

IVOMAR ZANCANARO

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM FLUIDO ORAL DE
CONDUTORES BRASILEIROS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

Brasília, 2012

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

IVOMAR ZANCANARO

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM FLUIDO ORAL DE
CONDUTORES BRASILEIROS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientador: Dr^a Eloísa Dutra Caldas

Co-Orientador: Dr^a Renata Pereira Limberger

Brasília, 2012

IVOMAR ZANCANARO

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM FLUIDO ORAL DE
CONDUTORES BRASILEIROS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Eloisa Dutra Caldas
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré
Membro Externo do Programa
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Membro Externo do Programa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUPLENTE:

Prof. Dr. Carlos Martín Infante Córdova
Membro Externo do Programa
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais, Ivo e Loreci e aos meus irmãos Rafael e Renan, por todo o apoio incondicional prestado.

Agradeço as Professoras Dra. Eloisa Dutra Caldas e Dra Renata Pereira Limberger pela orientação deste trabalho. Obrigado pela oportunidade e pelos ensinamentos, sempre serei muito grato por tudo.

A minha namorada Luana Godinho, pelo amor, paciência e compreensão.

Aos membros do Laboratório de Toxicologia da UFRGS, Paula Boehl, Kristiane, Maíra e Eloisa por todo o trabalho realizado e apoio prestado nesta interminável jornada.

Um agradecimento especial aos amigos que me acolheram no planalto central: Guilherme e Caroline, Alexandre Santos e Helenita, Pedro “Nego” Kerpel e Luciana Coutinho, peço desculpas por todo incomodo causado pela minha presença em suas residências.

Aos membros do Laboratório de Toxicologia da UnB agradeço o apoio prestado, em especial a Camille, Marcia, Patrícia, Mariana e ao Prof. Mauricio Homem de Mello.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de algum modo contribuíram para que fosse possível a realização deste duro trabalho.

*“A conquista da liberdade é algo que faz tanta poeira, que por medo da bagunça,
preferimos, normalmente, optar pela arrumação.”*

Carlos Drummond de Andrade

LISTA DE ABREVIATURAS

- A/C – Antes de Cristo
- AcEt - Acetato de etila
- ACN - Acetonitrila
- AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico
- APCI - Ionização a pressão atmosférica
- BZE - Benzoilecgonina
- CE - Energia de colisão
- CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
- CTB - Código de trânsito brasileiro
- DP – Declustering potential
- DPR – Desvio padrão relativo
- DW - Dwell time
- ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
- ELL - Extração líquido-líquido
- EME - Ecgonina metil ester
- ESI - Ionização por eletrospray
- FDA – Food and Drug Administration
- GABA-A - Receptores do ácido gama-aminobutílico
- HCl - Ácido clorídrico
- IM - Intramuscular
- IP - Isopropanol
- LC - Cromatografia líquida
- LC-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
- LC-MS/MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas *in tandem*
- LC-QTOF/MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas quadrupolo *time-of-flight in tandem*
- LOD - Limite de detecção
- LOQ - Limite de quantificação
- MBDB - *d,l*-n-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina
- m-CPP - 1,3-clorofenil-piperazina
- MDA - *d,l*-3,4-metilenodioxianfetamina

MDEA - *d,l*-etilenodioxietilamfetamina
MDMA - *d,l*-3,4-metilenodioximetamfetamina
MeOH - Metanol
MS - Espectrometria de massa
MS/MS - Espectrometria de massa *in tandem*
NH₃ - Amônia
NH₄OH - Hidróxido de amônia
NMDA - Receptor de glutamato N-metil-D-aspartato
NOP - Nociceptin orphanin peptide receptor
PAD - Psychoactive drug
PHCL- Fenilcloroformato
SNC - Sistema nervoso central
SPA - Substâncias psicoativas
THF - Tetrahidrofurano
Δ9-THC - Δ9-tetrahidrocannabinol
6-AM - 6-monoacetilmorfina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação internacional das estimativas dos consumidores problemáticos de opiáceos (incluindo semi-sintéticos, como a Heroína) e do número de pacientes em tratamento de substituição de opiáceos (EMCDDA, 2011)	22
Tabela 2: Prevalência de uso na vida, nos últimos 12 meses e nos últimos 30 dias de SPA entre os universitários (SENAD, 2010).....	26
Tabela 3. Metodologias analíticas para análise de SPA em fluido oral.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química (peso molecular) das anfetaminas.	7
Figura 2. Mecanismos moleculares da ação de psicoestimulantes (cocaína e anfetaminas)	8
Figura 3. Estrutura química (peso molecular) da cocaína e metabólitos	10
Figura 4. Metabolismo da cocaína (Koob et al., 2006)	10
Figura 5. Estrutura química (peso molecular) da cetamina e m-CPP (1,3-clorofenil-piperazina).....	11
Figura 6. Estrutura química (peso molecular) dos benzodiazepínicos.	14
Figura 7: Mecanismo de ação dos benzodiazepínicos através da modulação da sinapse GABAérgica (Rudolph et al., 2011)..	15
Figura 8. Estrutura química (peso molecular) dos opioides.....	16
Figura 9. Mecanismo de ação dos opioides através de ativação do receptor de proteína-G (McDonald et al., 2005).	16
Figura 10. Síntese da heroína (Heroinfo, 2010)	17
Figura 11. Metabolismo da heroína (Sweeney et al., 2003).	18
Figura 12. Estrutura química e peso molecular dos principais canabinoides encontrados na <i>cannabis</i>	19
Figura 13. Vias metabólicas de Δ 9-THC (Koob et al., 2006)	20
Figura 14. Prevalência anual do uso de SPA ilícitas entre a população de 15-64 anos, 2008-2010 (UNODC, 2012).....	21
Figura 15: Estimulantes tipo anfetamínicos, média de consumo nacional por região do globo nos períodos de 2002-2004, 2005-2007 e 2008-2010 (United Nations, 2012).....	23
Figura 16: Benzodiazepínicos do tipo ansiolíticos (a) e do tipo sedativo-hipnóticos (b): percentual de produção total reportada, por substância, 2010 (UNODC, 2012). 24	
Figura 17: Prevalências (%) de uso na vida de diferentes drogas psicotrópicas (exceto Álcool e Tabaco), nas 108 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes em 2005.	25

Figura 18: Representação esquemática da fonte de ESI (a) como célula eletroquímica (Moffat et al., 2004) e imagem do ESI (b) na fonte de íons de um analisador de massas (Neto, 2009).....	38
Figura 19. Espectro de massas da cocaína (a) (Smith, 2004). Os principais íons formados são os íons m/z 182 ($C_{10}H_{16}NO_3$) formado por α -clivagem pós-ionização inicial de nitrogênio ou do oxigênio da carbonila na posição C2 (b) e m/z 82 (C_5H_8N) formado por α -clivagem e subsequente clivagem alílica (c), fragmentos de maior abundância (Smith, 1997).	39
Figura 20: Diagrama de funcionamento de um analisador de massas LC-MS/MS triplo quadrupolo (a) (Xavier, 2010) e funcionamento de uma haste quadrupolar (b) (Smith, 2004).....	40

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Estimulantes do SNC	6
1.2. Depressores do SNC	13
2.3. Uso de substâncias psicoativas	20
2.3.1. Na população geral.....	20
2.3.2. Por condutores de veículos	26
2.3.3. Uso de SPA por condutores de veículos no Brasil.....	28
2.4. Fluido oral como matriz para análise de SPA	29
2.4.1. Farmacocinética de drogas no fluido oral	30
2.5. Metodologias analíticas utilizadas na análise de SPA em fluido oral.....	32
2.6. Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS)	36
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. <i>Geral:</i>	41
2.2. <i>Específicos:</i>	41
3. RESULTADOS	42
3.1. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid - LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers	43
3.2. Prevalence of psychoactive drug use on a roadside survey of Brazilian drivers	68
4. CONCLUSÕES FINAIS	82
ANEXO I: Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.	98
ANEXO II: Espectros de massas.....	99
Anfetaminas.....	99
Canabinoides.....	101
Outros	101
Cocaína e Metabólitos	102
Opioides.....	102
Padrões Internos	103

RESUMO

Este estudo colaborativo foi realizado com objetivo de estimar a prevalência ponderada de substâncias psicoativas (SPA) entre os condutores automotivos brasileiros. Um total de 3397 amostras de fluido oral foi coletado em estradas federais de todas as capitais estaduais e do Distrito Federal, de Agosto/2008 a Setembro/2009. Deste total, 2235 amostras foram analisadas por LC-MS/MS após extração líquido-líquido com acetato de etila:hexano para a determinação simultânea de 32 SPA (anfetaminas, benzodiazepínicos, cocaína, canabinoides, opioides, cetamina e m-CPP) e seus metabólitos. O limite de detecção do instrumento (LOD) foi de 0,26 ou 0,65 ng/mL. A linearidade foi satisfatória entre 0,5-20 ng/mL ($R^2 = 0,9942-0,9995$) e $DPR < 20\%$ em todos os níveis avaliados. A metodologia foi satisfatoriamente validada para 24 compostos (recuperação entre 50 a 120%, $DPR \leq 20\%$) no nível de 1,3 ou 13 ng/mL (LLOQ). Supressão iônica devido à interferência da matriz foi $< 20\%$ para todos 32 compostos, com exceção de ecgonina metil ester e dietilpropiona ($> 60\%$). A maioria dos condutores que forneceram as amostras de saliva eram homens (94,4%), entre 18 e 80 anos de idade (média $37,1 \pm 11,2$). A metade dirigia automóvel, e 29,6% motocicleta. Mais de 10% (236) das amostras foram positivas para pelo menos uma das SPA investigadas ($\geq LOD$). A classe mais prevalente encontrada nas amostras foi cocaína/metabólitos (6,1%), seguido por anfetaminas (3,2%), benzodiazepínicos (1,7%), canabinoides (1,3%) e opioides (0,4%). Entre as anfetaminas, a anfetamina (provavelmente como metabólito) teve a maior prevalência (1,7%), e entre os benzodiazepínicos, o diazepam (0,7%). Os condutores de moto e carro foram mais associados ao uso de cocaína e *cannabis* (8.2 e 3.0%, respectivamente), enquanto motoristas de caminhões e ônibus ao uso de anfetaminas. A prevalência do consumo de anfetaminas parece ser maior para os condutores > 25 anos e de cocaína e *cannabis* para motoristas entre 18 e 24 anos de idade. Este estudo contribuiu com importantes informações em relação ao perfil de uso de SPA em estradas de rodagem brasileiras. O governo e demais formuladores de políticas devem considerar a inclusão de testes de SPA em estradas de rodagem, além do álcool, para aumentar a segurança de motoristas e passageiros.

Palavras-chave: Drogas psicoativas, LC-MS/MS, fluido oral, condutores, rodovias, Brasil.

ABSTRACT

This is a collaborative work designed to investigate the prevalence of psychoactive drug (PAD) use among Brazilian drivers. A total of 3397 oral fluid samples were collected on federal roads of all state capitals and the Federal District from August 2008 to September 2009. From this total, 2235 samples were analyzed by LC-MS/MS after liquid-liquid extraction with ethyl acetate:hexane for the determination of 32 PAD (amphetamines, benzodiazepines, cocaine, cannabis, opioids, ketamine and m-CPP) and metabolites. Instrumental limit of detection (LOD) was 0.26 or 0.65 ng/mL. Linearity between 0,5-20 ng/mL was satisfactory ($R^2 = 0.9942-0.9995$) and was $RSD < 20\%$ at all levels. The method was validated for 24 compounds (extraction recovery 50 to 120%, $RSD \leq 20\%$) at the level of 1.3 or 13 ng/mL (LLOQ). Ionic suppression due to matrix effects was $< 20\%$ for all 32 compounds, except for ecgonine methyl ester and diethylpropion ($> 60\%$). Most of the drivers who donated samples were men, between 18 and 80 years (mean of $37,1 \pm 11,2$). About half were driving car and 29.6% motorcycle. Over 10% (236) of the samples were positive for at least one compound analyzed (\geq LOD). The most prevalent PAD class found in the samples was cocaine/metabolites (6.1%), followed by amphetamines (3.2%), benzodiazepines (1.7%), cannabinoids (1.3%) and opioids (0.4%). Among amphetamines, amphetamine (probably as a metabolite) had the highest prevalence (1.7%), and among the benzodiazepines, diazepam (0.7%). Car and motorcycle were more associated with cocaine and cannabis use (8.2 e 3.0%, respectively), while truck and bus drivers with amphetamine use. Prevalence of amphetamine use seemed to be higher for drivers over > 25 years and that for cocaine e cannabis for drivers between 18 and 24 years of age. This study brought relevant information over the PDA use profile in Brazilian federal roads. Government and policymakers need to consider the inclusion of roadside drug testing, other than alcohol, to increase the safety of drivers and passengers in Brazilian roads.

Keywords: Psychoactive drugs; Oral fluid; Drivers; LC-MS/MS; Brazil

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o abuso de substâncias psicoativas (SPA), incluindo cocaína, canabinoides, heroína, benzodiazepínicos e anfetaminas, é um grande problema global que atinge todas as classes sociais. Estima-se que 230 milhões de pessoas, ou 5% da população adulta do mundo tenham usado alguma SPA ilícita pelo menos uma vez em 2010. Dentre esses usuários, cerca de 27 milhões são problemáticos, o que corresponde a 0,6% da população adulta mundial (UNODC, 2012). No Brasil, 22,8% da população fizeram uso na vida de qualquer SPA, excluindo tabaco/álcool, sendo que 8,8% utilizaram *cannabis* (Carlini et al., 2006).

O aumento do risco de dirigir sob a influência de SPA tem sido substancialmente demonstrado na literatura (Longo et al., 2000; Zhuo et al., 2010; De Boni et al., 2011; Gjerde et al., 2011). Estas substâncias são de maneira em geral, de estimulação ou sedação, ocorrendo sinergismo quando SPA de efeitos semelhantes são consumidas concomitantemente (Berghaus et al., 2011). Estudos epidemiológicos têm mostrado que a combinação de mais de uma SPA, incluindo o álcool, aumenta de forma exponencial o risco de acidentes (Hargutt et al., 2011).

Diversos estudos foram realizados com objetivo de investigar a presença de SPA em condutores de veículos, principalmente em países do hemisfério norte, utilizando na sua maioria sangue e/ou fluido oral como matrizes de coleta (Lacey, 2007; Gjerde et al., 2008; Senna et al., 2010).

O uso de fluido oral para avaliar o uso de SPA no trânsito apresenta diversas vantagens em relação ao uso de matrizes tradicionais como urina e sangue (Drummer, 2006; Crouch et al., 2008; De Giovanni et al., 2008). É uma matriz de coleta fácil e não invasiva, podendo ser realizada no próprio local da abordagem, sob vigilância e sem constrangimentos, além de fornecer informação sobre o uso recente, comprovando a condução sob influência de SPA. As desvantagens do uso dessa matriz incluem o elevado conteúdo glicoproteico, reduzido volume de amostra e baixa concentração de SPA que são ligadas fortemente a proteínas plasmáticas (Huestis et al., 2004; Yonamine, 2004; De Giovanni et al., 2008). Estas desvantagens podem ser suplantadas pela utilização de técnicas analíticas de alta sensibilidade, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

em tandem (LC-MS/MS) (Samyn et al., 2002; Bernhoft et al., 2005; Toennes et al., 2005; Wylie et al., 2005; Drummer et al., 2007).

Alguns estudos têm sido conduzidos em determinadas regiões do Brasil para avaliar o uso de SPA por condutores de veículos automotivos (Silva et al., 2003; Leyton et al., 2012). Porém não há informação disponível que abranja todo o país. Este estudo teve como principal objetivo preencher esta lacuna, e se insere no âmbito de um projeto maior, financiado e coordenado pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD). Dados sobre a extensão e o padrão do consumo de álcool e outras SPA por motoristas particulares e profissionais são essenciais para subsidiar ações de vigilância e educação e apoiar a legislação de trânsito no país.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde a pré-história, em diferentes sociedades e culturas, o homem utiliza elementos da natureza que contêm substâncias psicoativas em contextos sociais e religiosos (Vetulani, 2001; Padosch et al., 2006).

O uso da *Amanita muscaria* Sch., fungo contendo o alucinógeno muscarina, data do período Neolítico (10.000 anos A/C). O ópio, suco condensado da papoula (*Papaver somniferum* L.) que contém a morfina, é conhecido desde 6000 anos A/C. Na China e na Ásia Central, o haxixe, preparado a partir de planta do cânhamo (*Cannabis Sativa* L.), é conhecido desde 5000 anos A/C (Vetulani, 2001). Já em tempos pré-colombianos, a folha do arbusto *Erythroxylon coca* L, era consumida pelos andinos para suportar a elevada altitude, sendo trazida para a Europa pelos espanhóis, e se tornando o tônico/estimulante da moda (Musto, 1997). Entre outros exemplos temos a Dama da Noite (*Datura stramonium* L.), que contém escopolamina, atropina e hiosciamina e o absinto, da *Artemisia absinthium* L., uma das bebidas alcoólicas mais populares do final do século 19 na Europa. (Padosch et al., 2006; López-Muñoz et al., 2008).

Somente na história recente, principalmente a partir do início do século XX, o uso dessas substâncias, principalmente no contexto recreativo, passou a ser percebido como um problema social (Vetulani, 2001). Preocupados com o alto índice de consumo de ópio na época e as consequências desse consumo, diversos países se reuniram pela primeira vez para discutir o problema das drogas na Comissão do Ópio de Xangai, em 1909. Até então, o ópio era comercializado, principalmente pelos ingleses, como forma de pagamento por produtos (UNODC, 2012).

As SPA podem ser divididas em três grandes grupos relacionados aos seus efeitos no sistema nervoso central (SNC): os estimulantes, os depressores e os alucinógenos. Neste trabalho, vamos focar nos dois primeiros grupos, que têm maior influência nas funções cerebrais envolvidas na condução de veículos automotivos, trazendo maior risco a segurança do trânsito (Pil et al., 2009).

1.1. Estimulantes do SNC

Consideram-se estimulantes, ou psicoestimulantes, as drogas que produzem uma ativação comportamental geralmente acompanhada de aumento na excitação, alerta, e atividade motora (Koob et al., 2006; Rang et al., 2007). Dividem-se em simpaticomiméticos diretos ou indiretos. Neste último incluem os estimulantes do SNC relevantes para este estudo: os compostos anfetamínicos (anfetaminas) e a cocaína (Figura 1). O termo simpaticomimético deriva originalmente da descrição do mecanismo de ação destes fármacos, pois imitam a ação do sistema nervoso simpático quando ele é ativado (Koob et al., 2006).

As anfetaminas constituem um grupo de substâncias com potente ação central e periférica, cujo protótipo é a anfetamina (Rafael de la et al., 2004). Quimicamente, apresentam o esqueleto básico da beta-fenetilamina e farmacologicamente atuam como aminas simpaticomiméticas de ação agonista indireta, estimulando a liberação de monoaminas nas fendas sinápticas e impedindo sua recaptação neuronal (Chasin, 2003; Rafael de la et al., 2004; Rang et al., 2007), sendo as metanfetaminas mais potentes que as anfetaminas (EMCDDA, 2009).

A anfetamina é um fraco inibidor da monoamina oxidase, no entanto, a sua principal ação neurofarmacológica ocorre sobre os sistemas de dopamina no SNC, mais precisamente, os situados na porção medial abrangendo o núcleo *accumbens*, associados à função motora (Koob et al., 2006). Os mecanismos moleculares dos psicoestimulantes cocaína e anfetaminas se assemelham e estão mostrados na Figura 2. Como simpaticomiméticos indiretos, estimulam a liberação de dopamina (1) que atua nos receptores acoplados à proteína G, especificamente nos receptores D1, D2, D3, D4 e D5 (2), modulando os níveis de segundos mensageiros (como monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e Ca^{+2}) (3). Estes, por sua vez, regulam a atividade da proteína-quinase (4), afetando as funções das proteínas localizadas no citoplasma, membrana e núcleos (5, 6 e 7), como os canais iônicos de potássio e cálcio diretamente nas suas subunidades $\beta\gamma$ (8). Vias de transdução de proteína quinase também afetam as atividades de fatores de transcrição (7), como AMPc e Fos, podendo resultar em mudanças funcionais de longo prazo (11), incluindo alterações na expressão de genes de proteínas envolvidas na transdução de sinal (9) e/ou na neurotransmissão (10) (Robbins et al., 1999; Koob et al., 2006).

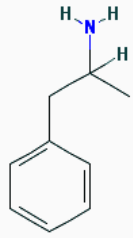
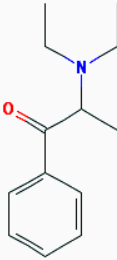
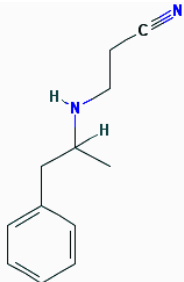
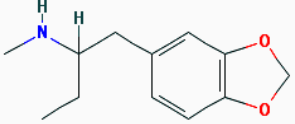
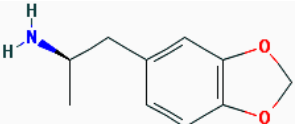
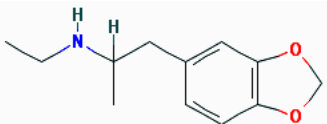
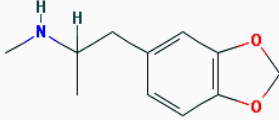
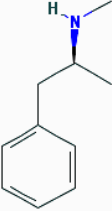
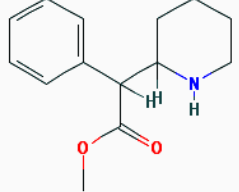
 <p>Anfetamina (135,21)</p>	 <p>Dietilpropiona (205,29)</p>	 <p>Femproporex (188,27)</p>
 <p><i>d,l</i>-n-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina, MBDB (207,27)</p>	 <p><i>d,l</i>-3,4-metilenodioxifetamina, MDA (179,22)</p>	 <p><i>d,l</i>-etilenodioxietilfetamina, MDEA (207,27)</p>
 <p><i>d,l</i>-3,4-metilenodioximetanfetamina, MDMA (193,25)</p>	 <p>Metanfetamina (149,23)</p>	 <p>Metilfenidato (233,31)</p>

Figura 2. Estrutura química (massa molar em g/mol) das anfetaminas. *Fonte:*

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

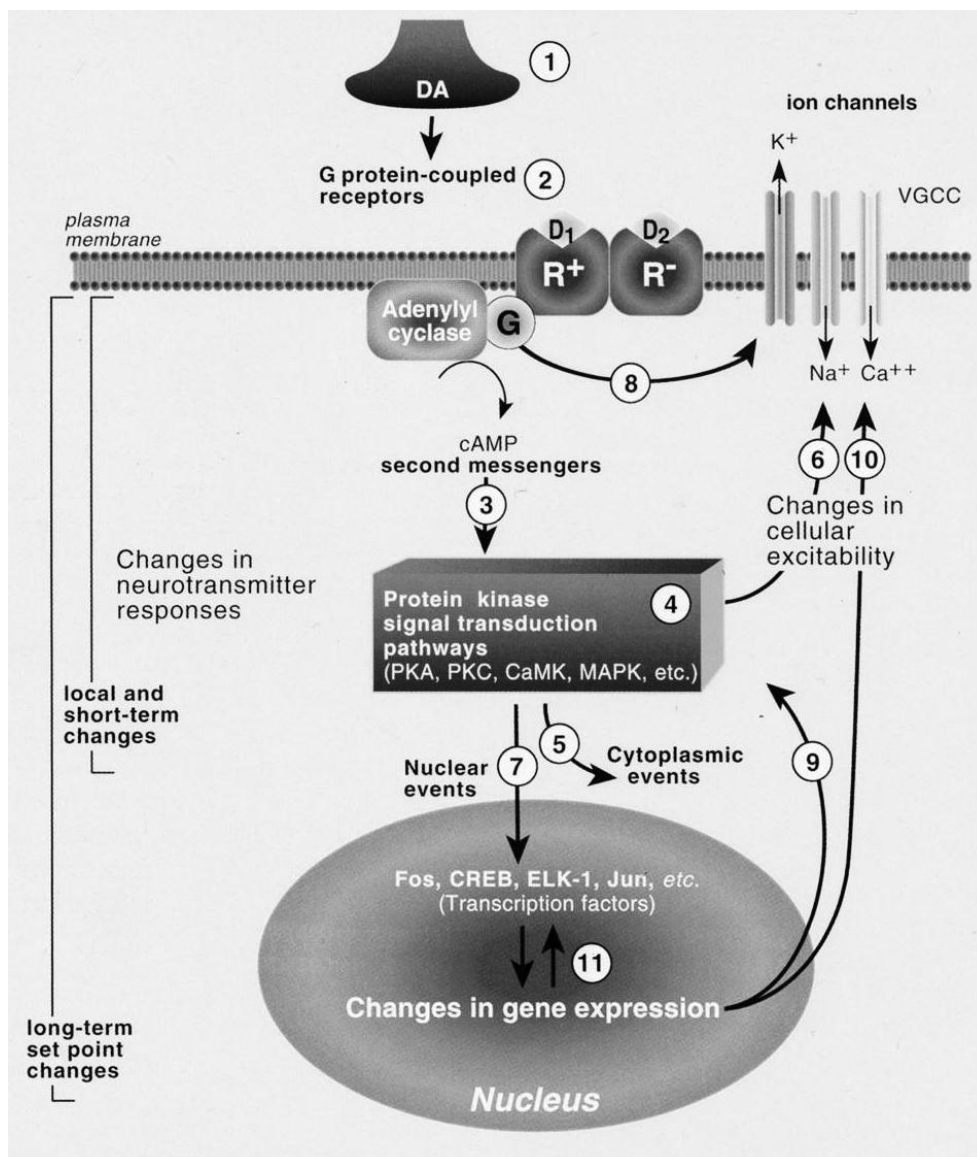


Figura 2: Mecanismos moleculares da ação de psicoestimulantes (cocaína e anfetaminas)(Koob et al., 2006).

A anfetamina é legalmente prescrita em alguns países do globo, para tratar condições como déficit de atenção e hiperatividade, como também é o caso do metilfenidato (Ritalina®, legalmente prescrita no Brasil (Brasil, 1999)) ou para tratar narcolepsia (desejo incontrolável de dormir). (FDA, 2011; ADF, 2012). Algumas formulações, tais como o medicamento Adderall® ou Adderall XR®, contêm combinações de *d*- e *l*-isómeros estão disponíveis em formulações de liberação imediata e de liberação sustentada, em doses que variam de 3 a 30 mg. A dextro-anfetamina é de três a quatro vezes mais potente do que o isómero *l*-(levo-anfetamina) (Cone et al., 2007).

As anfetaminas femproporex e dietilpropiona, são usadas como inibidores de apetite, sendo susceptíveis de abuso e objeto de tráfico ilícito, estando sob controle internacional desde 1971 (United Nations, 1971). No Brasil, a venda destes medicamentos foi proibida em outubro/2011 (Brasil, 2011).

Os efeitos colaterais das anfetaminas incluem a estimulação excessiva do SNC levando a nervosismo, inquietação, excitabilidade, tontura, dor de cabeça, insônia, medo, alucinações, ansiedade, tremor, convulsões. A pressão arterial e a frequência cardíaca podem aumentar, podendo levar a palpitações. Pode levar a episódios maníaco-depressivos, comportamento agressivo ou hostilidade, psicose, supressão do crescimento (uso em longo prazo), ataque cardíaco, acidente vascular cerebral e, inclusive, a morte súbita. Dependência e sintomas de abstinência também podem ocorrer (FDA, 2011).

A via metabólica principal para a anfetamina envolve sua desaminação pelo citocromo P450 para p-hidroxianfetamina e fenilacetona; este último composto é subsequentemente oxidado para o ácido benzóico e excretado como glucuronídeo ou glicina conjugada (ácido hipúrico). Pequenas quantidades de anfetaminas são convertidas em norefedrina, por oxidação (INCHEM, 2012). Quatorze drogas, incluindo o femproporex e a metanfetamina, detectados em fluido oral são metabolizadas em isômeros *d* e/ou *l*- anfetamina (Cone et al., 2007).

A cocaína (Figura 3) é o principal alcaloide encontrado nas folhas da *Erythroxylon coca L.*, arbusto nativo dos países andinos (Larini et al., 1993). Ela potencializa as ações da dopamina, bloqueando a recaptura desses neurotransmissores nos terminais nervosos pré-sinápticos, conforme mecanismo descrito na Figura 2 (Robbins et al., 1999; Koob et al., 2006; Rang et al., 2007). Os principais riscos do uso da cocaína são a nível de SNC e do sistema cardiovascular. O abuso de cocaína leva à forte dependência psicológica (INCHEM, 2012). Os efeitos clínicos dependem da dose, de outras substâncias, da via de administração e da susceptibilidade individual. Em doses baixas, ocorre intoxicação aguda provocando euforia e agitação. Doses maiores causam hipertermia, náusea, vômito, dor abdominal, dor no peito, taquicardia, arritmia ventricular, hipertensão, ansiedade extrema, agitação, alucinações, midríase. Estes podem ser seguidos por efeitos mais graves como respiração irregular, convulsões, coma, distúrbios cardíacos, colapso e morte. A intoxicação crônica produz euforia, agitação psicomotora,

ideação suicida, anorexia, alucinações e deterioração mental. Síndrome de abstinência com graves efeitos psiquiátricos pode ocorrer (INCHEM, 2012).

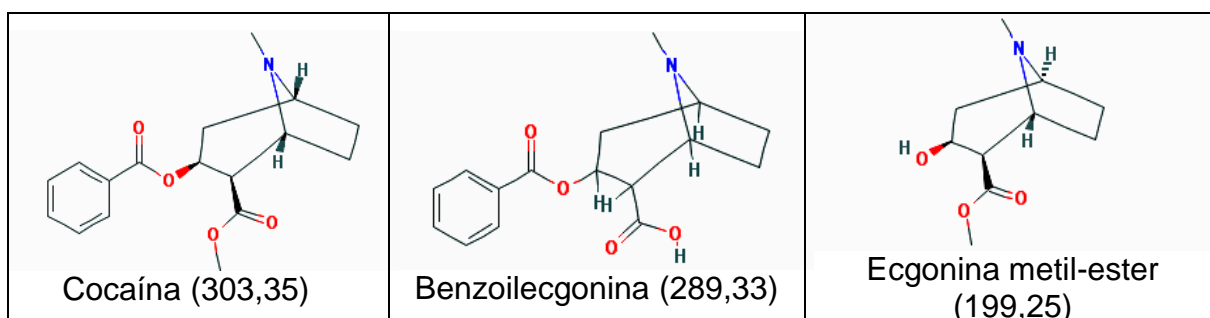


Figura 3. Estrutura química (massa molar em g/mol) da cocaína e metabólitos.

A cocaína é rapidamente metabolizada por esterases hepáticas a benzoilecgonina e ecgonina metil éster (Figura 3), as quais são farmacologicamente inativas (Koob et al., 2006). Uma variedade de outros metabolitos da cocaína também tem sido identificada (Figura 4). Quando a cocaína é administrada associada ao uso de etanol, um produto de transesterificação, o cocaetileno, é formado em quantidades menores e metabolizado de um modo semelhante à cocaína (Cone et al., 2007).

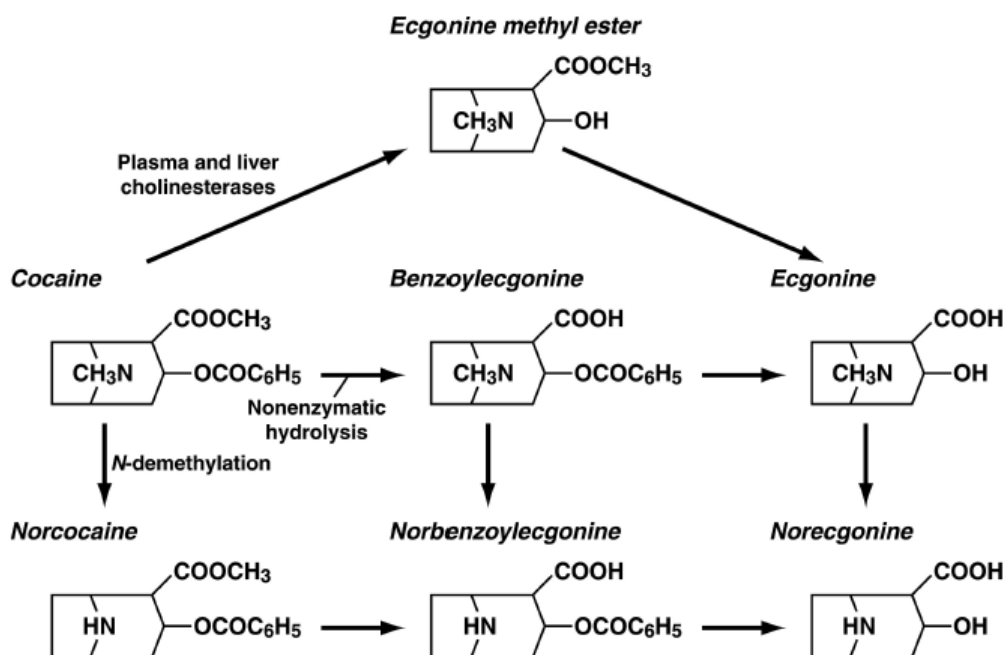


Figura 4. Metabolismo da cocaína (Koob et al., 2006)

A **cetamina** (Figura 5) é uma “*club drug*”, utilizada como estimulante pelo público de adolescentes e jovens adultos frequentadores de bares, shows e festas “rave”. É um anestésico dissociativo, usado principalmente na prática veterinária. Atua distorcendo a percepção de imagem e som e produzindo sentimentos de distanciamento do ambiente, sendo geralmente inalada ou injetada por via intramuscular (NIDA, 2011). Possui efeito antidepressivo com rápido início de ação (Machado-Vieira et al., 2009).

A ação anestésica de cetamina afeta o funcionamento do córtex cerebral, através da depressão ou desorganização das áreas de associação do cérebro, bloqueando vários sistemas transmissores e receptores do SNC. Bloqueia o receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), através da inibição da recaptação de glutamato na fenda sináptica e modulando a taxa de transferência de NMDA. O excesso de glutamato estimula os receptores NMDA extra sinápticos, que antagonizam a ativação neurológica (Fish, 1997; Machado-Vieira et al., 2009).

A intoxicação por baixa dosagem resulta em diminuição da atenção, capacidade de aprendizagem e memória. Em doses mais elevadas, a cetamina pode causar estados de sonho e alucinações, delírios e amnésia (NIDA, 2011).

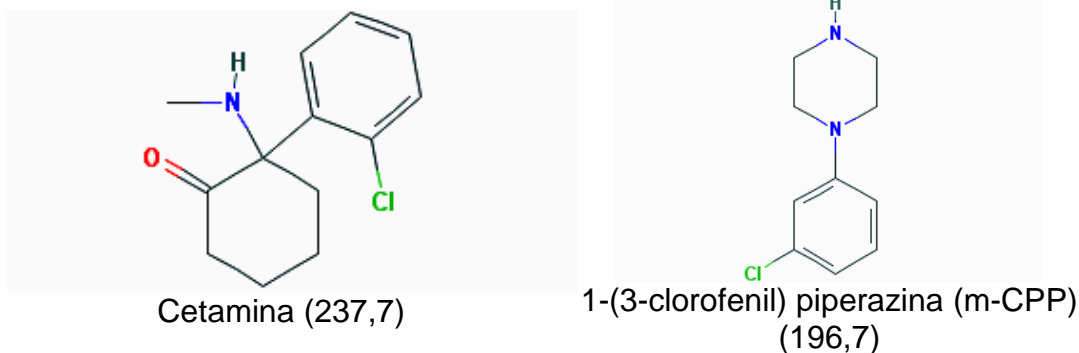


Figura 5. Estrutura química (massa molar em g/mol) da cetamina e m-CPP (1,3-clorofenil-piperazina)

O **1-(3-clorofenil) piperazina (mCPP)** (Figura 5), popularmente conhecido em alguns países como “X4”, “rainbow”, “regenboogies”, é uma nova droga sintética cada vez mais comum em países da Europa (EMCDDA, 2008; Lanaro et al., 2010). Sua utilização foi reportada em várias regiões, incluindo Ásia, Europa e Oceania em 2010 (UNODC, 2012). É o principal derivado da benzilpiperazina e normalmente encontrado em cápsulas, em pó solto, ou em comprimidos, que muitas vezes têm logotipos semelhantes aos vistos em comprimidos de “ecstasy” (EMCDDA, 2008).

Esta substância é um produto de biotransformação ativa do fármaco antidepressivo trazodona, comercializado no Brasil mediante prescrição médica (fármaco sujeito a controle especial). De maneira análoga à trazodona, os efeitos psicoativos da mCPP são relacionados à inibição da recaptação de serotonina e como agonista deste neurotransmissor. Além da ação sobre neurônios serotoninérgicos, a mCPP interage ainda com receptores de dopamina, acetilcolina e, também, com os receptores alfa e beta-adrenérgicos (EMCDDA, 2008; Lanaro et al., 2010; Arbo et al., 2012).

1.2. Depressores do SNC

Os benzodiazepínicos (Figura 6) são amplamente utilizados e indicados clinicamente para tratar transtornos de ansiedade (tais como ataque de pânico) e insônia (redução da latência do sono), e de maneira limitada no tratamento de perturbações convulsivas (epilepsia) em crianças e adultos (Tan et al., 2011). Estão entre os fármacos de prescrição mais utilizados em todo o mundo (Oga, 2008). No Brasil, 35 destes fármacos constam na Lista de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e outras sob Controle Especial (Lista B1), conforme a Portaria SVS/MS nº 344/1998 e atualizações (Brasil, 1999).

Os benzodiazepínicos em baixas concentrações podem induzir efeitos adversos como a amnésia anterógrada (diminuição da capacidade de consolidar novos conhecimentos, ainda sendo capaz de lembrar fatos ocorridos no passado (Rigo et al., 2012). A administração inicial de benzodiazepínicos leva a sonolência e diminuição da coordenação, mas rapidamente ocorre a tolerância a estes efeitos sedativos. Após algumas semanas, caso haja redução ou interrupção abrupta da administração do fármaco, ocorre dependência física semelhante a uma síndrome de abstinência, levando a distúrbios do sono, irritabilidade, aumento da tensão e ansiedade, ataques de pânico, sudorese e outras mudanças de percepção. Existem também relatos mais raros, de sintomas graves como esquizofrenia, transtornos convulsivos, até mesmo o suicídio (Chouinard, 2004; Tan et al., 2011).

Os benzodiazepínicos são depressores do SNC que atuam de modo seletivo modulando a atividade dos receptores do ácido gama-aminobutílico (GABA-A) em membranas pós-sinápticas, mediando a transmissão sináptica inibitória no SNC. Esta mediação se dá pela potencialização da resposta gabaérgica através da abertura de canais de cloretos, conduzindo a um influxo de cloreto gerando hiperpolarização do neurônio pós-sináptico, inibindo assim a excitação celular (Rang et al., 2007; Rudolph et al., 2011). Este mecanismo está ilustrado na Figura 7.

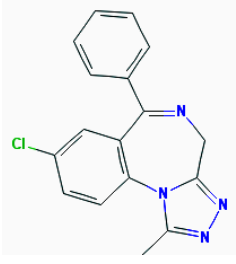
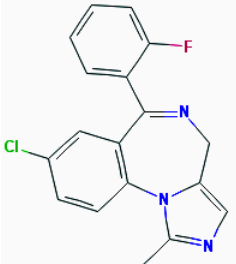
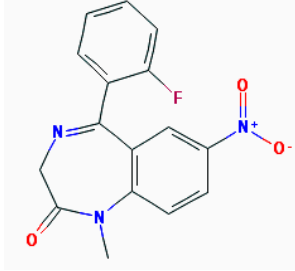
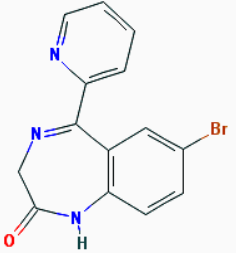
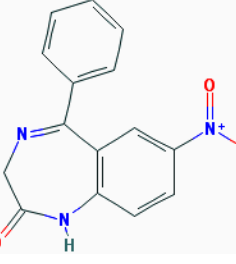
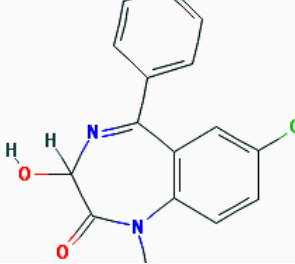
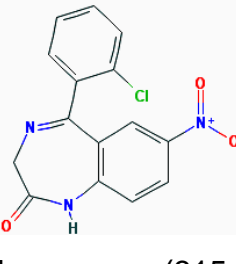
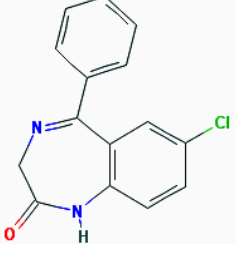
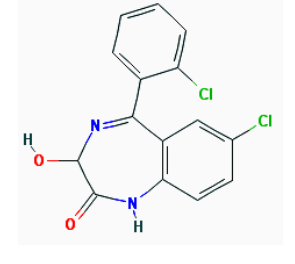
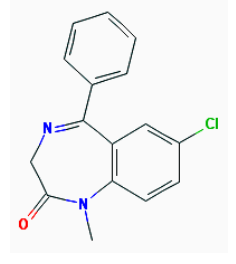
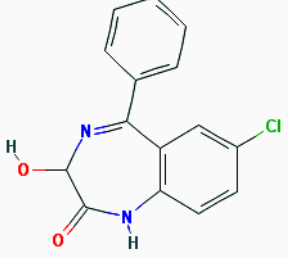
 <p>Alprazolam (308,8)</p>	 <p>Midazolam (325,8)</p>	 <p>Flunitrazepam (313,3)</p>
 <p>Bromazepam (316,2)</p>	 <p>Nitrazepam (281,3)</p>	 <p>Temazepam (300,7)</p>
 <p>Clonazepam (315,7)</p>	 <p>Nordiazepam (270,7)</p>	 <p>Lorazepam (321,2)</p>
 <p>Diazepam (284,7)</p>	 <p>Oxazepam (286,7)</p>	

Figura 6. Estrutura química (massa molar em g/mol) dos benzodiazepínicos

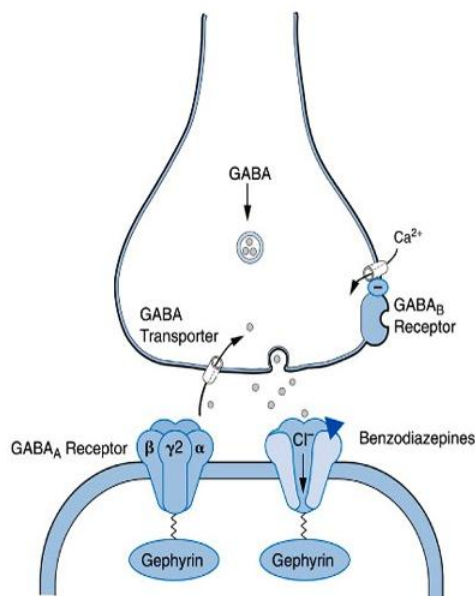


Figura 7: Mecanismo de ação dos benzodiazepínicos através da modulação da sinapse GABAérgica (Rudolph et al., 2011).

A morfina é extraída do ópio (*Papaver somniferum L.*) e juntamente com outros alcaloides naturais são denominados opiáceos, ou opiáceos semissintéticos, no caso da heroína (Oga, 2008). O ópio e seus derivados têm sido usados há séculos tanto de modo medicinal quando de modo recreativo. São as drogas mais potentes e eficazes para o alívio da dor conhecidas para seres humanos (Sweeney et al., 2003). No Brasil, os opioides constam nas Listas A1 e A2 anexas a Portaria SVS/MS nº 344/1998 (Brasil, 1999). De maneira geral, opioides são substâncias de origem endógena ou sintética, análogos ou não à morfina, que produzem efeito semelhante à morfina (Figura 8).

Os receptores opioides se dividem nos subtipos μ , δ , κ e, mais recentemente descoberto, o receptor NOP (*nociceptin orphanin peptide receptor*) (McDonald et al., 2005), responsáveis por diferentes efeitos funcionais (analgesia supra espinhal, espinhal e periférica), dado pela seletividade de cada opióide a estes subtipos de receptores. Compreende-se agora que os opioides de maneira geral agem não somente no controle e processamento nociceptivo (limiar da dor), mas também participam da modulação gastrintestinal, endócrina e função autonômica, bem como um possível papel na cognição (McDonald et al., 2005). A Figura 9 mostra a ativação do receptor por ligantes opioides que leva a iniciação de vias de transdução intracelulares que incluem: a inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem dependente,

levando a uma estimulação do efluxo de potássio, hiperpolarizando a membrana celular e reduzindo a produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) pela inibição da adenilato ciclase, reduzindo assim a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores (McDonald et al., 2005).

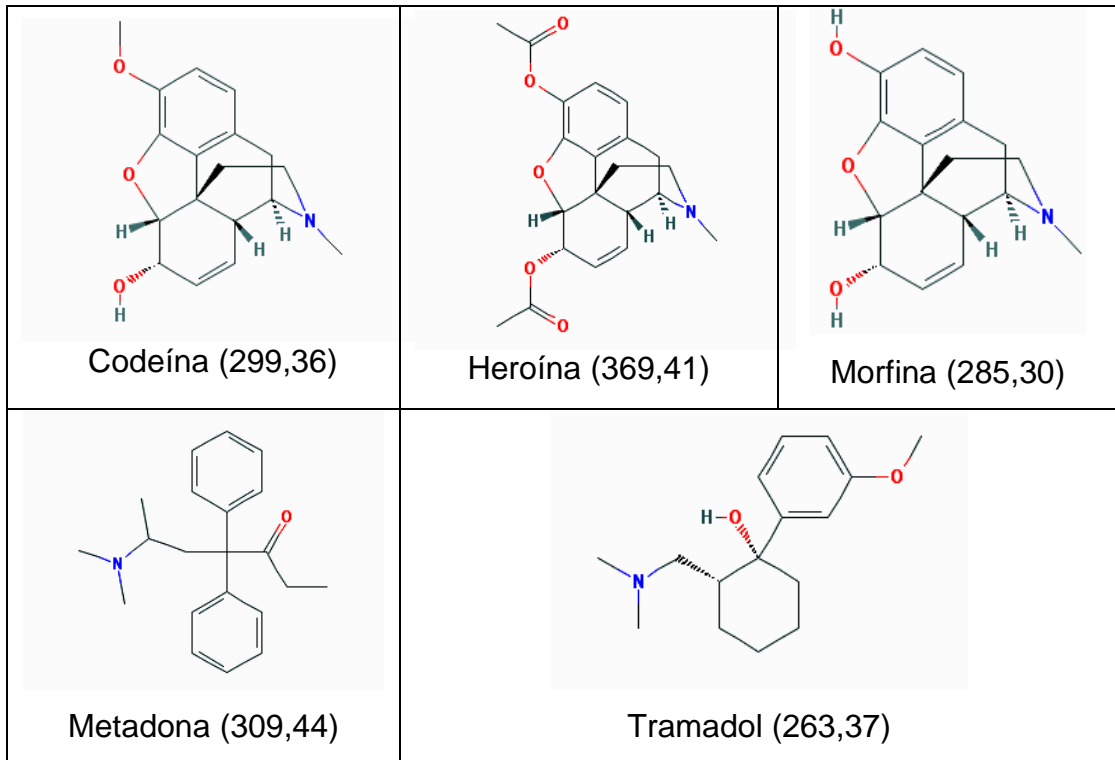


Figura 8. Estrutura química (massa molar em g/mol) dos opioides.

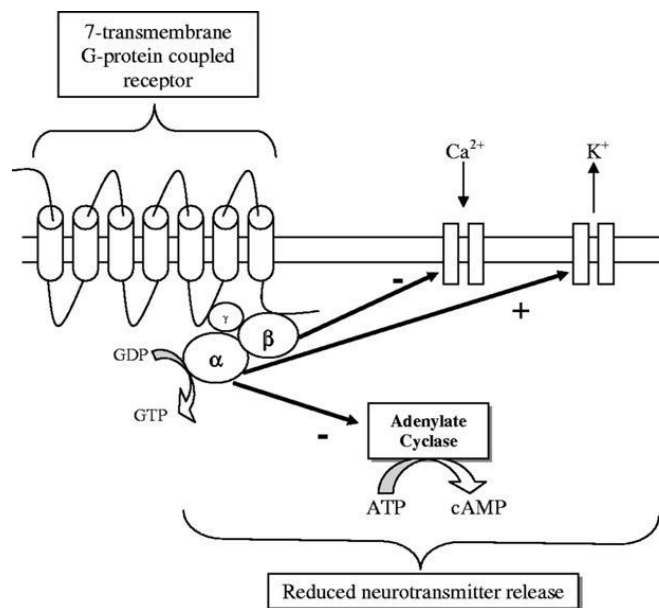


Figura 9. Mecanismo de ação dos opioides através de ativação do receptor de proteína-G (McDonald et al., 2005).

A heroína (Figura 8) é um opiáceo semissintético, obtido a partir da acetilação da morfina (Figura 10). Em 1895, a empresa alemã Bayer, comercializou a diacetilmorfina como medicamento sob o nome de marca de “heroína” (Heroinfo, 2010).

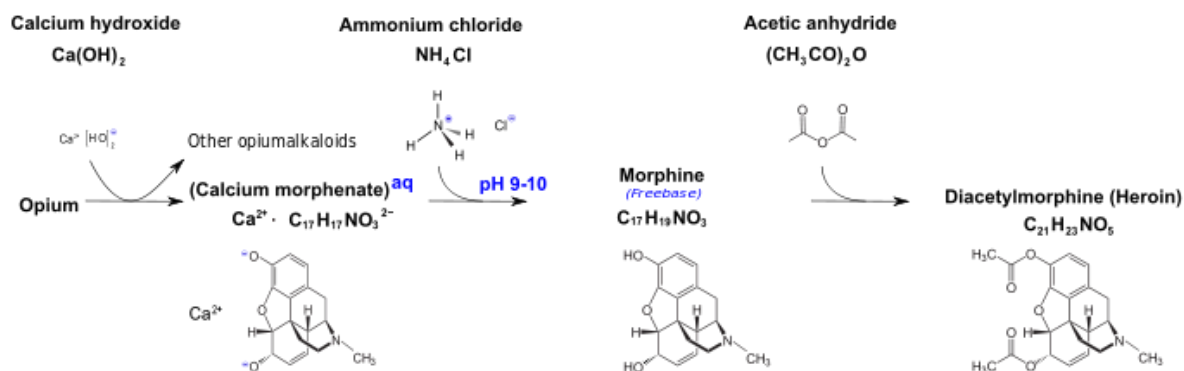


Figura 10. Síntese da heroína (Heroinfo, 2010)

A heroína é mais comumente administrada por via intravenosa e outras vias parenterais, também podendo ser fumada. A maior lipofilicidade da heroína e da 6-acetilmorfina (principal indicador biológico no organismo do consumo de heroína, Figura 11) em comparação com a morfina, permite uma rápida passagem pela barreira hematoencefálica, resultando em um rápido início de euforia. A heroína possui uma meia-vida extremamente curta (minutos) e é rapidamente convertida em 6-acetilmorfina e morfina, aparecendo no fluido oral dentro de 2 minutos após a administração (Cone et al., 2007).

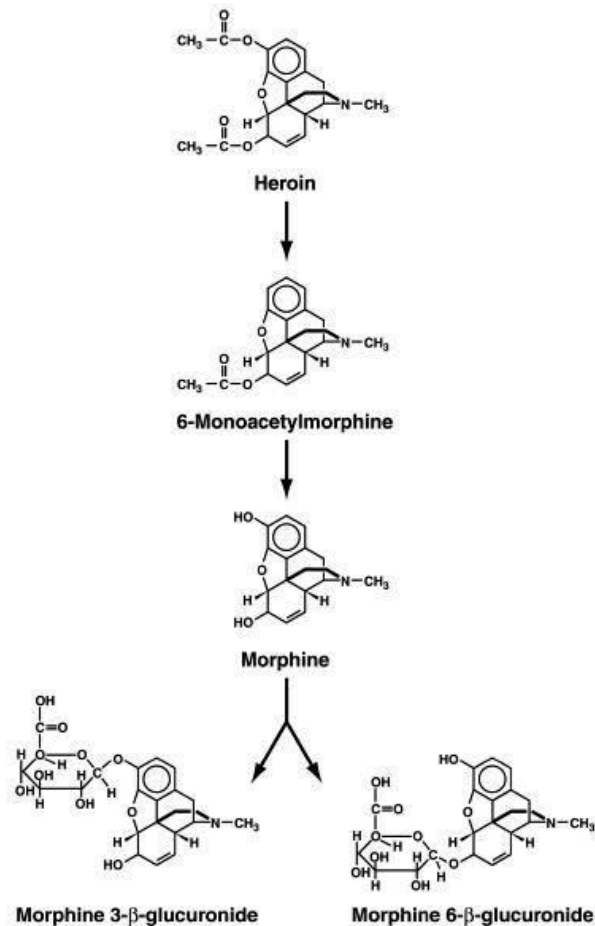


Figura 11: Metabolismo da heroína (Sweeney et al., 2003).

A metadona é prescrita há décadas para o tratamento da dependência de opioides, sendo utilizada para proporcionar alívio para pacientes que não respondem aos medicamentos não narcóticos (Anderson et al., 2000; Sweeney et al., 2003). Na Europa, a metadona é o medicamento de substituição mais frequentemente prescrito, chegando a ser administrado a três quartos dos pacientes (EMCDDA, 2011).

A codeína é um componente natural do ópio, mais comumente utilizado como analgésico opióide, como alternativa para o tratamento de dor ligeira a moderada, sendo muitas vezes combinada com a ácido acetilsalicílico ou paracetamol. É significativamente menos potente do que a morfina (Sweeney et al., 2003) É disponível comercialmente em preparações de comprimidos de 15, 30 e 60 mg em solução aquosa de 15 mg/5ml (uma colher de chá) e em ampolas de injeção de 15 e 30 mg/ml (FDA, 2008).

O **tramadol** é um analgésico opióide sintético indicado para tratamento de dor leve a moderada, com a propriedade adicional de inibir a recaptação de noradrenalina e serotonina, dando-lhe assim uma dupla ação analgésica (De Decker et al., 2008). Tem vantagens terapêuticas significativas sobre os outros opioides, incluindo um menor efeito de depressão respiratória e baixa tolerância e dependência (Budd, 1999). Os efeitos adversos frequentemente relatados incluem náuseas, vômitos, sonolência, vertigem, constipação, dor de cabeça e sonolência (De Decker et al., 2008). O FDA recomenda a não prescrição para pacientes com risco de suicídio, para consumidores de sedativos, antidepressivos ou pacientes alcoolistas (FDA, 2010). É disponível comercialmente no Brasil em preparações de comprimidos de liberação imediata de 50 mg e comprimidos de liberação prolongada de 100 mg (Pfizer, 2012).

Os canabinoides são constituintes naturais da maconha (*Cannabis sativa* L.) possuindo como principal ativo, o Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), além de inúmeros compostos correlatos denominados de canabinoides, principalmente o canabinol e o canabidiol (Figura 12) (Oga, 2008).

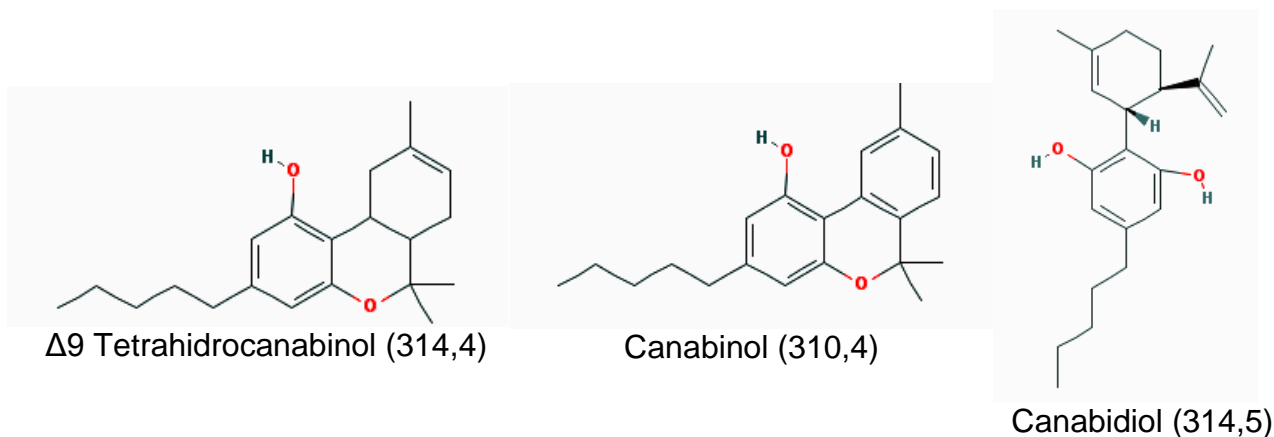


Figura 12. Estrutura química e massa molar em g/mol dos principais canabinoides encontrados na *cannabis*.

A *cannabis* atua sobre o SNC gerando efeitos simpatomiméticos e depressores/perturbadores, ligando-se aos receptores canabinoides (CB), de origem cerebral (subtipo CB1) abundantes no hipotálamo (efeito de prejuízo da memória), cerebelo e substância nigra (distúrbio motor), nas vias dopaminérgicas mesolímbicas (recompensa) e no córtex (Rang et al., 2007). O Δ 9-THC é rapidamente metabolizado e hidroxilado no fígado principalmente pelo citocromo microsomal

P450, para 11-hidroxi- Δ^9 -tetra-hidro-canabinol (11-OH-THC), principal metabólito ativo no sangue. Em seguida, é oxidado a um metabólito inativo, o 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocanabinol (THC-COOH), que é conjugado com ácido glucurônico e predominantemente excretado na urina (Figura 13). Após consumo por via oral, a maior parte do Δ^9 -THC é rapidamente hidroxilada por enzimas da mucosa intestinal levando também a formação de 11-OH-THC (Yamamoto et al., 1995; Koob et al., 2006).

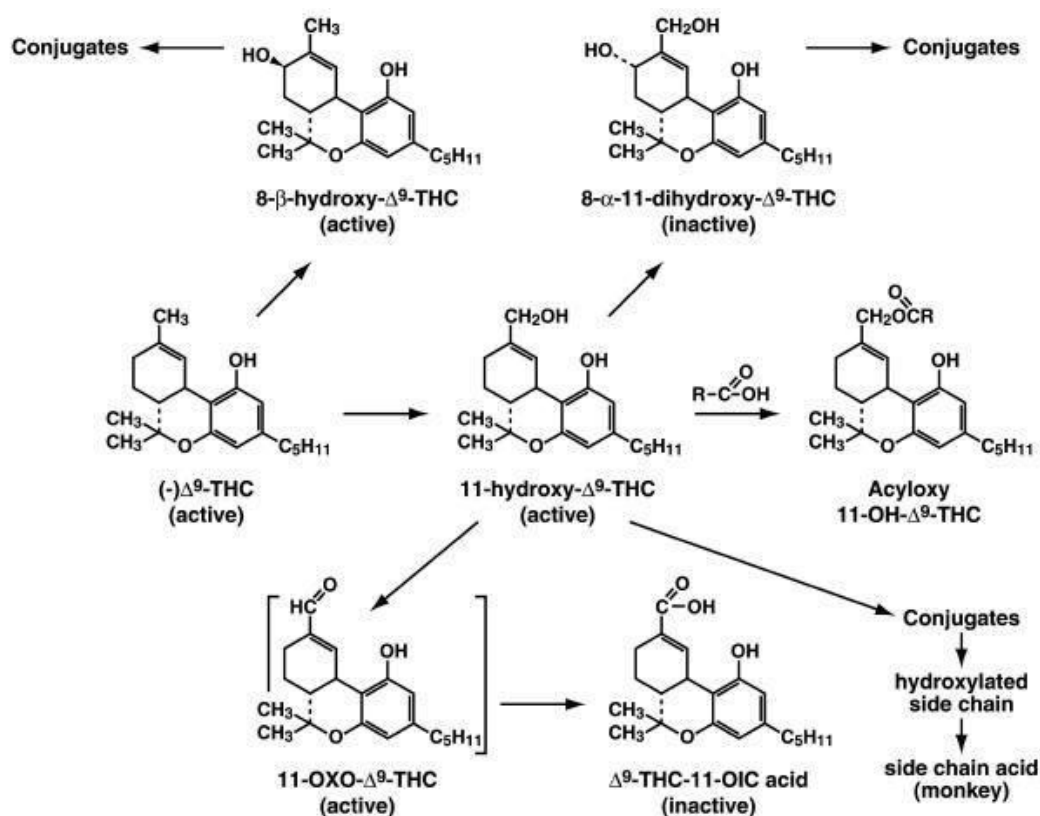


Figura 13: Vias metabólicas de Δ^9 -THC (Koob et al., 2006).

2.3. Uso de substâncias psicoativas

2.3.1. Na população geral

O uso de SPA em todo o mundo tem apresentado estabilidade nos últimos anos, sendo a maconha (*cannabis*) a mais utilizada, consumida em 2010 por 119 a 224 milhões de pessoas, correspondendo a uma prevalência anual de 2,6 - 5% (Figura 14). O uso de anfetaminas (ATS, *amphetamine type stimulants*, excluindo o ecstasy) tem a segunda maior prevalência (0,2 – 0,6), seguido de opioides/opiáceos,

ecstasy e cocaína (Figura 14). A falta de dados é particularmente grave em países da África e em partes da Ásia (UNODC, 2012).

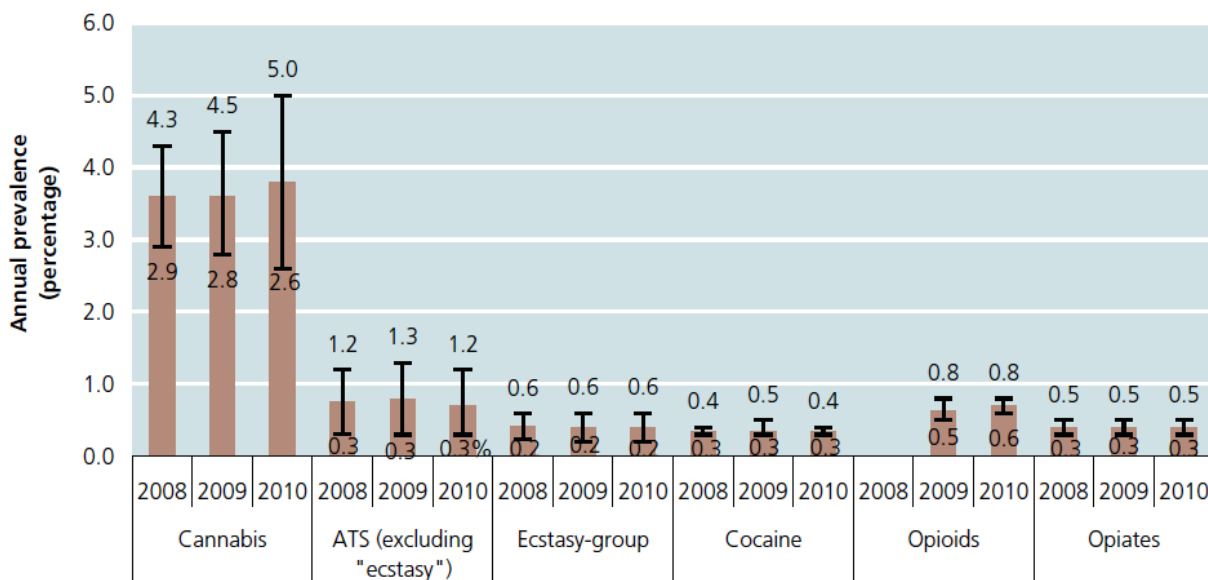


Figura 14. Prevalência anual do uso de SPA ilícitas entre a população de 15-64 anos, 2008-2010 (UNODC, 2012).

Globalmente, o UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*) estima que no ano de 2010, entre 150 e 300 milhões de pessoas, ou 3,4% a 6,6% da população 15-64 anos, usou alguma substância ilícita pelo menos uma vez no ano anterior. Destes, 27 milhões de indivíduos são usuários problemáticos, o que corresponde a quase 12% dos usuários de SPA ilícitas e a 0,6% da população adulta mundial (UNODC, 2012).

Na Europa, o uso de *cannabis* ao longo da vida pela população adulta (15-64 anos) foi cerca de 78 milhões de pessoas (23,2% dos adultos europeus). Cerca de 4% dos adultos europeus reportaram o uso de cocaína ao longo da vida, 3,2% o uso de “ecstasy” e 3,8 % de anfetaminas. Os usuários problemáticos de opiáceos no mundo foram estimados em 68 milhões de pessoas e cerca de 1,7 milhões receberam tratamento de substituição no ano de 2009 (Tabela 1). Trata-se da principal classe de droga em toda a Europa, abrangendo mais de 50% do total de solicitações de tratamentos de toxicod dependência (EMCDDA, 2011).

Tabela 1: Comparação internacional das estimativas dos consumidores problemáticos de opiáceos (incluindo semissintéticos, como a heroína) e do número de pacientes em tratamento de substituição de opiáceos (EMCDDA, 2011).

	Consumidores problemáticos de opiáceos:	Tratamento de substituição dos opiáceos
UE e Noruega	1 300 000	695 000
Austrália	90 000	43 000
Canadá	80 000	22 000
China	2 500 000	242 000
Rússia	1 600 000	0
Estados Unidos	1 200 000	660 000

NB: Ano: 2009, excepto Canadá (o ano de referência é 2003).
 Fonte: Arfken e outros (2010), Chalmers e outros (2009), Popova e outros (2006), UNODC (2010b), Yin e outros (2010).

Embora haja tendência de estabilização ou até mesmo de queda no consumo de SPA ilícitas no mundo, como heroína e cocaína, esta diminuição atualmente é compensada pelo uso de SPA com prescrição médica e por novas drogas sintéticas, algumas inclusive fora do controle internacional (United Nations, 2012; UNODC, 2012). Em 2008, a *International Narcotics Control Board* (United Nations, 2008) destacou o crescimento mundial do abuso de medicamentos à base de anfetamínicos, com dietilpropiona e femproporex entre os três anorexígenos estimulantes do SNC mais utilizados no mundo. No período de 2006-2009, Bélgica e Brasil foram os principais fabricantes de femproporex, representando 99% da produção mundial. A partir de 2010, o Brasil veio a ser o único fabricante da substância. De 2001 a 2010, o Brasil foi o maior fabricante de dietilpropiona, seguido pela Suíça e Itália. Em 2010, a produção mundial de dietilpropiona diminuiu consideravelmente, porém a maioria foi fabricada no Brasil (87%) e Itália (United Nations, 2012).

A maior parte da anfetamina consumida no mundo é legal, isto é, sob prescrição médica como anorexígeno ou, no caso do metilfenidato, para tratamento de desordens de déficit de atenção. Porém o uso abusivo destas substâncias tem crescido em todo o globo (UNODC, 2011; United Nations, 2012). O Brasil, Argentina

e Estados Unidos são os países com maior taxa de utilização de anfetaminas, com consumo per capita aproximadamente três vezes maior no continente americano do que em qualquer outra região do globo (Figura 15) (United Nations, 2008; United Nations, 2012).

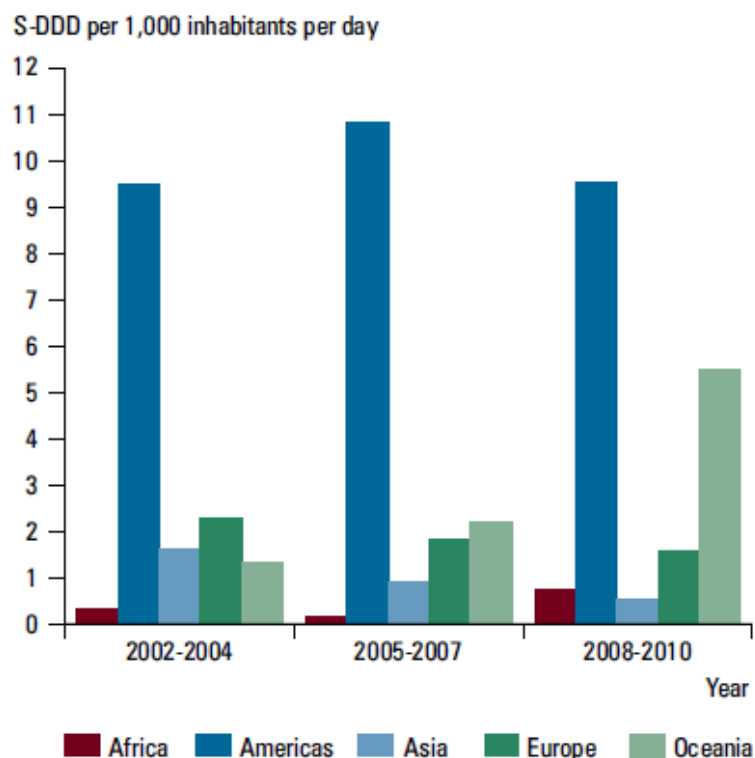


Figura 15: Estimulantes anfetamínicos, média de consumo nacional por região do globo nos períodos de 2002-2004, 2005-2007 e 2008-2010 (United Nations, 2012).

No total, 35 benzodiazepínicos estão atualmente sob controle internacional, dos quais 34 são classificados como ansiolíticos e sedativo-hipnóticos e utilizados na prática clínica para pré-medicação e indução de anestesia geral (United Nations, 2012). Em 2010, os benzodiazepínicos ansiolíticos, diazepam e alprazolam foram os psicotrópicos mais manufaturados no globo, em termos de doses diárias definidas por fins estatísticos (S-DDD). A produção de benzodiazepínicos do tipo sedativo-hipnóticos em 2010 ascendeu a 5.5 bilhões S-DDD, sendo que flunitrazepam continua a ser o benzodiazepínico mais frequentemente utilizado com abuso (Figura 16). A fabricação e o comércio internacional de clonazepam (único benzodiazepínico classificado como antiepiléptico) aumentou durante a última década e, em 2010, se tornou um dos psicotrópicos mais utilizados no globo (United Nations, 2012).

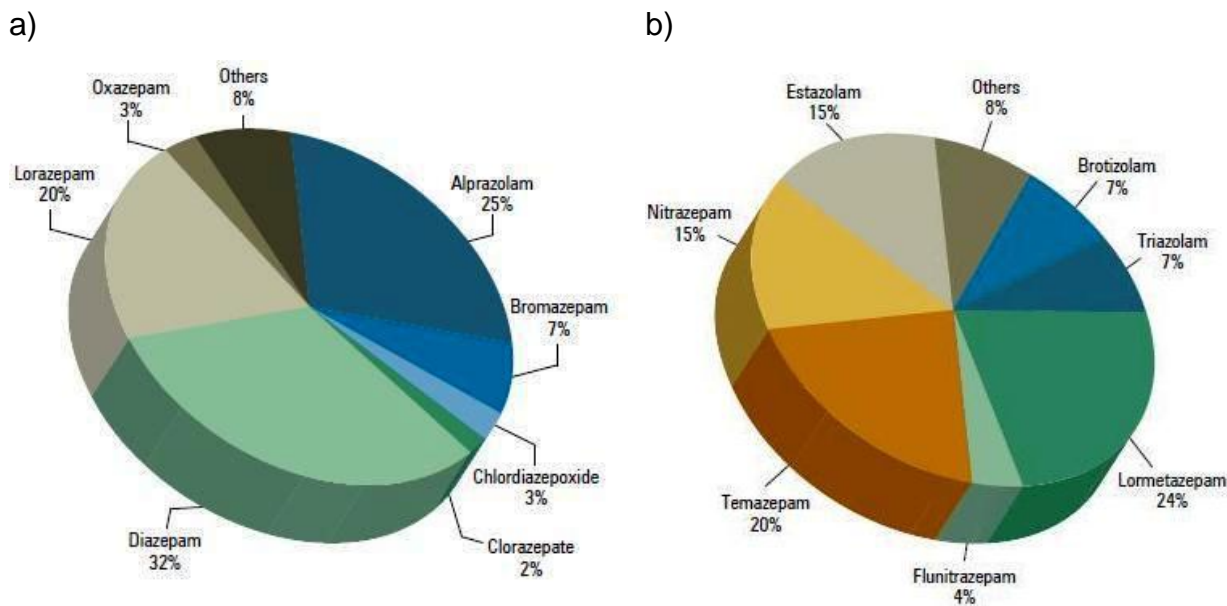


Figura 16: Benzodiazepínicos do tipo ansiolíticos (a) e do tipo sedativo-hipnóticos (b): percentual de produção total reportada, por substância, em 2010 (UNODC, 2012).

Num estudo populacional brasileiro realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicótropas (CEBRID, II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicótropas no Brasil - 2005), 7.939 pessoas entre 12 e 65 anos foram entrevistadas em 108 cidades com mais de 200 mil habitantes. Os resultados mostraram que 22,8% dos indivíduos fizeram uso na vida de qualquer SPA (excluindo tabaco e álcool), 10,3% o fizeram no último ano e 4,5% no último mês. Seguindo o cenário mundial, cannabis foi a SPA mais usada ao longo da vida (8,8% dos entrevistados), seguida pelos solventes (6,1%), benzodiazepínicos (5,6%), orexígenos (4,1%), estimulantes (3,2%), cocaína (2,9%), xaropes contendo codeína (1,9%) e opiáceos (1,2%) (Figura 17). O estudo mostrou também uma predominância do sexo feminino em uso de anfetaminas - quase três vezes maior do que os homens em uso na vida (Carlini et al., 2006).

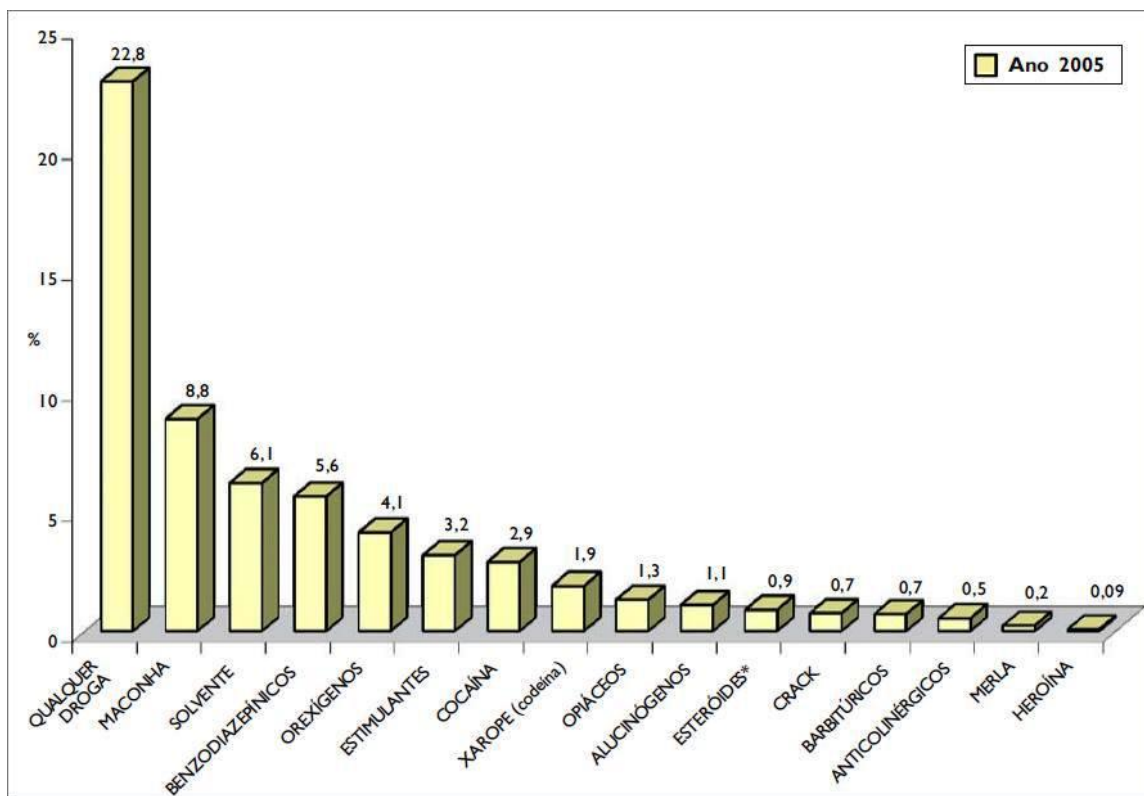


Figura 17: Prevalências (%) de uso na vida de diferentes drogas psicotrópicas (exceto Álcool e Tabaco), nas 108 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes em 2005 (Carlini et al., 2006).

Um estudo recente realizado em 149 cidades brasileiras investigou o padrão de uso somente de SPA ilícitas pela população (II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas, LENAD-II, 2012). Dos 4.607 indivíduos com mais de 14 anos entrevistados, 7% relataram já terem experimentado maconha pelo menos uma vez na vida, destes, 62% experimentaram pela primeira vez antes dos 18 anos de idade e cerca de 3% relataram este uso no último ano. Mais da metade dos usuários de maconha consomem a droga diariamente (cerca de 1.5 milhões de pessoas) (LENAD-II, 2012).

Outro estudo nacional realizado em 2009 entrevistou mais de 18.000 universitários (SENAD, 2010). Quase a metade dos universitários brasileiros já fez uso de alguma substância ilícita e 80% dos entrevistados menores de 18 anos já consumiram algum tipo de bebida alcoólica (Tabela 2). O estudo revelou também que o consumo de álcool, tabaco e outras SPA entre universitários é mais frequente que na população em geral, e cerca de 40% usaram duas ou mais SPA nos últimos 12 meses e 43% em múltiplo e simultâneo.

Tabela 2: Prevalência de uso na vida, nos últimos 12 meses e nos últimos 30 dias de SPA entre os universitários (SENAD, 2010).

Substância Psicotrópica/ Medida de uso	Uso na vida (%)	Uso nos últimos 12 meses (%)	Uso nos últimos 30 dias (%)
Álcool	86,2	72	60,5
Produtos de Tabaco	46,7	27,8	21,6
Uso de Drogas Ilícitas	48,7	35,8	25,9
Maconha/ Haxixe/ Skank	26,1	13,8	9,1
Inalantes e Solventes	20,4	6,5	2,9
Cocaína (Pó)	7,7	3	1,8
Merla	0,8	0,1	0,1
Crack	1,2	0,2	0,2
Alucinógenos	7,6	4,5	2,8
Cetamina®	0,8	0,6	0,6
Chá de Ayahuasca	1,4	0,9	0,2
Ecstasy	7,5	3,1	1,9
Esteróides Anabolizantes	3,8	0,9	0,5
Tranquilizantes e Ansiolíticos	12,4	8,4	5,8
Sedativos ou Barbitúricos	1,7	1,1	0,9
Analgésicos Opiáceos	5,5	3,8	2
Xaropes à Base de Codeína	2,7	1	0,7
Anticolinérgicos	1,2	0,6	0,4
Heroína	0,2	0,1	0
Anfetamínicos	13,8	10,5	8,7
Drogas Sintéticas	2,2	1,1	0,8

2.3.2. Por condutores de veículos

Diversos estudos foram realizados com objetivo de investigar o uso de SPA por condutores de veículos, principalmente em países do hemisfério norte. No ano de 2000, o projeto americano denominado CERTIFIED (*Conception and Evaluation of Roadside Testing Instruments to Formalize Impairment Evidence in Drivers*) estabeleceu uma relação causal entre o risco inerente ao uso de SPA e o perigo no tráfego em rodovias. Foi atribuída uma classificação de alto risco para álcool, benzodiazepínicos e *cannabis* com o álcool; de risco moderado-alto para cocaína; de risco moderado para *cannabis* e anfetamínicos; risco baixo-moderado para opioides e anti-histamínicos; e de baixo risco para antidepressivos (Brookhuis et al., 2000).

O projeto europeu IMMORTAL (*Impaired Motorists, Methods of Roadside Testing and Assessment for Licensing*) concluiu que o uso de antidepressivos, ansiolíticos, barbitúricos, codeína e morfina consumidos em níveis terapêuticos, em geral é adequado para a condução segura de veículos automotivos. Entretanto, um limite de tolerância zero para a combinação álcool/SPA é mais apropriado, visto que o comprometimento do ato de dirigir é bastante aumentado (Bernhof, 2005).

O projeto DRUID (*Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines*; (Pil et al., 2009; DRUID-Project, 2010), é um estudo epidemiológico com 13 laboratórios europeus com objetivo de analisar amostras de fluido oral, sangue e urina de condutores em geral, incluindo condutores acidentados. As SPA selecionadas incluíram etanol, anfetaminas, cocaína, benzodiazepínicos, Δ 9-THC, e opioides (Walsh et al., 2008). Este projeto trouxe uma base sólida para regulamentação de normas e um maior embasamento legal ao combate do uso de SPA associado a trânsito (Pil et al., 2009). A prevalência de SPA ilícitas foi de 1.90% na população geral de condutores sendo menor que o uso de álcool (3,48%). Dentre dos condutores envolvidos em acidentes, a maioria das SPA apareceu em combinações, principalmente com álcool, e benzodiazepínicos foi o segundo grupo mais frequente depois do álcool. Δ 9-THC (1,32%) foi a SPA ilegal mais frequentemente detectada, seguido de cocaína (0.42%). Em geral, SPA ilícitas foram detectadas entre os jovens condutores do sexo masculino, principalmente no final de semana. *Cannabis* foi a mais prevalente entre os motoristas jovens (18-34 anos) e 2-3 vezes mais prevalente em homens que mulheres. A cocaína foi duas vezes mais prevalente no sexo masculino do que no feminino. SPA prescritas foram mais detectadas entre os condutores mais velhos, do sexo feminino e durante o dia.

Nos Estados Unidos, uma pesquisa nacional em estradas de rodagem foi realizada em 2007 processando 7719 amostras de fluido oral e 3276 amostras de sangue (Lacey, 2007). As drogas mais detectadas no sangue e no fluido oral de condutores noturnos foram Δ 9-THC (8,6%), cocaína (3,9%) e metanfetamina (1,3%) (Lacey, 2007; Compton et al., 2009). Na Noruega, 4,5% das 10835 amostras de fluido oral coletadas de condutores apresentaram álcool ou SPA, dos quais 3,4% continham SPA prescritos, drogas ilegais em 1,0% e apenas álcool em 0,4%. A prevalência do consumo de SPA prescritos foi maior entre as mulheres, nos dias úteis em relação aos finais de semana e em condutores mais velhos. As drogas ilegais foram encontradas com maior frequência em jovens (Gjerde et al., 2008). As

SPA mais frequentemente detectadas foram zopiclona, hipnótico não benzodiazepínico (1,4%), benzodiazepínicos (1,4%), codeína (0,8%), Δ9-THC (0,6%) e anfetaminas (0,3%) (Gjerde et al., 2008). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no Reino Unido (Wylie et al., 2005) e Dinamarca (Bernhoft et al., 2005).

Na Austrália, um estudo recente com 853 amostras de fluido oral de condutores mostrou uma incidência de 14% para opioides (codeína em 9,1%, morfina em 7,7% e 6-monoacetilmorfina (6-AM) em 4,8%) e 8,0% para cocaína/metabolitos. As principais combinações de drogas encontradas foram metanfetamina/cocaína (7,9%), metanfetamina/codeína (7,6%), Δ9-THC/codeína (3,6%) e MDMA/cocaína (3,5%) (Chu et al., 2012).

No estudo realizado por Morland et al., cerca de 60% dos condutores fatalmente acidentados em países do norte da Europa possuíam álcool e/ou SPA no sangue. Em acidentes envolvendo veículos individuais, 66% dos condutores com menos de 30 anos de idade possuíam álcool e/ou SPA no sangue (40% tendo apenas álcool; 12% com somente SPA e 14% contendo álcool/SPA) (Mørland et al., 2011).

2.3.3. Uso de SPA por condutores de veículos no Brasil

O Código de Trânsito Brasileiro (CTB), alterado pela Lei nº 11.705 (Brasil, 2008) determina no artigo 306 que “conduzir veículo automotor, na via pública, estando com concentração de álcool por litro de sangue igual ou superior a 6 (seis) decigramas, ou sob a influência de qualquer outra substância psicoativa que determine dependência” constitui crime sujeito a pena de detenção. O artigo 165 do CTB ainda estabelece que “dirigir sob influência de álcool ou de qualquer substância psicoativa que determine dependência” é infração de natureza “gravíssima”(Brasil, 1997).

Apesar disso, diversos estudos nacionais têm evidenciado uma grande frequência no consumo de SPA por condutores no trânsito. Em 2003, Silva et al. analisaram 728 amostras de urina de caminhoneiros das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país e evidenciaram presença de anfetamina ou cocaína em 5,4% das amostras (Silva et al., 2003). Yonamine (2004) analisou amostras de urina (n=558) e saliva (n=559) coletadas aleatoriamente de motoristas de caminhões nas rodovias

de São Paulo, encontrando resultados positivos para anfetamina ou benzodiazepínicos em 2,5% das amostras de urina e para anfetamina ou cocaína em 1,2% das amostras de saliva (Yonamine, 2004). Souza et al. (2005) entrevistaram 260 motoristas de caminhão do Estado do MS, identificando uma prevalência reportada de 11,1% no consumo de estimulantes anorexígenos (dietilpropiona e femproporex), sendo que 77,1% dos entrevistados afirmaram usar estes medicamentos seis ou mais vezes na semana (Souza, 2005). Em Minas Gerais, 66% dos 91 caminhoneiros entrevistados informaram utilizar anfetamínicos durante o trabalho, adquiridos de forma ilícita em postos de combustíveis ou das empresas transportadoras em que trabalhavam (Nascimento, 2007). Quase um terço dos usuários relatou o envolvimento em acidentes de trânsito decorrentes deste uso. Em estudo recente realizado na região Sudeste do país, 9,3% das amostras de urina coletadas de 456 caminhoneiros foi positiva para SPA (Leyton et al., 2012). Anfetaminas foram encontradas em 5,8% das amostras, representando 61,9% das amostras positivas, e femproporex foi o medicamento mais utilizado. A prevalência do uso de cocaína foi 2,2% e de *cannabis*, 1,1%.

2.4. Fluido oral como matriz para análise de SPA

O fluido oral é um fluido incolor, viscoso, formado pelas secreções de três glândulas principais, a submandibular, a parótida e a sublingual, além de outras glândulas menores (Samyn et al., 2007). O fluxo diário em um indivíduo adulto varia de 500 a 1500 mL (UNODC, 2001), sendo composto por 99% de água, 0,3% de enzimas (principalmente amilase), 0,3% de glicoproteínas (mucina) e o restante por eletrólitos. (Kidwell et al., 1998). Seu pH situa-se na faixa de 5,6 a 7,0, podendo aumentar até 8,0 quando a sua produção é estimulada.

As glândulas salivares recebem alto aporte sanguíneo das artérias carótidas (UNODC, 2001) e uma fina camada de células epiteliais separa os ductos salivares da circulação sistêmica. Desta forma, o principal mecanismo de transporte do sangue ao fluido oral é a difusão passiva, no caso de substâncias com massa entre 100 e 500 Da, correspondendo a grande maioria dos fármacos. Este tipo de transporte só ocorre no caso de moléculas não ionizadas, lipossolúveis e não ligadas a proteínas plasmáticas, as quais atravessam livremente as membranas

plasmáticas a favor do gradiente de concentração (Kidwell et al., 1998; Samyn et al., 2007).

O uso de fluido oral para avaliar a utilização de SPA no trânsito tem sido muito utilizado devido às vantagens apresentadas em relação ao uso tradicional de matrizes como urina e sangue (Drummer, 2006; Crouch et al., 2008; De Giovanni et al., 2008). Dentre estas vantagens se destacam a coleta fácil e de forma não invasiva, podendo ser realizada no próprio local da abordagem, sob vigilância e sem maiores constrangimentos, fornecendo informações sobre o consumo recente (algumas horas) e comprovando a condução sob influência de SPA. Também apresenta a droga na forma não metabolizada, favorecendo o acúmulo no fluido oral de drogas básicas, como anfetamínicos e cocaína, devido à sua maior acidez em relação ao plasma sanguíneo (Yonamine, 2004). O uso de fluido oral apresenta desvantagens, como o elevado conteúdo glicoproteico (mucina), reduzido volume de amostra e baixa concentração de fármacos ligados fortemente a proteínas plasmáticas, como é o caso dos benzodiazepínicos e dos cannabinóides (Huestis et al., 2004; Yonamine, 2004; De Giovanni et al., 2008).

A coleta de fluido oral pode ser realizada diretamente ou através de dispositivos coletores comerciais, os quais fazem o uso de absorventes, impregnados ou não com estimulantes da salivação (ex. ácido cítrico), podendo ou não apresentar tampões de preservação (Samyn et al., 2007).

2.4.1. Farmacocinética de drogas no fluido oral

Anfetaminas e cocaína são bases fracas (pKa variando de 10,1 a 7,6; (Moffat et al., 2004), de baixa massa molecular (entre 135 e 303 Da) e baixa ligação a proteínas plasmáticas. Estas características permitem a estas substâncias uma rápida difusão pelas membranas celulares, vindo a se acumular no fluido oral, que possui pH mais baixo em relação ao sangue. No fluido oral, anfetaminas são ionizadas nos grupamentos amínicos, impedindo seu retorno à corrente sanguínea (Cone et al., 2007). A concentração da anfetamina no fluido oral pode superar em 2,8 vezes a do sangue; a de cocaína (pKa 8,4) supera em mais de cinco vezes a do sangue, e seus metabólitos benzoilecgonina (BZE) e ecgonina metil éster (EME) são encontrados no fluido oral em concentrações variáveis (Moffat et al., 2004).

Em uma amostra de fluido oral positiva para cocaína, a ausência de BZE indica um uso muito recente, a concentração de cocaína maior que a de BZE um uso entre 2-8 h antes da coleta e concentração de cocaína menor que BZE um uso anterior entre 12 h e 48 h. Uma amostra positiva somente para BZE caracteriza o uso de cocaína de até 48 h por usuários ocasionais, podendo variar entre 48 a 96 dias para usuários frequentes (Cone et al., 2007).

Logo após a cessação do tabagismo de *cannabis*, a concentração de $\Delta 9$ -THC no fluido oral se mantém entre 150 e 390 ng/mL, obtendo-se uma boa correlação entre os níveis no fluido oral e no plasma (razão de 1,2, em média) (Niedbala et al., 2004). O mesmo estudo também avaliou a exposição à fumaça da *cannabis* pela análise de fluido oral de quatro voluntários expostos passivamente e cinco indivíduos consumindo a droga através de cigarro, todos dentro de um quarto sem ventilação por 20 min. $\Delta 9$ -THC foi detectado nos indivíduos passivos nos primeiros 30 min. de exposição, com níveis variando entre 7 e 26 ng/mL (em média 13 ng/mL) (Niedbala et al., 2004).

A heroína pode ser detectada em poucos minutos no fluido oral após a utilização de uma dose de 12 mg intramuscular (IM), havendo um pico de concentração de 0,3 μ g/mL, podendo ser detectado por cerca de uma hora até a concentração de 1 ng/mL. A morfina também é rapidamente detectada, chegando a 25-60 ng/mL em 10 e 60 min, respectivamente (Wang et al., 1994). No mesmo estudo, a administração IM de 30 mg de fosfato de codeína resultou em uma concentração máxima no fluido oral de 3,5 μ g/mL após 15 min, atingido a concentração de 38 ng/mL em 6 h (Wang et al., 1994; Drummer, 2005)

Devido à sua extensa ligação de proteínas plasmáticas (de 70 a 99%), os benzodiazepínicos estão presentes em concentrações muito pequenas no fluido oral, entre 1 a 20 ng/mL em média. A razão fluido oral/plasma é muito baixa, no intervalo de 0,01-0,08 (Kintz et al., 2005; Moore et al., 2007). O metabólito do diazepam, o nordiazepam, pode ser encontrado no *steady state* em altas concentrações em relação ao diazepam (Cone et al., 2007).

Por ser uma droga de uso recente, poucos trabalhos foram realizados com o 1,3-clorofenil-piperazina (m-CPP), e nenhum abrangendo a detecção deste através de fluido oral (EMCDDA, 2008). A meia-vida de eliminação na urina variou entre 2,6 e 6,1 h após administração oral em indivíduos saudáveis e voluntários do sexo masculino (Feuchtl et al., 2004).

2.5. Metodologias analíticas utilizadas na análise de SPA em fluido oral

Diversas metodologias analíticas publicadas recentemente utilizam a amostragem de fluido oral associadas à pesquisa de substâncias psicoativas em condutores em estradas de rodagem. Os principais métodos de extração da amostra existentes na literatura são a extração em fase sólida (Teixeira et al., 2005; Wood et al., 2005; Concheiro et al., 2007) e extração líquido-líquido (ELL) (Kintz et al., 2005; Dams et al., 2007; Øiestad et al., 2007; Sergi et al., 2009; Molnar et al., 2012). Dentre os métodos de análise se destacam as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas, com CG-MS, LC-MS, LC-MS/MS e LC-qTOF/MS. A Tabela 3 mostra as informações mais relevantes destes estudos.

Na Dinamarca, amostras de fluido oral (n = 3002) coletadas aleatoriamente de condutores em rodovias foram analisadas por LC-MS/MS após *clean-up* com SPE, obtendo-se uma recuperação de 36% – 114% (Badawi et al., 2009; Simonsen et al., 2012). Concheiro et al. (2008) utilizaram LC-MS/MS na determinação de 23 SPA/metabólitos após *clean-up* com SPE Oasis HLB, obtendo recuperações na faixa de 7,5 – 82,6%, utilizando com eluente 2 mL de CH₂Cl₂:2-propanol (Concheiro et al., 2008). Øiestad et al. (2007) determinaram 32 SPA (anfetaminas, benzodiazepínicos, cocaína/BZE, opiáceos, alucinógenos e outros) utilizando LC-MS/MS após extração líquido-líquido com 1 AcEt:heptano (4:1), obtendo recuperação de mais de 50%, exceto para morfina (30%) e BZE (0,2%)(Øiestad et al., 2007) (Tabela 3).

Tabela 3. Metodologias analíticas para determinação de SPA em fluido oral.

País/região	Classe e número de SPA	Extração/clean-up (recuperação)	Equipamento	LOD/LOQ do método, ng/mL	Referência
Dinamarca	29 SPA e metabólitos: opioides, cocaína, BZDP, Δ 9-THC, zolpidem/zopiclona, anfetaminas.	SPE (36 -114%) Bond Elut SPE (130 mg, 3 mL; Varian) Cond.: 2 mL H ₂ O e 2 mL H ₂ O/MeOH (95:5 v/v). Eluição: 3 x 1,5 mL de ACN:NH ₄ OH 25% (49:1, v/v).	UPLC-ESI-MS/MS	LOQ: 0,53	(Simonsen et al., 2012) (Badawi et al., 2009)
Austrália	31 SPA/metabólitos: anfetaminas, Δ 9-THC, cocaína, BDZP.	ELL - <i>sem informação</i>	LC-ESI-MS/MS	LOQ: 2,5	(Chu et al., 2012)
*	9 SPA básicas (anfetaminas/METH, cocaína/BZE, morfina, codeína e 6-AM)	SPE (>76%) Cond.: 1 mL MeOH; 1 mL HCl 0,1N; 1 mL 0,1N HCl, THF e MeOH/H ₂ O (50:50, v/v). Eluição: 0,5 mL (5% NH ₃ /MeOH).	LC-ESI-MS/MS	LOQ: 2	(Wood et al., 2005)
*	14 BZDP	SPE (>81%) <i>sem informação</i> (cartucho). Cond.: MeOH (3 mL), H ₂ O (3 mL), e 0.1M tampão fosfato (pH 6.0, 2 mL). Eluição: H ₂ O (3 mL), 0,1M tampão fosfato (pH 6.0), ACN (80:20; 2 mL) Hexano (1 mL), AcEt + 2% NH ₄ OH (2 mL).	LC-ESI-MS/MS	LOQ: 0,5 e 1	(Moore et al., 2007)
Espanha	11 SPA básicas: anfetaminas/METH, cocaína / BZE e 6-AM). Outro método para THC	SPE (>50%) Oasis HLB (3 cm ³ , 60 mg) Cond.: 2 mL MeOH e 2 mL H ₂ O. Clean up: 2 mL H ₂ O/MeOH (95:5, v/v) e 2% NH ₄ OH em MeOH (80:20, v/v). Eluição: 2 mL ácido acético em MeOH.	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,5 e 1 LOQ: 1 e 2	(Concheiro et al., 2007)
*	23 SPA/metabólitos (anfetaminas, cocaína, BZDP, Δ 9-THC, opioides, zolpidem/zopiclona, difenidramina e amitriptilina).	SPE (7,5 – 82,6%) Oasis HLB (3 cm ³ , 60 mg). Cond.: 2 mL MeOH e 2 mL H ₂ O. Clean-up: 2 mL H ₂ O/MeOH (95:5, v/v) e H ₂ O/MeOH/NH ₄ OH (60:39.5:0,5,v/v). Eluição: 2 mL CH ₂ Cl ₂ /2-propanol (75:25, v/v).	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,5 LOQ: 1 e 5	(Concheiro et al., 2008)

País/região	Classe e número de SPA	Extração/clean-up (recuperação)	Equipamento	LOD/LOQ do método, ng/mL	Referência
EUA	22 opioides e cocaína/metabólitos.	ELL (31-115%) Precipitação proteica: 600 µL de ACN.	LC-APCI-MS/MS	LOD: 0,25-0,5 LOQ: 1-10	(Dams et al., 2007)
*	17 benzodiazepínicos e hipnóticos	ELL (>80%) 3 mL CH ₂ Cl ₂ / éter etílico (50/50, v/v).	LC-ESI-MS/MS	LOQ: 0,1-0,2	(Kintz et al., 2005)
Finlândia	50 SPA/metabólitos: THC, cocaína, anfetaminas, opiáceos, BZDP e outros.	ELL / SPE (33-120%) Oasis MCX 3cm ³ /60mg. Clean up: 1,4 mL IP:AcEt 1:4 (v:v). Eluição: 3 mL ACN com 4% NH ₃ .	GC/EI-MS e GC/NICI-MS	LOQ: 0,5-25	(Langel et al., 2011)
*	12 SPA (opiáceos, anfetaminas, cocaína/BZE).	SPE (52,3 a 98,8%) Bond Elut, Varian. Cond.: 3 mL of MeOH, 2 mL tampão fosfato (0,1 M, pH 6); Clean up: 2 mL ácido acético (0,1 M). Eluição: 2 mL MeOH, 1 mL CH ₂ Cl ₂ /2-propanol/NH ₄ OH 25%.	LC-ESI-qTOF/MS	LOD: 0,22 a 1,07 LOQ: 2	(Mortier et al., 2002)
Glasgow, Escócia	49 SPA (opiáceos, anfetaminas, cocaína/BZE, BZDP e outros).	SPE (30 a 109%) Bond Elut LRC (130 mg, 10 mL). Cond.: 2 mL MeOH, 2 mL tampão fosfato Clean up: 1 mL H ₂ O, 0,5 mL ácido acético 0,01 M, 50 mL MeOH. Fração ácida: acetona: clorofórmio (1:1 v/v, 4 mL). Fração básica: AcEt:2% NH ₃ (2 x 1,5 mL).	LC-MS-MS; GC-MS	LOD: 0,2 a 3,4 LOQ: 0,8 a 11	(Wylie et al., 2005; Wylie et al., 2005)
*	11 SPA (anfetaminas, cocaína/BZE, alucinógenos, cetamina e fenciclidina).	Micro-SPE (61 a 81%) OMIX C18, Varian. Cond.: H ₂ O/ACN (1:1, v:v) e 3 x H ₂ O/MeOH (9:1, v:v).	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,05 a 1,2 LOQ: 0,2 a 4,9	(Sergi et al., 2010)
*	32 SPA (anfetaminas, cocaína/BZE, opiáceos, BZDP, alucinógenos e outros).	ELL (>50% exceto morfina (30%) e BZE (0,2%)). 1.3 mL de AcEt:heptano (4:1)	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,05 a 1,2 LOQ: 0,2 a 4,9	(Øiestad et al., 2007)
*	13 SPA (anfetaminas, cocaína/BZE, canabinoides, opioides,	ELL (68,5 a 99,5%); MeOH até atingir 0,5 mL.	LC-ESI-MS/MS	LOD: 0,1 a 1,1 LOQ: 0,2 a 3,7	(Sergi et al., 2009)

País/região	Classe e número de SPA	Extração/clean-up (recuperação)	Equipamento	LOD/LOQ do método, ng/mL	Referência
	cetamina e fenciclidina).				
*	36 SPA (anfetaminas, cocaína/BZE, canabinoides, opioides, antipsicóticos e antidepressivos).	SPE (44,5 a 97,7 %) Bond Elut, Varian. Cond.: 2 mL MeOH e 2 mL tampão fosfato (pH 6); Clean up: 1 mL/min, 2 mL ácido acético 0.25 M. Fração ácida: acetona Fração básicas e neutras CH ₂ Cl ₂ :IP:NH ₃ (80:20:2, v/v/v)	GC-MS	LOD: 0,1 a 1,1 LOQ: 0,9 a 44,2	(Pujadas et al., 2007)
*	Anfetamina, metanfetamina, femproporex, dietilpropiona e metilfenidato.	Micro SPE (77,2 a 112,1%) Fibra Supelco (PDMS 30µM). 1,5 mL amostra e 75 mg de Na ₂ CO ₃ , 150 mg de Na ₂ SO ₄ , 5 µL PRCL (pH final 10,1). Após vórtice durante 1 min, a fibra de SPME foi imersa sob agitação magnética (1200 rpm) durante 20 min.	GC-MS	LOD: 0,5 a 2,0 LOQ: 4 a 16	(Souza et al., 2011)

Abreviaturas: acetato de etila (AcEt), acetonitrila (ACN), ácido clorídrico (HCl), água (H₂O), amônia (NH₃), benzodiazepínicos (BZDP), cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por *eletrospray* (LC-ESI-MS/MS), extração líquido-líquido (ELL), metanfetamina (METH), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por ionização química (LC-APCI-MS/MS), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas por ionização por impacto de elétrons (GC/EI-MS), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas por ionização química por íon negativo (GC/NICI-MS), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por *eletrospray in tandem* quadrupolo *time-of-flight* (LC-ESI-QTOF/MS), extração em fase sólida (SPE), fenilclorofornato (PHCL), hidróxido de amônia (NH₄OH), isopropanol (IP), metanol (MeOH), substâncias psicoativas (SPA), tetrahydrofurano (THF). *Desenvolvimento da metodologia apenas, não sendo utilizada em amostras de fluido oral de condutores de algum país ou região.

2.6. Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Técnicas como a cromatografia líquida (LC) acoplada à espectrometria de massa (MS) ou a espectrometria de massa *in tandem* (MS/MS) são cada vez mais importantes na toxicologia clínica e forense por combinar uma elevada seletividade de detecção através do uso da espectrometria de massa com a possibilidade de se analisar amostras aquosas e hidrófilas diretamente, tanto para analitos termolábeis, quanto não-voláteis (Peters, 2011).

O uso da cromatografia foi primeiramente reportado pelo russo Mikhail Semyonovich Tswett em 1903 para a separação de pigmentos de plantas, utilizando coluna de carbonato de cálcio e resultando em bandas coloridas (Lanças, 2009; Britannica, 2012). A cromatografia é um método de separação em que os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases imiscíveis: uma fase móvel que flui através de uma fase estacionária. A fase móvel é responsável por interagir diferentemente com cada componente por meio de diferentes interações, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals (Collins et al., 1987; Lanças, 2009)

A evolução da cromatografia líquida foi impulsionada pelo desenvolvimento de novas partículas de fases estacionárias que por sua vez geraram colunas mais seletivas, eficientes e estáveis química e mecanicamente (Collins et al., 1987; Maldaner et al., 2009). Na cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), a bomba é responsável por pressurizar a fase móvel através da coluna diminuindo assim o tempo de eluição e controlando e mantendo o fluxo reprodutível e livre de pulsos (Lanças, 2009). Dentre os equipamentos normalmente acoplados a um cromatógrafo líquido estão os detectores espectrofotométricos nas regiões ultravioleta e visível, o de fluorescência e o espectrômetro de massas.

A espectrometria de massas surgiu primordialmente no ano de 1913, quando o físico Joseph John Thompson demonstrou que o neon consistia em diferentes espécies atômicas (isótopos) de massas molares de 20 e 22 g/mol, sendo assim considerado o pai da espectrometria de massas, ganhando o Prêmio Nobel em 1906 (Kitson et al., 1996). O espectrômetro de massas funciona a partir da ionização de determinado analito (íon precursor), obtendo-se fragmentos de massa a partir deste íon, sendo estes posteriormente separados de acordo com a relação massa/carga

de cada fragmento e detectados proporcionalmente à sua abundância, produzido assim, um espectro de massa completo da molécula (Hoffmann, 2007).

O acoplamento dos detectores de espectrometria de massas com as técnicas de cromatografia líquida (LC-MS) ocorreu somente a partir de 1974 através do avanço das técnicas de interface como a ionização a pressão atmosférica (APCI), onde a ionização química é iniciada por elétrons a partir de uma descarga (de corona) elétrica (Niessen, 2006), e posteriormente a técnica de ionização por *eletrospray* (ESI).

A técnica de ionização por eletronebulização ou *eletrospray* (Figura 18) permitiu a ionização de compostos altamente polares e não voláteis através da transferência de fragmentos de massa ionizados na fase condensada para uma fase gasosa como entidades isoladas. Dentro da interface ou fonte de íons, ocorre a nebulização da fase móvel através da passagem por um tubo em forma de agulha sob forte campo elétrico (acima de 3 kV) e na presença de fluxo de nitrogênio sob aquecimento para promover evaporação das gotículas do aerossol formado à pressão atmosférica, proporcionando um aumento de carga elétrica (repulsão coulomb). Uma fração dos átomos produzidos é ionizada, normalmente como um íon positivo monocarregado ($M+H^+$) (Gaskell, 1997; Skoog et al., 2005; Crotti et al., 2006). Os íons são separados pelo analisador de massas com base na razão massa-carga das espécies iônicas para produzir um espectro de massas. (Skoog et al., 2005). A Figura 19 mostra um espectro de massa da cocaína obtida a partir de sistema LC-MS por *electrospray*.

A formação do aerossol do *eletrospray* depende da concorrência entre repulsão coulomb e da tensão superficial da fase móvel utilizada. Uma nebulização estável depende de parâmetros experimentais, tais como, a diferença de potencial elétrico aplicada, a forma do capilar e seu diâmetro interior e externo, bem como a, e da composição da fase móvel pulverizada (Niessen, 2006).

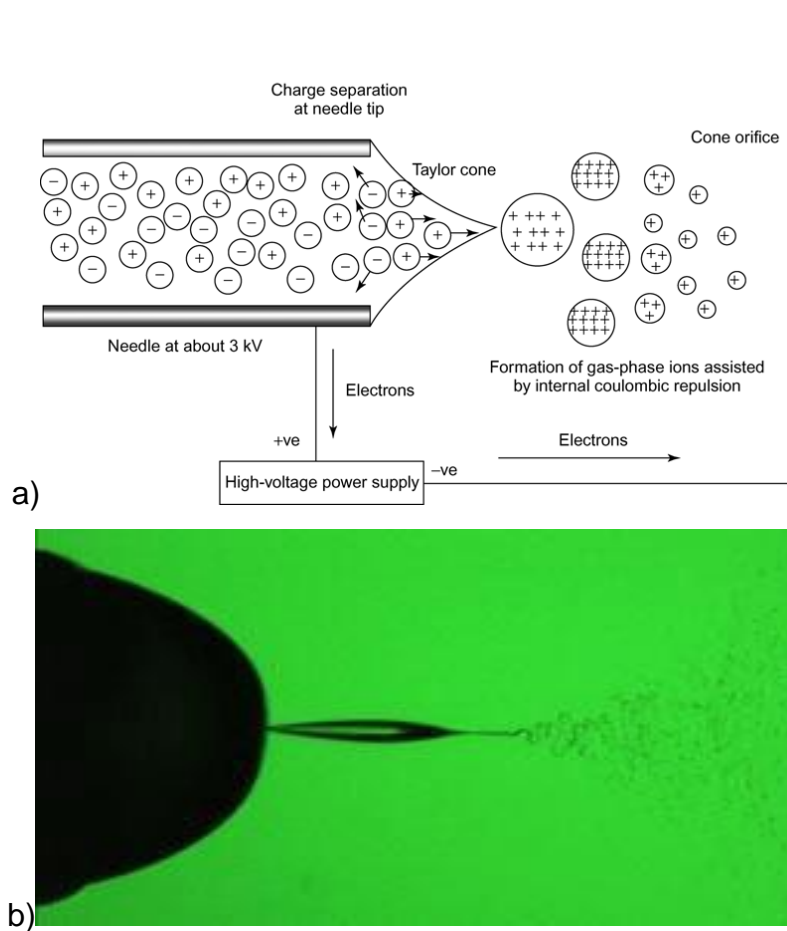
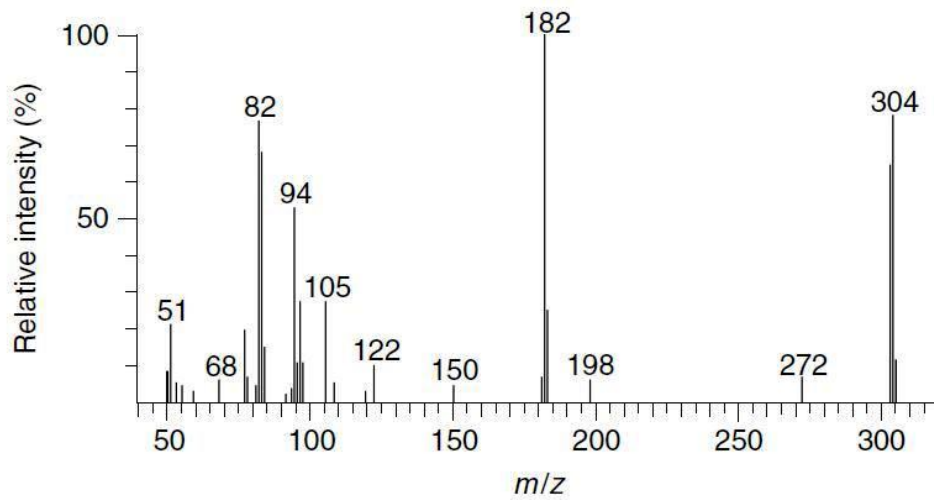
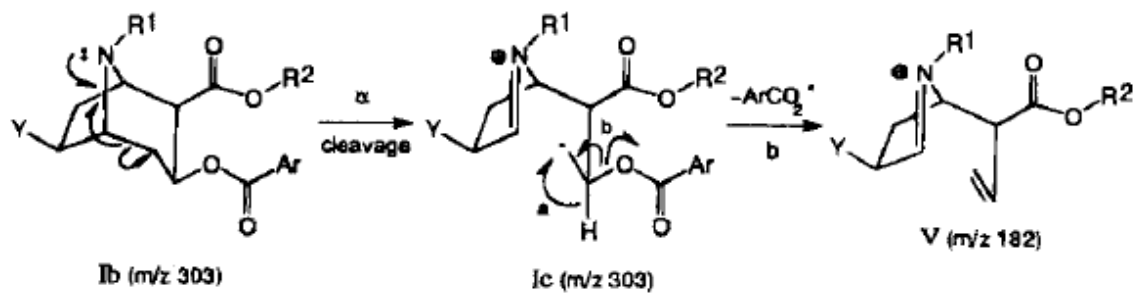


Figura 18: Representação esquemática da fonte de ESI (a) como célula eletroquímica (Moffat et al., 2004) e imagem do ESI (b) na fonte de íons de um analisador de massas (Neto, 2009).

a)



b)



c)

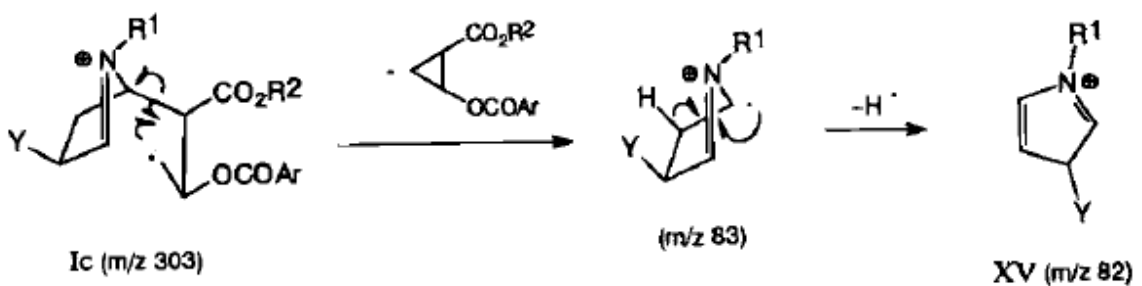


Figura 19. Espectro de massas da cocaína (a) (Smith, 2004). Os principais íons formados são os íons m/z 182 ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3$) formado por α -clivagem pós-ionização inicial de nitrogênio ou do oxigênio da carbonila na posição C2 (b) e m/z 82 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{N}$) formado por α -clivagem e subsequente clivagem alílica (c), fragmentos de maior abundância (Smith, 1997).

A partir de 1982, os primeiros espectrômetros de massa triplo-quadrupolo comerciais foram introduzidos (Hoffmann, 2007). Este tipo de espectrômetro consiste em dois analisadores de massas, cada um com quatro hastes (quadrupolos) e entre estas, uma célula de colisão formada por um hexapolo (Figura 20). As hastes opostas possuem iguais tensões, que são moduladas através da variação de radiofrequências (RF) e de corrente contínua (DC). A um valor específico de tensão, os íons com determinada m/z (íons percussores ou íons pais) são separados no primeiro analisador de massa, seguindo uma trajetória helicoidal estável através das varetas em direção à célula de colisão onde ocorrerá a fragmentação destes íons na presença de um gás neutro e inerte (He, N₂, Ar) regulado a uma pressão consideravelmente superior à do vácuo circundante. Posteriormente, estes fragmentos de massa (íons produtos ou íons filhos) são selecionados pelo segundo analisador de massas e direcionados ao detector (Ardrey, 2003; Gross, 2004).

Um espectro de massa é produzido através da variação das tensões de RF e DC de uma maneira sistemática para trazer fragmentos selecionados de íons (íons produtos) de m/z com valor específico ou dentro de um intervalo, em direção ao detector de massas (Ardrey, 2003; Smith, 2004).

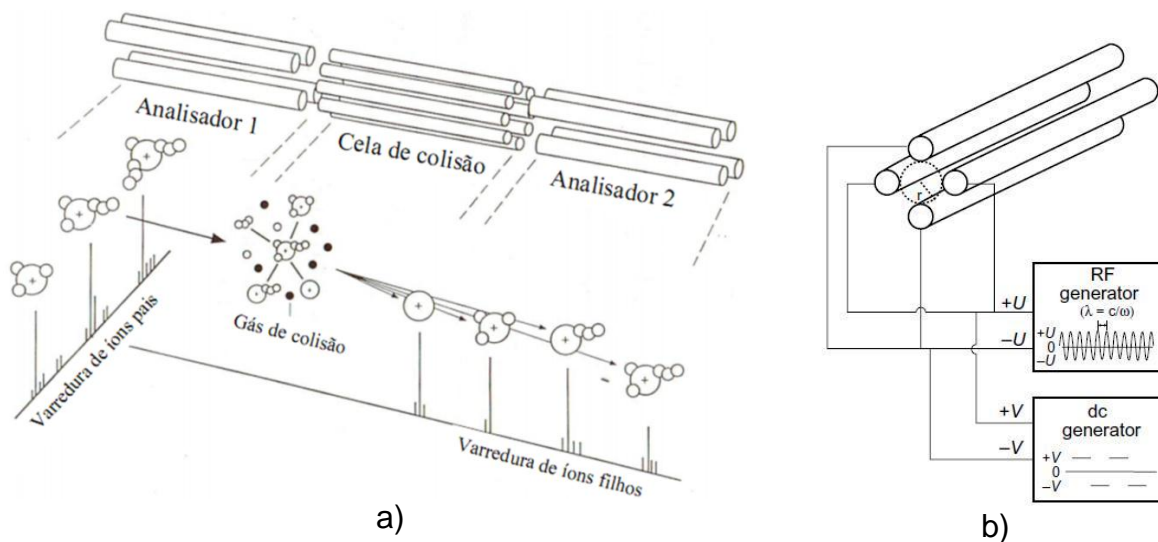


Figura 20: Diagrama de funcionamento de um analisador de massas LC-MS/MS triplo quadrupolo (a) (Xavier, 2010) e funcionamento de uma haste quadrupolar (b) (Smith, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar o uso de substâncias psicoativas por condutores nas rodovias brasileiras pela análise de fluido oral.

2.2. Específicos:

- Otimizar e validar um método multianalito para a determinação de anfetamínicos, benzodiazepínicos, cocaína e metabólitos, canabinoides, opioides e outras substâncias em fluido oral por LC/MS/MS.
- Analisar amostras de fluido oral coletadas de condutores nas principais rodovias de 24 estados brasileiros e Distrito Federal.
- Avaliar a prevalência de uso de substâncias psicoativas com relação às características do condutor (sexo, idade e escolaridade), tipo de veículo, hora e local de amostragem.

3. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados na forma de dois (02) trabalhos científicos que foram preparados para publicação em revistas indexadas:

3.1. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid - LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers

Aceito para publicação na *Forensic Science International* em: 29 de Agosto de 2012. ISSN: 0379-0738

3.2. Prevalence of psychoactive drug use on a roadside survey of Brazilian drivers

A ser submetido

3.1. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid - LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers

Ivomar Zancanaro^a, Paula O. Bohel^b, Máira Kerpel dos Santos^b, Raquel De Boni^c, Flavio Pechansky^c, Renata Pereira Limberger^b, Eloisa Dutra Caldas^{a*}

^a Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brazil.

^b Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

^c Center for Drug and Alcohol Research, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

* **Corresponding author at:** Toxicology Laboratory, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasilia, Distrito Federal 70910-900, Brazil. Phone/Fax: 55-61-3107-1871.

E-mail address: eloisa@unb.br

Abstract

This study is part of a larger project designed to investigate the prevalence of psychoactive drug (PAD) use among Brazilian drivers. In this paper we describe the development and validation of an analytical method to analyze 32 prescription and illicit PADs (amphetamines, benzodiazepines, cocaine, cannabis, opioids, ketamine and m-CPP) and metabolites in oral fluid samples collected with a QuantisalTM device. Samples were extracted with ethyl acetate:hexane and analyzed by LC-MS/MS. Instrumental LOD ranged from 0.26 to 0.65 ng/mL. Mean procedural recoveries at 1.3 ng/mL (LLOQ) ranged from 50 to 120% for 24 compounds. Recoveries were concentration independent, with the exception of femproporex, heroin and ecgonine methyl-ester (EME) for which the recovery decreased significantly at higher levels (13 and 52 ng/mL). RSD was < 20% for all compounds at all spiking levels. Ion suppression due to the matrix was < 20% for most compounds, and higher than 60% for EME and diethylpropion. Analysis were performed against an in-matrix standard curve. About 10% of the 2235 oral fluid samples collected from drivers on Brazilian Federal highways were positive (\geq LOD) for at least one analyte investigated. Alone or in combination with other drugs, cocaine/metabolites were the analytes most detected in the samples (129; 5.8%), followed by amphetamines/metabolite (69; 3.1%), benzodiazepines (28; 1.2%), cannabinoids (23; 1.1 %) and opioids (8; 0.4 %). Detection of at least two PADs from different classes accounted for 9.3% of the 236 positive samples. Cocaine was found at higher levels in the samples (up to 1165 ng/mL). Preventive measures aimed at reducing the use of PADs by drivers in Brazil will certainly contribute to decrease the country's highway death rates.

Keywords: Psychoactive drugs; Oral fluid; Drivers; LC-MS/MS; Brazil

1. Introduction

In the last decade, there has been a significant worldwide increase in the use of illicit drugs and the abuse of prescription drugs, such as benzodiazepines, barbiturates, and amphetamines [1]. The increased risk of driving under the influence of these psychoactive drugs (PAD) has been substantially demonstrated in the literature [2-7]. In Brazil, 11% of the truck drivers interviewed reported using

amphetamines in the state of Mato Grosso do Sul [8] and 66% in the state of Minas Gerais [9]. Biological samples from truck drivers have tested positive for various substances, including cannabinoids, cocaine and amphetamines in São Paulo state [10-12]. Traffic accidents were the second highest cause of death in the country in the last three decades, representing 20.3 deaths per 100 000 inhabitants in 2007 [13].

In the last ten years, the use of oral fluid to monitor the use of PAD by humans has been proved to have a number of advantages over the traditional urine and blood matrix. Oral fluid sampling is fast, easy and less intrusive for drivers [14]. It allows the detection of the drug in a non-metabolized form and, compared to serum analysis, it is potentially more sensitive to basic drugs and drugs with low plasma protein binding, such as amphetamines and cocaine [3, 15-18]. Some disadvantages regarding the use of oral fluid include the reduced sample volume, high content of glycoprotein (oral mucin), and low concentration of drugs strongly bound to plasma proteins, such as benzodiazepines and Δ^9 -THC (tetrahydrocannabinol).

The commercial oral fluid collection system contains buffers with stabilizing salts, non-ionic surfactants for surface wetting, and antibacterial agents which guarantee good stability for most drugs and their metabolites during storage at 4 °C [19]. However, these devices excessively dilute the samples, and thus a sensitive detection method, such as LC-MS/MS, needs to be used for quantification. Sample extraction methods include liquid-liquid extraction (LLE) [20-24], and solid phase extraction (SPE) [19, 25, 26].

The aims of this study were to develop an analytical methodology for PADs from various chemical classes by LC-MS/MS in oral fluid, and to apply this method to analyze samples collected from Brazilian drivers in the first nationwide survey conducted in the country.

2. Material and Methods

2.1. Psychoactive drug standards and reagents

Standards of d,l-diethylpropion (DIE) hydrochloride (HCl) and d,l-femproporex HCl (FEM) were kindly donated by Aché Pharmaceutical Laboratories S.A. (São

Paulo, Brazil), and d,l-threo-methylphenidate HCl (MPH) by Novartis Pharma (São Paulo, Brazil). Alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, oxazepam and temazepam were purchased from Roche Pharmaceutical (Anápolis, Brazil); codeine phosphate, methadone HCl, morphine sulfate and tramadol HCl from Cristália Pharmaceutical (Itapira, Brazil); atropine sulfate monohydrate from Henrifarma (São Paulo, Brazil); ethyl morphine HCl from Merck (Darmstadt, Germany); zolazepam HCl from United States Pharmacopoeia, and dl-amphetamine HCl and Δ^9 -THC from Lipomed (Arlesheim, Switzerland). Standard solutions of 1 mg/mL of d,l-methamphetamine (METH), d,l-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), d,l-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), d,l-n-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine (MBDB), d,l-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), ketamine, heroin, cannabinol, cocaine, benzoylecgonine (BZE), ecgonine methyl-ester (EME), nordiazepam and 1-(3-chlorophenyl) piperazine (m-CPP) were provided by the Brazilian National Institute of Criminology (Brasília, Brazil).

PAD and metabolite stock solutions at 1 mg/ml were prepared in ethyl acetate (benzodiazepines), acetonitrile (opioids) or methanol. Working solutions were prepared by diluting the stock solution in methanol at final concentrations of 3.75 μ g/mL and 25 ng/mL. Stock and working solutions were stored at -15 ± 4 °C. In-matrix standard solutions at concentrations ranging from 0.5 to 20 ng/mL were prepared by spiking a blank oral fluid extract.

Methanol (MeOH) and acetonitrile HPLC grade and ultrapure ammonium formate (98% purity) for HPLC were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), ammonium carbonate and hexane from Mallinckrodt (Phillipsburg, USA), ethyl acetate HPLC grade and ammonium hydroxide concentrate p.a. from Merck (Darmstadt, Germany). High purity water was obtained from a Milli-Q water system (Billerica, USA).

Quantisal™ oral fluid collection devices, filters and preservative buffer solution were purchased from Immalysis Corporation (Pomona, CA, USA). Each device contained a collection pad with an indicator that turned blue when 1 mL of oral fluid was collected, and a plastic transport tube with 3 mL of preservative buffer (final specimen volume of 4 mL).

2.2. Sample preparation and extraction

The cotton pad containing the oral fluid was squeezed and the released solution poured into a glass container to freeze. The LLE was based on the method described by Øiestad [21]. In summary, a 0.50 mL aliquot of the sample was transferred to a 2 mL eppendorf tube, 50 μ L of saturated ammonium carbonate solution (pH 9.3) was added, the tube vortex to mix, 1.3 mL of ethyl acetate: hexane (4:3) added and the tube vortex for 20 seconds and stirred in a shaker for 10 min. A 1.0 mL aliquot of the organic phase was concentrated to dryness under nitrogen at 50°C. The residue was resuspended for analysis in LC-MS/MS in 250 μ L of initial mobile phase with internal standards (IS) (zolazepam, atropine and ethyl morphine at 25 ng/ml). Oral fluid samples were thawed and immediately extracted. All samples above the in-matrix standard curve concentration range were diluted and reanalyzed.

2.3. LC-MS/MS analysis

Analyses were performed in a Shimadzu LC-20AD (Kyoto, Japan) liquid chromatograph coupled with a mass spectrometer Applied Biosystems/MDS Sciex 4000 QTRAP MS system (Foster City, USA), with an electrospray interface (ESI). The chromatographic separation was performed at 40°C with a Luna® C18(2) column, 150 x 2.0 mm, 5 μ m (Phenomenex; Torrance, USA). The injection sample volume was 10 μ L. The mobile phase, delivered at a flow rate of 0.2 mL/min, was a gradient of water with 5 mmol/L ammonium formate (solvent A), and MeOH with 20% of acetonitrile and 5 mmol/L ammonium formate (solvent B), programmed as follow: 32.5% (solvent B) during 2 min linearly increased to 75% for 6.5 min, 80% for 7.4 min, 95% in 13 min to 13.2 min, 100% in 17 min, decreased to original conditions for 5 min, which resulted in a total chromatographic run time of 22 min.

The MS/MS ion source was operated in positive ESI mode at 600.0 °C with the nebulizer and heater gas set to 45.0 psi. Ion spray voltage was set to 4.500 KV, curtain gas at 10.0 psi, and collision gas to HIGH. Positive ionization (ESI+) was performed in the Schedule MRM (multiple reaction monitoring) mode, range of detection for 120 s, obtaining the transition from two fragments for each analyte (quantifier and qualifier ions) [27]. The overall cycle time for 67 MRM transitions (including three for internal standards) was 2.5s and 528 cycles/scan. The MRM

transitions, collision energies and other target-dependent parameters for each target were optimized by direct infusion of the corresponding standard solutions at concentrations of 50 to 200 ng/mL in the mobile phase (MeOH/H₂O and ammonium formate 5 mmol/L), according to manufacturer instructions. The resolutions for the selection of the precursor ions in Q1 and the product ions in Q3 were set to UNIT mass. Data processing was performed using the Analyst Version 1.5.1 software.

2.4. Method validation

Linearity of the response and selectivity (interfering signals) of the method were evaluated by analyzing a blank oral fluid extract (pool from 10 volunteers) [28]. Linearity was evaluated using in-matrix standard solutions at levels of 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5, 10, 15 and 20 ng/mL (n=3 at each level) by plotting the peak area ratio of an analyte/IS using weighted ($1/x^2$) linear least-square regressions. The % of intercept was calculated as $\text{linear coefficient} \times 100 / (\text{angular coefficient} \times \text{xmean})$ and the regression precision as $\text{standard deviation of residues} \times 100 / \text{ymean}$. Within the linearity study, the ratios between the quantifier and qualifier ions were calculated for each compound at each level (n= 24).

The limit of detection (LOD) of the instrument was defined as the lowest concentration of each analyte spiked in a blank oral fluid extract (n = 5) which gave a response of a quantitative ion equal to 3 times the signal-to-noise ratio (S/N), calculated by the instrument software. The limit of quantification (LOQ) of the instrument was defined as before, but considering 10 x S/N. In both cases, the qualitative ion should give a response of at least 2 x S/N. Extraction recovery was determined by comparing the response of the fortified extracted samples (prepared by spiking with the standard solution a blank oral fluid sample before extraction) with the response in samples fortified after extraction, not corrected by internal standard [29]. The extraction recovery was determined at three levels for each compound (n=6 at each level) and used to assess accuracy of the method (bias). The relative standard deviation (RSD) of the data was used to assess intra-day precision (repeatability). The method was satisfactorily validated and considered to be quantitative for compounds for which the mean extraction recovery was within the

range of 50 to 120%, and RSD <20% [30, 31]. LLOQ of the method for each compound was defined as the lowest level for which the method was validated.

Matrix effects were evaluated by two different ways [28]: a) comparing the analyte signal in the solvent with the analyte signal in the oral fluid matrix (pool from 6 volunteers) fortified after extraction, and the result expressed as a percentage of ion suppression or enhancement in comparison to a solvent solution; b) visual observation of the detector response of a continuous post-column infusion (10 μ L/min) of a solvent and in-matrix solution of THC (10 ng/ml), cocaine and diazepam (5 ng/mL).

The stability of the processed samples containing 16 ng/mL analyte concentration arranged in the chromatograph rack at 10 ° C was investigated (n=3). Samples were analyzed at 0, 24, 36, 56 and 68 h after being processed.

2.5. Oral fluid samples

This study is part of a larger project designed to evaluate the use of PAD among drivers on federal highways in Brazil. In this project, oral fluid samples were collected by trained personnel from 3397 drivers on federal highways in all 26 Brazilian states and the Federal District. Samples were collected with the support of the Brazilian Federal Highway Police on Fridays and Saturdays between 12 pm to 12 am, from August 2008 to September 2009. The project was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre. In the present study, 2235 samples of the overall collected samples were analyzed.

Oral fluid (1 mL) samples were collected using a QuantisalTM device that uses a pad with a cotton swab which is placed between the subject's cheek and gum. The cotton pad is transferred to a vial containing buffering solution, then capped, labeled, and transferred to the laboratory in containers with temperature monitored at approximately 5°C no more than 2 days after sample collection. Blank oral fluid samples were obtained using the same procedure for non-drug user volunteers. The samples were not further weight before analysis.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

Table 1 shows the precursor and product ions, fragmentation and optimized ionization conditions, ion ratios and chromatographic retention times of the 32 PADs and metabolites analyzed in this study. The ratios between the quantifier and qualifier ions (IR) were generally stable among the runs and at the different concentration levels, with RSD lower than 15% in most cases (n=24), and morphine showing the greatest variation (19.1%). The method was shown to be selective under the chromatographic conditions, with no significant interferences from endogenous components at the retention times of the analyzed compounds.

For all compounds, linearity using $1/x^2$ weighted linear regression was satisfactory from 0.5 to 20 ng/mL ($R^2 = 0.9942$ to 0.9995), with % of intercept ranging from -0.1 to 6.7, and regression precision ranging from 1.8 to 5.9 %. The ion chromatograms are shown in Figure 1. Low signal intensities were obtained for THC and cannabinal. The chromatographic run lasted 22 min (methanol/acetonitrile mobile phase, 0.3 mL/min), longer than that used by Øiestad et al. [21] also for 32 compounds at the same flow rate using acetonitrile as mobile phase (<10 min), but shorter than the method used by Wylie et al. [17] for 22 compounds (29 min, acetonitrile).

Table 2 shows the instrumental and method parameters evaluated in the study. Instrumental LOD was 0.26 or 0.52 ng/mL and instrumental LOQ ranged from 0.52 to 1.3 ng/mL. The method was considered to be quantitative for 24 compounds (extraction recovery ≥ 50 %), including all 11 benzodiazepines, with a LLOQ of 1.3 ng/mL for all compounds except for THC (13 ng/mL). For the other 8 compounds, the extraction recoveries were sufficient only for a semi-quantitative analysis. In general, recoveries were independent of concentration, with the exception of femproporex, heroin and ecgonine methyl-ester (EME) for which recovery decreased significantly at higher levels. RSD was < 20% for all compounds at all spiking levels. Very low extraction recoveries were found for diethylpropion (< 6%) and benzoylecgonine (<1%). Øiestad et al. [21] also found very low recovery for benzoylecgonine (0.2%) using ethylacetate: heptane (4:1) in the LLE at similar concentration levels. Wylie et

al. [17] found a 62% recovery for benzoylecgonine in oral fluid samples at 200 ng/mL after SPE and LC-MS/MS detection; recoveries at lower levels were not reported.

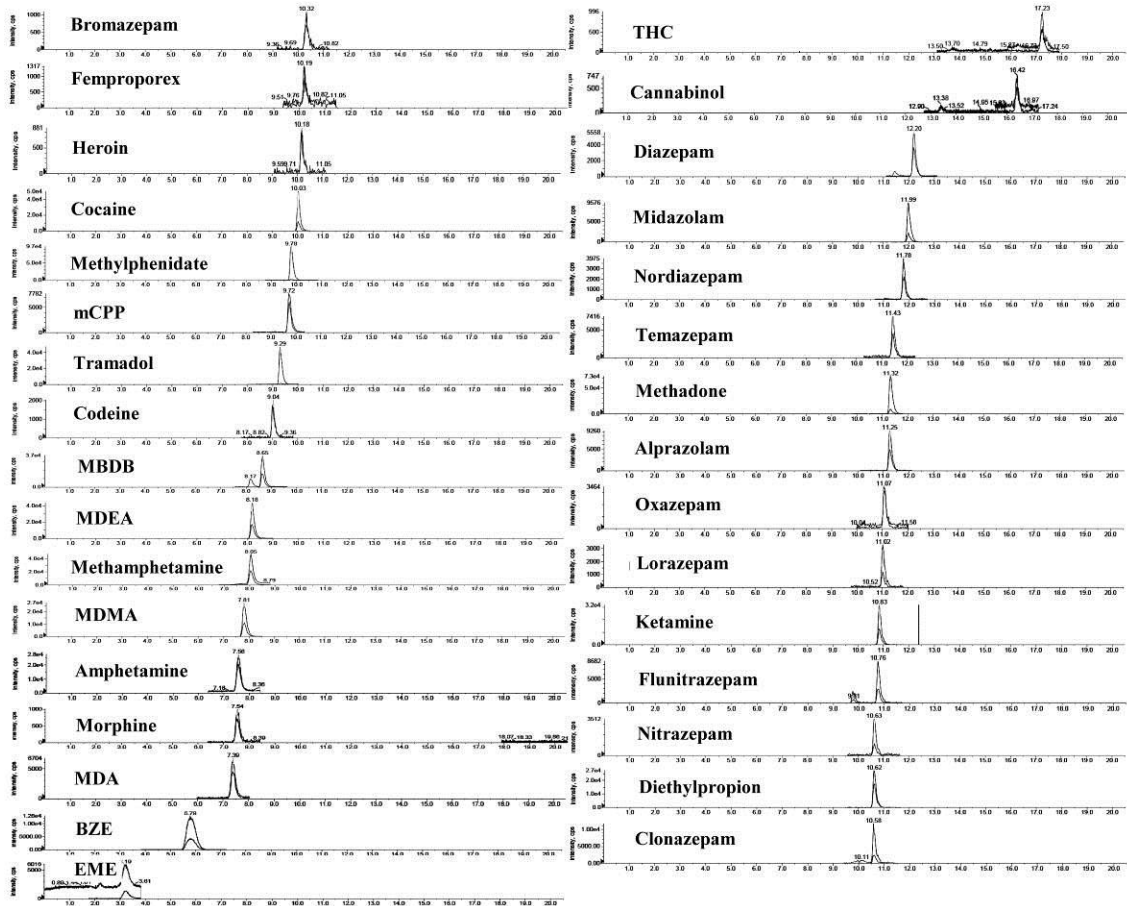


Fig. 1. LC-MS/MS ions chromatograms of a blank oral fluid sample extract spiked at concentration of 0.5 ng/mL. MBDB= n-metyl-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamine; m-CPP=1-(3-chlorophenyl)piperazine; MDA=3,4- methylenedioxy amphetamine; MDEA=methylene dioxyethylamphetamine; MDMA=3,4- methylene dioxymethamphetamine; THC= tetrahydrocannabinol; BZE=benzoylecgonine; EME=ecgonine methyl-ester.

1 **Table 1.** Optimized conditions for LC-MS/MS, precursor and product ions, ion ratio and respective RSD (%), and retention time for
 2 each psychoactive drug and metabolite analyzed.

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) ^a	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CPX (V)	IR average (RSD, %), n=24	RT (min)
<i>Amphetamines and metabolite</i>								
Zolazepam (IS)	287	243	86	51	10	20	-	9.0
Amphetamine	136	<u>91</u> ; 119	80	20; 20	10	06; 08	1.4 (14.2)	7.4
Diethylpropion	206	<u>105</u> ; 100	76	31;33	11	06; 06	1.5 (5.8)	10.4
Femproporex	189	119; <u>91</u>	101	15; 29	11	06; 08	1.0 (16.1)	9.9
MBDB	208	<u>135</u> ; 177	51	25; 17	11	10; 12	2.2 (10.3)	7.6
MDA	180	<u>105</u> ; 133	36	33; 27	11	06; 08	1.5 (16.9)	5.2
MDEA	208	<u>163</u> ; 105	46	19; 35	11	10; 06	2.1 (6.5)	6.7
MDMA	194	<u>163</u> ; 105	51	19; 35	11	10; 06	2.3 (6.7)	5.6
Methamphetamine (METH)	150	119; <u>91</u>	46	17; 25	11	06; 08	1.9 (18.7)	5.9
Methylphenidate	234	<u>84</u> ; 91	46	29; 63	10	06; 14	39.0 (16.7)	9.4
<i>Benzodiazepines</i>								
Zolazepam (IS)	287	243	86	51	11	20	-	9.0
Alprazolam	309	<u>281</u> ; 205	121	37; 59	11	22; 14	1.8 (6.6)	11.0
Bromazepam	318	<u>209</u> ; <u>182</u>	76	37; 47	11	12; 16	1.5 (16.8)	10.1
Clonazepam	316	<u>270</u> ; 214	61	37; 53	11	20; 16	3.8 (18.2)	10.4
Diazepam	285	<u>257</u> ; <u>193</u>	81	31; 45	11	14; 20	1.6 (6.9)	12.0
Flunitrazepam	314	<u>268</u> ; 239	86	37; 49	10	20; 18	2.9 (10.7)	10.7
Lorazepam	321	<u>275</u> ; 229	61	31; 43	11	22; 18	2.9 (15.6)	10.8
Midazolam	326	<u>291</u> ; 249	121	39; 51	11	22; 18	4.6 (5.6)	11.8
Nitrazepam	282	<u>236</u> ; 180	111	35; 53	11	18; 14	3,0 (10.4)	10.4
Nordiazepam	271	165; <u>140</u>	86	41; 41	11	10; 12	1.7 (12.6)	11.5
Oxazepam	287	269; <u>241</u>	71	21; 33	11	16; 20	1.2 (17.9)	10.9
Temazepam	301	283; <u>255</u>	71	21; 31	11	20; 22	2.0 (13.4)	11.2
<i>Cannabinoids</i>								
Zolazepam (IS)	287	243	86	51	11	20	-	9.0

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) ^a	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CPX (V)	IR average (RSD, %), n=24	RT (min)
Cannabinol	311	<u>223</u> ; 293	81	31; 25	11	12; 24	2.5 (12.1)	16.4
Tetrahydrocannabinol	315	<u>193</u> ; 259	71	33; 27	11	15; 18	2.3 (13.9)	17.0
<i>Cocaine and metabolites</i>								
Atropine (IS)	291	124	81	35	11	8	-	7.0
Cocaine	304	<u>182</u> ; 82	71	27; 45	11	12; 04	4.8 (4.6)	9.7
Benzoylcegonine (BZE)	290	<u>168</u> ; 105	61	27; 41	11	12; 06	2.9 (1.2)	5.4
Ecgonine methyl-ester (EME)	200	<u>182</u> ; 82	61	25; 35	11	14; 14	2.2 (9.3)	2.5
<i>Opioids</i>								
Ethyl morphine (IS)	314	152	126	91	11	8	-	9.5
Codeine	300	<u>152</u> ; 115	116	85; 99	11	10; 06	1.2 (9.4)	8.6
Heroin	370	<u>268</u> ; <u>165</u>	101	39; 71	11	12; 16	1.2 (13.7)	9.9
Methadone	310	<u>265</u> ; <u>223</u>	56	21; 31	11	16; 18	8.7 (5.5)	10.8
Morphine	286	<u>152</u> ; 128	116	79; 81	11	10; 08	1.6 (1.6)	6.9
Tramadol	264	<u>246</u> ; <u>58</u>	61	17; 47	11	08; 20	48.4 (17.1)	8.8
<i>Others</i>								
Ketamine	238	<u>125</u> ; 207	36	39; 21	11	08; 12	2.7 (4.7)	10.6
m-CPP	197	<u>154</u> ; 118	71	29; 47	11	10; 08	1.5 (8.2)	8.9

3
4 ^a Quantifier ion underlined; V= Volts; IS= internal standard; DP= declustering potencial (DP); CE= collision energy; EP= entrance
5 potential; CXP= collision cell exit potential; IR= ratio between the quantifier and qualifier ions; RSD= relative standard deviation;
6 RT= retention time; MBDB= n-metyl-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamine; MDA=3,4- methylenedioxyamphetamine; MDEA=
7 methylene dioxyethylamphetamine; MDMA=3,4- methylenedioxyamphetamine; m-CPP=1-(3-chlorophenyl) piperazine

Table 2. Instrumental limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), extraction recovery, and intra-day precision (RSD) obtained from fortified blank oral fluid samples (n=6 at each level). All concentrations are related to the oral fluid sample

Analyte	Instrumental, ng/mL		Extraction recovery (RSD), %		
	LOD	LOQ	1.3 ng/mL	13 ng/mL	52 ng/mL
Quantitative analysis					
Amphetamines					
MBDB	0.26	0.65	66.6 (6.7)	77.1 (7.7)	64.0 (8.9)
MDA	0.26	0.65	58.7 (7.5)	60.1 (7.0)	50.8 (2.7)
MDEA	0.26	0.52	74.2 (4.0)	83.5 (9.2)	67.1 (1.2)
MDMA	0.26	0.65	67.9 (3.4)	75.3 (9.4)	60.7 (5.2)
Methylphenidate	0.52	1.04	81.9 (9.8)	76.1(7.8)	60.9 (3.6)
Benzodiazepines					
Alprazolam	0.26	0.52	83.8 (10.7)	92.9 (3.5)	77.1 (3.9)
Bromazepam	0.26	0.65	119 (7.0)	92.2 (10.0)	76.5 (11.1)
Clonazepam	0.26	0.65	101 (14.8)	96.1 (3.8)	77.3 (2.4)
Diazepam	0.26	0.52	95.6 (7.8)	94.0 (5.3)	80.4 (4.1)
Flunitrazepam	0.26	0.65	79.5 (6.5)	93.9 (7.4)	82.7 (3.3)
Lorazepam	0.52	0.78	83.1 (11.6)	92.9 (3.5)	75.3 (4.0)
Midazolam	0.26	0.52	79.1 (4.8)	87.5 (3.1)	79.2 (4.4)
Nitrazepam	0.52	1.04	86.7 (11.3)	95.7 (6.1)	79.8 (4.2)
Nordiazepam	0.52	1.3	81.3 (6.6)	94.8 (7.1)	80.6 (5.0)
Oxazepam	0.26	0.65	77.1 (10.3)	92.7 (4.5)	78.8 (4.5)
Temazepam	0.26	0.65	81.7 (4.3)	87.2 (9.3)	79.4 (7.8)
Cannabinoids					
THC	0.52	1.04	44.8 (12.9)	57.0 (7.2)	62.5 (9.9)
Cannabinol	0.52	1.3	54.3 (6.0)	74.2(5.5)	66.0 (8.3)
Cocaine	0.26	0.52	94.9 (7.2)	95.1 (6.1)	81.6 (8.9)
Opioids					
Codeine	0.26	0.65	96.4 (2.7)	84.0 (6.7)	71.4 (2.8)
Methadone	0.26	0.65	85.9 (5.8)	94.3 (6.6)	82.4 (2.8)
Tramadol	0.52	0.65	96.4 (2.5)	89.1 (7.6)	73.5 (2.3)
Others					
Ketamine	0.26	0.52	56.8 (3.9)	63.5 (3.7)	48.7 (3.5)
m-CPP	0.26	0.65	53.9 (3.6)	62.1 (2.9)	55.1 (1.9)
Semi-quantitative analysis					
Amphetamines					
Amphetamine	0.26	0.65	40.4 (9.8)	44.0 (10.6)	37.0 (4.8)
Diethylpropion	0.26	0.52	5.8 (19.2)	2.2 (16.6)	2.4 (11.1)
Femproporex	0.65	1.3	78.2 (5.3)	63.2 (11.4)	41.9 (12.4)

Analyte	Instrumental, ng/mL		Extraction recovery (RSD), %		
	LOD	LOQ	1.3 ng/mL	13 ng/mL	52 ng/mL
METH	0.52	1.04	39.0 (7.9)	40.4 (15.3)	28.3 (6.7)
Cocaine metabolites					
Benzoilecgonine	0.26	0.65	0.45 (12.0)	1.6 (18.9)	0.56 (12.2)
Ecgonine methyl ester	0.65	1.3	52.7 (12.2)	21.1 (12.0)	14.2 (13.7)
Opioids					
Heroin	0.26	0.65	105 (6.8)	63.6 (8.8)	49.9 (15.0)
Morphine	0.65	1.04	43.4 (7.8)	40.6 (10.7)	35.1 (3.0)

MBDB=n-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine; MDA=3,4-methylenedioxyamphetamine; MDEA=methylenedioxyethyl amphetamine; MDMA=3,4-methylenedioxymethamphetamine;m-CPP=1-(3-chlorophenyl) piperazine

Figure 2 shows the matrix effects of each analyte in the oral fluid extract spiked at the 5 ng/mL level. With exception of flunitrazepam and clonazepam, there was a depletion of the response in all cases due to the matrix, which reached 20% for most compounds. Ion suppression was greater for EME and diethylpropion (> 60%, in average). RSD (n=6) of the analyte response in-matrix was <12% in all cases, except for EME (28%). Ion suppression was 38.6% for THC, an effect that is illustrated in Figure 3.

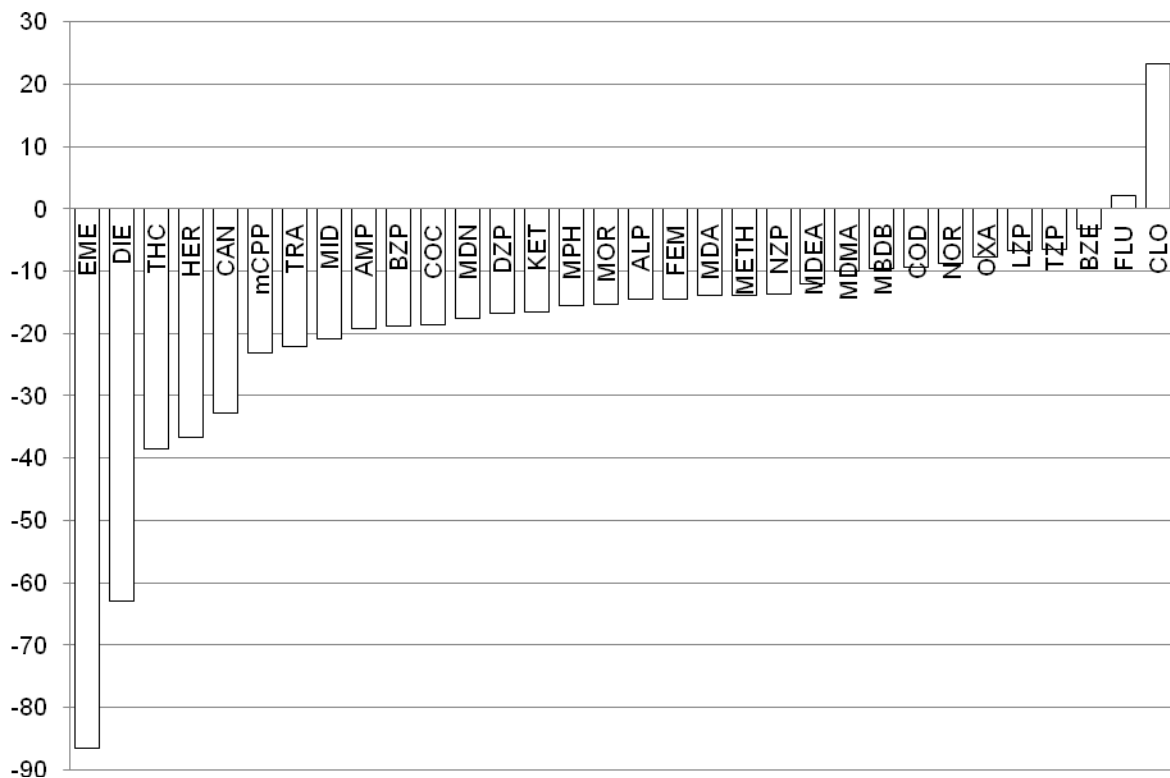


Fig. 2. Matrix effect of PADs and metabolites in oral fluid, in % suppression or enhancement related to the solvent standard solution (mean, n=6). AMP=amphetamine; ALP= alprazolam BZE=benzoylecgonine; BZP= bromazepam; CAN= canabinol; CLO= clonazepam; COC=cocaine; COD= codeine; DZP= diazepam; DIE= diethylpropion; EME=ecgonine methyl-ester; FEM= femproporex; FLU=flunitrazepam; HER=heroin; KET= ketamine; LRZ=lorazepam; MBDB=n-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamine; m-CPP=1-(3-chlorophenyl)piperazine; MDA=3,4-methylenedioxy amphetamine; MDEA=methylene dioxyethylamphetamine; MDMA=3,4- methylene dioxymethamphetamine; METH= methamphetamine; MDN=methadone; MPH= methylphenidate; MOR= morphine; MID=midazolam; NZP=nitrazepam; NOR= nordiazepam; OXA=oxazepam; TZP= temazepam; THC= tetrahydrocannabinol; TRA= tramadol

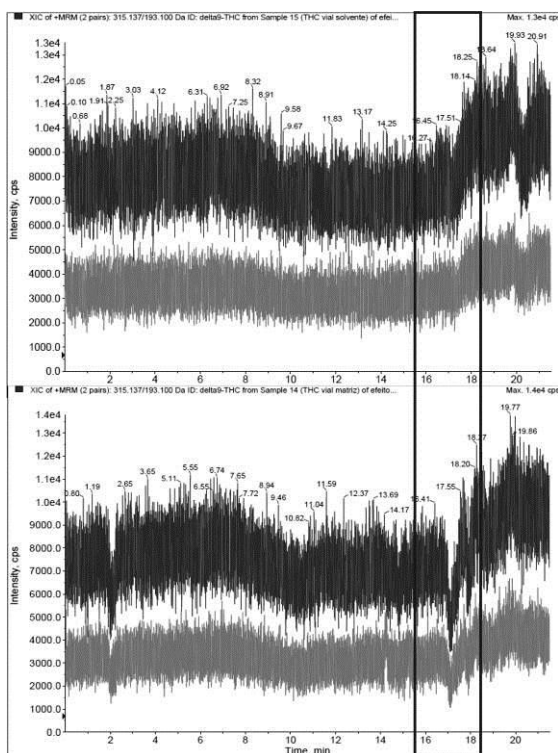


Fig. 3. Ion suppression for THC at 17 min retention time (upper insert in solvent and lower insert in matrix, showing);

Suppression or enhancement of the analyte response in LC-MS/MS is normally due to the presence of stabilizers and preservatives present in the sample collection device, and to proteins present in the matrix [19]. Although fewer matrix effects are expected in cleaner samples, Dams et al. [32] observed no signal suppression for morphine in oral fluid collected with a Salivette® after a simple dilution step, and 10–15% ion suppression after SPE extraction; protein precipitation resulted in suppression of 50–70% in some areas of the chromatogram. After direct injection of diluted spiked oral fluid samples, Wood et al. [19] found the most dramatic signal suppression effect for morphine and 6-AM (68–87%), as well as codeine, amphetamine and MDA (33–67%). Concheiro et al [26] obtained a large matrix suppression effect for amphetamines (46.2 to 70.7%) even after SPE clean-up. In our study, we used an in-matrix standard curve for the quantification of all investigated analytes to compensate for matrix effects. The stability study has shown that processed samples can be stored at 10 oC for up to 36 hours before being analyzed (at least 80% remaining, Figure 4).

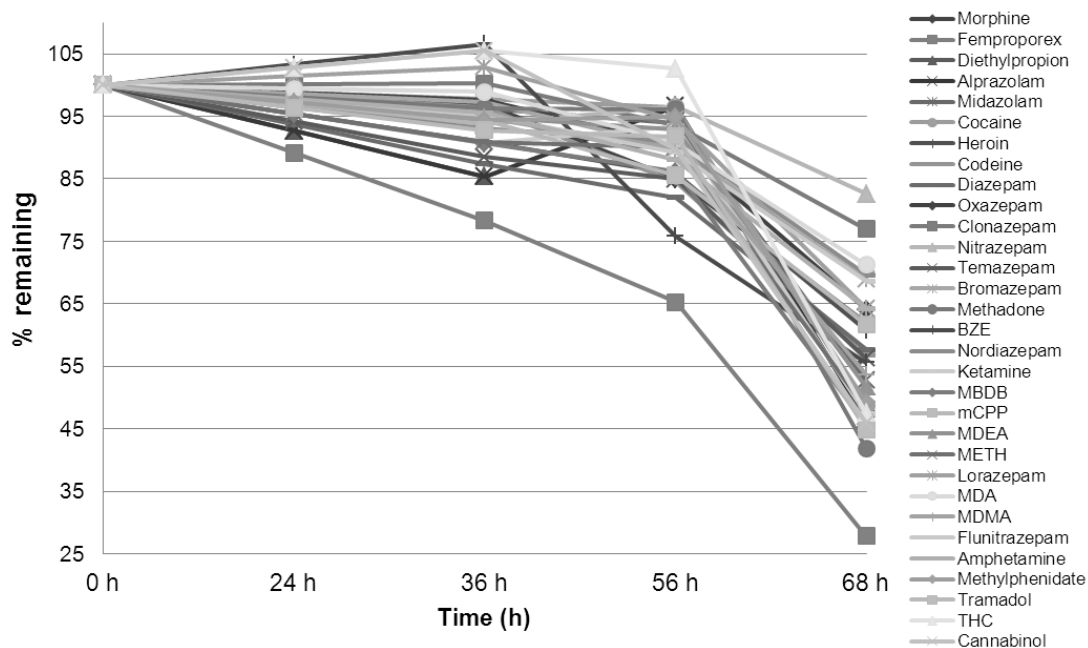


Fig. 4. Stability of processed sample extract at 16 ng/mL, calculated as a percentage of the peak area response remaining after 0, 24, 36, 56 and 68 h of extraction (n=3 each time); BZE= benzoylecgonine; MBDB= n-metyl-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamine; MDA= 3,4- methylenedioxyamphetamine; MDEA= methylene dioxyethylamphetamine; MDMA=3,4- methylenedioxymethamphetamine; METH= methamphetamine; m-CPP=1-(3-chlorophenyl) piperazine; THC= tetrahydrocannabinol.

To the best of our knowledge, this is the first multiclass LC-MS/MS analytical method developed for PADs in oral fluid that includes methylphenidate, diethylpropion, femproporex and m-CPP. Souza et al. (2011) developed a GC/MS method for the analysis of five amphetamines in oral fluid that include methylphenidate, femproporex and diethylpropion. The commercial immunoassays usually applied on roadside surveys with oral fluid are not able to detect these three compounds, even at high concentrations [33, 34].

3.2. Samples analyzed

Oral fluid samples obtained from 2235 drivers on federal highways in 24 of the 26 Brazilian states and the Federal District were analyzed. About 95% of the drivers were men, and were 18 to 80 years of age (mean age: 37.1 years \pm 11.2). About half

of them were driving automobiles (50.5%), 29.6% motorcycles, 10.8% busses and 9.1% trucks.

About 10% of the samples (236 samples) were positive (\geq LOD) for at least one of the 32 analytes investigated, alone or in combination with a metabolite or other drugs. Eleven analytes were not detected ($<$ LOD) in any of the samples analyzed (MBDB, MDA, MDEA, flunitrazepam, midazolam, oxazepam, temazepam, heroine, methadone, ketamine and m-CPP). Table 3 summarizes the results of the 236 positive samples. Concentration was given only to those compounds which were quantitatively analyzed (see Table 2).

Table 3. Prescription and illicit psychoactive drugs detected (\geq LOD) in oral fluid samples collected from Brazilian drivers (N=2235 samples)

Analyte	Samples detected	% positive samples	% total samples	Range, ng/mL
Amphetamines and metabolites ^a	60	25.4	2.7	
Only amphetamine (AMP)	10	4.2	0.4	-
Only diethylpropion	3	1.3	0.1	-
Only femproporex	1	0.4	0.0	-
Only methylphenidate (MPH)	19	8.1	0.9	3.0 - 18.2
Only MDMA	1	0.4	0.0	2.6
Methylphenidate/AMP	2	0.8	0.1	10.4 - 22.5 / -
Femproporex/AMP	18	7.6	0.8	-
Femproporex/diethylpropion/AMP	3	1.3	0.1	-
Femproporex/METH/AMP	1	0.4	0.0	-
Femproporex/MPH/AMP	2	0.8	0.1	- / 3.7 - 19.1 / -
Benzodiazepines	20	8.5	0.9	
Only alprazolam	5	2.1	0.2	1.3 - 3.5
Only clonazepam	2	0.8	0.1	1.4 - 1.6
Only diazepam	3	1.3	0.1	^b - 2.2
Only lorazepam	1	0.4	0.0	2.5
Only nitrazepam	1	0.4	0.0	8.9
Only nordiazepam	2	0.8	0.1	^b
Diazepam/nordiazepam	2	0.8	0.1	^b - 1.3 ^c
Diazepam/lorazepam	2	0.8	0.1	^b - 13.0 / 4.1 - 11.0
Diazepam/alprazolam	1	0.4	0.0	1.5 / 2.9
Diazepam/bromazepam/lorazepam	1	0.4	0.0	^b / 2.1 / 31.7
Cocaine and metabolites	112	47.5	5.0	
Only cocaine	48	20.3	2.1	^b - 1165
Only EME	4	1.7	0.2	-

Analyte	Samples detected	% positive samples	% total samples	Range, ng/mL
BZE/EME	1	0.4	0.0	-
Cocaine/EME	5	2.1	0.2	^b - 9.2 / -
Cocaine/BZE	28	11.9	1.3	^b - 9.6 / -
Cocaine/BZE/EME	26	11.0	1.2	^b - 915 / - / -
Cannabinoids	18	7.6	0.8	
Only THC	9	3.8	0.4	^b - 65.5
Only cannabinoil	5	2.1	0.2	^b - 7.8
THC/cannabinoil	4	1.7	0.2	^b - 5.0 / ^b - 1.3
Opioids	4	1.7	0.2	
Only codeine	2	0.8	0.1	^b - 3.3
Only morphine	1	0.4	0.0	-
Only tramadol	1	0.4	0.0	2.6
Drug combination from different classes	22	9.3	1.0	
Cocaine/THC/cannabinoil	2	0.8	0.1	^b - 49.4 / ^b - 20.2 / 7.8 - 14.5
Cocaine/cannabinoil	2	0.8	0.1	^b - 5.6 / ^b -
Cocaine/clonazepam	2	0.8	0.1	1.45 - 6.2 / ^b - 1.3
Cocaine/THC	1	0.4	0.0	2.4 / ^b
Cannabinoil/EME	1	0.4	0.0	^b / -
Cocaine/AMP	1	0.4	0.0	650 / -
Cocaine/bromazepam	1	0.4	0.0	^b / 3.8
Cocaine/diazepam	1	0.4	0.0	6.45 / ^b
Cocaine/diethylpropion	1	0.4	0.0	141 / -
Cocaine/femproporex	1	0.4	0.0	135 / -
Cocaine/MPH	1	0.4	0.0	^b / 18.8
Cocaine/morphine	1	0.4	0.0	4.6 / -
Cocaine/tramadol	1	0.4	0.0	2.6 / 0.9
AMP/codeine	1	0.4	0.0	7.4 / -
Femproporex/bromazepam	1	0.4	0.0	- / 4.0
Femproporex/tramadol	1	0.4	0.0	- / 93.1
MPH/alprazolam	1	0.4	0.0	21.7 / 2.8
AMP/clonazepam/diazepam	1	0.4	0.0	- / ^b / 1.6
Cocaine/alprazolam/diazepam	1	0.4	0.0	1.4 / 1.65 / 1.9
Total of positive samples	236	100	10.6	

METH=methamphetamine; MDMA=3,4-methylenedioxymethamphetamine;^a Femproporex, METH and MDMA metabolize to AMP (Cone et al., 2007); ^b >LOD < LLOQ; ^c expressed as diazepam.

Amphetamines and metabolites were found in 69 samples (9 samples with drugs of other classes), corresponding to 3.1% of all samples analyzed (29.2% of positive samples). Amphetamines used as appetite suppressants such as femproporex and diethylpropion are subject to abuse and illicit traffic, being under international control since 1971 [35]. In Brazil, femproporex and diethylpropion were prohibited in 2011 [36], and currently only methylphenidate and lisdexamphetamine are legally prescribed in the country, the latter registered in 2011. Most of the amphetamine detected in the samples analyzed is likely the metabolite of other amphetamine drugs analyzed (femproporex, MDMA or METH; [37]). Amphetamine alone was detected in 10 oral fluid samples (~2-190 ng/mL), femproporex alone in one sample (~4 ng/mL), and femproporex plus amphetamine detected in 24 samples, of which 1 also had METH, 2 methylphenidate and 3 diethylpropion (Table 3). A semi-quantitative analysis showed that in 18 of these 24 samples, amphetamine levels were higher (~6 to 1500 ng/mL) than those for femproporex (~2 – 800 ng/mL) (AMP/FEM ~ 1.2 - 21). Assuming that all amphetamine detected in these samples came from the use of femproporex, and according to the pharmacokinetics study conducted by Comiran et al.[38], it is most likely that individuals had taken femproporex more than 4 hours before the oral fluid samples were collected. Peak femproporex concentrations in oral fluid occur between 1 and 1.5 hours after administration (70.7 - 227.5 ng/mL) and that of amphetamine between 1.5 and 4 hours (33.0–150.9 ng/mL) [38].

Benzodiazepines were detected in 28 samples (8 samples with drugs of other classes), corresponding to 1.3 % of all samples and 11.9% of positive samples. Diazepam was the most detected benzodiazepine (39.3% of the positive samples containing this class), but lorazepam was found at the highest level (31.7 ng/mL). Cocaine and metabolites were detected in most positive samples (129, 54.7%), corresponding to 5.8% of all samples, and in 77.2% of the 22 samples containing drugs from different chemical classes. Cocaine levels reached 165 ng/mL, lower than the levels found by Wylie et al. [17] in oral fluid samples from English drivers (4-11110 ng/mL, mean of 1001 ng/mL). THC and/or cannabinal were found in 24 samples (1.1% of all samples, 10.2% of positive samples), from which six samples with cocaine or its metabolite EME. Opioids were found in 8 samples (0.4% of all

samples, 3.4% of positive samples), half in combination with drugs from other classes.

A national survey conducted in 2005 by the Brazilian Information Center on Psychotropic Drugs (CEBRID) estimated that 1.9% of the 7939 interviewed individuals (12 years or older) declared having used cannabis in the last month, 1.3% benzodiazepines, 0.5% cocaine/crack, 0.3% amphetamines and 0.3% opiates [39]. The results found in our study show that benzodiazepines (alone or in combination) and opioid use by Brazilian highway drivers reflects the use by the general population. However, the use rate of cocaine and amphetamines by the drivers in this study was higher than that by the general population. These drugs are stimulants of the central nervous system, delivering to the driver the desired effect of decreased fatigue, increased alertness, and combating sleep [40]. These results were also higher than those found by Yonamine (2004) in the state of São Paulo, where 1.2 % of the 559 oral fluid samples from truck drivers were positive for amphetamines or cocaine. In a recent study conducted in the Brazilian Southeast region, 9.3% of the 456 urine samples from truck drivers were positive for PAD, with 5.8% positive for amphetamine, mainly femproporex, 2.2 % for cocaine and 1.1% for cannabis [12].

The prevalence of driving under the influence of drugs has been demonstrated in several studies worldwide, showing a different profile from what is found in Brazil. In Australia, a study conducted with 853 oral fluid samples found a much higher incidence of positive samples, with 14% for opioids/metabolites, 8% for cocaine/metabolites, 8% for benzodiazepines and 1.5% of ketamine [24]. In the United States, the national roadside survey conducted in 2007 with 7719 oral fluid samples showed THC (8.6%) and cocaine (3.9%) the most commonly detected drugs in nighttime drivers [41]. Gjerde et. al [42] found a higher prevalence of benzodiazepines, diazepam/nordiazepam and codeine in samples collected on working days as compared with weekend samples in Norway. In our study, due to logistic and safety issues, sample collection took place only on Fridays and Saturdays (12 pm to 12 am), so this comparison could not be performed.

Considering amphetamine a metabolite of legal amphetamines, illicit drugs (MDMA, methamphetamine, cocaine and cannabinoids) were present in 7.7% of all samples analyzed in our study, 72.9% of positive samples. In Norway, the profile was

inverse, with three times more samples containing prescribing drugs (3.4%) than illicit drugs (1.1%; THC, amphetamines and cocaine) [42].

The results shown in Table 3 should be interpreted critically against the limitations of the analytical method developed in this study, mainly regarding the low recovery for some analytes, such as diethylpropion and benzoylecgonine (less than 6% recovery), which might have led to an underestimation of the number of positive samples. Another limitation was the lack of 6-acetylmorphine, the specific metabolite of heroin [37], although the prevalence of this illicit drug in Brazil is not significant [39]. This study also did not include the crack pyrolysis products anhydroecgonine and anhydroecgonine methyl-ester in the method, which would enable the detection of crack users. The widespread use of crack cocaine has become a public health issue in Brazil in recent years [43, 44].

4. Conclusion

Obtaining a good recovery for analytes from different chemical classes while maintaining good sensitivity is a challenge that most authors have encountered in method development. This paper described a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 32 compounds (amphetamines, benzodiazepines, cocaine, cannabis, opioids, ketamine and m-CPP and their respective metabolites) in oral fluid samples. The method proved to be simple and useful for the analysis of a large amount of samples, and showed to be quantitative for 24 compounds, including all benzodiazepines and cocaine. This is first oral fluid LC-MS/MS method to include femproporex, diethylpropion and m-CPP. About 10% of the 2235 oral fluid samples collected from Brazilian drivers showed to be positive for at least one drug investigated, mostly from cocaine and amphetamine users. The results indicate a need for preventive measures aimed at reducing the use of psychoactive drugs by drivers in Brazil, which will certainly have a positive impact on decreasing the country's highway death rates.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian Secretariat for Drug and Alcohol Policies (SENAD/Brazil), under the project MED/SENAD #2929-7 and Research Incentive Fund and Events (FIPE/HCPA). This study was funded by the National Secretariat for Drug and Alcohol Policies, under grant #004/2007. We also thank the Aché (Guarulhos, SP, Brazil), Novartis (Resende, RJ, Brazil) and the Brazilian National Institute of Criminology for the donation of drug standards.

References:

- [1] United Nations. International Narcotics Control Board - World Drug Report (2010). Vienna, Austria: 2011.
- [2] F.J. Alvarez, I. Fierro, M.C. Del Rio, Cannabis and driving: Results from a general population survey, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 111-116.
- [3] I.M. Bernhoft, A. Steentoft, S.S. Johansen, N.A. Klitgaard, L.B. Larsen, L.B. Hansen, Drugs in injured drivers in Denmark, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 181-189.
- [4] O.H. Drummer, J. Gerostamoulos, H. Batziris, M. Chu, J. Caplehorn, M.D. Robertson, P. Swann, The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes, *Accid. Anal. Prev.* 36 (2004) 239-248.
- [5] H. Gjerde, P.T. Normann, A.S. Christophersen, S.O. Samuelsen, J. Morland, Alcohol, psychoactive drugs and fatal road traffic accidents in Norway: A case-control study, *Accid. Anal. Prev.* 43 (2011) 1197-1203.
- [6] M.C. Senna, M. Augsburg, B. Aebi, T.A. Briellmann, N. Donze, J.L. Dubugnon, P.X. Iten, C. Staub, W. Sturm, K. Sutter, First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland, *Forensic Sci. Int.* 198 (2010) 11-16.
- [7] R. De Boni, M.C. Bozzetti, J. Hilgert, T. Sousa, L. Von Diemen, D. Benzano, G. Menegon, B. Holmer, P.d.C.A.V. Duarte, F. Pechansky, Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil, *Accid. Anal. Prev.* 43 (2011) 1408-1413.
- [8] J.C.P. Souza, T.; Reimão, R., Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers., *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 63 (2005) 925-930.
- [9] E.C.N. Nascimento, E.; Silva, J. P. Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada, *Rev. Saude Publica* 41 (2007) 290-293.
- [10] O.A. Silva, J.M.D. Greve, M. Yonamine, V. Leyton, Drug use by truck drivers in Brazil, *Drugs-Education Prevention and Policy* 10 (2003) 135-139.
- [11] M. Yonamine. The oral fluid as a biological specimen to monitor the use of alcohol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and marijuana by professional drivers: University of São Paulo; 2004.
- [12] V. Leyton, D.M. Sinagawa, K.C.B.G. Oliveira, W. Schmitz, G. Andreuccetti, B.S. De Martinis, M. Yonamine, D.R. Munoz, Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil, *Forensic Science International*

- [13] IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics - Sustainable Development Indicators Brazil 2010. 07 Jan 2010: [Available from: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1703&id_pagina=1].
- [14] V. Vindenes, H.M.E. Lund, W. Andresen, H. Gjerde, S.E. Ikdahl, A.S. Christophersen, E.L. Øiestad, Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers, *Forensic Sci. Int.*
- [15] N. Samyn, G. De Boeck, A.G. Verstraete, The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers, *Journal of Forensic Sciences* 47 (2002) 1380-1387.
- [16] S.W. Toennes, G.F. Kauert, S. Steinmeyer, M.R. Moeller, Driving under the influence of drugs - evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms, *Forensic Sci. Int.* 152 (2005) 149-155.
- [17] F.M. Wylie, H. Torrance, A. Seymour, S. Buttress, J.S. Oliver, Drugs in oral fluid: Part II. Investigation of drugs in drivers, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 199-204.
- [18] O.H. Drummer, D. Gerostamoulos, M. Chu, P. Swann, M. Boorman, I. Cairns, Drugs in oral fluid in randomly selected drivers, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 105-110.
- [19] M. Wood, M. Laloup, M.d.M.R. Fernandez, K.M. Jenkins, M.S. Young, J.G. Ramaekers, G.D. Boeck, N. Samyn, Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 227-238.
- [20] P. Kintz, M. Villain, M. Concheiro, V. Cirimele, Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 213-220.
- [21] E.L. Øiestad, U. Johansen, A.S. Christophersen, Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clinical Chemistry* 53 (2007) 300-309.
- [22] R. Dams, R.E. Choo, W.E. Lambert, H. Jones, M.A. Huestis, Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients, *Drug and Alcohol Dependence* 87 (2007) 258-267.
- [23] M. Sergi, E. Bafile, D. Compagnone, R. Curini, D. D'Ascenzo, F.S. Romolo, Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 709–718.
- [24] M. Chu, D. Gerostamoulos, J. Beyer, L. Rodda, M. Boorman, O.H. Drummer, The incidence of drugs of impairment in oral fluid from random roadside testing, *Forensic Sci. Int.* 215 (2012) 28-31.
- [25] H. Teixeira, P. Proença, A. Verstraete, F. Corte-Real, D.N. Vieira, Analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 205-211.

- [26] M. Concheiro, A. de Castro, Ó. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla, Confirmation by LC–MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing, *Forensic Science International* 170 (2007) 156-162.
- [27] AAFS, SOFT. Forensic Toxicology Laboratory Guidelines. www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf: Society of Forensic Toxicologists Inc and by the American Academy of Forensic Sciences - Toxicology Section, 2006.
- [28] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019-3030.
- [29] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216-224.
- [30] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 535-552.
- [31] A. Gustavo González, M. Ángeles Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 227-238.
- [32] R. Dams, M.A. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy, Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14 (2003) 1290-1294.
- [33] D.Z. Souza, P.O. Boehl, E. Comiran, D.S. Prusch, I. Zancanaro, A.M. Fuentefria, F. Pechansky, P.C.A.V. Duarte, R.B. De Boni, P.E. Fröhlich, R.P. Limberger, Which Amphetamine-Type Stimulants Can Be Detected by Oral Fluid Immunoassays?, *Therapeutic Drug Monitoring* 34 (2012) 98-109 10.1519/JSC.1510b1013e3181bde1512cf.
- [34] G. Cooper, L. Wilson, C. Reid, C. Hand, V. Spiehler, Validation of the Cozart® Amphetamine Microplate EIA for the analysis of amphetamines in oral fluid, *Forensic Sci. Int.* 159 (2006) 104-112.
- [35] United Nations. Convention on psychotropic substances. Vienna, Austria: International Narcotics Control Board INCB, 1971.
- [36] Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC N°52, de 6 de outubro de 2011, (2011).
- [37] E.J. Cone, M.A. Huestis, Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse, *Oral-Based Diagnostics* 1098 (2007) 51-103.
- [38] E. Comiran, D.Z. Souza, P.O. Boehl, K.d. Cássia Mariotti, F. Pechansky, P.d.C.A.V. Duarte, R.B. De Boni, P.E. Fröhlich, R.P. Limberger, Fenproporex and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid After Controlled Oral Administration of Fenproporex, *Therapeutic Drug Monitoring Publish Ahead of Print* (2012) 10.1097/FTD.1090b1013e318263c318266c318265.
- [39] E.A. Carlini, J.C.F. Galduróz, A.A.B. Silva, A.R. Noto, A.M. Fonseca, C.M. Carlini, L.G.O. Oliveira, S.A. Nappo, Y.G. Moura, Z.V.M. Sanchez. II Levantamento

domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005. São Paulo: CEBRID/UNIFESP; 2006. 468 p. p.

[40] J. Ramaekers, A. Knoche, H. Schulze. Effects of stimulant drugs on actual and simulated driving. Web: Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines (DRUID), 2011.

[41] R. Compton, A. Berning. Results of the 2007 National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers. Washington, DC: National Highway Traffic Safety Administration (NHTSA), NHTSA's National Center for Statistics and Analysis, 2009.

[42] H. Gjerde, P.T. Normann, B.S. Pettersen, T. Assum, M. Aldrin, U. Johansen, L. Kristoffersen, E.L. Oiestad, A.S. Christophersen, J. Morland, Prevalence of alcohol and drugs among Norwegian motor vehicle drivers: A roadside survey, *Accid. Anal. Prev.* 40 (2008) 1765-1772.

[43] L.B. Duailibi, M. Ribeiro, R. Laranjeira, Profile of cocaine and crack users in Brazil, *Cadernos de Saúde Pública* 24 (2008) 545-557.

[44] EMCDDA. Cocaine and crack cocaine: a growing public health issue. Luxembourg: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Office for Official Publications of the European Communities, 2007.

3.2. Prevalence of psychoactive drug use on a roadside survey of Brazilian drivers

Ivomar Zancanaro^a, Renata Pereira Limberger^b, Flavio Pechansky^c, Raquel De Boni^c, Daniela Benzano Bumaguin^c, Paula Bohel^b, Eloisa Dutra Caldas^{a*}

^a Faculty of Health Sciences, University of Brasília Brasília, DF, Brazil.

^b Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Center for Drug and Alcohol Research, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* **Corresponding author at:** Toxicology Laboratory, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal 70910-900, Brazil. Phone/Fax: 55-61-3107-1871.

E-mail address: eloisa@unb.br

Abstract

A collaborative study was conducted to estimate the weighted prevalence of psychoactive drug use among drivers in Brazil. A total of 3397 oral fluid samples were collected from individuals driving busses, trucks, cars or motorcycles on Federal highways in all State capitals and the Federal District between August 2008 and September 2009. Of this total, 2235 samples were analyzed by high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for the presence of 32 drugs and metabolites (LOD= 0.26-0.52 ng/mL). The prevalence was estimated by multiplying the frequency of positive samples (\geq LOD) in each Brazilian state by the probability (weight) of the vehicle being registered in the same State. Most drivers were men (94.4%) between the ages of 18 to 80 (mean of 37.1 ± 11.2). Approximately 10% of the samples (236) presented at least one analyte investigated. The most prevalent drug class found in the samples was cocaine/metabolites (6.1%), followed by amphetamines (3.2%), benzodiazepines (1.7%), cannabinoids (1.3%), and opioids (0.4%). Amphetamine alone (probably as a metabolite) had a prevalence of 1.7 %, methylphenidate 1.6%, and femproporex 1.0%. Amphetamines were the drugs most used by truck and bus drivers (10.5 and 4.3%, $p < 0.000$). Policymakers need to consider the inclusion of drugs other than alcohol in roadside testing to increase the safety of drivers and passengers on Brazilian highways.

Keywords: Psychoactive drugs, Oral fluid, Drivers, Roadside survey, Brazil.

1. Introduction

The abuse of psychoactive drugs (PSD) is a major global problem, and includes illegal and prescription drugs (UNODC, 2011). Every year, 210 million people use illicit drugs worldwide, mainly cannabis (125 to 203 million people in 2009; annual prevalence from 2.8 to 4.5%). Although the use of heroin and cocaine has remained stable or decreased in recent years, there has been an increase in the use of synthetic and prescription PSDs (UNODC, 2011). For many years, consumption levels of amphetamines in countries on the American continent, including Brazil, have been about three times higher than in any other region of the globe (UNITED NATIONS, 2011). In general, this use is related to prescribed

amphetamines, used primarily as appetite suppressors or to treat attention deficit disorders (Ramaekers et al., 2011).

Brazil is the largest country in South America, with a territorial extension of 8.514.876.000 km², ranking fifth in annual road traffic mortality, with 18 deaths per 100,000 inhabitants [4]. The number of annual road deaths in the country increased by 20% between 1998 and 2008 (from 31,000 to 39,000), with a fourfold increase in cyclist fatalities, and a more than sevenfold leap in motorcycle deaths, with teenagers being the main victims (Bacchieri et al., 2011; Waiselfis, 2011; WHO, 2011).

The increased risk of driving under the influence of drugs (DUID) has been substantially demonstrated in the literature (Longo et al., 2000; Drummer et al., 2003; Mura et al., 2003; Drummer et al., 2004; Appenzeller et al., 2005; Bernhoft et al., 2005; Mura et al., 2006; Alvarez et al., 2007; Bedard et al., 2007; Labat et al., 2008; Elliott et al., 2009; Ingsathit et al., 2009; Senna et al., 2010; Zhuo et al., 2010; Gjerde et al., 2011), mainly in studies conducted in the Northern hemisphere. Some studies have also been conducted in Brazil. In the state of *Mato Grosso do Sul*, 11.1% of 260 truck drivers interviewed declared using amphetamines (diethylpropion and femproporex), 77.1% at least six times a week (Souza, 2005). Sixty-six per cent of 91 truck drivers in the state of *Minas Gerais* reported using amphetamines while driving, after illegally buying them at gas stations or from the transport company; almost one-third of users reported having been involved in traffic accidents while under the influence of amphetamines (Nascimento, 2007). Silva et al. (Silva et al., 2003) found that 5.4% of 728 urine samples from truck drivers in the Northeast, Southeast and South of Brazil contained amphetamine or cocaine, substances which were also found in 1.2% of the 559 oral fluid samples collected randomly from truck drivers on the highways of São Paulo (Leyton et al., 2012).

National data on the use of legal and illegal psychoactive drugs by drivers on Brazilian roads, however, are still lacking. These data are important to establish priorities regarding roadside testing and law enforcement, and are required by government authorities and policymakers. This paper describes a collaborative study that aimed to investigate the prevalence of psychoactive drug use among drivers on federal highways in the 26 state capitals, and the Federal District of Brazil.

Methods

Study design and sampling

In a cross-sectional design, 3,397 drivers crossing the metropolitan areas of all 26 Brazilian State capitals and the Federal District were randomly selected to participate in the study, corresponding to 29.6% of the 214,249 km of paved roads in Brazil (Brasil, 2012). The sample was stratified by type of vehicle - cars, motorcycles, buses and trucks. Collection points were mapped for all State capitals, at distances no greater than 50 km from the geographical center of each capital. Oral fluid samples and driver information were collected between August 8, 2008 and September 26, 2009, on Fridays and Saturdays, between 12 pm and 12 am. Regional, local, and national holidays were excluded. Data were collected by trained personnel following adapted roadside data collection procedures. Trained federal police and federal highway patrol officers were responsible for approaching the drivers. Further details of the study's design are described elsewhere (Fernandes et al., 2010; Pechansky et al., 2010). The study was approved by the Ethics committee of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (n° 07-069).

2.2. Biological Samples

Oral fluid samples were obtained using a collection device (Quantisal™, Immunalysis Corporation, Pomona, CA, USA), which uses a pad placed between the subject's cheek and gum. After collecting 1 mL of oral fluid, the pad was transferred to a vial containing 3 ml of buffering solution, capped and labeled, and transported to the laboratory using containers with temperature monitored at approximately 5°C no more than 2 days after sample collection. Samples were kept in the laboratory at -70°C until analyzed.

2.3. Analysis of oral fluids

From the 3397 oral fluid samples collected within the project, 2235 samples were analyzed by LC-MS/MS (Shimadzu-Applied Biosystems/MDS Sciex 4000QTRAP) system, after extraction with ethyl acetate: hexane (4:3). The method analyzed 32 psychoactive drugs and metabolites: 9 amphetamines, 11

benzodiazepines, tetrahydrocannabinol (THC), cannabiol, cocaine and its metabolites benzoylecgonine and ecgonine methyl-ester, 5 opioids, ketamine and 1-(3-chlorophenyl) piperazine (m-CPP). The instrumental LOD was either 0.26 or 0.52 ng/mL. Details of the method procedure and validation are described elsewhere (Zancanaro et al, 2012)

2.4. Statistical Analyses

Prevalence (weighted) of drug use was estimated by multiplying the frequency of positive sample in each state by the probability (weight) of having a vehicle in this state. The weight was calculated dividing the true probability of the vehicle in each state for the probability of each vehicle type in our sample (Pechansky, 2010). For example, in Amapa state (AP), the probability of a vehicle to be of this state in the overall population of vehicles is 0.002 and the probability of a bus in AP is 0.12. Hence, the true probability of being a bus in AP is $0.002 \times 0.12 = 0.00024$. As there were 13 buses in AP sampled out of the total of 3,397 vehicles, the probability of being a bus in our sample is $13/3,397 = 0.004$. Therefore, the weight for the buses in AP would be $0.00024/0.004 = 0.06$. Chi-squared tests were used to compare categorical variables within the groups and multiple comparisons were performed for percentages. All statistical analyses were performed using the SPSS 16.0 (SPSS Inc., Illinois, USA) software.

3. Results and discussion

Nearly 95% of the 2235 drivers who provided oral fluid samples for this study were men, from 18 to 80 years of age (mean age: 37.1 years \pm 11.2). The majority of drivers (62.2%) had at least high school education. About half were driving automobiles (50.5%), 29.6% motorcycles, 10.8% busses, and 9.1% trucks.

Over 10% of the samples (236 samples) were positive (\geq LOD) for at least one analyte investigated. Eleven analytes were not detected ($<$ LOD) in any of the samples analyzed: the amphetamines MBDB (n-metyl-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamine), MDA (3,4-methylenedioxyamphetamine) and MDEA (methylenedioxyethylamphetamine), the benzodiazepines flunitrazepam, midazolam,

oxazepam and temazepam, the opioids heroin and methadone, and ketamine and m-CPP. In 22 of the 236 positive samples, samples contained drugs from different chemical classes, and 77.3 % contained cocaine/metabolite.

Table 1 shows the prevalence of drug use in the studied population. The samples contained either the drug alone or in combination with other drugs or metabolites. The most prevalent drugs were cocaine and metabolites, with 6.1% [CI 95%: 5-7], followed by amphetamines (3.2%; [CI 95%: 2.5-4.0]). Among the amphetamines, amphetamine, methylphenidate and femproporex had the highest prevalence. Amphetamine is not registered in Brazil and it is not commonly found on the Brazilian illegal market [40]. Its presence in oral fluid samples (1.7% mean prevalence) is most likely to be a metabolite of femproporex, MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) or methamphetamine (Cone and Huestis, 2007). Methylphenidate and femproporex are commonly used by professional drivers in Brazil to keep awake, and are known as *rebites* [22, 23]. The profile of drug use prevalence found in this study among Brazilian drivers is different from what has been found elsewhere. In Norway, the weighted prevalence of alcohol or drug use among over 10,000 drivers was 4.5%, with zopiclone, codeine, diazepam/nordiazepam, THC, and amphetamine the most commonly detected drugs in oral fluid samples [30]. In the USA, the 2007 National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers showed, based on the oral fluid results, a mean weighted prevalence of 12.2%, with THC, cocaine and methamphetamine the most commonly detected drugs.

Table 1. Drug use prevalence (weighted %) at a 95% confidence interval.

Substance	N	Prevalence (CI 95%)
<i>Cocaine and metabolites</i>	129	6.1 (5.0-7.0)
Cocaine	119	5.7 (4.7-6.7)
Benzoilecgonine	54	2.0 (1.5-2.5)
Ecgonine methyl ester	36	1.7 (1.2-2.3)
<i>Any amphetamine</i>	67	3.2 (2.5-4.0)
Amphetamine	39	1.7 (1.2-2.3)
Femproporex	28	1.0 (0.6-1.5)
Methylphenidate	25	1.6 (1.1-2.2)
Diethylpropion	4	0.3 (0.1-0.6)
3,4methylenedioxymethamphetamine	1	0 (0-0.2)
Methamphetamine	1	0 (0-0.1)
<i>Any benzodiazepine</i>	28	1.7 (1.2-2.3)

Substance	N	Prevalence (CI 95%)
Diazepam	12	0.7 (0.4-1.2)
Alprazolam	8	0.2 (0.1-0.5)
Clonazepam	5	0.3 (0.1-0.6)
Nordiazepam	4	0.4 (0.2-0.7)
Lorazepam	4	0.3 (0.1-0.6)
Bromazepam	3	0.2 (0.1-0.5)
Nitrazepam	1	0.1 (0-0.3)
<i>Any cannabinoid</i>	24	1.3 (0.9-1.8)
Δ9-Tetrahydrocannabinol	16	1.0 (0.6-1.5)
Canabinol	14	0.7 (0.4-1.2)
<i>Any opioid</i>	8	0.4 (0.2-0.7)
Codeine	3	0.2 (0.1-0.5)
Tramadol	3	0.2 (0.1-0.5)
Morphine	2	0 (0-0.1)

^a alone or in combination with other drugs or metabolites.

Drug use prevalence according to driver and vehicle characteristics, and time and place of sampling are shown in Table 3. The prevalence of any drug was not significantly ($p > 0.05$) affected by gender, level of education, or time of sample collection. The age of the driver and the type of vehicle significantly influenced the prevalence of amphetamine, cannabinoid and cocaine use. The prevalence of amphetamine use seemed to be higher for drivers over the age of 25, and of cocaine and cannabinoid for drivers between the ages of 18 and 24. Motorcycle drivers had a higher prevalence of cocaine and cannabinoid use than bus drivers. Benzodiazepine use is higher in the Midwestern region (14.6%), and cannabinoids are higher in the South (7.3%) and Midwestern (5.0%) regions.

DUID detected by oral fluid testing of randomly selected drivers has been investigated in several studies worldwide, but the profiles are different from the one found in Brazil (Concheiro et al., 2007; Drummer et al., 2007; Øiestad et al., 2007; Gjerde et al., 2008; Compton et al., 2009). In the United States [34], the national roadside survey conducted in 2007 with 7719 oral fluid samples showed a higher prevalence of nighttime drivers (14.4%) being drug-positive than daytime drivers (11.0%). In Norway, Gjerde et. al (Gjerde et al., 2008) found a significantly higher prevalence of benzodiazepines, diazepam/nordiazepam and codeine in samples collected on working days as compared with weekend samples. In our study, due to

logistic and safety issues, sample collection took place only on Fridays and Saturdays (12 pm to 12 am), thus this comparison could not be performed.

Table 2. Drug use prevalence (weighted %) according to the driver and vehicle characteristics, and time and place of sampling

Parameters (n unweighted)		Cocaine	Amphetamines	Benzodiazepines	Cannabinoids	Opioids
Gender	Males (n= 2.109)	6.1	3.2	1.6	1.4	0.3
	Females (n= 126)	5.9	3.9	2.0	0.0	1.3
	<i>p value</i>	<i>0.929</i>	<i>0.603</i>	<i>0.726</i>	<i>0.140</i>	<i>0.069</i>
Age	18-25 (n= 291)	10.7 ^a	0.8 ^a	1.6	4.4 ^a	0.0
	25-34 (n= 737)	5.2 ^b	3.5 ^{a,b}	1.7	1.7 ^{a,b}	0.6
	35-44 (n= 609)	6.4 ^{a,b}	4.5 ^b	1.9	0.5 ^{b,c}	0.3
	>45 (n= 598)	5.1 ^b	2.8 ^{a,b}	1.4	0.3 ^c	0.3
	<i>p value</i>	<i>0.008</i>	<i>0.040</i>	<i>0.912</i>	<i><0.000</i>	<i>0.629</i>
Education	Never studied (n=10)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Elementary school (n=672)	6.4	4.1	0.8	0.8	0.3
	Incomplete high school (n= 244)	4.4	5.3	2.2	2.6	0.0
	High school (n= 687)	6.1	2.5	2.4	1.3	0.4
	Incomplete university (n= 222)	6.5	4.6	0.9	2.3	0.9
	University (n= 377)	6.4	1.6	2.1	0.5	0.5
	Professional education (n= 23)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>p value</i>	<i>0.766</i>	<i>0.074</i>	<i>0.342</i>	<i>0.163</i>	<i>0.855</i>	
Vehicles	Buses (n= 241)	3.0 ^a	4.3 ^{a,b}	0.4	0.0 ^a	0.9
	Trucks (n= 207)	4.3 ^{a,b}	10.5 ^a	0.5	1.0 ^{a,b,c}	0.0
	Cars (n= 1.127)	5.9 ^{a,b}	2.7 ^b	2.1	0.8 ^{a,b}	0.3
	Motorcycles (n= 660)	8.2 ^b	1.4 ^b	1.6	3.0 ^c	0.5
	<i>p value</i>	<i>0.027</i>	<i><0.000</i>	<i>0.150</i>	<i><0.000</i>	<i>0.488</i>
Time	Daytime (n= 1.502)	5.8	3.4	1.6	1.4	0.3
	Nighttime (n= 733)	6.6	2.9	1.8	1.2	0.6
	<i>p value</i>	<i>0.470</i>	<i>0.545</i>	<i>0.703</i>	<i>0.812</i>	<i>0.204</i>
Region	Southeast (n= 773)	6.3	3.1	1.7 ^a	0.3 ^a	0.6
	South (n= 138)	5.7	2.8	1.6 ^a	7.3 ^b	0.0

Parameters (n unweighted)	Cocaine	Amphetamines	Benzodiazepines	Cannabinoids	Opioids
Midwest (n= 59)	12.5	2.5	14.6 ^b	5.0 ^{a,b}	0.0
North (n= 576)	4.5	0.8	0.0 ^a	0.7 ^a	0.7
Northeast (n= 689)	5.0	4.7	0.9 ^a	0.9 ^a	0.0
<i>p value</i>	0.359	0.252	<0.000	<0.000	0.449
Total (n = 2.235)	6.1 (5.0-7.0)	3.2 (2.5-4.0)	1.7 (1.2-2.3)	1.3 (0.9-1.8)	0.4 (0.2-0.7)

Data presented in percentages and compared by chi-square test. Multiple comparisons of percentages were conducted.

^{a,b,c}Different letters represent statistically different percentages.

This is the first Brazilian study to provide survey data from a nationwide sample of drivers. In this study, motorcycle and car drivers were positively associated with illicit drugs use when compared to bus and truck drivers, with higher prevalence of amphetamine consumption. Professional drivers usually avoid high alcohol and central nervous system depressant use (i.e. cannabis and benzodiazepines) but tend to use more stimulant drugs to increase alertness, as confirmed by our results. Leyton et al. (Leyton et al., 2012) recently conducted a study in Brazil with urine samples collected from truck drivers (n = 456) and 9.3% (n = 42) that tested positive for drugs; Amphetamines were found in 5.8% (61.9% of positive samples) – with femproporex being the most commonly used drug; while cocaine was found in 2.2%, cannabis in 1.1%, and amphetamine and cocaine in 0.02% of the samples. Truck drivers between the ages of 25 and 34 presented the highest prevalence of drug use.

The current findings of this study must be considered in light of certain methodological limitations: 1) the sample was non-probabilistic; although it was random in nature, it was not possible to generalize the findings for all drivers who drive on Brazilian federal highways; 2) the study was conducted only on federal highways and in close geographical proximity to the State capitals, which may underestimate drug prevalence, since higher prevalence may be found in urban metropolitan areas (Duailibi et al., 2007); 3) although data were collected on days when the prevalence of DUID is typically higher, data was intentionally not collected on holidays (Pechansky et al., 2009). The aforementioned limitations prevented generalizing the findings for the entire population of drivers in the country.

5. Conclusion

The findings of this study may help design drug abuse and driving policies and preventive measures through screening and LC-MS/MS tests, and contribute to reduce large number of accidents and deaths on the country's highways. It seems that the limited enforcement of existing policies is a major barrier to health and safety which may be overcome with additional resources, along with political commitment and public support.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the dozens of members of the Brazilian Federal Highway Patrol, Federal Police, and in particular officers Rubin, Rossy, Getúlio and Uelber (code names) for their efforts in the data collection procedures. This study was funded by the National Secretariat for Drug and Alcohol Policies, under grant #004/2007.

References:

- [1] UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime - World Drug Report 2011. 2011.
- [2] UNITED NATIONS. International Narcotics Control Board - World Drug Report (2010). Report. 2011 Vienna, Austria. Report No.
- [3] J. Ramaekers, A. Knoche, H. Schulze. Effects of stimulant drugs on actual and simulated driving. Web: Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines (DRUID), 2011.
- [4] WHO. Brazil targets drink driving on the road to fewer deaths. web: 2011 0042-9686.
- [5] J.J. Waiselfis. Mapa da Violência - 2011 - os jovens do brasil. São Paulo: Brasília, DF: Ministério da Justiça., 2011.
- [6] G. Bacchieri, A.J.D. Barros, Acidentes de trânsito no Brasil de 1998 a 2010: muitas mudanças e poucos resultados, Rev. Saude Publica 45 (2011) 949-963.
- [7] F.J. Alvarez, I. Fierro, M.C. Del Rio, Cannabis and driving: Results from a general population survey, Forensic Sci. Int. 170 (2007) 111-116.
- [8] B.M.R. Appenzeller, S. Schneider, M. Yegles, A. Maul, R. Wennig, Drugs and chronic alcohol abuse in drivers, Forensic Sci. Int. 155 (2005) 83-90.
- [9] M. Bedard, S. Dubois, B. Weaver, The impact of cannabis on driving, Canadian Journal of Public Health-Revue Canadienne De Sante Publique 98 (2007) 6-11.
- [10] I.M. Bernhoft, A. Steentoft, S.S. Johansen, N.A. Klitgaard, L.B. Larsen, L.B. Hansen, Drugs in injured drivers in Denmark, Forensic Sci. Int. 150 (2005) 181-189.
- [11] O.H. Drummer, J. Gerostamoulos, H. Batziris, M. Chu, J. Caplehorn, M.D. Robertson, P. Swann, The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes, Accid. Anal. Prev. 36 (2004) 239-248.
- [12] O.H. Drummer, J. Gerostamoulos, H. Batziris, M. Chu, J.R.M. Caplehorn, M.D. Robertson, P. Swann, The incidence of drugs in drivers killed in Australian road traffic crashes, Forensic Sci. Int. 134 (2003) 154-162.

- [13] S. Elliott, H. Woolacott, R. Braithwaite, The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: A comparative study of victims, *Science & Justice* 49 (2009) 19-23.
- [14] H. Gjerde, P.T. Normann, A.S. Christophersen, S.O. Samuelsen, J. Morland, Alcohol, psychoactive drugs and fatal road traffic accidents in Norway: A case-control study, *Accid. Anal. Prev.* 43 (2011) 1197-1203.
- [15] A. Ingsathit, P. Woratanarat, T. Anukarahanonta, S. Rattanasiri, P. Chatchaipun, K. Wattayakorn, S. Lim, P. Suriyawongpaisal, Prevalence of psychoactive drug use among drivers in Thailand: A roadside survey, *Accid. Anal. Prev.* 41 (2009) 474-478.
- [16] P. Mura, C. Chatelain, V. Dumestre, J.M. Gaulier, M.H. Ghysel, C. Lacroix, M.F. Kergueris, A. Lhermitte, M. Moulisma, G. Pepin, F. Vincent, P. Kintz, Use of drugs of abuse in less than 30-year-old drivers killed in a road crash in France: A spectacular increase for cannabis, cocaine and amphetamines, *Forensic Sci. Int.* 160 (2006) 168-172.
- [17] P. Mura, P. Kintz, B. Ludes, J.M. Gaulier, P. Marquet, S. Martin-Dupont, F. Vincent, A. Kaddour, J.P. Goulle, J. Nouveau, M. Moulisma, S. Tilhet-Coart, O. Pourrat, Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study, *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 79-85.
- [18] M.C. Senna, M. Augsburg, B. Aebi, T.A. Briellmann, N. Donze, J.L. Dubugnon, P.X. Iten, C. Staub, W. Sturm, K. Sutter, First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland, *Forensic Sci. Int.* 198 (2010) 11-16.
- [19] X.Y. Zhuo, Y. Cang, H. Yan, J. Bu, B.H. Shen, The prevalence of drugs in motor vehicle accidents and traffic violations in Shanghai and neighboring cities, *Accid. Anal. Prev.* 42 (2010) 2179-2184.
- [20] L. Labat, B. Fontaine, C. Delzenne, A. Doublet, M.C. Marek, D. Tellier, M. Tonneau, M. Lhermitte, P. Frimat, Prevalence of psychoactive substances in truck drivers in the Nord-Pas-de-Calais region (France), *Forensic Sci. Int.* 174 (2008) 90-94.
- [21] M.C. Longo, C.E. Hunter, R.J. Lokan, J.M. White, M.A. White, The prevalence of alcohol, cannabinoids, benzodiazepines and stimulants amongst injured drivers and their role in driver culpability - Part II: The relationship between drug prevalence and drug concentration, and driver culpability, *Accid. Anal. Prev.* 32 (2000) 623-632.
- [22] J.C.P. Souza, T.; Reimão, R. , Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers., *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 63 (2005) 925-930.
- [23] E.C.N. Nascimento, E.; Silva, J. P., Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada, *Rev. Saude Publica* 41 (2007) 290-293.
- [24] O.A. Silva, J.M.D. Greve, M. Yonamine, V. Leyton, Drug use by truck drivers in Brazil, *Drugs-Education Prevention and Policy* 10 (2003) 135-139.
- [25] V. Leyton, D.M. Sinagawa, K.C.B.G. Oliveira, W. Schmitz, G. Andreuccetti, B.S. De Martinis, M. Yonamine, D.R. Munoz, Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil, *Forensic Sci. Int.* 215 (2012) 25-27.

- [26] Brasil. Boletim Estatístico Janeiro 2012. Brasília / DF, Brasil: Confederação Nacional do Transporte (CNT), 2012 5 Mar. 2012. Report No.
- [27] M.S. Fernandes, J.S. Protas, C.F. Fernandes, J.R. Goldim. Ethical, legal and methodological aspects of research on the use of alcohol and other drugs. In: F. Pechansky, P. Duarte, & R. De Boni (Orgs.). Use of alcohol and other drugs on Brazilian roads and other studies. Porto Alegre: National Secretariat for Drug Policies; 2010.
- [28] F. Pechansky, R. De Boni, P. Duarte, F.C. Paula, D. Benzano, L. Von Diemen, C. Leukefeld. Alcohol and drug use among private and professional drivers in Brazil. In: F. Pechansky, P. Duarte, & R. De Boni (Orgs.). Use of alcohol and other drugs on Brazilian roads and other studies. Porto Alegre: National Secretariat for Drug Policies; 2010.
- [29] E.J. Cone, M.A. Huestis, Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse, *Oral-Based Diagnostics* 1098 (2007) 51-103.
- [30] O.H. Drummer, D. Gerostamoulos, M. Chu, P. Swann, M. Boorman, I. Cairns, Drugs in oral fluid in randomly selected drivers, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 105-110.
- [31] H. Gjerde, P.T. Normann, B.S. Pettersen, T. Assum, M. Aldrin, U. Johansen, L. Kristoffersen, E.L. Oiestad, A.S. Christophersen, J. Morland, Prevalence of alcohol and drugs among Norwegian motor vehicle drivers: A roadside survey, *Accid. Anal. Prev.* 40 (2008) 1765-1772.
- [32] R. Compton, A. Berning. Results of the 2007 National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers. Washington, DC: National Highway Traffic Safety Administration (NHTSA), NHTSA's National Center for Statistics and Analysis, 2009.
- [33] M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. Lopez-Rivadulla, Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 156-162.
- [34] E.L. Øiestad, U. Johansen, A.S. Christophersen, Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clinical Chemistry* 53 (2007) 300-309.
- [35] S. Duailibi, I. Pinsky, R. Laranjeira, Prevalência do beber e dirigir em Diadema, estado de São Paulo, *Rev. Saude Publica* 41 (2007) 1058-1061.
- [36] F. Pechansky, R. De Boni, L.V. Diemen, D. Bumaguin, I. Pinsky, M. Zaleski, R. Caetano, R. Laranjeira, Highly reported prevalence of drinking and driving in Brazil: data from the first representative household study, *Revista Brasileira de Psiquiatria* 31 (2009) 125-130.

4. CONCLUSÕES FINAIS

A metodologia LC-MS/MS otimizada neste estudo foi validada para a determinação simultânea de 32 SPA e seus metabólitos, dos quais 24 aptos a serem analisados quantitativamente, incluindo todos os benzodiazepínicos e cocaína. A metodologia proposta é simples e rápida e útil para a análise de uma grande quantidade de amostras de fluido oral. Este é o primeiro método LC-MS/MS em análise de fluido oral a incluir femproporex, dietilpropiona e m-CPP.

O desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis e rápidas é importante para aplicação da legislação de trânsito propriamente dita, proporcionando um melhor direcionamento para abordagens preventivas através do uso de técnicas de triagem e análises por LC-MS/MS. A aplicação limitada destas metodologias devido às políticas públicas atualmente existentes é uma barreira importante para a saúde e segurança que pode ser facilmente superada com recursos adicionais junto com um maior compromisso político e apoio público.

Cerca de 10% (n = 236) das 2235 amostras de fluido oral analisadas foram positivas (\geq LOD) para pelo menos uma das SPA/metabólitos, principalmente em condutores usuários de cocaína e anfetamina. Onze analitos não foram detectados ($<$ LOD) em quaisquer amostras analisadas, estes sendo as anfetaminas: MBDB, MDA e MDEA; os benzodiazepínicos: flunitrazepam, oxazepam, midazolam e temazepam; os opioides: heroína e metadona; além de cetamina e m-CPP. Em 22 de 236 amostras positivas havia combinação de drogas de diferentes classes químicas, com 77,3% destas contendo cocaína/metabólitos.

A droga mais prevalente encontrada nas amostras dos condutores automotivos foi cocaína e metabólitos, com 6,1% [IC 95%: 5-7], seguida pelas anfetaminas (3,2%; [IC 95%: 2,5-4,0]). Entre as anfetaminas, anfetamina, metilfenidato e femproporex apresentaram maior prevalência.

A idade do condutor, tipo de veículo e/ou a região influenciaram significativamente na prevalência do uso de algumas SPAs. O consumo de anfetaminas foi maior entre os condutores maiores de 25 anos e de cocaína e canabinoides para aqueles entre 18 e 24 anos. O uso de cocaína e *cannabis* esteve mais associado com condutores de moto e carro e o de anfetaminas com condutores

de ônibus e caminhões. Uso de benzodiazepínicos foi maior na região Centro-Oeste e de *cannabis* nas regiões Sul e Centro-Oeste.

Os achados deste estudo sugerem que fatores ambientais externos, tais como características socioeconômicas e demográficas, bem como características pessoais, são determinantes para uso de SPA entre os condutores brasileiros. Este é o primeiro estudo brasileiro a fornecer dados de prevalência do uso de substâncias psicoativas de condutores de veículos automotivos com amostragem que abrange praticamente todas as unidades federativas do Brasil. Seus resultados podem contribuir para estabelecer políticas públicas para o controle e educação desta população em relação ao uso e abuso de SPA com o objetivo de aumentar a segurança no trânsito.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADF. (2012). "Amphetamine facts." Retrieved 18 Aug 2012.
- Alvarez, F. J., I. Fierro and M. C. Del Rio (2007). "Cannabis and driving: Results from a general population survey." Forensic Science International **170**(2-3): 111-116.
- Anderson, I. B. and T. E. Kearney (2000). "Medicine Cabinet: Use of methadone." West J Med. **January**; **172**(1): 43-46.
- Appenzeller, B. M. R., S. Schneider, M. Yegles, A. Maul and R. Wennig (2005). "Drugs and chronic alcohol abuse in drivers." Forensic Science International **155**(2-3): 83-90.
- Arbo, M. D., M. L. Bastos and H. F. Carmo (2012). "Piperazine compounds as drugs of abuse." Drug and Alcohol Dependence **122**(3): 174-185.
- Ardrey, R. E. (2003). Liquid Chromatography -Mass Spectrometry: An Introduction., John Wiley & Sons, Ltd.
- Bacchieri, G. and A. J. D. Barros (2011). "Acidentes de trânsito no Brasil de 1998 a 2010: muitas mudanças e poucos resultados." Revista de Saúde Pública **45**: 949-963.
- Badawi, N., K. W. Simonsen, A. Steentoft, I. M. Bernhoft and K. Linnet (2009). "Simultaneous Screening and Quantification of 29 Drugs of Abuse in Oral Fluid by Solid-Phase Extraction and Ultraperformance LC-MS/MS." Clinical Chemistry **55**(11): 2004-2018.
- Bedard, M., S. Dubois and B. Weaver (2007). "The impact of cannabis on driving." Canadian Journal of Public Health-Revue Canadienne De Sante Publique **98**(1): 6-11.
- Berghaus, G., G. Sticht, W. Grellner, D. Lenz, T. Naumann and S. Wiesenmüller (2011). Meta-analysis of empirical studies concerning the effects of medicines and illegal drugs including pharmacokinetics on safe driving. 6th Framework Programme - Deliverable D 1.1.2b. A. a. M. D. Driving under the Influence of Drugs.
- Bernhof, I. M. (2005). Impaired Motorists, Methods of Roadside Testing and Assessment for Licensing (IMMORTAL) - Drugs, alcohol and traffic safety. A

synthesis of results. Deliverable D-R4.6, School of Psychology, University of Leeds. **Version 2, August 2005.**

- Bernhoft, I. M., A. Steentoft, S. S. Johansen, N. A. Klitgaard, L. B. Larsen and L. B. Hansen (2005). "Drugs in injured drivers in Denmark." Forensic Science International **150**(2-3): 181-189.
- Brasil (1997). Lei nº. 9.503 de 23 de setembro de 1997. Institui o Código Brasileiro de Trânsito. Brasília, Diário Oficial da União (D.O.U) 24 set. 1997.
- Brasil (1999). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344 de 12 de maio de 1998. Aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial., In: Diário Oficial da União (D.O.U), Brasília.
- Brasil (2008). Lei nº. 11.705 de 19 de junho de 2008. Altera a Lei no 9.503, de 23 de setembro de 1997, que institui o Código de Trânsito Brasileiro, e a Lei no 9.294, de 15 de julho de 1996, que dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumíferos, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas. Brasília, Diário Oficial da União (D.O.U) 20 jun. 2008.
- Brasil (2011). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC N°52, de 6 de outubro de 2011. d. d. o. d. Diário Oficial da União (D.O.U) nº 194, Seção 1, Pág. 61.
- Brasil (2012). Boletim Estatístico Janeiro 2012. Brasília / DF, Brasil, Confederação Nacional do Transporte (CNT).
- Britannica, E. (2012). Mikhail Semyonovich Tsvet. Encyclopædia Britannica. E. B. Inc. Web.
- Brookhuis, K. A., W. Riedel, M. Mathijssen, R. Tunbridge, A. Clark, N. Ward, L. Dye and G. Berghaus (2000). Conception and Evaluation of Roadside Testing Instruments to Formalise Impairment Evidence in Drivers. CERTIFIED A3 (DR4). U. o. L. School of Psychology.
- Budd, K. (1999). "The role of tramadol in acute pain management." Acute Pain **2**(4): 189-196.
- Carlini, E. A., J. C. F. Galduróz, A. A. B. Silva, A. R. Noto, A. M. Fonseca, C. M. Carlini, L. G. O. Oliveira, S. A. Nappo, Y. G. Moura and Z. V. M. Sanchez (2006). II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no

- Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005. São Paulo, CEBRID/UNIFESP.
- Chasin, A. A. M. S., E. S. (2003). Estimulantes do sistema nervoso central. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. A. Editora. São Paulo. **2° ed.:** 239-257.
- Chouinard, G. (2004). "Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound." J Clin Psychiatry. **65**(Suppl 5): 7-12.
- Chu, M., D. Gerostamoulos, J. Beyer, L. Rodda, M. Boorman and O. H. Drummer (2012). "The incidence of drugs of impairment in oral fluid from random roadside testing." Forensic Science International **215**(1–3): 28-31.
- Collins, C. H. and G. L. Braga (1987). Introdução a métodos cromatográficos. São Paulo, Editora da Unicamp.
- Compton, R. and A. Berning (2009). Results of the 2007 National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers. Washington, DC, National Highway Traffic Safety Administration (NHTSA), NHTSA's National Center for Statistics and Analysis: 5.
- Concheiro, M., A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz and M. Lopez-Rivadulla (2007). "Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing." Forensic Science International **170**(2-3): 156-162.
- Concheiro, M., A. de Castro, Ó. Quintela, A. Cruz and M. López-Rivadulla (2008). "Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **391**(6): 2329-2338.
- Cone, E. J. and M. A. Huestis (2007). "Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse." Oral-Based Diagnostics **1098**: 51-103.
- Crotti, A. E. M., R. Vessecchi, J. L. C. Lopes and N. P. Lopes (2006). "Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular." Química Nova **29**: 287-292.
- Crouch, D. J., J. M. Walsh, L. Cangianelli and O. Quintela (2008). "Laboratory Evaluation and Field Application of Roadside Oral Fluid Collectors and Drug Testing Devices." Therapeutic Drug Monitoring **30**(2): 188-195
110.1097/FTD.1090b1013e3181679249.

- Dams, R., R. E. Choo, W. E. Lambert, H. Jones and M. A. Huestis (2007). "Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients." Drug and Alcohol Dependence **87**(2-3): 258-267.
- De Boni, R., M. C. Bozzetti, J. Hilgert, T. Sousa, L. Von Diemen, D. Benzano, G. Menegon, B. Holmer, P. d. C. A. V. Duarte and F. Pechansky (2011). "Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil." Accident Analysis and Prevention **43**(4): 1408-1413.
- De Decker, K., J. Cordonnier, W. Jacobs, V. Coucke, P. Schepens and P. G. Jorens (2008). "Fatal intoxication due to tramadol alone: Case report and review of the literature." Forensic Science International **175**(1): 79-82.
- De Giovanni, N. and N. Fucci (2008). "The State of the Art on the Use of Oral Fluid as Alternative Specimen in Forensic Toxicology." Current Pharmaceutical Analysis **4**(4): 258-273.
- DRUID-Project. (2010). "Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines (2007-2010)." Retrieved 09/03/2011, from http://www.druid-project.eu/cln_007/Druid/EN/home/homepage_node.html?_nnn=true.
- Drummer, O. H. (2005). "Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid." Forensic Science International **150**(2-3): 133-142.
- Drummer, O. H. (2006). "Drug testing in oral fluid." Clin Biochem Rev **27**(3): 147-159.
- Drummer, O. H., D. Gerostamoulos, M. Chu, P. Swann, M. Boorman and I. Cairns (2007). "Drugs in oral fluid in randomly selected drivers." Forensic Science International **170**(2-3): 105-110.
- Drummer, O. H., J. Gerostamoulos, H. Batziris, M. Chu, J. Caplehorn, M. D. Robertson and P. Swann (2004). "The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes." Accident Analysis and Prevention **36**(2): 239-248.
- Drummer, O. H., J. Gerostamoulos, H. Batziris, M. Chu, J. R. M. Caplehorn, M. D. Robertson and P. Swann (2003). "The incidence of drugs in drivers killed in Australian road traffic crashes." Forensic Science International **134**(2-3): 154-162.
- Duailibi, S., I. Pinsky and R. Laranjeira (2007). "Prevalência do beber e dirigir em Diadema, estado de São Paulo." Revista de Saúde Pública **41**: 1058-1061.

- Elliott, S., H. Woolacott and R. Braithwaite (2009). "The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: A comparative study of victims." Science & Justice **49**(1): 19-23.
- EMCDDA (2008) "BZP and other piperazines."
- EMCDDA (2009). 2009 Annual report on the state of the drugs problem in Europe. Lisbon, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- EMCDDA (2011). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Annual report 2011: the state of the drugs problem in Europe. Luxembourg: Publications Office of the European Union: 102.
- FDA. (2008). "Codeine." 12/10/2008. Retrieved 22 Aug. 2012.
- FDA (2010). Important Drug Warning. C. S. O. Norman Rosenthal. <http://www.fda.gov/downloads/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/UCM213265.pdf>.
- FDA. (2011). "Amphetamines." Retrieved 18 Aug 2012, from <http://www.druginfo.adf.org.au/drug-facts/amphetamines>.
- Fernandes, M. S., J. S. Protas, C. F. Fernandes and J. R. Goldim (2010). Ethical, legal and methodological aspects of research on the use of alcohol and other drugs. In: F. Pechansky, P. Duarte, & R. De Boni (Orgs.). Use of alcohol and other drugs on Brazilian roads and other studies. Porto Alegre, National Secretariat for Drug Policies. **Section A.III.**
- Feuchtl, A., M. Bagli, R. Stephan, C. Frahnert, H. Kölsch, K. U. Kühn and M. L. Rao (2004). "Pharmacokinetics of m-Chlorophenylpiperazine after Intravenous and Oral Administration in Healthy Male Volunteers: Implication for the Pharmacodynamic Profile." Pharmacopsychiatry **37**(04): 180,188.
- Fish, R. E. (1997). Chapter 1 - Pharmacology of Injectable Anesthetics. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. F. K. Dennis, K. W. Sally, J. W. William, S. K. W. W. J. W. G. John BensonA2 - Dennis F. Kohn and G. J. Benson. San Diego, Academic Press: 1-28.
- Gaskell, S. J. (1997). "Electrospray: Principles and Practice." Journal of mass spectrometry **32**: 677-688
- Gjerde, H., P. T. Normann, A. S. Christophersen, S. O. Samuelsen and J. Morland (2011). "Alcohol, psychoactive drugs and fatal road traffic accidents in Norway: A case-control study." Accident Analysis and Prevention **43**(3): 1197-1203.

- Gjerde, H., P. T. Normann, B. S. Pettersen, T. Assum, M. Aldrin, U. Johansen, L. Kristoffersen, E. L. Oiestad, A. S. Christophersen and J. Morland (2008). "Prevalence of alcohol and drugs among Norwegian motor vehicle drivers: A roadside survey." Accident Analysis and Prevention **40**(5): 1765-1772.
- Gross, J. H. (2004). Mass Spectrometry - a Textbook Berlin, Springer-Verlag.
- Hargutt, V., H.-P. Krüger and A. Knoche (2011). Driving under the influence of alcohol, illicit drugs and medicines. Risk estimations from different methodological approaches. 6th Framework Programme - Deliverable 1.3.1. A. a. M. DRUID Driving under the Influence of Drugs.
- Heroinfo. (2010). "The Heroine Drug History & Facts."
- Hoffmann, E. d., Stroobant V (2007). Mass spectrometry: principles and applications. San Francisco, CA, USA, John Wiley & Sons Ltd.
- Huestis, M. A. and E. J. Cone (2004). "Relationship of Δ 9-tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis." Journal of Analytical Toxicology **28**(6): 394-399.
- INCHEM. (2012). "Amphetamines." Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations (Inchem), 18 Aug 2012.
- INCHEM. (2012). "Cocaine." Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations (Inchem).
- Ingsathit, A., P. Woratanarat, T. Anukarahanonta, S. Rattanasiri, P. Chatchaipun, K. Wattayakorn, S. Lim and P. Suriyawongpaisal (2009). "Prevalence of psychoactive drug use among drivers in Thailand: A roadside survey." Accident Analysis and Prevention **41**(3): 474-478.
- Kidwell, D. A., J. C. Holland and S. Athanaselis (1998). "Testing for drugs of abuse in saliva and sweat." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **713**(1): 111-135.
- Kintz, P., M. Villain, M. Concheiro and V. Cirimele (2005). "Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS." Forensic Science International **150**(2-3): 213-220.
- Kitson, F. G., B. S. Larsen and C. N. Mc Even (1996). Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guideline. California, USA.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (2006). Chapter 3 - Psychostimulants. Neurobiology of Addiction. London, Academic Press: 69-120.

- Koob, G. F. and M. Le Moal (2006). Chapter 7 - Cannabinoids. Neurobiology of Addiction. London, Academic Press: 289-337.
- Labat, L., B. Fontaine, C. Delzenne, A. Doublet, M. C. Marek, D. Tellier, M. Tonneau, M. Lhermitte and P. Frimat (2008). "Prevalence of psychoactive substances in truck drivers in the Nord-Pas-de-Calais region (France)." Forensic Science International **174**(2-3): 90-94.
- Lacey, J. H., Kelley-Baker, T., Furr-Holden, D., Voas, R., Moore, C., Brainard, K., Tippetts, A.T., Romano, E., Torres, P., Berning, A. (2007). National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers. DOT/National Highway Traffic Safety Administration, Pacific Institute for Research and Evaluation.
- Lanaro, R., J. L. Costa, L. A. Zanolli Filho and S. O. S. Cazenave (2010). "Identificação química da clorofenilpiperazina (CPP) em comprimidos apreendidos." Química Nova **33**: 725-729.
- Lanças, F. M. (2009). Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Campinas, São Paulo.
- Langel, K., T. Gunnar, K. Ariniemi, O. Rajamäki and P. Lillsunde (2011). "A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography–mass spectrometry." Journal of Chromatography B **879**(13–14): 859-870.
- Larini, L. and D. Carvalho (1993). Estimulantes centrais. In: Larini, L. Toxicologia. São Paulo, Monele. **2. ed**: p. 251-256.
- LENAD-II (2012). Levantamento Nacional de Álcool e Drogas - O uso de maconha no Brasil. http://www.uniad.org.br/images/stories/LENAD_Maconha.pdf.
- Leyton, V., D. M. Sinagawa, K. C. B. G. Oliveira, W. Schmitz, G. Andreuccetti, B. S. De Martinis, M. Yonamine and D. R. Munoz (2012). "Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil." Forensic Science International **215**(1–3): 25-27.
- Longo, M. C., C. E. Hunter, R. J. Lokan, J. M. White and M. A. White (2000). "The prevalence of alcohol, cannabinoids, benzodiazepines and stimulants amongst injured drivers and their role in driver culpability - Part II: The relationship between drug prevalence and drug concentration, and driver culpability." Accident Analysis and Prevention **32**(5): 623-632.
- López-Muñoz, F., C. Álamo and P. García-García (2008). "Psychotropic drugs in the Cervantine texts." JRSM **101**(5): 226-234.

- Machado-Vieira, R., G. Salvadore, N. DiazGranados and C. A. Zarate Jr (2009). "Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action." Pharmacology & Therapeutics **123**(2): 143-150.
- Maldaner, L. and I. C. S. F. Jardim (2009). "O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência." Química Nova **32**: 214-222.
- McDonald, J. and D. Lambert (2005). "Opioid receptors." Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain **5**(1): 22-25.
- Moffat, A. C., M. D. Osselton and B. Widdop (2004). Clarke's analysis of drug and poisons. London, Pharmaceutical Press.
- Molnar, A., J. Lewis, P. Doble, G. Hansen, T. Prolov and S. Fu (2012). "A rapid and sensitive method for the identification of delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Forensic Science International **215**(1–3): 92-96.
- Moore, C., C. Coulter, K. Crompton and M. Zumwalt (2007). "Determination of Benzodiazepines in Oral Fluid using LC–MS–MS." Journal of Analytical Toxicology **31**(November/December 2007).
- Mørland, J., A. Steentoft, K. W. Simonsen, I. Ojanperä, E. Vuori, K. Magnusdottir, J. Kristinsson, G. Ceder, R. Kronstrand and A. Christophersen (2011). "Drugs related to motor vehicle crashes in northern European countries: A study of fatally injured drivers." Accident Analysis & Prevention **43**(6): 1920-1926.
- Mortier, K. A., K. E. Maudens, W. E. Lambert, K. M. Clauwaert, J. F. Van Bocxlaer, D. L. Deforce, C. H. Van Peteghem and A. P. De Leenheer (2002). "Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry." Journal of Chromatography B **779**(2): 321-330.
- Mura, P., C. Chatelain, V. Dumestre, J. M. Gaulier, M. H. Ghysel, C. Lacroix, M. F. Kergueris, A. Lhermitte, M. Moulisma, G. Pepin, F. Vincent and P. Kintz (2006). "Use of drugs of abuse in less than 30-year-old drivers killed in a road crash in France: A spectacular increase for cannabis, cocaine and amphetamines." Forensic Science International **160**(2-3): 168-172.
- Mura, P., P. Kintz, B. Ludes, J. M. Gaulier, P. Marquet, S. Martin-Dupont, F. Vincent, A. Kaddour, J. P. Gouille, J. Nouveau, M. Moulisma, S. Tilhet-Coart and O. Pourrat (2003). "Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other

- drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study." Forensic Science International **133**(1-2): 79-85.
- Musto, D. F. (1997). "History: The American Experience With Stimulants." The National Methamphetamine Drug Conference.
- Nascimento, E. C. N., E.; Silva, J. P. (2007). "Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada." Revista de Saúde Pública **41**(2): 290-293.
- Neto, Á. J. S. (2009). Critérios de validação e identificação em análises por LC-MS/MS. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia.
- NIDA. (2011). "Club Drugs (GHB, Ketamine, and Rohypnol)." Retrieved 19 Aug 2012.
- Niedbala, S., K. Kardos, S. Salamone, D. Fritch, M. Bronsgeest and E. J. Cone (2004). "Passive Cannabis Smoke Exposure and Oral Fluid Testing." Journal of Analytical Toxicology **28**(7): 546-552.
- Niessen, W. M. A. (2006). Liquid chromatography--mass spectrometry. Boca Raton, FL, CRC Press - Taylor & Francis Group.
- Oga, S. (2008). Fundamentos de toxicologia. São Paulo, Ateneu.
- Øiestad, E. L., U. Johansen and A. S. Christophersen (2007). "Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Clinical Chemistry **53**(2): 300-309.
- Padosch, S., D. Lachenmeier and L. Kroner (2006). "Absinthism: a fictitious 19th century syndrome with present impact." Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy **1**(1): 14.
- Pechansky, F., R. De Boni, L. V. Diemen, D. Bumaguin, I. Pinsky, M. Zaleski, R. Caetano and R. Laranjeira (2009). "Highly reported prevalence of drinking and driving in Brazil: data from the first representative household study." Revista Brasileira de Psiquiatria **31**: 125-130.
- Pechansky, F., R. De Boni, P. Duarte, F. C. Paula, D. Benzano, L. Von Diemen and C. Leukefeld (2010). Alcohol and drug use among private and professional drivers in Brazil. In: F. Pechansky, P. Duarte, & R. De Boni (Orgs.). Use of alcohol and other drugs on Brazilian roads and other studies. Porto Alegre, National Secretariat for Drug Policies.
- Peters, F. T. (2011). "Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology." Clinical Biochemistry **44**(1): 54-65.

- Pfizer. (2012). "Bula TRAMAL - Cloridrato de Tramadol."
- Pil, K., E. Raes and A. G. Verstraete (2009). "The toxicological challenges in the European research project DRUID." Forensic Science International Supplement Series **1**(1): 29-32.
- Pujadas, M., S. Pichini, E. Civit, E. Santamariña, K. Perez and R. de la Torre (2007). "A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography–mass spectrometry." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **44**(2): 594-601.
- Rafael de la, T., Farr, eacute, M, M. Navarro, R. Pacifici, P. Zuccaro and S. Pichini (2004). "Clinical Pharmacokinetics of Amfetamine and Related Substances: Monitoring in Conventional and Non-Conventional Matrices." Clinical Pharmacokinetics **43**(3): 157-185.
- Ramaekers, J., A. Knoche and H. Schulze (2011). Effects of stimulant drugs on actual and simulated driving. 6th Framework Programme - Deliverable D 1.2.1. Web, Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines (DRUID). Status: under review: 165.
- Rang, H. P., M. M. Dale, J. M. Ritter and R. J. Flower (2007). Rang & Dale - Farmacologia. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Rigo, F. S. and M. d. A. Oliveira (2012). Amnesia e inferências sobre a memória. MC906A - Inteligencia Artificial
http://www.ic.unicamp.br/~wainer/cursos/906/trabalhos/M2_Amnesia_009264_008632.pdf, Instituto de Computação - Universidade Estadual de Campinas
- Robbins, T. W. and B. J. Everitt (1999). "Drug addiction: bad habits add up." Nature **398**(6728): 567-570.
- Rudolph, U., M. F. Davies, J. Barr, M. M. Alex S. Evers and E. D. Kharasch (2011). Benzodiazepines Anesthetic Pharmacology, Cambridge University Press.
- Samyn, N., G. De Boeck and A. G. Verstraete (2002). "The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers." Journal of Forensic Sciences **47**(6): 1380-1387.
- Samyn, N., M. Laloup and G. De Boeck (2007). "Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in oral fluid." Analytical and Bioanalytical Chemistry **388**(7): 1437-1453.

- SENAD (2010). I Levantamento Nacional sobre Uso de Álcool, Tabaco e Outras Drogas entre Universitários das 27 Capitais Brasileiras http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Publicacoes/Universitarios_2010/328160.pdf, Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas - SENAD.
- Senna, M. C., M. Augsburg, B. Aebi, T. A. Briellmann, N. Donze, J. L. Dubugnon, P. X. Iten, C. Staub, W. Sturm and K. Sutter (2010). "First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland." Forensic Science International **198**(1-3): 11-16.
- Sergi, M., E. Bafile, D. Compagnone, R. Curini, D. D'Ascenzo and F. S. Romolo (2009). "Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS." Anal Bioanal Chem **393**: 709–718.
- Sergi, M., D. Compagnone, R. Curini, G. D'Ascenzo, M. Del Carlo, S. Napoletano and R. Risoluti (2010). "Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids." Analytica Chimica Acta **675**(2): 132-137.
- Silva, O. A., J. M. D. Greve, M. Yonamine and V. Leyton (2003). "Drug use by truck drivers in Brazil." Drugs-Education Prevention and Policy **10**(2): 135-139.
- Simonsen, K. W., A. Steentoft, T. Hels, I. M. Bernhoft, B. S. Rasmussen and K. Linnet (2012). "Presence of psychoactive substances in oral fluid from randomly selected drivers in Denmark." Forensic Science International **221**(1): 33-38.
- Skoog, West, Holler and Crouch (2005). Fundamentos de Química Analítica, Thomson.
- Smith, R. M. (1997). "The mass spectrum of cocaine." Journal of Forensic Sciences **42**(3): 475-480.
- Smith, R. M. (2004). Understanding Mass Spectra: A Basic Approach. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.
- Souza, D. Z., P. O. Boehl, E. Comiran, K. C. Mariotti, F. Pechansky, P. C. A. V. Duarte, R. De Boni, P. E. Froehlich and R. P. Limberger (2011). "Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **696**(1–2): 67-76.

- Souza, J. C. P., T.; Reimão, R. (2005). "Sleep habits, sleepiness and accidents among truck drivers." Arquivos de Neuro-psiquiatria **63**(4): 925-930.
- Sweeney, C. and E. Bruera (2003). Chapter 24 - Opioids. Handbook of Pain Management. M. Ronald, O. F. PhD and F. D. F. Patrick D Wall. Philadelphia, Churchill Livingstone: 377-396.
- Tan, K. R., U. Rudolph and C. Lüscher (2011). "Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction." Trends in Neurosciences **34**(4): 188-197.
- Teixeira, H., P. Proença, A. Verstraete, F. Corte-Real and D. N. Vieira (2005). "Analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry." Forensic Science International **150**(2-3): 205-211.
- Toennes, S. W., G. F. Kauert, S. Steinmeyer and M. R. Moeller (2005). "Driving under the influence of drugs - evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms." Forensic Science International **152**(2-3): 149-155.
- United Nations (1971). Convention on psychotropic substances. Vienna, Austria, International Narcotics Control Board INCB.
- United Nations (2008). Psychotropic Substances - Statistics for 2007 Assessments of Annual Medical and Scientific Requirements for Substances in Schedules II, III and IV of the Convention on Psychotropic Substances of 1971. . Sales No.: T.12.XI.3. U. N. PUBLICATION, INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD.
- UNITED NATIONS (2011). International Narcotics Control Board - World Drug Report (2010). United Nations Publication, Sales No. E.10.XI.13.
- United Nations (2012). Psychotropic Substances - Statistics for 2010 Assessments of Annual Medical and Scientific Requirements for Substances in Schedules II, III and IV of the Convention on Psychotropic Substances of 1971. Sales No.: T.12.XI.3. U. N. PUBLICATION, INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD.
- UNODC (2001). Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva. Sales No. E.01.XI.12. I. D. C. Programme. New York, United Nations Office on Drugs and Crime: 23 p.

- UNODC (2011). United Nations Office on Drugs and Crime - World Drug Report 2011. Sales No. E.11.XI.10. U. N. publication.
- UNODC (2012) "Drogas: marco legal."
- UNODC (2012). United Nations Office on Drugs and Crime - World Drug Report 2012. Sales No. E.12.XI.1. U. N. Publication.
- Vetulani, J. (2001). "Drug addiction. Part I. Psychoactive substances in the past and presence." Pol J Pharmacol **53**(3): 201-214.
- Waiselfis, J. J. (2011). Mapa da Violência - 2011 - os jovens do brasil. I. Sangari. São Paulo, Brasília, DF: Ministério da Justiça.: 162.
- Walsh, J. M., A. G. Verstraete, M. A. Huestis and J. Morland (2008). "Guidelines for research on drugged driving." Addiction **103**(8): 1258-1268.
- Wang, W.-L., W. D. Darwin and E. J. Cone (1994). "Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography—mass spectrometry." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **660**(2): 279-290.
- WHO (2011). Brazil targets drink driving on the road to fewer deaths. Bulletin of the World Health Organization. W. H. Organization. web. **89**: 474-475.
- Wood, M., M. Laloup, M. d. M. R. Fernandez, K. M. Jenkins, M. S. Young, J. G. Ramaekers, G. D. Boeck and N. Samyn (2005). "Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography—tandem mass spectrometry." Forensic Science International **150**(2-3): 227-238.
- Wylie, F. M., H. Torrance, R. A. Anderson and J. S. Oliver (2005). "Drugs in oral fluid: Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid." Forensic Science International **150**(2–3): 191-198.
- Wylie, F. M., H. Torrance, A. Seymour, S. Buttress and J. S. Oliver (2005). "Drugs in oral fluid: Part II. Investigation of drugs in drivers." Forensic Science International **150**(2-3): 199-204.
- Xavier, J. M. M. (2010). Treinamento Plataforma 4000QTRAP®. A. B. Company.
- Yamamoto, I., K. Watanabe, S. Narimatsu and H. Yoshimura (1995). "Recent advances in the metabolism of cannabinoids." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **27**(8): 741-746.

- Yonamine, M. (2004). The oral fluid as a biological specimen to monitor the use of alcohol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and marijuana by professional drivers. Doctor, University of São Paulo.
- Zhuo, X. Y., Y. Cang, H. Yan, J. Bu and B. H. Shen (2010). "The prevalence of drugs in motor vehicle accidents and traffic violations in Shanghai and neighboring cities." Accident Analysis and Prevention **42**(6): 2179-2184.

**ANEXO I: Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre.**



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 07-069

Pesquisadores:

FLAVIO PECHANSKY
RAQUEL BRANDINI DE BONI
JOSE ROBERTO GOLDIM
LUIS AUGUSTO PAIM ROHDE
SABINO DA SILVA PORTO JUNIOR

Título: ESTUDO DO IMPACTO DO USO DE BEBIDAS ALCOÓLICAS E OUTRAS
SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS NO TRÂNSITO BRASILEIRO

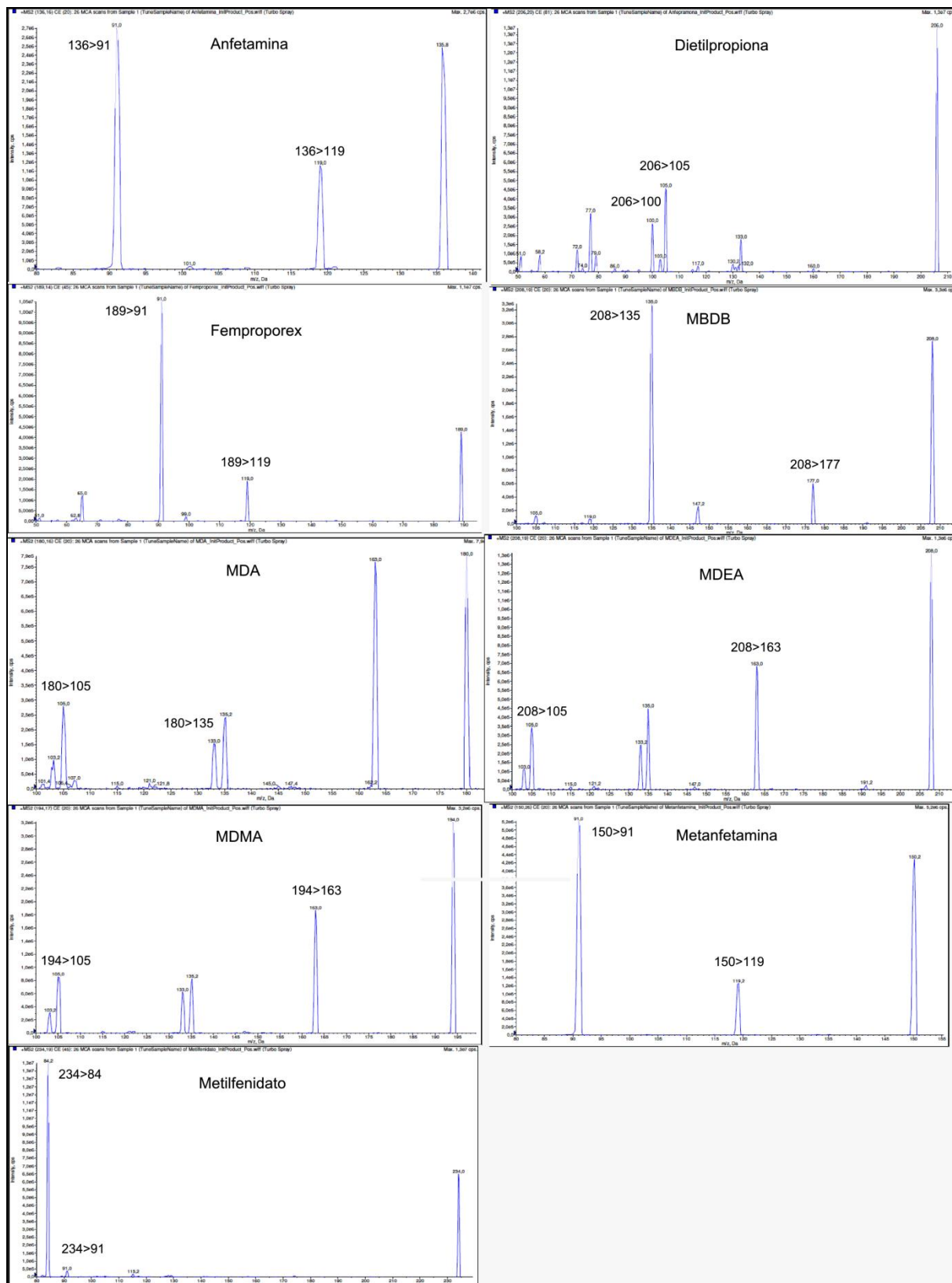
Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 22 de março de 2007.

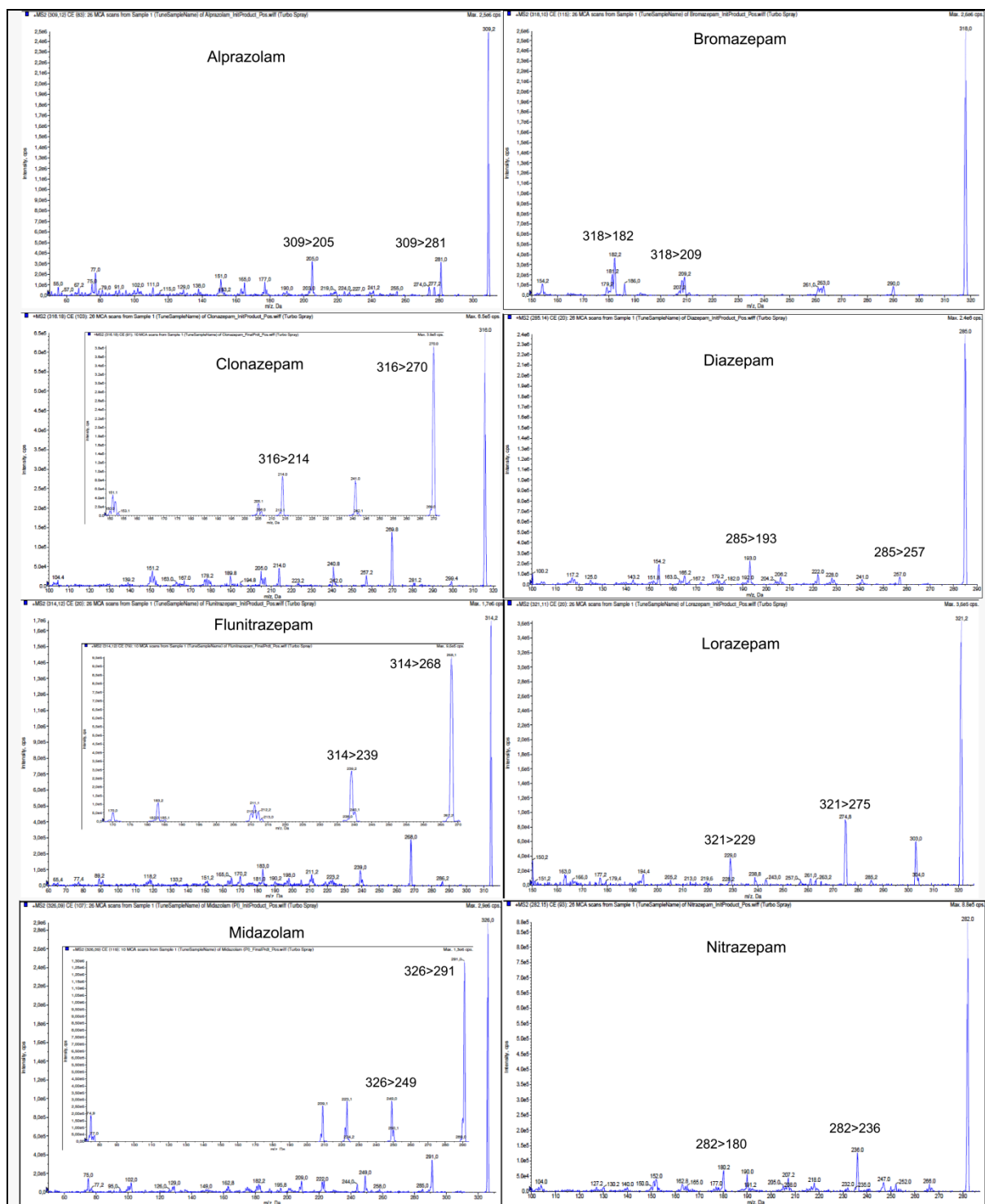
Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

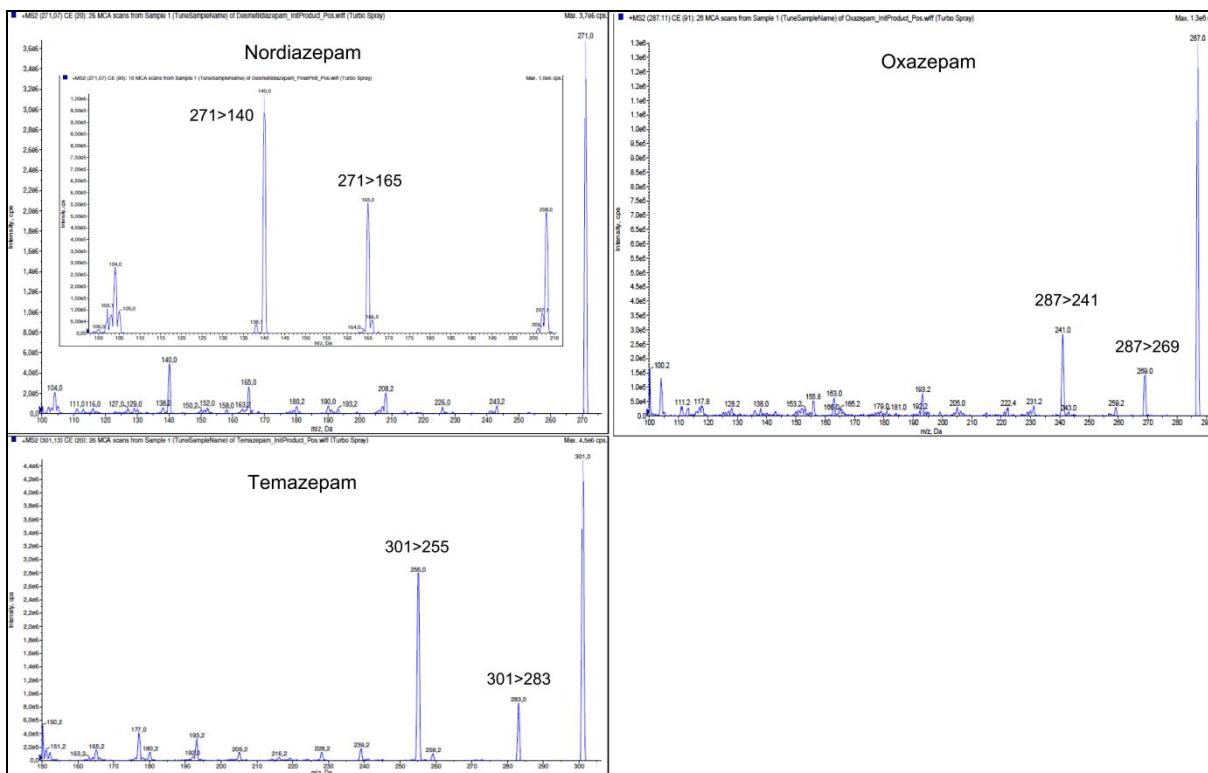
ANEXO II: Espectros de massas

Anfetaminas

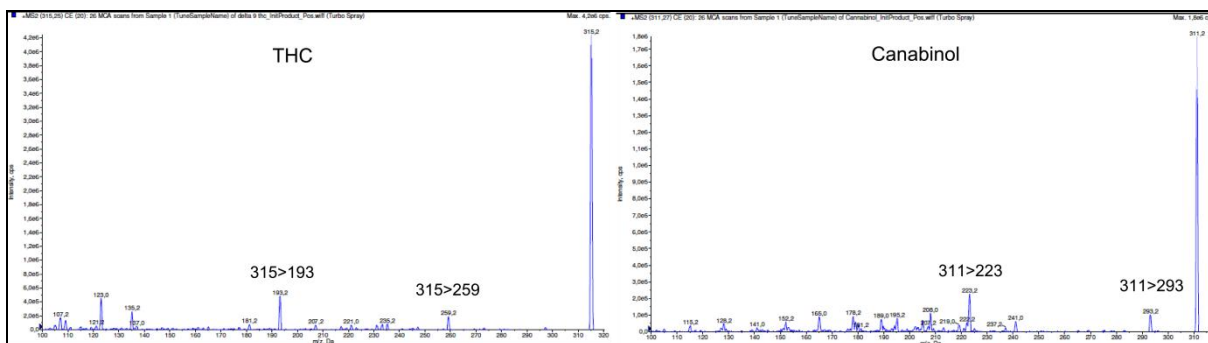


Benzodiazepínicos

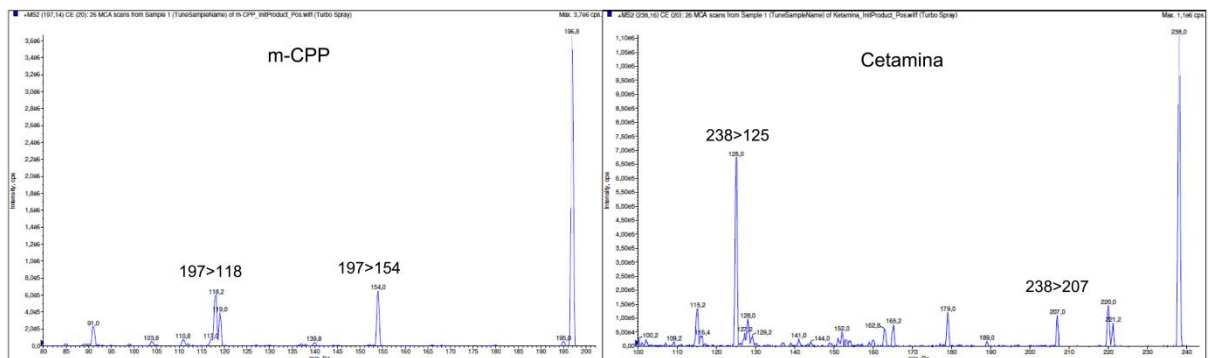




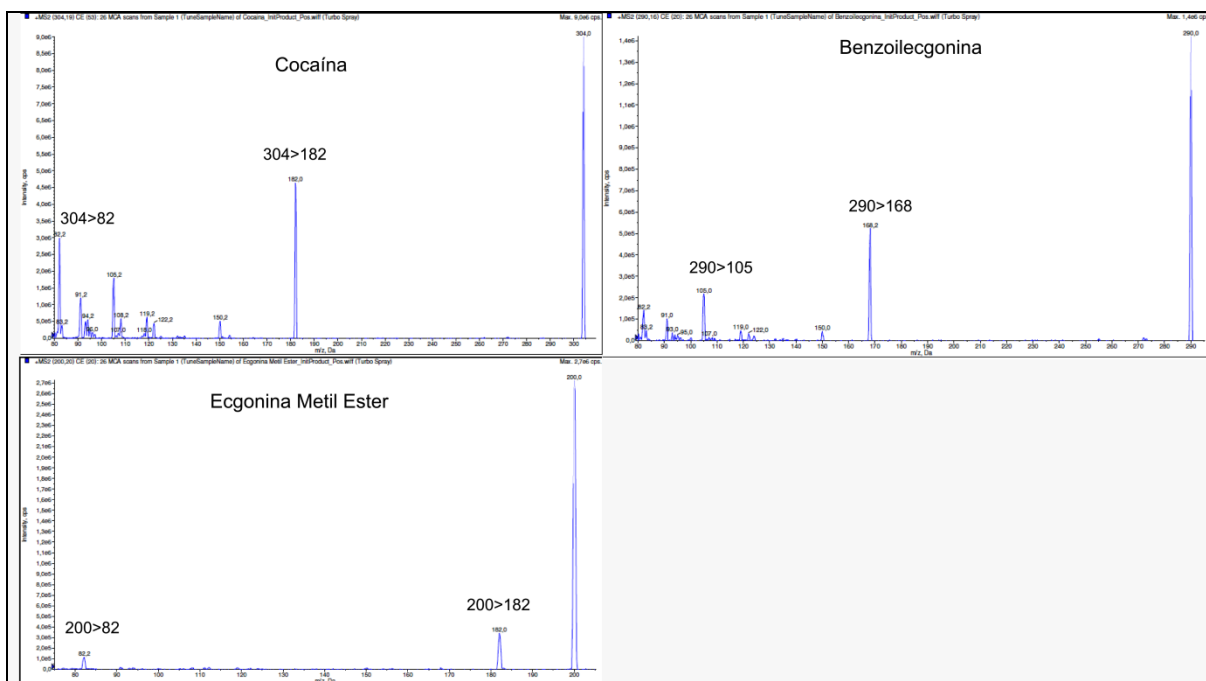
Canabinoides



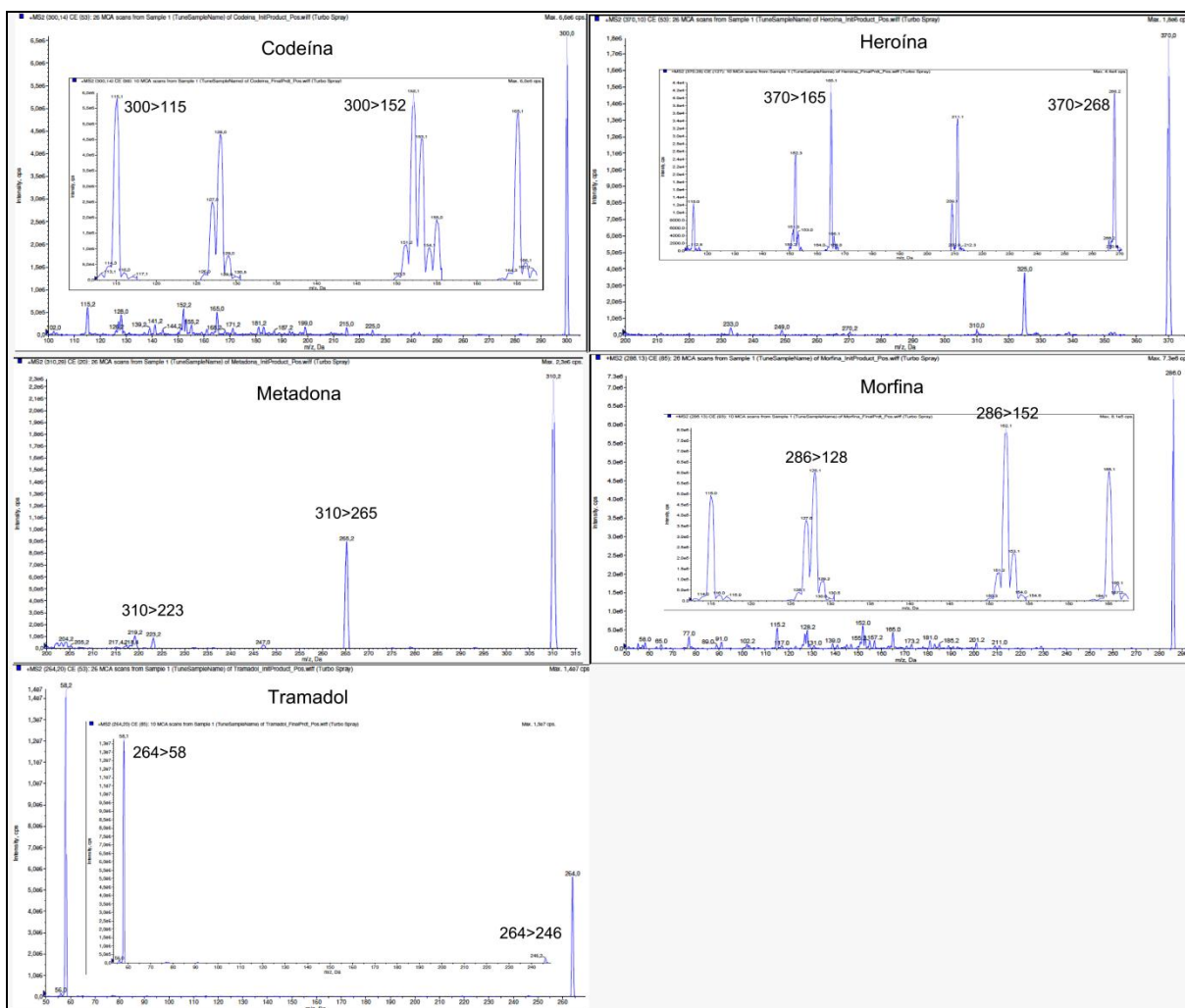
Outros



Cocaína e Metabólitos



Opioides



Padrões Internos

