

# Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense

**Dayanne Cristiane Mozaner Bordin**<sup>1</sup>  
**Fernanda F. da Silva Souza Monedeiro**<sup>2</sup>  
**Eduardo Geraldo de Campos**<sup>2</sup>  
**Marcela Nogueira Rabelo Alves**<sup>1</sup>  
**Laís Helena Picolo Bueno**<sup>2</sup>  
**Bruno Spinosa de Martinis**<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas,  
Toxicológicas e Bromatológicas,  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

<sup>2</sup>Departamento de Química, Faculdade  
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão  
Preto, Universidade de São Paulo,  
Ribeirão Preto, SP, 14050-140, Brasil

\*martinis@usp.br

Recebido: 18 Ago 2015

Aceito: 08 Set 2015

## Resumo

As análises toxicológicas forenses caracterizam-se pela investigação de compostos de interesse forense, em especial drogas de abuso, em diversas matrizes biológicas. As características particulares de cada matriz determinam quais técnicas de preparo de amostra são requeridas, ainda, cada qual possui a esta associadas vantagens e limitações, que devem ser observadas pelo analista. São aspectos fundamentais a consideração do intervalo de concentração do analito na amostra, a janela de detecção, a complexidade e o conhecimento de como se dá a distribuição da droga pesquisada na matriz. Já as técnicas de preparo de amostra a serem utilizadas devem ser escolhidas também com base em sua capacidade de pré-concentração do analito, além da disponibilidade de materiais específicos, tempo e custo. O presente artigo visa delinear as principais matrizes biológicas utilizadas em Toxicologia Forense assim como as técnicas, clássicas e recentes, empregadas no preparo dessas amostras.

**Palavras-chave:** toxicologia forense, amostras biológicas, matrizes alternativas, preparo de amostra.

## 1. Introdução

A Toxicologia Forense, área da toxicologia que se aplica a propósitos legais, apresenta como objetivo principal fornecer respostas às questões que surgem durante investigações criminais. Utiliza como ferramenta as análises toxicológicas, que são requisitadas com a finalidade de se detectar a presença de substâncias exógenas, determinar sua concentração, e, por fim, relacioná-las aos seus efeitos tóxicos no organismo, a fim de se estabelecer se houve ou não a intoxicação que recaí sob suspeita. Os resultados gerados por essas análises devem ser inequívocos, e o laudo irrefutável<sup>[1]</sup>.

Técnicas de preparo de amostra aplicadas às análises forenses têm sido amplamente discutidas na literatura. Samanidou et al. (2011) avaliou as diversas técnicas disponíveis em função dos analitos de interesse em Toxicologia Forense. Contudo, é interessante também a discussão incluindo aspectos acerca das principais matrizes biológicas empregadas na área<sup>[2]</sup>.

Diversas amostras biológicas podem ser utilizadas para realização destas análises, dentre elas sangue, urina, cabelo, saliva, suor, mecônio, entre outras. A escolha da matriz depende de uma gama de fatores que se relacionam com a natureza, integridade da amostra submetida à análise, tipo de investigação (*antemortem* e *postmortem*), facilidade de coleta, e, as considerações analíticas e de ensaio juntamente com a interpretação dos resultados. Desafios específicos podem surgir dependendo da matriz escolhida, como por exemplo, nos casos *postmortem* as alterações que as amostras sofrem nos processos de autólise, redistribuição e putrefação podem conferir dificuldades adicionais no uso dessas amostras<sup>[1,3]</sup>.

O sangue e a urina são as matrizes convencionais mais prevalentes e utilizadas para realização das análises toxicológicas. No entanto, nas últimas décadas as matrizes biológicas alternativas ou não convencionais têm apresentado relevante importância na toxicologia, principalmente devido às suas vantagens quando comparadas com as amostras convencionais,

considerando que possuem características interessantes em relação à estabilidade dos analitos, método de coleta facilitado e maior janela de detecção<sup>[3,4]</sup>.

Os avanços nas áreas de preparo de amostra e as técnicas analíticas modernas foram cruciais para o desenvolvimento das análises toxicológicas forenses, pois possibilitaram a detecção de drogas e seus metabólitos em baixas concentrações em amostras extremamente complexas. As técnicas mais utilizadas são a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas, ou *in tandem* (LC-MS, LC-MS/MS). Estas técnicas são comumente escolhidas por apresentarem maior sensibilidade, compatibilidade com as concentrações dos compostos de interesse encontradas nas diversas amostras biológicas, e por permitirem a confirmação da presença dos analitos também pela análise do espectro de massas<sup>[4-7]</sup>. Contudo, toda técnica analítica, por mais seletiva e sensível que seja apresenta limitações, as quais podem ser reduzidas com um preparo de amostra eficiente. O preparo da amostra caracteriza-se pelo processo que visa isolar o analito de interesse a partir da matriz, minimizando e eliminando os interferentes (endógenos e exógenos), além de propiciar a concentração da substância, sendo um processo geralmente indispensável para o emprego de técnicas de detecção e quantificação de substâncias de interesse forense<sup>[8-9]</sup>.

## 2. Principais matrizes biológicas empregadas nas análises toxicológicas forenses

Com o desenvolvimento de novas tecnologias na extração de analitos, a utilização de uma variedade de amostras biológicas tornou-se ainda mais acessível e possível. Dentre as matrizes biológicas amplamente utilizadas estão urina, sangue, cabelo, fluido oral, suor, humor vítreo e mecônio. Cada uma destas matrizes será abordada em termos de sua composição, forma como o analito é incorporado e sua utilidade no âmbito das análises forenses, com base nas informações que é capaz de fornecer.

## 2.1. Urina

A urina é uma matriz biológica de escolha tradicional em análises toxicológicas forenses e seu uso é bem estabelecido. Consiste em um ultrafiltrado do sangue formado continuamente pelos rins a partir do qual foram reabsorvidas substâncias essenciais ao metabolismo do organismo, como glicose, aminoácidos e água. Em sua composição constam substâncias químicas orgânicas (como ureia, ácido úrico e creatinina) e inorgânicas (como íons cloreto e sódio) dissolvidas em água. Como principal via de eliminação de substâncias, esta matriz é geralmente alvo de investigação de metabólitos. A quantidade média diária de urina formada no organismo de um indivíduo saudável é 1200 mL. Fatores como quantidade de líquido ingerido, perda de líquidos por outras vias e variações na secreção do hormônio antidiurético podem alterar esse volume<sup>[10-14]</sup>.

O perfil da urina de “amostra tradicional” para análises toxicológicas se deve a alguns aspectos como a coleta fácil e não invasiva, grandes volumes disponíveis para análise e menor número de interferentes quando comparada a outras matrizes. Sob congelamento apresenta alta estabilidade permitindo o armazenamento em longo prazo de amostras positivas. No entanto, é uma amostra de fácil adulteração, uma vez que a coleta vigiada, apesar de ser recomendada, não é uma prática comum<sup>[15-17]</sup>.

Drogas e metabólitos, geralmente, são encontrados em elevadas concentrações nesta matriz. As drogas metabolizadas pelo fígado formam metabólitos polares que são facilmente eliminados através da urina. A excreção urinária da maioria dos metabólitos é mais rápida e extensa do que com os fármacos originais, e, em concentrações muito maiores que as drogas. Entretanto, como a maioria das drogas encontram-se presentes na urina por um período de 2 a 5 dias após o consumo, apenas o uso recente de drogas é detectado<sup>[17-22]</sup>.

## 2.2. Sangue

Trata-se de um fluido complexo, constituído em grande parte de água (cerca de 80%), proteínas solúveis, gorduras, sais e células suspensas. O sangue é uma matriz convencional amplamente estudada nas análises toxicológicas forenses, pois fornece de forma apropriada a correlação da concentração da droga no sangue com o estado clínico do indivíduo, além disso, o uso da razão droga original/metabólito pode ser bastante útil para prever o período decorrido desde a administração. Contudo, é uma amostra obtida através de método invasivo, que envolve maior risco de contaminação, além disso, possui uma janela de detecção restrita com relação às drogas de abuso, já que estas podem ser rapidamente metabolizadas, dependendo da meia vida da substância, de alguns minutos a algumas horas passadas da exposição. Dessa forma, os compostos investigados podem ser encontrados em maiores concentrações na urina<sup>[1,7]</sup>.

Para coleta do sangue é indispensável a adição de anticoagulante e conservante, e a escolha do anticoagulante depende dos analitos a serem investigados. No caso da heparina sabe-se que esta pode interagir com alguns fármacos, enquanto que o EDTA é agente complexante, não sendo indicado em casos em que os analitos são metais ou compostos organometálicos<sup>[1,7,3]</sup>.

A amostra de sangue pode ser avaliada na forma de sangue total, plasma (que constitui do sobrenadante obtido do sangue adicionado de anticoagulante, com o conteúdo precipitado) ou o soro (que constitui o plasma sem os fatores de coagulação, podendo ser obtido pela centrifugação do sangue já coagulado). Se o objetivo da análise compreender a quantificação da droga é mais indicada a avaliação em amostra de sangue total, pois as drogas apresentam diferentes afinidades por proteínas e uma vez que apresentam considerável afinidade, podem ser descartadas se investigadas apenas em amostra de plasma ou soro<sup>[1,7]</sup>.

Para a pesquisa de metabólitos conjugados, reações de clivagem hidrolítica são demandadas anteriormente ao processo de extração e nestas podem ser empregadas enzimas, ácidos ou bases. Já a etapa de precipitação proteica envolve a adição de agentes precipitantes, tais como sais, ácidos ou, mais comumente, solventes orgânicos como metanol, acetona ou acetonitrila, geralmente em volumes ao menos duas vezes maior do que da amostra tratada. Neste processo é possível que ocorra baixa recuperação dos analitos devido também aos fenômenos de adsorção e oclusão do composto-alvo, neste caso o analito poderá se encontrar no precipitado. A adição de tampão não só colabora para a obtenção do analito em sua forma apolar nesta amostra, possibilitando sua posterior extração com solvente orgânico, como também contribui para diminuição da viscosidade do meio<sup>[1,23]</sup>.

Com relação à coleta do sangue *postmortem* requer-se consideração dos fenômenos de redistribuição, os quais participam a distribuição de drogas de órgãos que atuam como reservatórios, o movimento do sangue e outros processos provenientes das alterações cadavéricas<sup>[24-26]</sup>. O sangue periférico é menos suscetível à redistribuição *postmortem* de substâncias dos tecidos em que se concentram drogas, dessa forma, avaliar o local de onde o sangue foi coletado é de extrema importância para interpretação dos resultados das análises toxicológicas. O sangue periférico é geralmente obtido da veia femoral, enquanto que o sangue central pode ser coletado das artérias subclávias ou diretamente do coração<sup>[27]</sup>. No sangue *postmortem* a atividade de microorganismos, em especial as espécies *Escherichia coli* e *Candida albicans* são responsáveis pela formação endógena do etanol, na qual a glicose é o substrato, que, no entanto só é mais significativa nos estágios mais avançados de decomposição<sup>[28-30]</sup>.

### 2.3. Fluido oral

O fluido oral é uma mistura de células da mucosa bucal, restos de alimentos e saliva, secretada pelas glândulas presentes na mucosa bucal<sup>[31]</sup>. Um indivíduo

saudável, geralmente produz de 500 a 1500 mL de fluido por dia<sup>[32]</sup>. As drogas são transferidas do sangue para a saliva por ultrafiltração ou difusão passiva, podendo ser detectadas nesta matriz na forma não-metabolizada. Porém, esta incorporação de drogas na saliva é restringida para moléculas de alto peso molecular, drogas ionizadas ou ligadas a proteínas plasmáticas<sup>[33-34]</sup>.

Uma das principais aplicações dessa matriz é sua utilização no monitoramento de condutores no trânsito e na verificação de uso de drogas em ambiente de trabalho<sup>[35,36]</sup>. As drogas no fluido oral são pesquisadas para exposições mais recentes, dependendo de sua natureza, as substâncias podem ser detectadas até cerca de 2 dias passados da exposição, como é o caso da maconha e anfetaminas. Drogas de caráter básico tendem a ser detectadas em concentrações superiores em comparação com aquelas de caráter ácido<sup>[37]</sup>.

A coleta do fluido oral caracteriza-se por ser de fácil realização no local da abordagem, além de não exigir profissional especializado. A desvantagem, no entanto, é a possibilidade de contaminação por drogas utilizadas por via oral, e o restrito número de estudos que avaliam a interferência dos coletores, adulterantes e exposição passiva<sup>[38-42]</sup>. Além disso, a coleta é um processo simples, não-invasivo e pode ser monitorado. Pode ser realizada com dispositivos disponíveis comercialmente, como Omni-Sal®, OraSure® e Salivette®, sendo este último constituído de um tubo coletor com tampa, algodão e um orifício em sua base. Quando o algodão é inserido na boca do indivíduo, o fluido oral é absorvido pelo algodão<sup>[35]</sup>.

O desenvolvimento científico tornou as técnicas de extração mais sensíveis e, além disso, o avanço nos procedimentos de preparo de amostras possibilitou a análise de várias drogas de interesse forense no fluido oral, como a cocaína<sup>[43]</sup>, as anfetaminas<sup>[44]</sup>, os opióides<sup>[43,45]</sup>, os canabinóides<sup>[46]</sup>, os benzodiazepínicos<sup>[47]</sup> e o etanol<sup>[48]</sup>. A coleta de fluido oral é uma ótima alternativa ao teste realizado com o etilômetro, uma vez que permite a identificação simultânea de álcool e outras drogas de

abuso, além de permitir que a amostra seja armazenada e reanalisada, caso haja requisição judicial<sup>[49-50]</sup>.

Existem testes de imunoensaio para drogas de abuso, que podem ser realizados na saliva no local da abordagem. Estes produtos são de fácil utilização e por serem rápidos, os resultados são obtidos em apenas 1 ou 2 minutos. Um resultado positivo no teste de triagem indica o uso de substância psicoativa, o que pode ser confirmado por técnicas mais sensíveis<sup>[51]</sup>.

## 2.4. Suor

A análise de suor tornou-se uma possibilidade útil em Toxicologia Clínica e Forense, utilizada como matriz biológica alternativa para o monitoramento do uso de drogas<sup>[52-54]</sup>. O suor é composto por 99% de solução aquosa hipertônica, e outros constituintes como lactato, albumina, gama globulina, ureia, íons de amônio, enzimas e compostos orgânicos<sup>[55-57]</sup>. Em média, o volume de suor excretado por dia em indivíduos saudáveis varia entre 300 a 700 mL. O pH encontra-se em 5,8<sup>[58,59]</sup>. As glândulas sudoríparas são amplamente distribuídas através da pele, e são classificadas em dois tipos: apócrinas e écrinas. As glândulas apócrinas são maiores e estão localizados principalmente nas axilas, púbis e mamas. E as glândulas écrinas são mais numerosas e estão presentes nas palmas das mãos, nas plantas dos pés, na face e no peito. A pele também é banhada por secreção sebácea composta de lipídios como colesterol (75%), triglicerídeos e ácidos graxos (20%)<sup>[60,61]</sup>.

As drogas são incorporadas no suor por difusão passiva e migração transdérmica. As características físico-químicas das drogas como massa molecular, pKa, grau de ligação às proteínas plasmáticas e lipofilicidade e o pH influenciam essa incorporação. Maiores concentrações de drogas são encontradas no suor quando comparadas a outras matrizes biológicas alternativas devido à composição dessa matriz<sup>[52,55,60]</sup>.

A coleta do suor é simples, não invasiva, não constrangedora, com menor risco de adulteração e de modo contínuo fornecendo uma ampla janela de detecção

(de até 14 dias). Apresenta poucos interferentes exigindo menos etapas no procedimento analítico e no preparo de amostra. As espécies predominantes encontradas no suor são as próprias substâncias utilizadas, ao invés de seus metabólitos<sup>[62]</sup>. Dentre as desvantagens no uso dessa matriz incluem-se a falta de informações sobre a relação dose-resposta, a quantidade limitada de amostra e a literatura sobre uso dessa matriz é limitada. Além disso, as concentrações encontradas dos analitos são relativamente baixas, exigindo técnicas analíticas com alta sensibilidade e seletividade<sup>[60,63]</sup>.

Para coleta, são utilizados dispositivos próprios para detecção de drogas no suor, aprovados pelo FDA (*Federal Drug Administration*) dos Estados Unidos, os “*patches*”, constituídos basicamente de material absorvente coberto por camada adesiva, disponíveis comercialmente como PharmChek<sup>®</sup><sup>[61]</sup>.

Dentre as drogas de abuso já estudadas e detectadas no suor incluem-se o etanol, as anfetaminas, o fenobarbital, a cocaína, a heroína, a morfina, a fenciclidina, o Ácido Gama Hidroxiúterico (GHB) e a metadona. Ensaio imunoenzimático e radioensaio estão descritos na literatura como métodos de triagem para avaliar a presença de drogas em suor. Exames confirmatórios indicados e utilizados são principalmente aqueles empregando as técnicas de GC-MS e LC-MS<sup>[2,65]</sup>.

## 2.5. Cabelo

O cabelo é uma matriz biológica complexa composta de 65% a 95% de proteína queratina, de 15 a 35% de água, de 1 a 9% de lipídios e ainda por uma pequena parcela de minerais. Os fios capilares têm origem no conjunto de células hermeticamente ligadas inseridas num centro germinativo denominado matriz, que está localizada na base do folículo capilar, a aproximadamente 3 a 5 mm abaixo da superfície da epiderme. Os folículos capilares localizam-se no interior da pele do couro cabeludo e são circundados por vasos capilares arteriais, assim como glândulas sudoríparas<sup>[66]</sup>.

A estrutura e fisiologia desta matriz implicam no envolvimento de mais de um mecanismo de incorporação de drogas. Os modelos incluem: a) a incorporação através da difusão ativa ou passiva do sangue presente nos vasos capilares para o folículo capilar; b) a incorporação através do suor e secreções provenientes das glândulas sudoríparas e sebáceas adjacentes à porção intradérmica do fio; c) a incorporação de substâncias externas (presentes no ambiente), que acabam por se depositar e permanecer na fibra capilar<sup>[67]</sup>. À medida que as células se alongam e envelhecem, elas morrem e coalescem, formando a fibra capilar com a droga incorporada na matriz<sup>[68]</sup>. Portanto, as drogas são incorporadas no cabelo progressivamente, assim, estas poderão estar presentes em determinado segmento do cabelo, dependendo da taxa de crescimento dos fios. Diferentes taxas de crescimento do cabelo já foram calculadas, variando de 0,6 a 1,42 cm/mês. Tais valores são dependentes da cor do cabelo, etnia, ou região anatômica em que o cabelo se encontra<sup>[66]</sup>. O conteúdo proteico, especialmente de melanina, afeta a eficiência da ligação da droga ao cabelo, já que servem como sítios de ligação para estas substâncias<sup>[68]</sup>. Fatores, tais como lipofilicidade e basicidade das substâncias, também influenciam sua incorporação no cabelo: drogas de caráter básico, como a cocaína e as anfetaminas, tendem a se incorporar no cabelo em maior quantidade quando em comparação com drogas de caráter ácido ou neutro, como os canabinóides e benzodiazepínicos<sup>[69-71]</sup>.

A principal vantagem do uso desta matriz é a possibilidade de determinação da exposição progressiva às drogas, possuindo uma ampla janela de detecção (semanas, meses, anos), mas não possibilitando identificar o uso recente, já que o processo de incorporação na matriz queratinizada pode levar dias, dependendo da natureza da substância<sup>[70]</sup>.

A estabilidade e retenção das drogas no cabelo são afetadas pela realização de tratamentos cosméticos como descoloração e tinturas e permanentes. Os produtos utilizados são formulados com bases fortes, que causam danos na fibra, afetam a estabilidade ou a quantidade de droga presente na matriz capilar. Processos como estes,

associados à contínua exposição aos fatores naturais (luz solar, clima, poluição etc) podem gerar dano considerável da cutícula capilar, acarretando na redução, de 50 a 80% da concentração inicialmente presente de drogas<sup>[68,72]</sup>.

O cabelo é uma amostra coletada através de método não invasivo, de fácil transporte e armazenamento, justamente devido à sua alta estabilidade. Além disso, é uma matriz de difícil adulteração. Recomenda-se a coleta de aproximadamente 100 mg de cabelo, cortados rentes ao couro cabeludo, localizado na parte posterior e inferior da cabeça, porque nesta região, menos exposta, o cabelo é menos afetado pelas condições externas e apresenta menor variabilidade na taxa de crescimento e o número de fios na fase de crescimento é mais constante<sup>[73-77]</sup>.

Considerando o processo de contaminação ambiental que ocorre especialmente quando o indivíduo entra em contato externo com pó, vapores ou fumaça, especialmente em caso de drogas cujo consumo envolve sua pirólise (como é o caso da maconha, *crack* e heroína), a etapa de lavagem da amostra é de grande importância para eliminar compostos externamente ligados. Neste processo podem ser aplicados surfactantes e soluções especiais de limpeza, assim como solventes orgânicos (acetona, metanol, diclorometano, entre outros) em uma ou mais etapas. Após, a amostra deve ser pulverizada, para aumento de sua área superficial. Uma etapa de digestão da amostra antes da realização de outras técnicas de extração permite a liberação dos analitos da matriz, a digestão pode ser enzimática ou mediada pela adição de solução de hidróxido de sódio e aquecimento<sup>[72]</sup>.

Neste tipo de amostra, a concentração dos analitos é geralmente muito baixa, em muitos casos, quantidade inferiores a dezenas de nanogramas por miligrama de cabelo são obtidas, de modo que alta sensibilidade da análise é requerida<sup>[78,79]</sup>.

## 2.6. Mecônio

O mecônio tem sido apontado em diversos trabalhos como matriz biológica alternativa para verificar a exposição uterina às drogas de abuso e outras

substâncias. Os principais analitos já detectados nessa matriz são: nicotina, álcool, pesticidas organofosforados e organoclorados, medicamentos, cocaína, opiáceos, anfetaminas, metanfetaminas, *ecstasy* e maconha<sup>[80-82]</sup>.

O mecônio consiste na primeira excreção do recém-nascido, a sua formação inicia-se a partir do segundo trimestre de gestação (por volta da 12ª semana) e acumulando-se no intestino do feto até o momento do parto, podendo ser excretado em até cinco dias após o nascimento. É uma matriz extremamente complexa, apresenta consistência pegajosa, coloração verde escura a negra e não possui o odor característico, geralmente presente nas fezes. É composto por água, células epiteliais descamadas do trato gastrointestinal e da pele, ácido e sais biliares, entre outros<sup>[83-85]</sup>.

As drogas utilizadas pela mãe durante a gestação são incorporadas no mecônio por dois mecanismos distintos. O primeiro consiste na difusão passiva através dos vasos sanguíneos da placenta para o feto, e os fatores que influenciam esse mecanismo são a massa molecular, o grau de ionização, o grau de ligação a proteínas plasmáticas materna e/ou fetal e a lipofilicidade das drogas e o fluxo sanguíneo para a placenta. O segundo mecanismo trata-se da incorporação das substâncias por deglutição do líquido amniótico: nesse mecanismo as substâncias excretadas pelo feto no líquido amniótico via urinária ou biliar são deglutidas novamente e acumulando-se no intestino e sendo eliminadas após o nascimento através do mecônio. A incorporação e o acúmulo de substâncias nessa matriz são resultantes do consumo, metabolismo e eliminação materna, transferência placentária e metabolismo fetal, fatores estes que tornam o mecônio uma ótima matriz para verificar exposição fetal com ampla janela de detecção gestacional<sup>[84,80]</sup>.

As vantagens do uso do mecônio são a disponibilidade da amostra, coleta fácil e não invasiva, e a capacidade de fornecer informações preservadas sobre a exposição fetal à substâncias a partir do primeiro trimestre de gravidez<sup>[85,82]</sup>. As desvantagens dessa matriz são a complexidade e heterogeneidade da amostra, o

que exige etapas adicionais de preparo, purificação e concentração dos analitos, aumentando o tempo e o custo das análises. No entanto, apesar da sua complexidade, com esta matriz já foram realizados trabalhos pioneiros e empregadas técnicas de preparo de amostra mais inovadoras, como o uso das ponteiros DPX (*Disposable Pipette Tips Extraction*), que auxiliaram na redução de processos envolvidos no seu preparo e permitiram uma análise rápida e sem interferentes dessa amostra<sup>[86,87,103]</sup>.

Métodos de triagem imunoenzimáticos podem ser aplicados a esta matriz, requerendo técnicas de instrumentação analítica para confirmação dos resultados<sup>[85]</sup>.

## 2.7. Humor vítreo

O humor vítreo é o líquido gelatinoso contido no interior do olho, constituído basicamente por água (cerca de 99%), além de sais e pequena porcentagem de proteína (cerca de 0,2%), especialmente colágeno. Neste fluido são ausentes as esterases, responsáveis pela rápida degradação de substâncias como a cocaína, heroína e 6-acetilmorfina. As drogas e toxinas chegariam ao humor vítreo através da passagem pela barreira sangue-retina, por meio de transporte ativo e passivo. Nesta matriz a presença da droga original é predominante em relação aos metabólitos<sup>[88-90]</sup>.

Trata-se de uma matriz de grande interesse nas análises toxicológicas *postmortem*. Sua importância reside na grande estabilidade diante dos processos de putrefação, uma vez que se encontra alocada no interior da câmara ocular, em ambiente consideravelmente estéril e protegido de traumas, disponível em casos de estado de putrefação ou carbonização parcial do corpo<sup>[91-92]</sup>.

A coleta do humor vítreo pode ser feita por meio de punctura no canto lateral do olho. O volume coletado desta amostra é pequeno, em torno de 2 mL, o que limita o número de ensaios a serem realizados, além disso, drogas com alta afinidade proteica dificilmente são encontradas nesta matriz, é o caso do delta-9-THC e seus metabólitos<sup>[93]</sup>.

Por possuir alto percentual de água, o humor vítreo não requer etapas mais elaboradas de preparo de amostra, sendo uma matriz que apresenta, com relação às técnicas instrumentais, baixo ruído e reduzido efeito de matriz. Considerando os problemas relacionados à formação endógena ao sangue postmortem, o humor vítreo é uma matriz extremamente útil em exames de alcoolemia, considerando a distribuição eficiente do etanol neste fluido, de forma que as concentrações relativas encontradas no sangue periférico e as encontradas no humor vítreo chegam a valores próximos a 1, demonstrando correlação adequada<sup>[90,93]</sup>.

### 3. Principais técnicas de preparo de amostra na toxicologia forense

O preparo de amostra é parte crucial do procedimento analítico, pois reduz os interferentes que podem comprometer a seletividade e sensibilidade ao analito de interesse na matriz biológica. Nas análises toxicológicas forenses o aperfeiçoamento de métodos tradicionais para extração de drogas de abuso em amostras biológicas é de extrema importância para otimização da análise. O processo, na maioria das vezes é intensivo, equivalendo a até 80% do tempo total da análise e sujeito a erros em geral. As técnicas de preparo de amostras exigem condições mínimas para serem aplicadas, dentre elas, a perda mínima de amostra com remoção eficaz de interferentes, a alta recuperação do analito, baixos tempo de análise e custo. Atualmente, uma ampla variedade de métodos de preparo de amostras está disponível e muitos desses métodos têm sido empregados em análises toxicológicas de drogas e/ou metabólitos nas amostras biológicas com interesse forense<sup>[8,94-96]</sup> (Tabela 1).

#### 3.1. Precipitação proteica

A precipitação proteica é uma técnica de preparo de amostra simples e rápida. Consiste na desnaturação de proteínas (perda de estrutura terciária) presentes na matriz por adição de agentes precipitantes (ácido ou base fortes, temperatura, ou solventes orgânicos, como acetonitrila, metanol). Após adição do agente a amostra é submetida

a agitação e centrifugação, possibilitando a separação do precipitado proteico e o sobrenadante, utilizado para análise toxicológica. Nesse processo não ocorre a extração ou pré-concentração da amostra, consistindo na separação da ligação do analito em questão (droga, metabólito ou biomarcador) com a proteína. Apesar das vantagens citadas, trata-se de um processo realizado manualmente, o que pode aumentar o tempo de preparo para um grande número de amostras<sup>[97]</sup>.

#### 3.2. Extração Líquido-Líquido (Liquid-liquid extraction, LLE)

A LLE é um dos primeiros métodos de preparo de amostras e baseia-se na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do analito investigado pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. O processo envolve a adição do solvente extrator seguida de agitação mecânica para promover o máximo de contato entre as fases orgânica e aquosa. Posteriormente, a mistura é submetida à centrifugação para otimizar a separação entre as fases e então a fase de interesse é recolhida para análise. Atualmente, métodos mais eficientes na extração e concentração dos analitos estão disponíveis. Contudo, devido à sua rapidez, simplicidade e grande número de solventes extratores existente, a LLE ainda é amplamente aplicada em análises toxicológicas. Um dos principais problemas associados a esta técnica analítica é a geração de resíduos de solventes, muitas vezes mais tóxicos do que o próprio analito de interesse, e que pode afetar tanto o analista pela exposição durante o processo, como o meio ambiente pela dificuldade no descarte do mesmo<sup>[98,99]</sup>.

#### 3.3. Salting-out

Essa técnica caracteriza-se pela adição de um sal inorgânico à amostra aquosa e um solvente orgânico miscível em água, formando um sistema bifásico, com o objetivo de auxiliar na separação do solvente orgânico miscível em água, além de melhorar extrações em solventes orgânicos apolares. A eficácia desse procedimento depende das características físico-

químicas do analito e o tipo de sal utilizado. Apresenta várias vantagens sobre a LLE convencional tais como aplicabilidade a uma vasta gama de analitos, melhores valores de recuperação dos analitos e uma grande variedade de sais disponíveis (natureza química, peso molecular e volatilidade)<sup>[98-100]</sup>.

### 3.4. Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction, SPE)

A SPE é baseada no princípio de separação à base de afinidade como cromatografia em fase líquida, consistindo na separação líquido-sólido. Nas etapas dessa técnica incluem-se retenção e eluição de analitos do fluido biológico, remoção de interferentes e concentração da amostra. Tradicionalmente a SPE está disponível nos modos de fase normal, de fase reversa e de troca iônica; no entanto, um dos formatos mais utilizados é o de fase reversa. Devido à variação de propriedades físico-químicas de analitos de interesse estes formatos tradicionais não são sempre adequados e a disponibilidade de diferentes fases estacionárias e diferentes abordagens são necessárias. Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo um sólido sorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para retirar os analitos de interesse da fase. A SPE convencional oferece várias vantagens destacando-se o consumo de menores volumes de solventes em relação à LLE, o menor tempo de operação da técnica, a alta recuperação dos analitos e a possibilidade de automação. Porém, também apresenta algumas limitações, como a etapa de dessorção dos analitos que requer o uso de solventes tóxicos e a ocorrência de efeitos de matriz<sup>[101,102]</sup>.

### 3.5. Extração com Ponteiros DPX (Disposable Pipette Extraction tips)

A técnica de extração em fase sólida modificada com ponteiros descartáveis DPX é um novo método de extração em fase sólida utilizado para extrações rápidas em amostras em solução. Desenvolvida pelo pesquisador

William Brewer (Universidade da Carolina do Sul, EUA), a DPX consiste em uma ponteira de 1,0 ou 5,0 mL apresentando fase sólida dispersa na qual os analitos entram em contato constante, promovendo um rápido equilíbrio entre a fase sorvente e a amostra a ser extraída. A extração consiste no condicionamento da ponteira com o solvente adequado seguido da aspiração da amostra e promoção do contato com a fase estacionária contida na pipeta. Após o tempo de contato, a matriz é descartada e seguem-se então as etapas de lavagem e eluição. A utilização desta técnica combina rapidez, uso mínimo de solventes com alta recuperação, alta eficiência de extração, produtividade e rendimento e possibilidade de automação<sup>[103-105]</sup>.

### 3.6. Extração por Headspace (HS)

Para a determinação de etanol e outros compostos voláteis (tais como inalantes e gases venenosos) em sangue, outros fluidos e homogenatos de tecidos, a técnica mais conveniente a ser aplicada é a extração por *Headspace*. Nesta técnica a amostra é inserida em recipiente hermeticamente fechado e termostatizado, por determinado tempo de incubação, permitindo adequado equilíbrio dinâmico entre as fases líquida e gasosa da amostra. Em seguida, uma alíquota da fase gasosa da amostra é recolhida e analisada por cromatografia em fase gasosa. Trata-se de uma técnica que permite o isolamento dos analitos voláteis da matriz de modo simples, eficiente, consideravelmente rápido e de baixo custo<sup>[106]</sup>.

### 3.7. Microextração em Fase Sólida (SPME)

A microextração em fase sólida foi desenvolvida em 1990 por Arthur e Pawliszyn e consiste em uma técnica utilizada principalmente para a extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em amostras aquosas empregando uma seringa modificada contendo micro tubo de aço inoxidável com uma agulha interna. O micro tubo possui cerca de 1 cm de fibra de sílica fundida revestida com um polímero orgânico. O método consiste na captura dos analitos em uma fibra capilar de sílica fundida quimicamente modificada,

recoberta com uma película de material apropriado, com posterior análise direta por técnicas cromatográficas de alta eficiência tais como cromatografia em fase gasosa e cromatografia em fase líquida.

A fibra de SPME é introduzida no recipiente contendo a amostra, o protetor da agulha da fibra é retraído e a fibra de sílica é exposta ao meio onde ocorrerá a extração dos analitos. O revestimento polimérico da fibra atua concentrando os analitos por processos de absorção ou adsorção<sup>[107]</sup>.

Vários revestimentos de fibra são disponíveis comercialmente e a escolha é determinada pelas propriedades físico-químicas dos analitos, dentre eles polidimetilsiloxano (analitos apolares), poliacrilato (analitos polares, principalmente fenóis), divinilbenzeno polidimetilsiloxano (analitos polares, principalmente aminas), polidimetilsiloxano carboxen (analitos de baixo peso molecular), carbowax-divinilbenzeno (analitos polares, principalmente álcoois) e divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (analitos polares e apolares)<sup>[112]</sup>.

O procedimento de extração empregando a SPME pode ser realizado de duas maneiras. A primeira consiste na imersão direta da fibra na amostra mantendo-a sob agitação durante a extração do analito. E a segunda é através da utilização da técnica de *headspace*, na qual a amostra é aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos na fibra. É essencial que as condições para extração em fibra de SPME sejam otimizadas tais como pH, concentração de sal (para efeito de *salting-out*), o volume da amostra, tempo e velocidade de agitação da amostra, temperatura e tempo de extração. O espaço livre no frasco de amostra pode influenciar na extração da substância. Após o processo de extração, os analitos concentrados na fibra são dessorvidos termicamente através da introdução da fibra no injetor aquecido de um cromatógrafo em fase gasosa. A dessorção também pode ser realizada por cromatografia em fase líquida, utilizando o próprio solvente da fase móvel. As

principais vantagens da técnica são alta sensibilidade, seletividade e precisão, possibilidade de automação e eliminação do uso de solventes. As desvantagens são os elevados custos associados à técnica, fragilidade da fibra e elevado tempo de extração<sup>[107-112]</sup>.

### 3.8. Micro extração dispersiva líquido-líquido (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)

A DLLME é uma técnica de extração miniaturizada desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores. Baseia-se no equilíbrio de distribuição dos analitos entre a amostra e o solvente extrator. É caracterizada por um sistema de extração ternário, no qual o solvente extrator e o solvente dispersor são rapidamente injetados na amostra aquosa com o auxílio de uma seringa, formando uma solução turva no tubo (amostra aquosa/solvente extrator/solvente dispersor) que é submetida a centrifugação, onde as partículas do solvente extrator são sedimentadas. Essa fase sedimentada é recolhida e submetida à análise toxicológica<sup>[113]</sup>.

As principais vantagens da técnica são simplicidade, rapidez, baixo custo, alta recuperação, uso de volumes reduzidos de solvente orgânico e aplicável a uma ampla gama analitos. No entanto, a desvantagem dessa técnica é a dificuldade de automação, devido à necessidade de etapas de separação de fases e centrifugação<sup>[113-115]</sup>.

A composição de uma matriz biológica e os diferentes processos fisiológicos de incorporação de substâncias associados encontram-se relacionados com a forma química em que o analito se apresenta e as técnicas requeridas para eliminação dos interferentes e pré-concentração deste composto, já os compostos-alvo, em grande parte drogas e toxinas, devem ser conhecidos em função de suas propriedades físico-químicas principalmente com respeito à sua polaridade, faixa de pKa, ponto de ebulição e estabilidade no meio.

**Tabela 1.** Aplicações das técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense.

Amostra	Analitos	Técnica de extração	Limite de detecção	Técnica de análise	Referência
Humor vítreo	Opioides, anfetaminas, cocaína e metabólitos	Extração em fase sólida com cartucho Trace B® 335 (fase mista)	1-2 ng/mL	GC-MS	[92]
	Heroína, morfina e 6- acetilmorfina	LLE (acetato de etila: clorofórmio:hexano (7:2:1, v/v/v))	10-50 ng/mL	GC-MS	[116]
	Codeína, morfina, e 6-monoacetilmorfina	DPX (Fase reversa)	3 ng/mL	GC-NPD	[117]
	Cocaína e metabólitos	DPX (Fase catiónica)	10 ng/mL	GC-MS	[118]
Sangue	Cocaína, delta-9-tetrahydrocannabinol, anfetaminas, e os respectivos metabólitos	Extração em fase sólida com cartucho Bond Elut Certify® (fase mista)	5 ng/mL	GC-MS	[30]
	Canabinóides sintéticos	LLE (clorobutano:isopropanol (90:10, v/v))	> 0,5-5 ng/mL (limite de quantificação)	LC-MS/MS	[119]
	Opioides, cocaína, benzodiazepínicos e metabólitos	DLLME (100 µL clorofórmio e 250 µL de metanol)	0,05-2 ng/mL	LC-MS/MS	[120]
	Poluentes industriais (orgânicos voláteis)	Headspace	0,01-0,05 ng/mL	GC-MS	[121]
	Δ9-THC and 11-Nor-Δ9-THC	DPX (Fase reversa)	0,01-0,05 ng/mL	GC-MS	[122]
Cabelo	Cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina	Extração em fase sólida com cartucho Phenomenex Strata Screen C	> 0,1-0,03 ng/mg (limite de quantificação)	GC-MS	[123]
	Anfetaminas, cetamina, cocaína, cocaetileno e THC	HS-SPME com fibra PDMS (100 µm)	0,01-0,012 ng/mg	GC-MS	[124]
	THC, canabinol, canabidiol	LLE (iso-octano)/HS-SPME com fibra PDMS (100 µm)	0,012-0,016 ng/mg	GC-MS	[125]
	Anfetaminas, opioides, cocaína e metabólitos	SPE com cartucho OASIS HXC/ SPME com fibra PDMS (100 µm)	0,2 ng/mg	GC-MS	[126]
	Benzodiazepínicos e metabólitos	LLE (diclorometano:éter etílico (90:10, v/v))	0,001-0,02 ng/mg	LC-MS/MS	[127]
Fluido oral	Opioides, anfetaminas, cocaína, benzodiazepínicos e metabólitos	LLE (acetato de etila:heptano (4:1, v/v))	0,13-7,1 ng/mL	LC-MS/MS	[128]
	THC, canabinol, canabidiol	SPME com fibra PDMS (100 µm)	0,5-2 ng/mL	GC-MS	[129]
	Opioides, cocaína e metabólitos, anfetaminas	SPE automatizada com cartucho OASIS® HLB	0,5-2 ng/mL	LC-MS	[130]
	Canabinoides sintéticos	LLE (hexano:acetato de etila (99:1, v/v))	0,015-0,9 ng/mL	LC-MS/MS	[131]
	Catinonas sintéticas e piperazinas	SPE com cartucho Stracta X	0,025-0,1 ng/mL	LC-MS/MS	[132]

**Tabela 1.** Aplicações das técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense.

Amostra	Analitos	Técnica de extração	Limite de detecção	Técnica de análise	Referência
Urina	Morfina e codeína	LLE (acetato de etila)	> 25 ng/mL (limite de quantificação)	GC-MS	[133]
	Canabinoides sintéticos	LLE (éter etílico)	> 0,1 ng/mL (limite de quantificação)	LC-MS/MS	[134]
	Opioides, anfetaminas, benzodiazepínicos, barbitúricos e antidepressivos tricíclicos	SPE com cartucho BAKERBOND Narc™-2	0,05-0,20 ng/mL	GC-MS	[135]
	Analgésicos e anestésicos	HS-SPME com fibra PDMS (100 µm)	0,01-1,5 ng/mL	GC-NPD	[136]
	Anfetaminas, cocaína, antidepressivos tricíclicos, meperidina, metadona, e fenciclidina	DPX (fase catiônica)	2-5 ng/mL	GC-MS	[137]
Sangue e urina <i>postmortem</i> , humor vítreo	Etanol, metanol, acetona e acetaldeído	HS - SPME Poliacrilato (85µm)	0,0001 g/dL	GC-FID	[138]
Suor	Cocaína e cocaetileno	SPME PDMS (100 µm)	5-12,5 ng/patch	GC-MS	[139]
	Metileldioxi derivados, metamphetamine e anfetamina	SPE (SPEC MP1® 2007)	2-5 ng/patch	GC-MS	[140]
Mecônio	Cocaína, nicotina e metabólitos	DPX (Fase catiônica)	2,5-15 ng/g	GC-MS	[103]
	Cocaína, derivados e metabólitos	SPE com cartucho Bond Elut Certify I®	10-40 ng/g	GC-MS	[141]
	Ésteres etílicos de ácidos graxos (bioindicadores de etanol)	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (HS-SPME)	5-100 ng/g	GC-MS	[142]

Matrizes queratinizadas exigem etapas de digestão da amostra, enquanto que matrizes heterogêneas requerem homogeneização prévia. A presença de uma grande quantidade de proteínas na amostra, em particular sangue total, exige a inclusão da etapa de precipitação proteica e centrifugação eficiente. Matrizes com alto percentual de água podem ser tratadas com técnicas de preparo mais simples, como a LLE ou a DLLME, ainda, é esperado que sejam adequadas para avaliação de substâncias mais polares. No entanto, se analitos de diferentes classes químicas estão sendo avaliados é necessário o emprego de métodos com recuperação mais eficiente, como é o caso da SPE com fase mista.

Outro limitante para escolha de uma técnica de preparo de amostra mais elaborada é a baixa concentração do analito na amostra disponível. Desse modo, com relação à seleção das técnicas de preparo de amostra necessárias, cria-se uma complexa conexão entre tempo de execução do procedimento, custo, matriz biológica, técnica de análise e analitos a serem pesquisados.

#### 4. Considerações Finais

Em Toxicologia Forense, a complexidade das matrizes biológicas utilizadas nas análises e o aumento crescente na gama de substâncias a serem investigadas tornam particularmente importante a

seleção de métodos de preparo de amostra adequados para resolução de problemas analíticos. Para tanto, é necessário o conhecimento básico dos princípios químicos e operacionais das mais variadas técnicas disponíveis e suas principais aplicações, assim como exige uma constante otimização destas técnicas, a fim de se aprimorar as etapas de extração e análise. Além disso, as propriedades dos compostos de interesse e

as características das matrizes biológicas devem ser cuidadosamente avaliadas antes que uma técnica seja adotada para o processamento das amostras. Todos esses fatores são extremamente importantes uma vez que interferem no desempenho das análises e, portanto, direcionam a produção dos diagnósticos que podem contribuir para a elucidação de questões de interesse legal.

## Referências

1. S. Jickells, A. Negrusz. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. London, Pharmaceutical Press (2008).
2. V. Samanidou, L. Kovatsi, D. Fragou, K. Rentifis. Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. *Bioanalysis*. 3: 2019-2046 (2011).
3. E. Gallardo, J. Queiroz. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed. Chromat.* 8: 795-821 (2008).
4. B. Steven Karch. *Toxicology of Abused Drugs*. 216 p (2007).
5. A.W. Jones, A. Holmgren, F. C. Kugelberg. Concentrations of scheduled prescription drugs in blood of impaired drivers: considerations for interpreting the results. *Therapeutic Drug Monitoring*. 29: 248-260 (2007).
6. J. M. Walsh. Guidelines for research on drugged driving. *Addiction (Abingdon, England)*. 103: 1258-1268 (2008).
7. J. Pawliszyn. *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation*. Amsterdam: Elsevier. 785-786 (2002).
8. J. Smeraglia, S.F. Baldrey, D. Watson. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia*. 55: 95-99 (2002).
9. B.E. Richter. Current trends and developments in sample preparation LC-GC. 17: 22-28 (1999).
10. L. Meng, W. Zhang, P. Meng, B. Zhu, K. Zheng. Comparison of hollow fiber liquid-phase microextraction and ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of drugs of abuse in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1;989:46-53 (2015).
11. B.J. Moreira, J.M.C. Yokoya, C.M. De Gaitani. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. *Scientia Chromatographica*. 6 (3):186-204 (2014).
12. N. Pizarro, J. Ortuño, M. Farré, C. Hernández-López, M. Pujadas, A. Llebaria. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J Anal Toxicol*. 26(3):157-165 (2002).
13. A. Ramseier, J. Caslavská, W. Thormann. Screening for urinary amphetamine and analogs by capillary electrophoretic immunoassays and confirmation by capillary electrophoresis with on-column multi wave length absorbance detection. *Electrophoresis*. 19: 2956 - 2966 (1998).
14. G. Skopp. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int*.142: 75-100 (2004).
15. J.B. Henry, R.B. Lauzon, G.B. Schumann. *Urina e outros fluidos corporais: Exame básico de urina*. In: Henry JB. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 19. Ed. São Paulo: Manole. 411-456 (1999).
16. J. La Pointe, B. Musselman, T. O'Neill, J.R. Shepard. Detection of "bath salt" synthetic cathinones and metabolites in urine via DART-MS and solid phase microextraction. *J Am Soc Mass Spectrom*. 26:159-165 (2015).
17. S.K. Strasinger. Introdução à uroanálise. In: *Uroanálise & fluidos biológicos*. 3. ed. São Paulo: Premier. 1-12 (1998).
18. UNODC. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine, and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens. New York, 1995. Disponível em: <<http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/publications-drug-testing-laboratories.html>>.

19. UNODC. Recommended methods for the detection and assay of barbiturates and benzodiazepines in biological specimens. New York, 1997. Disponível em: <<http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/publications-drug-testing-laboratories.html>>.
20. UNODC. Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. New York, 2011. Disponível em: <[https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic\\_analys\\_of\\_drugs\\_facilitating\\_sexual\\_assault\\_and\\_other\\_criminal\\_acts.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf)>.
21. M. Yonamine, O.A. Silva. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 773:83-87 (2002).
22. M. Yonamine, A.M. Saviano. Determination of cocaine and cocaethylene in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 20:1071-1075 (2006).
23. Tiaft J, November TF, Preparation S, About G, Our I, Events N. Recommendations on Sample Preparation of Biological Specimens for Systematic Toxicological Analysis. 2: 1–10 (2012).
24. A.L. Pelissier-Alicot, J. Gaulier, P. Champsaur, P Marquetet al. Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs : A Review. 27 (2003).
25. D.M. Butzbach. The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. *Forensic Sci Med Pathol.* 6(1):35–45 (2010).
26. M. Yarema, C. Becker. Key Concepts in Postmortem Drug Redistribution. *Clin Toxicol.* 43(4):235–41 (2005).
27. D.S. Cook, R.A. Braithwaite, K.A. Hale. Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples : the influence of postmortem redistribution. 97:282–285 (2000).
28. M.D. Robertson, O.H. Drummer. Postmortem drug metabolism by bacteria. *J Forensic Sci.* 40:382–6 (1995).
29. D. Sutlovic, M. Nestic, Z. Kovacic, S. Gusic, T. Mlinarek, I. Salamunic. Microbial ethanol production in postmortem urine sample. *Med Sci Law.* 53:243–246 (2013).
30. F.S. Pelição, M.D. Peres, J.F. Pissinate, B.S. De Martinis. A one-step extraction procedure for the screening of cocaine, amphetamines and cannabinoids in postmortem blood samples. *J Anal Toxicol.* 38:341–348 (2014).
31. W. Schramm, R.H. Smith, P.A. Craig. Methods of simplified saliva collection for the measurement of drugs of abuse, therapeutic drugs, and other molecules. *Saliva as a Diagnostic Fluid.* 694: 311-313 (1993).
32. S. Chiappin, G. Antonelli, R. Gatti, E.F. De Palo. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta.* 383: 30-40 (2007).
33. O.H. Drummer. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *Forensic Science International* 2005, 150: 133-142.
34. L.H.P. Bueno, R.H.A. Silva, M.C.S. Dias, B.S. De Martinis. Oral fluid as an alternative matrix to determine ethanol for forensic purposes. *Journal of Forensic Sciences,* 242: 117-122 (2014).
35. P. Kintz, V. Cirimele, B. Ludes. Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers. *Journal of Analytical Toxicology.* 24: 557-561 (2000).
36. 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: 1380-1387 (2002).
37. A.G. Verstraete. Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. *Forensic Science International.* 150: 143-150 (2005).
38. O.H. Drummer. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring.* 30: 203-206 (2008).
39. V. Vindenes, B. Yttredal, E.L. Oiestad, J.P. Waal H, Bernard, J.G. Morland, A.S. Christophersen. Oral Fluid is a Viable Alternative for Monitoring Drug Abuse: Detection of Drugs in Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Comparison to the Results from Urine Samples from Patients Treated with Methadone or Buprenorphine. *Journal of Analytical Toxicology.* 35: 32-39 (2011).
40. E.J. Cone. Testing human-hair for drugs of abuse. I. individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug-induced effects on pupils and behavior. *Journal of Analytical Toxicology.* 14: 1-7 (1990).
41. E.J. Cone. Saliva testing for drugs of abuse. *Saliva as a Diagnostic Fluid.* 694: 91-127 (1993).

42. K. Clauwaert, T. Decalestecker, K. Mortier, W. Lambert, D. Deforce, C. Van Peteghem, J. Van Bocxlaer. The determination of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 28: 655-659 (2004).
43. 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: 258-267 (2007).
44. M. Concheiro M, A. de Castro, O. Quintela, M. Lopez-Rivadulla, A. Cruz. Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection. *Forensic Science International*. 150: 221-226 (2005).
45. K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, *et al.* 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-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 779: 321-330 (2002).
46. M. Pujadas, S. Pichini, E. Civit, E. Santamarina, K. Perez, R. de la Torre. 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: 594-601 (2007).
47. D. Fritch, K. Blum, S. Nonnemacher, B.J. Haggerty, M.P. Sullivan, E.J. Cone. Identification and Quantitation of Amphetamines, Cocaine, Opiates, and Phencyclidine in Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 33: 569-577 (2009).
48. M. Concheiro, T.R. Gray, D.M. Shakleya, M.A. Huestis. High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398: 915-924 (2010).
49. M. Concheiro, D.M. Shakleya, M.A. Huestis. Simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates and nicotine metabolites in sweat by determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 44: 594-601 (2007).
50. M. Yonamine, N. Tawil, R.L.M. Moreau, O. Silva. A. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and *Headspace*-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *Journal of Chromatography B*. 789:73-78 (2003).
51. E.A. Kolbrich, I. Kim, A.J. Barnes, E.T. Moolchan, L. Wilson, G.A. Cooper, C. Reid, *et al.* RapiScan oral fluid drug testing system: An evaluation of sensitivity, specificity, and efficiency for cocaine detection compared with ELISA and GC-MS following controlled cocaine administration. *Journal of Analytical Toxicology*. 27: 407-411 (2003).
52. P. Kintz, N. Samyn. Unconventional samples and alternative matrices. In: Bogunz MJ. *Handbook of Analytical Separations*. Elsevier Science.2 (2000).
53. P. Kintz, N. Samyn. Determination of "Ecstasy" components in alternative biological specimens. *J. Chrom. B*. 733: 137-143 (1999).
54. B.S. De Martinis. Sweat as an Alternative Matrix for Amphetamines and Methylenedioxy Derivatives Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*. 4: 274-278. (2008).
55. J.R. Taylor, I.D. Watson, J.F. Tames, D. Lowe. Detection of drug use in a methadone maintenance clinic: Sweat patches versus urine testing. *Addiction*. 93: 847-853 (1998).
56. N. De Giovanni, N. Fucci. The current status of sweat testing for drugs of abuse: a review. *Curr Med Chem*. 20: (4) 545-561(2013).
57. V.P. Kutysenko, M. Molchanov, P. Beskaravayny, V.N. Uversky, M.A. Timchenko. Analyzing and Mapping Sweat Metabolomics by High-Resolution NMR Spectroscopy. *Plus one*. 6: (12) 24-28 (2011).
58. M.A. Huestis, J.M. Oyler, E.J. Cone, A.T. Wstadik, D. Schoendorfer, R.E.J.R. Joseph. Sweat testing for cocaine, codeine and metabolites by gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 733: 247-264 (1999).
59. J.A. Levisky, D.L. Bowerman, W.W. Jenkins, S.B. Karch. Drug deposition in adipose tissue and skin: Evidence for an alternative source of positive, sweat patch tests. *For Science International*. 110: 35-46 (2000).
60. D.A. Kidwell, J.C. Holland, S. Athanaselis. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *Journal of Chromat B*. 713:111-135 (1998).

61. D.A. Kidwell, F.P. Smith. Susceptibility of Pharmchek™ drugs of abuse patch to environmental contamination. *Forensic Sci Int.* 116: 89–106 (2000).
62. S.L. Kacinko, A.J. Barnes, E.W. Schwilke, E.J. Cone, E.T. Moolchan, M.A. Huestis. Disposition of Cocaine and Its Metabolites in Human Sweat after Controlled Cocaine Administration. *Clin Chem.* 51: (11) 2085-2094 (2005).
63. D.M. Bush. The U.S. mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs: current status and future considerations. *174: 111-119(2008).*
64. N. Uemura, R.P. Nath, M.R. Harkey, G.L. Henderson, J. Mendelson, R.T. Jones. Cocaine levels in sweat collection patches vary by location of patch placement and decline over time. *J Anal Toxicol.* 28: 253–259 (2004).
65. M.A. Huestis, E.J. Cone. Testing in alternative matrices. In: KARCH, S.B. *Drug abuse handbook.* Boca Raton: CRC Press. (1998).
66. P. Kintz, V. Spiehler, A. Negrusz, G. Cooper. Alternative specimens. In: Negrusz A, Cooper G, editors. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology.* 2 ed. London: Pharmaceutical Press. 153-187 (2013).
67. M. Baliková. Hair analysis for drugs of abuse. Plausability of interpretation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 149(2): 199-207 (2005).
68. E.J. Cone. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Ther Drug Monit.* 18(4):438-443 (1996).
69. G.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz. Testing SoH. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int.* 218(1-3):20-24 (2012).
70. C.R. Borges, J.C. Roberts, D.G. Wilkins, D.E. Rollins. Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: application to human hair. *Anal Biochem.* 290(1):116-25 (2001).
71. R.E. Joseph, T.P. Su, E.J. Cone. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucasoid and Africoid hair. *J Anal Toxicol.* 20(6):338-44 (1996).
72. F. Pragst, M.A. Balikova. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta.* 370(1-2):17-49 (2006).
73. L. Pötsch, G. Skopp, M.R. Moeller. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci Int.* 84(1-3):25-35 (1997).
74. M. Barroso, E. Gallardo, D.N. Vieira, M. López-Rivadulla, J.A. Queiroz. Hair: a complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology. *Bioanalysis.* 3(1):67-79 (2011).
75. R. Kronstrand, S. Förstberg-Peterson, B. Kågedal, J. Ahlner, G. Larson. Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content. *Clin Chem.* 45(9):1485-94 (1999).
76. G.L. Henderson, M.R. Harkey, C. Zhou, R.T. Jones, P. Jacob. Incorporation of isotopically labeled cocaine into human hair: race as a factor. *J Anal Toxicol.* 22(2):156-65 (1998).
77. M. Wada, R. Ikeda, N. Kuroda, K. Nakashima. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. *Anal Bioanal Chem.* 397: 1039-67 (2010).
78. K.S. Scott, Y. Nakahara. A study into the rate of incorporation of eight benzodiazepines into rat hair. *Forensic Sci Int.* 133(1-2):47-56 (2003).
79. F. Musshoff, B. Madea. Analytical pitfalls in hair testing. *Anal Bioanal Chem.* 388(7):1475-94 (2007).
80. C. Moore, A. Negrusz, D. Lewis. Determination of drugs of abuse in meconium. *J Chromatog B.* 713:137–146 (1998).
81. J. Gareri, J. Klein, G. Koren. Drugs of abuse testing in meconium. *Clinica Chimica Acta.* 366: 101-111 (2006).
82. T.R. Gray, D.M. Shakleya, M.A. Huestis. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. *Analytical Bioanalytical Chemistry.* 393: 1977–1990 (2009).
83. D. Bielawski, E. Ostrea, J.N. Posecion, M. Corrión, J. Seagraves. Detection of several classes of pesticides and metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia.* 62: 623-629 (2005).
84. B.S De Martinis, D.J. Dorta, R.B. Bazzarella, M.N.R. Alves, M.D. Peres. Amostras biológicas alternativas para análises toxicológicas. In: *Fundamentos de Química Forense.* Campinas, SP: Millennium Editora, Cap.16: 306-316 (2012).

85. E.T. Yamaguchi, M.M.S.C. Cardoso, M.L.A. Torres, A.G. Andrade. Drogas de abuso e gravidez. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 35(1): 44 – 47 (2008).
86. T. Gray, M.A. Huestis. Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 388: 1455–1465 (2007).
87. T.R. Gray, D.M. Shakleya, M.A. Huestis. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, norcotinine and norcotinine in human meconium by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatography B*. 863: 107–114 (2008).
88. A.R. Allan, I.S.D. Roberts. Post-mortem toxicology of commonly-abused drugs. *Diagnostic Histopathol*. Elsevier. 15(1):33–41(2009).
89. J. Wyman, S. Bultman. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. *J Anal Toxicol*. 28(4):260–263 (2004).
90. W. Jones, P. Holmgren. Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *J Clin Pathol*. 54(9):699–702 (2001).
91. A.J. Jenkins. *Drug Testing in Alternate Biological Specimens*. 200 p. (2008).
92. M.D. Peres, F.S. Pelicão, B. Caleffi, B.S. De Martinis. Simultaneous quantification of cocaine, amphetamines, opiates and cannabinoids in vitreous humor. *J Anal Toxicol*. 38(1):39–45 (2014).
93. B. Steven. Karch. *Postmortem Toxicology of Abused Drugs*. 216 p. (2007).
94. B.E. Richter. Current trends and developments in sample preparation. *LC-GC*. 17(6): 22–28 (1999).
95. X. Fu, Y. Liao, H. Liu. Sample preparation for pharmaceutical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 381(1): 1618–2642 (2005).
96. D.M. Pavlovic, S. Babica, A.J.M. Horvata, M.K. Macana. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 26(11): 1062–1075 (2007).
97. S. England, S. Seifter. Precipitation techniques. *Methods in Enzymology* 182: 285–300 (1990).
98. H. Wu, J. Zhang, K. Norem, T.A El-Shourbagy. Simultaneous determination of a hydrophobic drug candidate and its metabolite in human plasma with salting-out assisted liquid/liquid extraction using a mass spectrometry friendly salt. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 48(4): 1243–1248 (2008).
99. F. Myasein, E. Kim, J. Zhang, H. Wu, T.A. El-Shourbagy. Rapid, simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid/liquid extraction, and ultrafast LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*. 651(1): 112–116 (2009).
100. G.M. Nikolic, J.M. Perovic, R.S. Nikolic, M.M. Cacic. Salting out extraction of catechol and hydroquinone from aqueous solutions and urine samples. *Physics, Chemistry and Technology*. 2(5): 293–299 (2003).
101. L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente. A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia*. 40(7–8): 474–483 (1995).
102. T.R. Krishnan, I. Ibrahim. Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 12(3): 287–294 (1994).
103. D.C.M. Bordin, M.N.R. Alves, O.G. Cabrices, E.G. De Campos, B.S. Martinis. A Rapid Assay for the Simultaneous Determination of Nicotine, Cocaine and Metabolites in Meconium Using Disposable Pipette Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) *Anal. Toxicol*. 38: 31–38 (2014).
104. H. Guan, W.E. Brewer, S.L. Morgan. New approach to multiresidue pesticide determination in foods with high fat content using disposable pipette extraction (DPX) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(22): 10531–10538 (2009).
105. H. Guan, W.E. Brewer, S.T. Garris, C Craft, S.L. Morgan. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables using disposable pipette extraction (DPX) and micro-luke method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(10): 5973–5981(2010).
106. R. Borusiewicz. Fire Debris Analysis – A Survey of Techniques Used for Accelerants Isolation and Concentration. *Zagadnień Nauk Sądowych Issues of Forensic Sciences*. 50: 44–63 (2002).

107. J. He, R. Lv, H. Zhan, H. Wang, J. Cheng, K. Lu, F. Wang. Preparation and evaluation of molecularly imprinted solid-phase micro-extraction fibers for selective extraction of phthalates in an aqueous sample. *Analytica Chimica Acta*. 674(1): 53–58 (2010).
108. S.S. Caldas. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Quim. Nova*. 34: 1604-1617(2011).
109. H.S. Dorea, A. Gaujac, S. Navickiene. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. *Scientia Plena*, 4: 7 (2008).
110. P.L. Kole. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*. 25: 199 – 217 (2011).
111. S.C.N. Queiroz, C. Collins, C.S.F. Jardim. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*. 24(1): 68 – 76 (2001).
112. G. Vas, K. Vékey. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, 39: 233–254 (2004).
113. M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghae, F. Ahmadi, S. Berijan. Determination Of Organic Compounds In Water Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *J. Chromatogr. A*. 1116: 1-9 (2006).
114. S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.R. Milani hosseini, E. Aghae. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined With Gas Chromatography-flame Photometric Detection: Very Simple, Rapid And Sensitive Method For The Determination Of Organophosphorus Pesticides In Water. *J Chromatogr A*. 1123: 1-9 (2006).
115. X.H. Zang, Q.H. Wu, M.Y. Zhang, G.H. Xi, Z. Wang. Developments Of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 37:161-168 (2009).
116. J.G. Guillot, M. Lefebvre, J.P. Weber. Determination of heroin, 6-acetylmorphine, and morphine in biological fluids using their propionyl derivatives with ion trap GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 21(2): 127-133 (1997).
117. L. Kovatsi, K. Rentifis, D. Giannakis, S. Njau, V.J. Samanidou. Disposable pipette extraction for gas chromatographic determination of codeine, morphine, and 6-monoacetylmorphine in vitreous humor. *Sci*. 34: 1716–1721 (2011).
118. M.D. Peres, B.S. De Martinis Cocaine, metabolites and derivates in vitreous humor using disposable pipette extraction (DPX) tips and GC-MS. In: *Alternative Matrices. Approaches in: Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) & The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) Meeting, San Francisco, California, Septemper 25-30 (2011)*.
119. J. Ammann, J.M. McLaren, D. Gerostamoulos, J. Beyer. Detection and quantification of new designer drugs in human blood: Part 1 - Synthetic cannabinoids. *J Anal Toxicol*. 36:372–80 (2012).
120. M. Fisichella, S. Odoardi, S. Strano-Rossi. High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and app. *Microchem J* 2015;123:33–41.
121. J-Y. Lee, S. Kim, J-T. Lee, J-H. Choi, J. Lee, H. Pyo. Rapid Determination of Volatile Organic Compounds in Human Whole Blood Using Static Headspace Sampling with Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Bull Korean Chem Soc*. 33:3963–3970 (2012).
122. J.L. Schroeder, L.J. Marinetti, R.K. Smith, W.E. Brewer, B.L. Clelland, S.L.J. Morgan. The analysis of delta9-tetrahydrocannabinol and metabolite in whole blood and 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using disposable pipette extraction with confirmation and quantification by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Toxicol*. 32: 659 – 666 (2008).
123. M.N.R. Alves, G. Zanchetti, A. Piccinotti, S. Tameni, B.S. De Martinis, A. Poletini. Determination of cocaine and metabolites in hair by column-switching LC-MS-MS analysis. *Anal Bioanal Chem*. 405:6299–306 (2013).
124. G. Merola, S. Gentili, F. Tagliaro, T. MacChia. Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. *Anal Bioanal Chem*. 397:2987–95 (2010).
125. T. Nadulski, F. Pragst. Simple and sensitive determination of Delta(9)-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 846:78–85 (2007).
126. K. Aleksa, P. Walasek, N. Fulga, B. Kapur, J. Gareri, G. Koren. Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. *Forensic Sci Int*. 218:31–6 (2012).

127. L. Morini, C. Vignali, M. Polla, A. Sponta, A. Groppi. Comparison of extraction procedures for benzodiazepines determination in hair by LC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 218:53–6 (2012).
128. Øiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007;53:300–9.
129. L. Anzillotti, E. Castrignanò, S. Strano Rossi, M. Chiarotti. Cannabinoids determination in oral fluid by SPME-GC/MS and UHPLC-MS/MS and its application on suspected drivers. *Sci Justice*, 54:421–426 (2014).
130. M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla. Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing. *Forensic Sci Int.* 170:156–162 (2012).
131. S. Kneisel, V. Auwärter, J. Kempf. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 5:657–669 (2013).
132. A. De Castro, E. Lendoiro, H. Fernández-Vega, S. Steinmeyer, M. López-Rivadulla, A. Cruz. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device. *J Chromatogr A.* 1374:93–101 (2014).
133. X. Zhang, M. Chen, G. Cao, G. Hu. Determination of morphine and codeine in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Methods Chem* (2013).
134. A.D. De Jager, J.V. Warner, M. Henman, W. Ferguson, A. Hall. LC-MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine-an Australian perspective. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 897:22–31 (2012).
135. S. Paterson, R. Cordero, S. McCulloch, P. Houldsworth. Analysis of urine for drugs of abuse using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Ann Clin Biochem.* 37:690–700 (2000).
136. N. Raikos, G. Theodoridis, E. Alexiadou, H. Gika, H. Argiriadou, H. Parlapani. Analysis of anaesthetics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC. *J Sep Sci.* 32:1018–26 (2009).
137. S.T. Ellison, W.E. Brewer, S.L.J. Morgan. Comprehensive analysis of drugs of abuse in urine using disposable pipette extraction. *Anal. Toxicol.* 33(7): 356–365 (2009).
138. B.S. De Martinis, C.C.S. Martin Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. *Forensic Science International* 128: 115–119 (2002).
139. M.J.D. Follador, M. Yonamine, R.L.M. Moreau, O.A. Silva. Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 811: 37–40 (2004).
140. B.S. De Martinis, A.J. Barnes, K.B. Scheidweiler, MA.A Huestis. Development and validation of a disk solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry method for MDMA, MDA, HMMA, HMA, MDEA, methamphetamine and amphetamine in sweat. *Journal of Chromatography B.* 852: 450–458(2007).
141. M. N. R. Alves, B. S. De Martinis, G. Duarte, M. M. M. Pinhata. Validation of a Solid Phase Extraction procedure for identification and quantification of Cocaine and metabolites in Meconium. *Curr Pharm Anal* 8: 317-23 (2012).
142. M. Roehsig, D. M. L. De Paula, S. Moura, E. M. A. Diniz, M. Yonamine. Determination of eight fatty acid ethyl esters in meconium samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 33(14): 2115-22 (2010).