

MARCELO CARVALHO LASMAR

Determinação de *ecstasy* e derivados anfetamínicos em amostras de urina utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta e em comprimidos utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE FARMÁCIA/UFMG**

2007

MARCELO CARVALHO LASMAR

Determinação de *ecstasy* e derivados anfetamínicos em amostras de urina utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta e em comprimidos utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Edna Maria Alvarez Leite

Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2007

L345d

Lasmar, Marcelo Carvalho.

Determinação de ecstasy e derivados anfetamínicos em amostra de urina utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta e em comprimidos utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama / Marcelo Carvalho Lasmar. – 2007.

135f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Alvarez Leite.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.

1. Cromatografia – Teses. 2. Drogas – Toxicologia – Teses. 3. Toxicologia – Teses. 4. Urina - Análise – Teses. I. Título. II. Leite, Edna Maria Alvarez. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 615.9

Dedico este trabalho à

Deus, aos meus pais, irmãos e à Tia Maria, companheiros de todas as horas... e fundamentais para o sucesso de mais uma etapa. Agradeço a vocês pela educação e ensinamentos transmitidos ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Edna Maria Alvarez Leite, pela fundamental orientação, incentivo, além de sua sincera amizade, contribuindo sobremaneira com a realização do presente trabalho e com o meu crescimento profissional;

Às professoras Josianne Nicácio Silveira, Leiliane André Coelho Amorim e Carlos Alberto Tagliati pelos conselhos, paciência e incentivo, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial, Sérgio, Elisângela, Dôra, Aline, Sílvia, Renan e Michele por toda inesquecível convivência.

Aos Peritos Criminais da Polícia Civil de Minas Gerais Márcia Martins Barroca, Délio Campolina e Silberto Azevedo, por toda a colaboração prestada e pelas amostras gentilmente cedidas;

À mestranda Patrícia Bergo, do Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da UFMG, pela troca de informações e materiais;

Às Professoras Doutoradas Lígia Maria Moreira de Campos e Cristina Duarte Vianna Soares, pelos comentários valiosos no exame de qualificação, aprimorando de forma substancial o presente trabalho;

À funcionária da Secretaria de Pós-Graduação, Rosemary Alves Guimarães, sempre prestativa;

Aos colegas do PPGCF, pelo “espírito” de pós-graduação;

E a todos que nas mais diferentes circunstâncias contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Pensar apenas ou desejar somente, nunca levou ninguém a lugar nenhum. É necessário também ação.”

W. Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VI
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1 Aspectos gerais	06
2.2 Tolerância e dependência	16
2.3 Epidemiologia do uso	18
2.4 Toxicocinética	22
2.4.1 Absorção e distribuição	22
2.4.2 Eliminação	23
2.5 Toxicodinâmica	26
2.5.1 Efeitos neuropsicológicos	28
2.5.2 Efeitos fisiológicos	31
2.5.3 Interação com outras drogas	35
2.6 Aspectos Analíticos	38
2.6.1 Principais matrizes biológicas disponíveis	38
2.6.2 Métodos de extração	41
2.6.3 Métodos de identificação	47
2.6.4 Avaliação do desempenho analítico	51

3	OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1	Materiais	56
4.1.1	Equipamentos e acessórios	56
4.1.2	Vidraria	58
4.1.3	Padrões, reagentes e solventes	59
4.1.3.1	Preparo das soluções de trabalho	61
4.1.4	Amostragem	62
4.1.4.1	Material biológico	62
4.1.4.2	Comprimidos	63
4.1.4.3	Outros	63
4.2	Métodos	64
4.2.1	Otimização das condições cromatográficas	64
4.2.1.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	64
4.2.1.2	Cromatografia em fase gasosa	64
4.2.2	Extração dos analitos de interesse	65
4.2.2.1	Amostras de urina	65
4.2.2.2	Comprimidos	68
4.2.3	Parâmetros de desempenho analítico	69
4.2.3.1	Seletividade	69
4.2.3.2	Linearidade	70
4.2.3.3	Limite de detecção – LD	72
4.2.3.4	Limite de quantificação – LQ	72
4.2.3.5	Precisão analítica	73
4.2.3.5.1	Repetitividade	74
4.2.3.5.2	Precisão intermediária	74
4.2.3.6	Robustez	76
4.2.3.7	Recuperação	77
4.2.3.8	Estabilidade	78

4.2.3.9	Curva analítica	78
4.2.3.10	Aplicação dos métodos validados nas amostras obtidas	79
5	RESULTADOS	81
5.1	Condições cromatográficas	81
5.1.1	Método CLAE	81
5.1.2	Método CG	83
5.2	Parâmetros de desempenho analítico	86
5.2.1	Seletividade	86
5.2.2	Linearidade	90
5.2.3	Limite de detecção	93
5.2.4	Limite de quantificação	93
5.2.5	Precisão analítica	94
5.2.6	Robustez	96
5.2.7	Recuperação	97
5.2.8	Estabilidade	97
5.2.9	Curvas analíticas	98
5.2.10	Aplicação das metodologias propostas	101
6	DISCUSSÃO	105
7	CONCLUSÕES	121
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

RESUMO

LASMAR, M.C. **Determinação de ecstasy e derivados anfetamínicos em amostras de urina utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta e em comprimidos utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama.** Belo Horizonte, 2007. 135p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

O uso abusivo de anfetaminas e seus derivados vêm aumentando dramaticamente nos últimos anos em diversas regiões do mundo e do Brasil, notando-se especial utilização do *ecstasy* (MDMA). Essas drogas são facilmente sintetizadas e comercializadas com extrema discricção, o que reforça a necessidade do desenvolvimento de formas de identificação dessas substâncias. Um método simples, de fácil execução e baixo custo financeiro é proposto para identificação e quantificação de MDMA e seu principal metabólito (MDA) em amostras de urina humana utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta. A identificação e quantificação de MDMA e outros derivados anfetamínicos (MDA e MDE) também foi realizada em comprimidos, utilizando-se cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. Os derivados anfetamínicos são eluídos em tempo e resolução adequados. Os métodos otimizados apresentaram adequada linearidade, precisão, seletividade e robustez, além de serem capazes de detectarem os analitos mesmo quando presentes em pequenas concentrações, não somente na urina, mas também em comprimidos, sendo assim adequados para serem adotados como métodos confirmatórios em laboratórios forenses.

PALAVRAS-CHAVE: MDMA; MDA; MDE; CLAE/UV; URINA; CG/DIC; COMPRIMIDOS.

ABSTRACT

LASMAR, M.C. **Determination of ecstasy and amphetamines derivatives in urine by high-performance liquid chromatography - UV detector and in tablets by gas chromatography - flame ionization detection.** Belo Horizonte, 2007. 135p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

The abusive amphetamine use and its derivatives have shown a dramatic increasing in the last years in diverse regions of the world and Brazil, namely the special use of *ecstasy* (MDMA). These drugs are easily synthesized and commercialized with extreme discretion, what it strengthens the necessity of the development of forms of identification of these substances. A simple method, of easy execution and low financial cost, is proposed for identification and quantification of MDMA and its main metabolite (MDA) in human urine samples performed by high performance liquid chromatography – UV detector. Identification and quantification of MDMA and others amphetamines derivatives (MDA and MDE) in tablets were also performed using gas chromatography – flame ionization detector. The amphetamines derivatives are eluted in adjusted time and resolution. The optimized methods have shown adequate linearity, precision, selectivity and robustness, besides being capable to detect the analytes even when present in very little amount, not only in urine but also in tablets, being thus suitable to be adopted as confirmatory methods in forensic laboratories.

KEY WORDS: MDMA; MDA; MDE; HPLC/UV; URINE; GC/FID; TABLETS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura química dos principais derivados metilendioxianfetamínicos com potencial abusivo. 7
- Figura 2 – Estrutura química de outros derivados anfetamínicos comumente encontrados em comprimidos de *ecstasy* apreendidos nas ruas. 10
- Figura 3 – Perfil de distribuição do uso de drogas nos Estados Unidos em função da faixa etária dos usuários. 19
- Figura 4 - Principais vias de biotransformação da MDMA, MDA e MDEA. 25
- Figura 5 – Procedimento de extração e derivação dos analitos de interesse na urina para determinação por CLAE/UV. 67
- Figura 6 – Esquema da reação de derivação da anfetamina e derivados, utilizando-se NQS em meio alcalino. 67
- Figura 7 – Procedimento de extração dos analitos de interesse em comprimidos para determinação por CG/DIC. 69
- Figura 8 – Cromatogramas de alíquotas de *pool* de urina referência negativa (a) e de *pool* de urina enriquecido com 1,0 µg/mL de MDMA, MDA, e MBDB (b), analisadas pelo método CLAE/UV. 83
- Figura 9 – Cromatogramas obtidos após a injeção de alíquota de metanol (a) e de solução metanólica contendo MDA, MDMA, MDEA e MBDB, em concentração de 50 µg/mL (b), no aparelho CG, nas condições estabelecidas. 86
- Figura 10 – Cromatograma de alíquotas de *pool* de urina enriquecido com 1,5 µg/mL de MDA, anfetamina, MDMA, metanfetamina e 1,0 µg/mL de MBDB, analisadas pelo método CLAE/UV. 87
- Figura 11 – Cromatograma obtido após injeção de solução metanólica contendo anfetamina, metanfetamina, catina, pseudoefedrina, MDA, MDMA e MBDB, em concentração de 71,4 µg/mL, no aparelho CG, nas condições estabelecidas. 90
- Figura 12 – Faixa de linearidade obtida para o método CLAE/UV na análise do MDMA em amostras de urina. 91
- Figura 13 – Faixa de linearidade obtida para o método CLAE/UV na análise do MDA em amostras de urina. 91

- Figura 14 – Faixa de linearidade do método CG/DIC para a análise do MDMA em metanol. 92
- Figura 15 – Faixa de linearidade do método CG/DIC para a análise do MDA em metanol. 92
- Figura 16 – Faixa de linearidade do método CG/DIC para a análise do MDEA em metanol. 93
- Figura 17 – Representação gráfica da variação encontrada na concentração de MDMA e MDA em amostras de urina mantidas em – 18 °C por 27 dias. 98
- Figura 18 – Curva analítica para a determinação de MDMA em amostras de urina empregando-se o método CLAE/UV. 99
- Figura 19 - Curva analítica para a determinação de MDA em amostras de urina empregando-se o método CLAE/UV. 99
- Figura 20 – Curva analítica para a determinação de MDMA em metanol, empregando-se o método CG/DIC. 100
- Figura 21 – Curva analítica para a determinação de MDA em metanol, empregando-se o método CG/DIC. 100
- Figura 22 – Curva analítica para a determinação de MDEA em metanol empregando-se o método CG/DIC. 101
- Figura 23 – Cromatograma obtido após a análise de urina de usuário de drogas, empregando-se o método CLAE/UV. 103
- Figura 24 – Fotografia de um dos comprimidos de *ecstasy* (MDMA) apreendido pela Polícia Civil de Minas Gerais. 104
- Figura 25 – Cromatograma obtido após a análise de extrato metanólico, diluído à metade, de um dos comprimidos de *ecstasy* apreendido pela Polícia Civil de Minas Gerais, empregando-se o método CG/DIC. 104

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Tempo de retenção médio, de retenção relativo, fator de retenção e número de pratos teóricos dos picos cromatográficos dos analitos, composto fisiológico urinário e padrão interno, após análise por CLAE/UV. 82
- Tabela 2 - Fatores de separação e resolução dos picos cromatográficos dos analitos, composto fisiológico da urina e padrão interno, após análise por CLAE/UV. 82
- Tabela 3 – Tempo de retenção médio, de retenção relativa, fator de retenção e número de pratos teóricos dos picos cromatográficos dos analitos e padrão interno por CG/DIC. 85
- Tabela 4 – Fatores de separação e resolução dos picos cromatográficos dos compostos de interesse e padrão interno após análise pelo método CG/DIC. 85
- Tabela 5 – Tempo de retenção e de retenção relativo de alguns dos possíveis interferentes na análise do MDMA e MDA por CLAE/UV. 88
- Tabela 6 - Tempo de retenção e de retenção relativo de alguns dos possíveis interferentes na análise de MDMA, MDA e MDEA por CG/DIC. 89
- Tabela 7 – Coeficientes de variação intra-ensaio do método CLAE/UV utilizado para a análise de MDMA e MDA em urina (n=5). 94
- Tabela 8 – Coeficientes de variação interensaio (precisão intermediária) do método CLAE/UV utilizado para a análise de MDMA e MDA em urina (n=5). 95
- Tabela 9–Coeficientes de variação intra-ensaio da análise de MDMA, MDA e MDEA por CG/DIC (n=5). 95
- Tabela 10 – Coeficientes de variação interensaio (precisão intermediária) do método CG/DIC para a análise de MDMA, MDA e MDEA (n=5). 95
- Tabela 11 – Porcentagem de recuperação do método de extração em CLAE para a determinação de diferentes concentrações de MDMA e MDA, em amostra de urina. 97
- Tabela 12 – Identificação ou quantificação de MDA, MDMA, MDEA, anfetamina e metanfetamina em amostras de urina cedidas pelo Instituto Médico Legal de Minas Gerais, analisadas por CLAE/UV. 102
- Tabela 13 – Teores de MDMA, MDA e MDEA encontrados nos comprimidos apreendidos pela Polícia Civil de Minas Gerais e analisados por CG/DIC. 103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2C-B: 4-bromo-2,5 dimetoxifeniletamina
2-P-2: 1-fenil-2-propanona
4-MTA: 4-metiltioanfetamina
5-HIAA: Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT: Serotonina
 α : Seletividade
 Δ^9 THC: delta-9-tetrahidrocanabinol
AT II: Angiotensina II
CG: Cromatografia gasosa
CG/DIC: Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama
CG/EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofométrica na região do ultravioleta
CLAE/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
COMT: Catecol-O-metiltransferase
CYP1A2: Citocromo P 450 isoforma 1 A 2
CYP2D6: Citocromo P 450 isoforma 2 D 6
CYP3A2: Citocromo P 450 isoforma 3 A 2
CYP3A4: Citocromo P 450 isoforma 3 A 4
DAD: Detector de arranjo de diodos
DCE: Detector de captura de elétrons
DENARC: Departamento de narcóticos
DEQ: Detector eletroquímico
DIC: Detector de ionização em chama
DNB: Cloreto de 3,5-dinitrobenzoila
DNP: Detector de nitrogênio e fósforo
DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina
DOM: 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina
EC: Eletroforese capilar
ELL - Extração líquido-líquido
EM: Espectrometria de massas
FDA : *Food and Drug Administration*
FMOC: 9-fluorenil metil cloroformato
GABA: Ácido gama-butírico
GSH: Glutathiona reduzida
HHA: 3,4 diidroxianfetamina
HHMA: 3,4-diidroximetanfetamina
HMA: 4-hidroxi-3-metoxi-anfetamina
HMMA: 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina
IDMU: *Independent Drug Monitoring Unit*
K: Fator de retenção

LD: Limite de detecção
L-DOPA: 3,4-diidroxifenil-L-alanina
LPME: Microextração em fase líquida, do inglês, *Liquid Phase Microextraction*
LQ: Limite de quantificação
LSD: Dietilamina do ácido lisérgico
MAO_A: Monoamino oxidase A
MAO_B: Monoamino oxidase B
MBDB: N-metilbenzodioxazolilbutamina
MDA: Metilenodioxianfetamina
MDEA: Metilenodioxietilamfetamina
MDMA: Metilenodioximetamfetamina
MDPBP: 3,4-metilenodioxifenil-2-bromopropano
N: Número de pratos teóricos
NIDA: *National Institute on Drug Abuse*
NMDA: N-metil-D-aspartato
NMDAR: receptor do N-metil-D-aspartato
NQS: 1,2-naftoquinona-4-sulfonato
ONU: Organização das Nações Unidas
PMA: Parametoxianfetamina
PDMS: Polidimetilsiloxano
r: Coeficiente de correlação
R²: Coeficiente de determinação
Rs: Resolução
SBSE: Extração sortiva em barra de agitação, do inglês, *Stir Bar Sorptive Extraction*
SERT: Transportador da serotonina
SNC: Sistema nervoso central
SPE: Extração em fase sólida, do inglês, *Solid Phase Extraction*
SPME: Microextração em fase sólida, do inglês, *Solid Phase Microextraction*
t: Tempo de retenção
UV: Ultravioleta
w: Largura da base do pico cromatográfico

1 INTRODUÇÃO

O uso abusivo de anfetaminas e seus derivados, que representam a maior classe de estimulantes do sistema nervoso central, vêm aumentando dramaticamente nos últimos anos em diversas regiões do mundo, especialmente em relação à utilização do *ecstasy* (3,4-metilenodioximetanfetamina) (COLE & SUMNALL, 2003a; COSTA & CHASIN, 2004; LAPACHINSKE, 2004; MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005; PARROTT, 2005; SOARES et al., 2004). Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), existem, atualmente, 8,3 milhões de usuários de *ecstasy* no mundo, um aumento de 84,4% em relação aos números divulgados em 2000, que registravam 4,5 milhões de usuários na década passada. A ONU estimou ainda, que cerca de 1,4 milhões de comprimidos de *ecstasy* são produzidos anualmente no mundo (média de 168 comprimidos por usuário) sendo os Estados Unidos e a Europa os maiores produtores e consumidores da droga no mundo (UNODC, 2003).

A situação é preocupante, também, no Brasil. Em 2004, foram apreendidos 82 mil comprimidos no Rio de Janeiro, quantitativo significativamente superior aos 72 mil comprimidos recolhidos no ano anterior (MONKEN, 2005). Durante o primeiro semestre de 2003, mais de 55 mil comprimidos de *ecstasy* foram apreendidos em São Paulo (COSTA & CHASIN, 2004). Em abril de 2005, foram apreendidos 30 mil comprimidos na bagagem de um jovem que desembarcava no Brasil, vindo da Holanda (MONKEN, 2005; CARUSO & JESUS, 2005). Durante o período de janeiro a março de 2005, a Polícia Federal apreendeu 31.623 comprimidos da droga no Brasil (POLÍCIA FEDERAL, 2006).

O *ecstasy* é uma droga geralmente utilizada de forma grupal, sendo que seus consumidores são basicamente jovens de classe média-alta e alta (COSTA & CHASIN, 2004; LAPACHINSKE, 2004; SARDINHA & GARCIA, 2000). Pode ser administrada de forma isolada ou, na maioria das vezes, associada com inúmeras outras drogas, como álcool, cocaína, maconha e até benzodiazepínicos (LAPACHINSKE, 2004; PARROTT, 2004; SCHIFANO, 2004; SOARES et al., 2004).

As análises de amostras de *ecstasy* apreendidas nas ruas evidência a presença de MDMA (3,4 metilendioximetanfetamina) e outras feniletilaminas, como MDA (3,4 metilendioxianfetamina), MDEA (3,4 metilendioximetiletlanfetamina ou *eve*), MBDB (N-metilbenzodioxazolilbutamina) e 2C-B (4 bromo-2,5 dimetoxifenilamina), considerados entactógenos, produzindo sensações de euforia, ânimo e um aumento da comunicação, justificando sua crescente popularidade como drogas de *raves* (MAURER et al., 2000; SOARES et al., 2004).

Os efeitos após o uso da droga podem variar consideravelmente, dependendo das características físicas e psicológicas do usuário, da dose, frequência e duração do uso, e também da variedade de substâncias encontradas nos comprimidos.

Atua no SNC, ao nível da neurotransmissão serotoninérgica alterando humor, impulsividade, cognição, sono, memória, concentração e implicando em várias doenças neuropsiquiátricas, como depressão e ansiedade, entre outros efeitos (BURGESS et al., 2000; COLE e SUMMALL, 2003b; PARROTT, 2001; 2005; SCHIFANO, 2004).

A MDMA também é responsável pela inibição das enzimas monoamino oxidase A (MAO_A) e monoamino oxidase B (MAO_B), levando a um aumento da concentração sinápticas de serotonina, dopamina e norepinefrina. É relatada, também, alteração na neurotransmissão de acetilcolina, histamina e GABA, resultante da afinidade da droga pelos transportadores ou interação direta com os receptores desses neurotransmissores (COLE & SUMNALL, 2003a; PARROTT, 2005).

Em administrações agudas a MDMA promove estimulação cardíaca e taquicardia, induzindo uma vasoconstrição. Essas alterações cardiovasculares, associadas à hiperperfusão cerebral podem ser responsáveis pelos inúmeros casos de hemorragias descritas na literatura (BURGESS et al., 2000; COLE & SUMNALL, 2003a; LAPACHINSKE, 2004; PARROTT et al., 2005).

O risco de hepatotoxicidade também é descrito na literatura, principalmente quando associado à hipertermia, que pode potencializar a depleção de glutathione induzida pela MDMA (BURGESS et al., 2000; COLE & SUMNALL, 2003b; SCHIFANO, 2004).

A presença de outras substâncias nos comprimidos de *ecstasy* e a ingestão associada a outras drogas como o álcool, pode favorecer o aumento dos efeitos fisiopatológicos da MDMA (SCHIFANO, 2004; PARROTT, 2004).

São, portanto, inúmeros os efeitos descritos resultantes do uso dessa droga, que variam desde as sensações agradáveis (procuradas pelos usuários) até crises de pânico, psicose e quadros de dependência (LAPACHINSKE, 2004).

O amplo espectro de efeitos resultante do uso do *ecstasy*, a falta de estudos científicos sobre o assunto no Brasil, a crescente utilização dessa droga

pela sociedade brasileira, indicam a importância do controle do uso dessa substância.

A pesquisa forense de drogas preconiza a utilização de dois métodos analíticos seletivos e independentes para a identificação confiável dessas substâncias na matriz suspeita (PIETTE & PARMENTIER, 2002). Geralmente a matriz suspeita é submetida a um teste mais simples e rápido (triagem) que apresenta, entretanto, baixa especificidade que pode acarretar inúmeros resultados falsos positivos (ENSSLIN et al., 1996; KINTZ et al., 2006; MAURER et al., 2000; NAKASHIMA, 2005; SADEGHIPOUR et al., 1997a, 1997b; SCHWARTZ & MILLER, 1997; TALWAR et al., 1999). Em função disso, quando a triagem apresenta um resultado positivo para a droga analisada, um segundo método mais confiável é aplicado para a confirmação da suspeita levantada.

As análises de triagem dos derivados anfetamínicos, em muitos laboratórios de toxicologia forense, são feitas por meio de técnicas de imunoenaios, geralmente, rápidas e simples, mas que apresentam diversas reações cruzadas (TALWAR et al., 1999). Os métodos de confirmação da presença dos derivados anfetamínicos são, geralmente, cromatográficos. Essas técnicas são mais confiáveis e específicas para a identificação e quantificação dos derivados anfetamínicos, entre eles o *ecstasy*. Dentre elas, a mais apropriada para a identificação dessas drogas, é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou gasosa (CG), utilizando-se detector de espectrometria de massas (LORD & PAWLISZYN, 1997; TAGLIARO et al., 2000; TALWAR et al., 1999; WOOD et al., 2005). De um modo geral, um método analítico deve ser de simples e rápida execução operacional, apresentar seletividade adequada para o analito de

interesse, demonstrar satisfatória capacidade de detecção e quantificação, ser preciso e exato, além de apresentar um baixo custo financeiro (CHASIN et al., 1994, 1998).

O uso de um detector de massas acoplado a um cromatógrafo, a gás ou a líquido, eleva significativamente o custo da aquisição e da manutenção desses aparelhos tornando, muitas vezes, inviável a sua aquisição pela maioria dos laboratórios de países em desenvolvimento.

A validação de métodos analíticos que utilizam equipamentos de menor custo, mas mantenham os fundamentos básicos de confiabilidade e praticidade é, portanto, bastante relevante. Assim, o presente estudo vem buscar a validação de dois métodos cromatográficos, que utilizam equipamentos de menores custos e que mantenham as características exigidas em uma análise toxicológica, quali e quantitativa.

As técnicas selecionadas para serem validadas no presente trabalho foram a cromatografia gasosa capilar com detecção por ionização de chama (CG/DIC), para a análise da droga em comprimidos e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofométrica na região do ultravioleta (CLAE/UV) para a identificação das substâncias em amostras de urina de usuários da droga.

Esses dois métodos podem ser considerados quase como métodos universais em análises toxicológicas, aumentando a possibilidade de serem executados em laboratórios de pequeno e médio porte de países em desenvolvimento como o Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais

A 3,4-metilenodioximetanfetamina-MDMA, também denominada MDM, *Adam*, *ecstasy*, ou XTC; a 3,4-metilenodioxianfetamina-MDA conhecida como *love pill*; a 3,4-metilenodioximetiletlanfetamina-MDEA (MDE ou *Eve*) e a N-metilbenzodioxazolilbutamina-MBDB (*Eden*) além de outros derivados anfetamínicos são amplamente utilizadas por jovens com idade entre 18 e 30 anos, geralmente bem educados e com boa condição financeira, sendo esse uso particularmente popular em festas *raves* e boates (HERNANDEZ et al., 2001; MAYFRANK & DAWMANN, 2006a; MURPHY et al., 2006; SADEGHIPOUR et al., 1997a, 1997b; UNODC, 2003).

Na Figura 1 estão mostradas as estruturas químicas dos derivados anfetamínicos MDMA, MDA, MDEA e MBDB.

A MDMA é o principal componente da droga *ecstasy* e foi patenteada em 1914 pela companhia alemã Merck® como um moderador de apetite, embora nunca tenha sido comercializada (BURGESS et al., 2000; COLE & SUMNALL, 2003a). Segundo SARDINHA & GARCIA (2000), em 1953 esta droga reapareceu nos Estados Unidos, quando o exército americano testou inúmeras drogas para fins militares, ficando conhecida como droga da verdade.

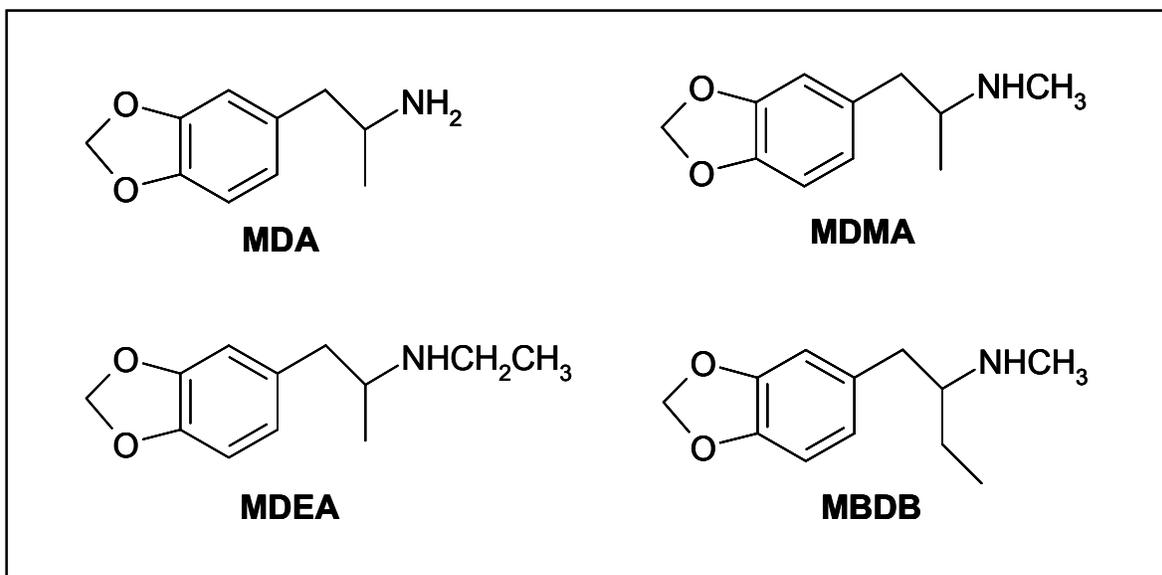


Figura 1 – Estrutura química dos principais derivados metilenodioxianfetamínicos com potencial abusivo (adaptado de KRAEMER & MAURER, 1998; McAVOY, et al., 1999; SADEGHIPOUR et al., 1997a, 1997b; UNODC, 2003).

Na década de 70 foi sugerido o seu uso como coadjuvante na psicoterapia, sendo esse uso relacionado à sua capacidade de indução a um estado emocional positivo, relaxamento, redução da ansiedade e favorecimento nas relações interpessoais (LAPACHINSKE, 2004; SARDINHA & GARCIA, 2000). Denominada de entactógeno, um termo derivado do latim *tactus* (tato, contato) e do grego *en* (dentro) e *gen* (produzir), a droga apresenta a conotação de “induzir um sentimento de contato com o mundo ao seu redor” (MAYFRANK & DAWMANN, 2006b).

Em 1977, o *United Kingdom Home Office* classifica a MDMA como uma droga de classe A e listada no *Schedule 1* do *Misuse of Drugs Act*, indicando que essa substância não apresenta uso medicinal.

A MDMA só desperta a atenção do público quando o *Food and Drug Administration* (FDA) o inclui no *Schedule 1* do *Controlled Substances Act*, em

1985, baseado na idéia de que MDMA não apresenta uso medicinal aceitável e apresenta um elevado potencial abusivo. Com a proibição de uso da MDMA, sua indicação terapêutica foi banida dos receituários com conseqüente eliminação desse padrão de uso (LAPACHINSKE, 2004; SARDINHA & GARCIA, 2000).

Outro derivado anfetamínico com potencial abusivo, o metilenodioximetilfanfetamina-MDEA (eve), não foi incluído na lista do *Controlled Substances Act*, sendo amplamente utilizada até a formulação do *Analogue Substance Act* que, em 1986, passou a classificar como ilegal, qualquer composto que apresente similaridade estrutural ou de ação às substâncias controladas (BURGESS et al., 2000; COLE & SUMNALL, 2003a).

Mesmo proibida, a MDMA a droga continuou a ser consumida e, em 1987 passou a ser a droga da moda na Ilha de Ibiza, na Espanha. Ali, seu uso passou a ser vinculado às grandes festas, chamadas *raves*, que começam durante a madrugada e se estendem até o dia seguinte. A administração da droga somada ao ambiente repleto de luzes, cores e a uma música eletrônica repetitiva é capaz de promover uma diversidade de sensações aos usuários, tornando a MDMA, a principal droga utilizada nesses eventos em todo o mundo, elevando a sua popularidade entre jovens e contribuindo para a grande expansão do número de usuários recreacionais de *ecstasy* (COLE & SUMNALL, 2003a; SARDINHA & GARCIA, 2000).

Durante toda a década de 80 e início da década de 90, os comprimidos de *ecstasy* então utilizados eram tidos como puros, constituídos quase sempre apenas por MDMA. Essa droga era, então, considerada de maior qualidade, quando comparada às outras drogas de rua e os termos *ecstasy* e MDMA

passaram a ser utilizados como sinônimos. Possivelmente naquele momento surge a falsa idéia de segurança relacionada ao uso de *ecstasy* (PARROTT, 2004, 2005).

No decorrer da década de 90, entretanto, passa a ser frequentemente relatada a mistura de outras drogas, como outras feniletilaminas (3,4 metilenodioxianfetamina-MDA; 3,4 metilenodioximetiletlanfetamina-MDEA) e drogas não anfetamínicas (cafeína, efedrina, ketamina, paracetamol, barbitúricos, anti-histamínicos, opióides sintéticos, LSD, efedrina, pseudorfedrina, dextrometorfano, salicilatos, entre outras). A redução no teor de MDMA nos comprimidos de *ecstasy* observada à época pode estar relacionada ao aumento da demanda pela droga, associada à dificuldade dos fabricantes de drogas ilícitas em obter material do precursor químico da MDMA.

Em 1996, ONU define o termo *ecstasy* como “virtualmente genérico” para esses derivados anfetamínicos com substituição no anel, embora seja reconhecido que muitos outros tipos de drogas possam ser encontrados (PARROTT, 2004, 2005).

A partir do final da década de 1990, até o presente, tem sido relatado, novamente, um aumento na pureza dos comprimidos de *ecstasy*, caracterizado por uma menor presença de substâncias interferentes e maior relação dose/quantidade de MDMA (PARROTT, 2004, 2005).

Essa suposta qualidade atual dos comprimidos é, entretanto, bastante contestada por vários autores, que descrevem a continuação da presença de diversas substâncias nos comprimidos de *ecstasy*. Segundo esses autores, análises de amostras de *ecstasy* apreendidas nas ruas evidência a presença de

MDMA e outras feniletilaminas, como MDA, MDEA, MBDB, anfetamina, metanfetamina, 2C-B (4-bromo-2,5 dimetoxifeniletilamina), DOB (2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina) e DOM (2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina) (Figura 2), além da identificação de cafeína, ácido acetilsalicílico, paracetamol, efedrina, pseudoefedrina, norepinefrina, cocaína, ketamina, metadona, morfina, bromomazepam, diazepam, flunitrazepam, dentre outros (COSTA & CHASIN, 2004; MAURER et al., 2000; SADEGHIPOUR et al, 1997a, 1997b; SADEGHIPOUR & VEUTHEY, 1997; SOARES et al., 2004). Neste contexto, pode-se observar que não é apropriado considerar o termo *ecstasy* como sinônimo de MDMA, embora essa substância seja o principal componente da droga (COLE & SUMNALL, 2003b).

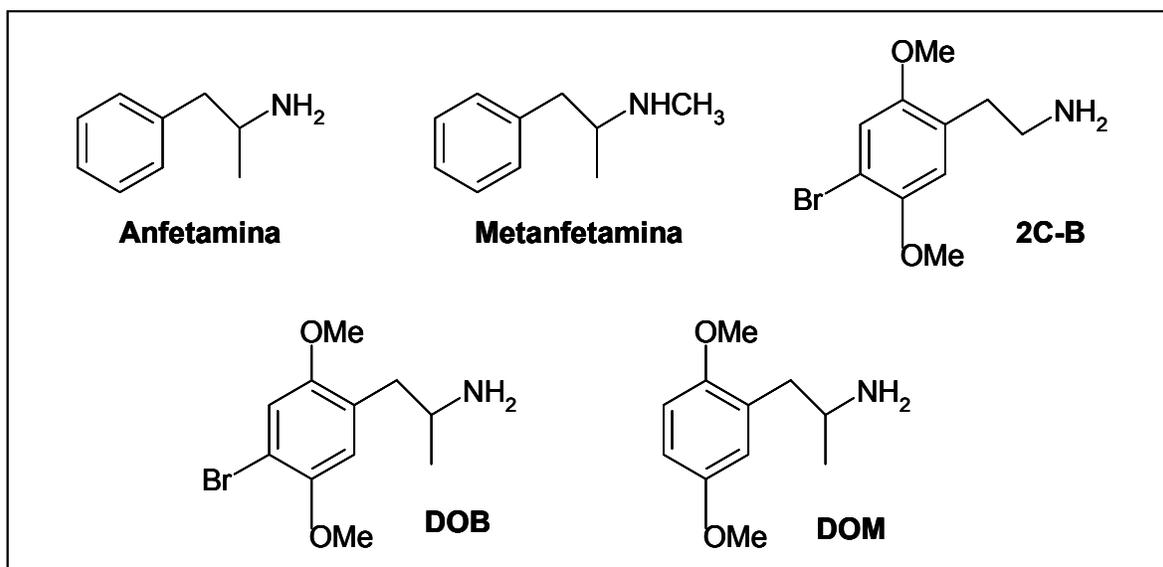


Figura 2 – Estrutura química de outros derivados anfetamínicos comumente encontrados em comprimidos de *ecstasy* apreendidos nas ruas (adaptado de KRAEMER & MAURER, 1998; MAURER et al., 2000; SADEGHIPOUR et al, 1997a, 1997b; SADEGHIPOUR & VEUTHEY, 1997).

No Brasil, a MDMA é considerada uma substância de uso proscrito pela Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde de nº 344 de 12 de maio de 1998 (LAPACHINSKE, 2004). Segundo a direção do DENARC (Departamento de Narcóticos) de São Paulo, o *ecstasy* vem, também no país, sendo incorporado a “novos coquetéis”, como o *sixtasy*, uma mistura de *ecstasy*, maconha, cocaína, LSD, xarope expectorante, viagra e água (RODRIGUES, 2005).

O *ecstasy* é traficado e utilizado principalmente na forma de comprimidos, apresentando certas características peculiares, como as cores ou os variados símbolos, muitas vezes associados às grandes empresas mundiais, como Calvin Klein e Mitsubishi (COLE & SUMNALL, 2003b; FURNARI et al., 1998).

O teor de MDMA é bastante variado nos comprimidos de *ecstasy*, estando normalmente, dentro de uma faixa de 50 a 150 mg da substância por comprimido. Comprimidos analisados por COLE & SUMNALL (2003b) e denominados ‘*White doves*’ por exemplo, possuem concentrações de 19,0 e 140,0 mg de MDMA, 94,0 a 125,0 mg de MDEA e 185,0 a 197,0 mg de ketamina. Já comprimidos com símbolo da Mitsubishi, por sua vez, se caracterizaram por apresentar concentrações de 40 a 109 mg de MDMA e, em alguns, traços de MDE, além de outras drogas como o dextrometorfano, MDA, 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletamina (2C-B), MBDB, metanfetamina, 4-metiltioanfetamina (4-MTA), parametoxianfetamina (PMA), efedrina, salicilatos, dentre outros.

Essa diversidade de teores de MDMA nos comprimidos é bastante preocupante, principalmente quando se trata de usuários recentes, pois elevados

teores dessa substância podem induzir severas reações oriundas da síndrome serotoninérgica (BURGESS et al., 2000; MAYFRANK & DAWMANN, 2006b; PARROTT, 2004).

O aumento do consumo de *ecstasy* especialmente entre os adolescentes, pode ser explicado pela sua fácil aquisição, uma falsa percepção de segurança de seu uso e a aceitação ou incentivo dos amigos, estimulando o seu uso (MURPHY et al., 2006; SCHWARTZ & MILLER, 1997).

Tem sido estimado que o uso recreacional de *ecstasy* envolve a ingestão de 50,0 a 150,0 mg de MDMA ou seja, 1 comprimido de *ecstasy* e, nesses casos, os efeitos agudos aparecem entre 30 a 60 minutos após a ingestão e duram por diversas horas. Alguns usuários administram vários comprimidos algumas horas após a primeira utilização da droga, induzindo, geralmente, maiores efeitos adversos e não, necessariamente, aumentando as sensações desejáveis (BURGESS et al., 2000; MAYFRANK & DAWMANN, 2006b).

Tem sido relatado que os usuários recentes administram, geralmente, um único comprimido de *ecstasy*, enquanto usuários regulares tipicamente administram 2 a 3 comprimidos e os mais experientes utilizam cerca de 10 a 25 comprimidos por noite (BURGESS et al., 2000; MAYFRANK & DAWMANN, 2006b). A redução da eficácia subjetiva após seguidas administrações é frequentemente descrita, com muitos usuários noticiando o desenvolvimento de tolerância.

PARROTT (2004) relata que usuários recentes normalmente utilizam comprimidos de diversas origens, quando comparados aos usuários mais

experientes, tornando-se assim mais vulneráveis à diversidade de componentes presentes nesses comprimidos.

Alguns desses usuários utilizam o pó de *ecstasy*, por via nasal e outros, em pequeno número, utilizam a via endovenosa (PARROT, 2005).

Embora todos os usuários da droga possam apresentar perda de memória, os usuários crônicos apresentam maiores prejuízos no processo cognitivo e na função neuroendócrina serotoninérgica (PARROT, 2005).

MURPHY et al. (2006) concluem que os homens geralmente consomem mais comprimidos (4 em média) do que as mulheres (2,9 em média), em uma mesma noite. De uma maneira geral, os usuários utilizam a droga por um período de aproximadamente 6 anos e só a partir daí eles passam a avaliar o binômio risco-benefício.

A administração simultânea de *ecstasy* com outras substâncias é freqüente entre os usuários da droga, seja com o objetivo de reduzir ou evitar os efeitos indesejados, seja com a finalidade de prolongar a duração das sensações procuradas. A associação com outras drogas pode aumentar o risco tóxico do *ecstasy* podendo agravar a síndrome serotoninérgica provocada pela droga. Esse risco é exacerbado quando são utilizados alguns antidepressivos, como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e inibidores da MAO (COPELAND et al., 2006).

A utilização de benzodiazepínicos e de *viagra* associada ao *ecstasy* é bastante citada na literatura especializada. O uso de *viagra* é justificado pelos usuários devido a suas propriedades afrodisíacas enquanto os benzodiazepínicos são administrados a fim de “prolongar a onda” e para conseguir dormir. Observa-

se, também, o uso de suplementos contendo precursores de serotonina, que poderiam prevenir os potenciais efeitos neurotóxicos, aumenta os efeitos procurados e reduz aqueles desfavoráveis (COPELAND et al., 2006).

O uso de outros estimulantes como cocaína e anfetaminas podem atuar de forma sinérgica, aumentando os efeitos adversos neurotóxicos do MDMA, enquanto que interações com *cannabis* podem ser mais complexas (MAYFRANK & DAWMANN, 2006b). A mistura com alucinógenos como LSD ou ketamina, leva a alterações comportamentais, prejudicando a condução de veículos, por exemplo. O uso de sedativos pode mascarar a excessiva estimulação simpaticomimética provocada pelos componentes do *ecstasy* (SCHIFANO et al., 2006).

Segundo HOSHI et al. (2006), os usuários de *ecstasy* consomem maiores quantidades de maconha e menores quantidades de álcool quando comparados aos indivíduos não usuários de MDMA e, de acordo com De WIN et al. (2006), o uso de maconha é, normalmente, precedido ao primeiro contato com derivados anfetamínicos.

Estudos afirmam que baixas doses de anfetaminas apresentam leves efeitos na função cognitiva e podem resultar no aumento de certas características psicomotoras relacionadas à condução de veículos. Entretanto, altas doses da droga parecem estar associadas com um inapropriado e perigoso comportamento na direção, caracterizado por excesso de confiança, de velocidade e redução da concentração (DEGENHARTDT et al., 2006).

A condução de veículos associada ao uso desses estimulantes é extremamente perigosa, principalmente durante os períodos iniciais de intoxicação que se caracterizam pela predominância dos efeitos estimulantes. Muitos usuários

de *ecstasy*, que não ingeriram álcool concomitantemente, se consideram aptos para dirigir veículos. No entanto, vários usuários que dirigiram após o uso de *ecstasy*, relatam experiências negativas durante a condução como visão turva, concentração prejudicada, propensão para altas velocidades e tempo de reação mais lento (DEGENHARTDT et al., 2006).

Segundo DEGENHARTDT et al. (2006), o *Independent Drug Monitoring Unit* (IDMU), do Reino Unido, apresenta alguns dados que mostram o maior envolvimento de usuários de *ecstasy* em acidentes de trânsito quando comparado com não usuários ou usuários de outras drogas.

O uso de *ecstasy* pode aumentar sentimentos de afeição e sensualidade, mas não está, necessariamente, relacionado à estimulação sexual; ao contrário, na maioria das vezes esse uso se relaciona com uma redução da função sexual. É relevante citar a possibilidade de contaminação por doenças sexualmente transmissíveis em decorrência de modificações comportamentais do usuário que passa a não se preocupar mais com medidas de prevenção no ato sexual (MURPHY et al., 2006).

Muitos usuários desconhecem os sérios efeitos adversos provocados pela MDMA, acreditando ser uma droga segura, pura e livre de adulterantes (MURPHY et al., 2006; SCHWARTZ & MILLER, 1997). Por outro lado, outros usuários procuram minimizar os problemas decorrentes da variedade nos teores de MDMA e da presença de outras substâncias nos comprimidos, adquirindo a droga na forma de pó, acreditando existir menos adulterações nessa forma da droga. Não há, entretanto, dados que comprovem essa teoria, uma vez que o *ecstasy* na forma de pó pode ser também facilmente alterado (PARROTT, 2004).

PARROTT (2004) entrevistou vários usuários da droga e observou que homens e mulheres apresentaram um comportamento semelhante em relação às precauções tomadas quando aparecem os efeitos tóxicos e aos sinais indicativos de que eles devem interromper o uso em uma sessão. Segundo os usuários, as principais medidas para evitar ou minimizar os efeitos tóxicos são limitar o consumo de *ecstasy*, ingerir muita água, manter a respiração de repouso, comer, consumir pílulas de vitaminas e suplementos, monitorar a temperatura e evitar álcool. Os primeiros fatores que levam aos usuários a interromper o uso da droga, em um dado momento, são, o prejuízo na consciência e na visão, a falta de dinheiro, a fadiga e a náusea.

O aumento na produção e a redução no preço dos comprimidos de MDMA, MDA, MDEA e MBDB, que ocorreu nos últimos anos, são fatores que, certamente, contribuíram para o aumento no consumo dessas drogas e no incremento no número de intoxicações e mortes associadas ao consumo dessas drogas. Outra tendência observada foi uma diminuição da quantidade de MDMA por comprimido, contribuindo para a redução do preço e conseqüente elevação da popularidade da droga. A redução da quantidade de MDMA por comprimido associa-se com um aumento na quantidade de comprimidos administrados (SCHIFANO et al., 2006).

2.2 Tolerância e dependência

A tolerância de drogas pode ser descrita como um estado de progressiva redução das respostas à droga. Uma pessoa que desenvolve tolerância necessita

de uma maior quantidade da droga para conseguir os efeitos originalmente obtidos com doses menores.

A maioria dos usuários ocasionais de *ecstasy* relata algum tipo de tolerância à MDMA e que a primeira experiência com a droga é a mais forte, sendo que as experiências sucessivas se apresentam em um caminho diferente. Alguns usuários necessitam aumentar as doses de MDMA, a fim de obter os mesmos efeitos psicoativos de reforço. O primeiro comprimido de *ecstasy* é sempre o mais efetivo e que, com o subsequente uso da droga, os efeitos desejados são reduzidos e os efeitos colaterais aumentados. O autor relata casos de ingestão de até 8 comprimidos de uma só vez, na tentativa de se obter os efeitos desejados. Aproximadamente 67% de usuários que administraram MDMA pelo menos em seis ocasiões, descrevem uma redução dos efeitos positivos e aumento dos efeitos negativos, com doses sucessivas. Há relato ainda, de indivíduos que ingeriram 10 a 25 comprimidos em um dia, apresentando como consequência uma série de graves problemas clínicos (PARROTT, 2005).

A MDMA tem sido descrita como a única droga conhecida que apresenta efeitos entactogênicos agudos, uma vez que é capaz de produzir uma mistura de sensações estimulantes, alucinógenas e euforizantes. Ela é também, característica, em alguns aspectos relacionados ao desenvolvimento de tolerância. Os padrões de tolerância se desenvolvem rapidamente e os efeitos de reforço de MDMA, estudados experimentalmente em macacos *rhesus*, são reduzidos com o tempo, ao contrário do observado, por exemplo, com a cocaína, em que os efeitos de recompensa permanecem inalterados (PARROTT, 2005).

Assim, um aumento de duas vezes na dose administrada, não resultará no aumento dobrado dos efeitos desejados pelos usuários, mas duplicará, praticamente, os efeitos indesejáveis. Mesmo quando o aumento escalonado da dose administrada é feito, o que pode promover a manutenção dos efeitos desejados pelo usuário, observa-se um maior aumento nos problemas neuropsicobiológicos relacionados à droga (PARROTT, 2005). Um possível mecanismo para a diminuição da efetividade da droga pode ser a destruição gradual de axônios terminais, portanto, o padrão não usual de tolerância crônica observado com a MDMA pode ser, ao menos parcialmente, atribuído ao seu mecanismo de neurotoxicidade serotoninérgica (PARROTT, 2005).

De acordo com COSTA (2004), o uso de *ecstasy* satisfaz os quatro critérios necessários para o diagnóstico de dependência, descritos pela *American Psychiatric Association*: é utilizado mesmo com o conhecimento dos seus efeitos indesejados; é administrado em doses maiores que as planejadas; é capaz de induzir tolerância; causa inúmeras sensações não procuradas após o uso, como cansaço, depressão e insônia.

2.3 Epidemiologia do uso

Ao contrário de drogas como a cocaína e a maconha, que possuem suas produções limitadas geograficamente e pelo clima, as drogas sintéticas podem ser produzidas em qualquer local e época do ano (FURNARI et al., 1998; UNODC, 2003). A produção dos estimulantes anfetamínicos, por exemplo, foi estimada em

500 toneladas por ano, com mais de 40 milhões de pessoas fazendo uso dessas drogas em 2003 (UNODC, 2003).

A prevalência de uso de *ecstasy* entre jovens é significativamente maior quando comparado com outras drogas. Dados obtidos nos Estados Unidos indicam que entre os jovens de 18 e 20 anos, a utilização de MDMA é mais do que seis vezes maior do que a média de uso na população em geral. Essa é, também, a droga mais consumida entre 12 e 25 anos, conforme Figura 3 (UNODC, 2003).

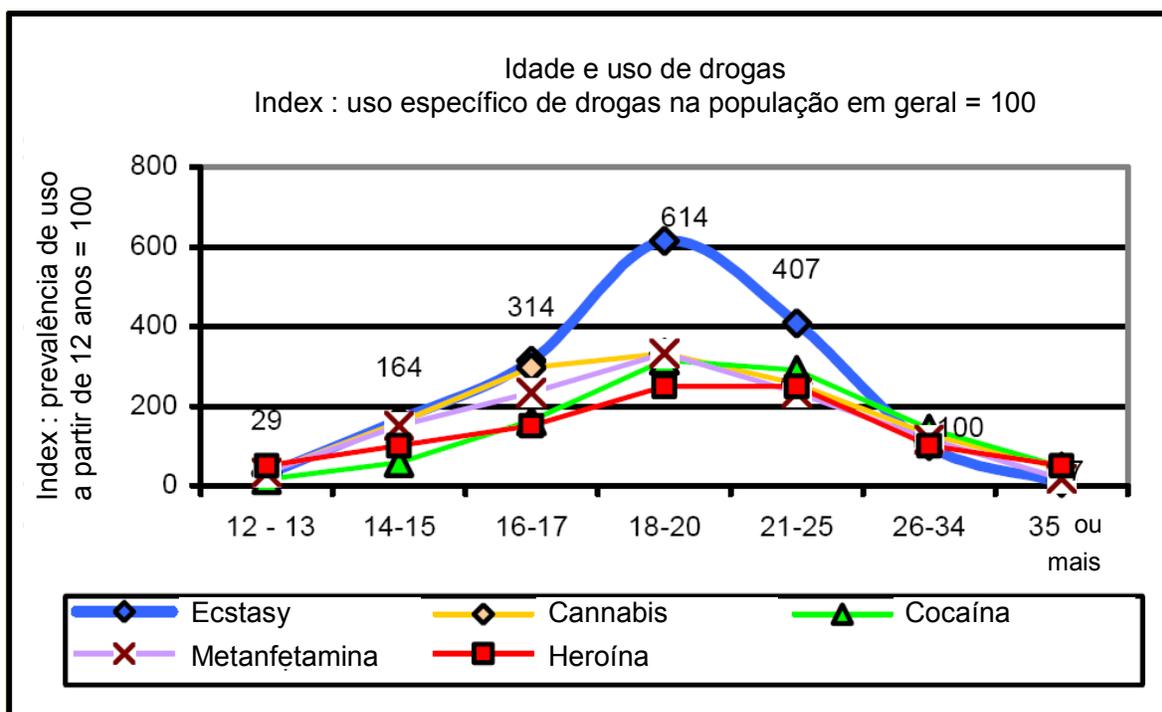


Figura 3 - Perfil de distribuição do uso de drogas nos Estados Unidos em função da faixa etária dos usuários (extraído de UNODC, 2003).

Estudos epidemiológicos realizados na Europa e Estados Unidos mostram que 4,7 a 13% dos jovens já utilizaram *ecstasy* ao menos uma vez na vida, e que 15 a 20% apresentaram sinais de abuso ou dependência (MAYFRANK & DAWMANN, 2006a, 2006b; MURPHY et al., 2006). Já a prevalência do uso da

droga entre os freqüentadores de festas *raves* pode variar de 50 a 90% (COLE & SUMNALL, 2003b; MAYFRANK & DAWMANN, 2006b; SANDERS, 2005).

Estimativas sugerem que somente no Reino Unido, 500 mil jovens utilizam *ecstasy* durante um final de semana. Um estudo realizado em 1998, nos Estados Unidos, indicou que 39% dos universitários teriam utilizado a droga no ano anterior (BURGESS et al., 2000). Outros dados também revelam que, entre 1997 e 1999, os níveis de uso da droga entre os estudantes europeus permaneceram estáveis, mas aumentaram em 69% nos Estados Unidos (COLE & SUMNALL, 2003b).

Metade das apreensões de *ecstasy*, relatadas no mundo, é oriunda da Europa, cerca de 40% da América do Norte, e somente 10% de outros países ou regiões. Na Europa, o maior número de apreensões ocorre principalmente na Holanda, seguido do Reino Unido e da Alemanha. Na América do Norte, os Estados Unidos e o Canadá apresentam índices de apreensões semelhantes (UNODC, 2003).

Em abril de 2005, uma mega operação envolvendo a polícia de diversos países resultou na apreensão de 5 milhões de comprimidos (aproximadamente 1 tonelada da droga) no Porto de Melbourne, Austrália, considerado um dos maiores consumidores do mundo (RANGEL & PRAGEL, 2005). Nesse mesmo período, foram apreendidos 30 mil comprimidos na bagagem de um jovem que desembarcava no Brasil, vindo da Holanda, país apontado como o principal fornecedor da substância (CARUSO & JESUS, 2005; MONKEN, 2005). Em 2004, foram apreendidos 82 mil comprimidos no Rio de Janeiro, total significativamente superior aos 72 mil, em 2003 (MONKEN, 2005). Durante o primeiro semestre de 2003, mais de 55 mil comprimidos de *ecstasy* foram apreendidos em São Paulo

(COSTA & CHASIN, 2004). Durante o período de janeiro a março de 2005, a Polícia Federal apreendeu 31.623 comprimidos da droga no Brasil (POLÍCIA FEDERAL, 2006).

A produção clandestina da droga vem se tornando mais sofisticada. Nos últimos anos, mais laboratórios têm sido desmantelados em todo o mundo, principalmente na América do Norte, Europa e Ásia. O tráfico vem aumentando, levando ao surgimento de novos locais de produção. Entretanto, o mercado também vem sendo alterado, parcialmente pela adoção de medidas no combate às drogas ou pelo resultado de uma demanda dinâmica. Essa expansão global do mercado induz um aumento do número de locais de produção, em muitos países. A grande parte desses locais são “laboratórios de cozinha”, entretanto atualmente são também encontrados laboratórios sofisticados operando com cerca de 100 quilogramas da droga por semana (equivalente a um milhão de comprimidos) (UNODC, 2003).

Pequenos investimentos de capital, fácil produção, equipamentos e precursores de baixo custo e elevados volumes de comprimidos, tornam esse comércio extremamente lucrativo. Incentivos econômicos similares são indisponíveis para os produtores de cocaína e maconha. Menos de um quilograma da droga, vendido no mercado ilícito, normalmente é suficiente para pagar os investimentos iniciais de um laboratório clandestino de pequena escala. Os riscos são significativamente baixos, devido a difícil identificação dos laboratórios, obtenção relativamente rápida dos comprimidos e facilidade de esconder ou remover o laboratório clandestino (UNODC, 2003).

Semelhantemente à crescente apreensão de comprimidos de *ecstasy*, pode-se observar, também, um aumento na apreensão de precursores dos estimulantes anfetamínicos. As apreensões mundiais desses precursores em 2001 foram 12 vezes maiores quando comparadas àquelas ocorridas em 1991. Na última década, as apreensões de substâncias precursoras da metanfetamina, como efedrina e pseudoefedrina, corresponderam a 67% das apreensões de estimulantes anfetamínicos. Substâncias precursoras do *ecstasy* como o 3,4-metilenodioxifenil-2-bromopropano (MDPBP), safrol, óleo de sassafrás, isosafrol e piperonil responderam por 19% dessas apreensões, e as precursores de anfetaminas, 1-fenil-2-propanona (P-2-P), norefedrina e ácido fenilacético à 14% dessas ações (FURNARI et al., 1998; UNODC, 2003).

2.4 Toxicocinética

2.4.1 Absorção e distribuição

A MDMA e outras feniletilaminas podem se apresentar na forma de base livre ou na forma de sal de vários ácidos. Normalmente as bases livres são voláteis e podem ser inaladas, entretanto a presença de radicais metilenodioxi na estrutura da MDMA promove um aumento no ponto de ebulição dessa base, inviabilizando a sua volatilização e conseqüente inalação. Os sais de ácidos são hidrossolúveis podendo ser administrados por via intravenosa ou por aspiração do pó (KALANT, 2001).

Os derivados metilendioxianfetamínicos são prontamente absorvidas pelo trato intestinal, podendo ser detectadas no sangue cerca de 15 minutos após a ingestão, atingindo uma concentração plasmática máxima cerca de 2 horas após a administração. Por serem lipossolúveis, apresentam ampla distribuição por todos os tecidos. A meia vida biológica da MDMA é de aproximadamente de 8 horas, sendo necessário cerca de 40 horas para que 95% da sua concentração plasmática sejam eliminadas (COLE & SUMNALL, 2003a; KALANT, 2001; MAS et al., 1999).

2.4.2 Eliminação

Os processos de biotransformação da MDEA, MDMA e MDA apresentam vias comuns, levando a formação de metabólitos semelhantes. As reações ocorrem principalmente na fração microsômica do fígado envolvendo enzimas do sistema Citocromo P-450. A biotransformação da MDEA envolve a N-desmetilação para MDMA, que também sofre uma N-desmetilação, formando a MDA. As isoenzimas envolvidas nessa etapa são CYP2D6, CYP3A4 e CYP1A2. A MDEA também pode sofrer uma desmetilação por meio das isoenzimas CYP3A2/4, transformando-se em MDA diretamente.

A biotransformação da MDMA, esquematizada na Figura 4, inicia-se com a N-desmetilação formando a MDA. A MDMA assim como a MDA formada, podem ser O-desmetiladas para 3,4-diidroximetanfetamina (HHMA) e 3,4-diidroxianfetamina (HMA), respectivamente, reações reguladas pelas isoenzimas

CYP2D6 e CYP3A2/4. A HHMA e a HHA são subsequentemente O-metiladas pela catecol-O-metiltransferase (COMT) formando, principalmente, a 4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina (HMMA) e a 4-hidroxi-3-metoxi-anfetamina (HMA). Estes quatro metabólitos hidroxilados, particularmente HMMA e HMA, são excretados na urina conjugados com ácido glicurônico ou radical sulfato, embora não existam muitos dados que correlacionem a concentração desses metabólitos na urina com as doses administradas das substâncias (BURGESS et al., 2000; COSTA, 2004; De la TORRE et al., 2000; MAURER et al., 2000).

Observa-se que, independente da dose administrada de MDMA, cerca de 50% a 65% é excretada inalterada na urina em 24 horas, além da presença de consideráveis proporções de seus metabólitos (De la TORRE et al., 2000; COLE & SUMNALL, 2003a; SCHWARTZ & MILLER, 1997).

A excreção urinária do HMMA conjugado com ácido glicurônico, é praticamente constante (cerca de 100,0 $\mu\text{mol/mL}$ de urina) independentemente da dose de MDMA administrada, entretanto a excreção da MDMA inalterada aumenta de maneira não proporcional com a dose administrada (De la TORRE et al., 2000).

Estudos realizados em voluntários demonstram que a administração de 100 a 120 mg de MDMA resulta na eliminação na urina de aproximadamente 28,1 $\mu\text{g/mL}$ de MDMA e 2,3 $\mu\text{g/mL}$ de MDA (MAURER et al., 2000), mas a excreção urinária dessas substâncias varia significativamente em função de vários fatores, entre eles o polimorfismo genético. A enzima CYP2D6, envolvida na biotransformação do MDMA, é polimórfica e a funcionalidade enzimática pode estar ausente em 5 a 9% dos caucasianos como resultado de uma herança

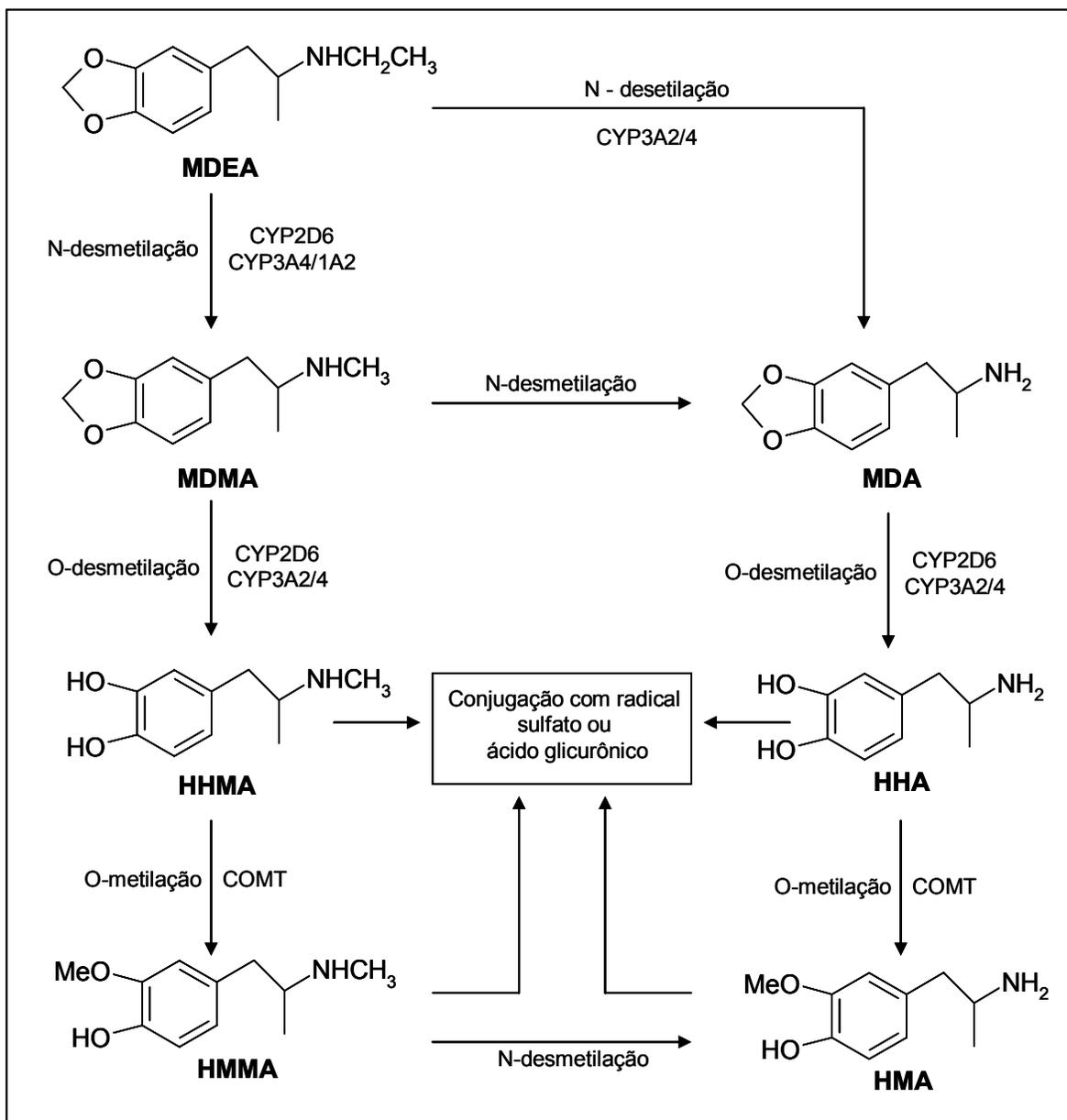


Figura 4 – Principais vias de biotransformação da MDMA, MDA e MDEA (adaptado de BURGESS et al., 2000; COSTA, 2004; De la TORRE et al., 2000; MAURER et al., 2000).

genética autossômica recessiva. Esses indivíduos são chamados de metabolizadores “pobres”, apresentando maiores riscos de toxicidade aguda ao MDMA. Esses indivíduos geneticamente deficientes da enzima hepática CYP2D6 podem apresentar uma intoxicação aguda após a administração de doses

moderadas de MDMA, devido um acúmulo da droga no organismo (De la TORRE et al., 2000; SOARES et al., 2004).

A enzima CYP2D6 também está envolvida na metabolização de diversas outras substâncias, como antidepressivos e antipsicóticos. Assim, é possível a ocorrência de efeitos inesperados em função da interação dessas drogas com o MDMA. Outro ponto importante a ser considerado é a existência de determinados medicamentos, como por exemplo, alguns antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina que se apresentam como inibidores competitivos da enzima CYP2D6. Na interação do MDMA com essas substâncias, um usuário que apresenta genótipo normal passará a se comportar como “metabolizador pobre”, aumentando o risco de se intoxicar com a MDMA (BURGESS et al., 2000; COLE & SUMNALL 2003a).

2.5 Toxicodinâmica

Os derivados anfetamínicos MDMA, MDA e MDEA são considerados entactógenos, uma vez que produzem sensações de euforia, energia e desejo de socialização. Isto pode explicar a crescente popularização dessas drogas *rave* (MAURER et al., 2000).

Especificamente em relação à MDMA, ela é inicialmente considerada um potente liberador e/ou inibidor da recaptação de diversos neurotransmissores pré-sinápticos, como serotonina, dopamina, noradrenalina e acetilcolina, promovendo os diversos efeitos descritos logo após a administração de *ecstasy*.

A MDMA pode atuar, também, como um substrato para a proteína transportadora da serotonina (SERT), facilitando a liberação desse neurotransmissor. Ela é capaz, também, de inibir a atividade das enzimas monoaminooxidasas A e B (MAO_A e MAO_B), contribuindo para o aumento da concentração extracelular de monoaminas (COLE & SUMNALL, 2003b; MAYFRANK & DAWMANN, 2006a; HOSHI et al., 2006).

Suas ações neuroquímicas são similares às de outros derivados anfetamínicos com anel substituído, como a MDA e a MDEA, assim, os três derivados anfetamínicos apresentam efeitos centrais e periféricos muito similares, embora distintos em relação à potência, tempo e duração de ação (PARROTT, 2004).

Sabe-se que a serotonina (5-HT) está envolvida na modulação de diversos processos fisiológicos (vasoconstrição, termoregulação) e funções neuropsicológicas (memória, aprendizado), sugerindo a capacidade de influenciar processos comportamentais e psicopatológicos, como humor, ansiedade, agressão, comportamento sexual, apetite, necessidade e busca de sensações estimulantes e impulsividade. Acredita-se, também, que os processos de depressão, impulsividade e agressividade correlacionam-se com baixos níveis do principal metabólito da serotonina, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), presente no fluido cerebrospinal. A relação do uso de *ecstasy* com o aparecimento de sinais clínicos como alteração no humor, impulsividade e sensação de busca não é, muitas vezes, mais clara, devido às inúmeras variáveis presentes, como o uso de outras drogas, o estilo de vida e a educação do usuário, além da presença de algum fator predisponente (De WIN et al., 2006). Existem, entretanto, diversos

casos relatados na literatura, de síndromes depressivas, ansiedade e episódios psicóticos associados ao uso crônico de *ecstasy* assim como uma elevada prevalência de distúrbios psiquiátricos em usuários dessa e de outras drogas (MAYFRANK & DAWMANN, 2006a).

2.5.1 Efeitos neuropsicológicos

Os efeitos psicológicos da MDMA, MDA e MDEA iniciam-se aproximadamente 3 a 5 horas após o uso, com um aumento da liberação de serotonina, caracterizado por relaxamento, euforia, ansiedade, sentimentos de empatia e aumento de comunicação. Essas drogas são capazes de provocar também, efeitos estimulantes, alteração da percepção e, ocasionalmente, podem induzir efeitos marcadamente alucinógenos (possuem estrutura semelhante à da mescalina) (MAYFRANK & DAWMANN, 2006a).

SAADAT (2006) administrou baixas doses de MDMA e outras anfetaminas em camundongos e encontrou alterações comportamentais similares às aquelas observadas em doses agudas de diversos antidepressivos e ansiolíticos, decorrente da liberação de 5-HT e compostos relacionados.

A alteração da memória observada nos usuários de *ecstasy* tem sido associada à ação do MDMA na neurotransmissão serotoninérgica, uma vez que a serotonina tem um importante papel nas funções cognitivas e de memória (ZAKZANIS & CAMPBELL, 2006).

A serotonina também tem sido implicada na modulação da agressão em humanos, onde tanto homens como mulheres apresentam-se menos agressivos logo após o uso (liberação aguda de serotonina), e mais agressivos dias após a administração da droga (depleção crônica desse neurotransmissor) quando comparados aos indivíduos não usuários (HOSHI et al., 2006). Quando submetidos a perguntas agressivas e neutras, os usuários se manifestaram de modo mais rápido nas questões mais agressivas, enquanto que nas neutras se manifestam mais lentamente quando comparados à não usuários de *ecstasy*. Embora alguns estudos afirmem ocorrer uma diferença de agressividade de acordo com o sexo, onde homens manifestam-se de forma mais direta e mulheres mais indiretamente, HOSHI et al. (2006) não observaram nenhuma alteração significativa entre os sexos.

Estudos demonstram que a neurotoxicidade induzida pelo MDMA pode ser atenuada pela administração de precursores da serotonina, tais como o triptofano e o 5-hidroxitriptofano e através de bloqueadores de receptores de dopamina como o haloperidol, sugerindo que a depleção crônica de serotonina e ativação de receptores de dopamina são essenciais no efeito neurotóxico dessa droga (BURGESS et al., 2000).

Neurônios serotoninérgicos cerebrais podem ser permanentemente danificados após o uso de MDMA, induzindo uma redução na liberação de serotonina, capaz de resultar em quadros de desordens neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade, pânico e impulsividade. Estudo avaliando a quantidade de ácido 5-hidroxiindolacético, metabólito da serotonina presente em menores

proporções em mulheres, sugeriu que estas seriam mais susceptíveis aos efeitos neurotóxicos da droga (RENEMAN et al., 2001).

Uma interação entre MDMA e a proteína transportadora de serotonina, SERT, é apontada como o primeiro sinal de neurotoxicidade da droga, mas o mecanismo desta ação não é, ainda, totalmente conhecido (HOSHI et al., 2006).

BUCHERT et al. (2006) descreve a realização do primeiro estudo longitudinal com humanos, em usuários de *ecstasy*, avaliando a disponibilidade da SERT em regiões cerebrais ricas desses transportadores como mesencéfalo, putâmen, caudado e tálamo. Foi relatado que a disponibilidade das SERT volta aos níveis normais quando o uso de *ecstasy* é interrompido, e permanece inalterado ou é futuramente reduzido se o uso é continuado. Assim, observa-se uma reversibilidade nas alterações de disponibilidade da SERT, provocadas pelo uso de *ecstasy*. Entretanto, como a SERT é um componente dinâmico do sistema serotoninérgico e pode ser modificada por inúmeros mecanismos, a reversibilidade dessa proteína transportadora não implica em completa reversibilidade dos efeitos neurotóxicos da droga.

Estudos de imagem de usuários recreacionais de *ecstasy* frequentemente indicam perda serotoninérgica. Usuários recreacionais em abstinência apresentam vários déficits funcionais ligados à essa perda, como prejuízo significativo da memória, elevada deficiência do processo cognitivo, distúrbios do sono e presença de sintomas psiquiátricos. Embora esses déficits possam ser exacerbados por diversos fatores relacionados ao uso de outras drogas, não se deve excluir a possibilidade da administração de uma dose única de MDMA ser capaz de causar danos a esses neurônios (PARROTT, 2005).

Existem evidências de que a neurotoxicidade do MDMA poderia ser altamente dependente tanto do metabolismo hepático quanto da temperatura corporal. Como observado na biotransformação dessa substância, ocorre produção de HHA e HHMA que, sendo catecóis, podem sofrer oxidação formando *o*-quinonas. Os compostos quinônicos são altamente reativos, capazes de formar espécies de oxigênio reativas. Esses metabólitos ainda podem se ligar à glutatona em sua forma reduzida (GSH), produzindo compostos também altamente reativos (BURGESS et al., 2000).

A neurotoxicidade dos metabólitos da MDMA foi avaliada em estudos realizados *in vitro*, em condições de temperatura normal (36°C) e hipertérmica (40°C). Foi observado que os metabólitos apresentavam neurotoxicidade maior do que a substância inalterada (MDMA), principalmente em condições de temperaturas mais elevadas indicando que os produtos de biotransformação do MDMA podem contribuir, sobremaneira, para a sua ação tóxica ao nível do SNC (BURGESS et al., 2000; CAPELA et al., 2006; MAYFRANK & DAWMANN, 2006a).

2.5.2 Efeitos fisiológicos

Diversos efeitos fisiológicos podem ser obtidos pela alteração do equilíbrio de neurotransmissores na fenda sináptica. São citados a elevação da pressão sanguínea e de batimentos cardíacos, náusea, vômitos, sudorese, tremor, bruxismo e moderada elevação da temperatura corporal. Casos fatais são frequentemente relatados na literatura, associados com severa hipertermia,

rabdomiólises, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla de órgãos, além de casos com hemorragias intracranianas e infartos originados da elevação da pressão arterial. Outro importante perigo é o uso de MDMA associado com outras drogas de abuso, principalmente quando ambas são administradas em repetidas e elevadas doses (BURGESS et al., 2000; MAYFRANK & DAWMANN, 2006b).

A administração aguda de MDMA pode promover uma estimulação cardíaca e consequente taquicardia, além de vasoconstrição. Alterações vasculares associados com uma hiperperfusão cerebral, dilatações cerebrovasculares e coagulopatias podem ser responsáveis por casos de hemorragias intracerebrais. Quando administradas com outras drogas, como cocaína ou outras anfetaminas, a MDMA pode desenvolver toxicidade cardiovascular devido, principalmente, a uma excessiva ativação simpaticomimética aguda. Mudanças cardiovasculares estão ligadas a uma liberação de renina induzida pelo MDMA, levando a um aumento da produção de angiotensina II (AII), importante peptídeo no sistema renina-angiotensina, e consequente liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, promovendo um aumento da pressão arterial. Efeitos neurotóxicos também podem alterar alguns reflexos cardiovasculares relacionados com sistemas serotoninérgicos descendentes centrais e periféricos. A MDMA, em baixas ou moderadas doses (1 a 5 mg/Kg), apresenta atividade agonista em adrenoreceptores $\alpha_{2A/D}$, levando a pequenas alterações na pressão arterial, seguidas por uma resposta depressora mais prolongada (COLE & SUMNALL, 2003b).

Uma ação hipertensiva repentina da MDMA pode levar ao aparecimento de hemorragias cerebrais ou infartos em alguns casos. Um mecanismo similar tem sido proposto para explicar hemorragias observadas na retina, em curtos períodos após a ingestão da droga (COLE & SUMNALL, 2003b).

A liberação de 5-HT e ativação de receptores 5-HT_{2A/2C} pós-sinápticos são conhecidos modificadores da temperatura corporal. Estudos em camundongos *Dark Agouti* indicaram que receptores D1 da dopamina também apresentam uma importante influência na hipertermia relacionada à administração de MDMA. A administração de L-DOPA (3,4-diidroxifenil-L-alanina), um precursor desse neurotransmissor, duas horas após a ingestão de MDMA pelos animais produziu severas, prolongadas e frequentemente fatais elevações da temperatura corporal dos camundongos (COLE & SUMNALL, 2003b).

A hipertemia provocada pelo MDMA é bastante significativa, resultando em temperaturas corpóreas superiores a 43°C e, a toxicidade associada a ela é bastante evidente. O uso de MDMA em ambientes fechados, com elevadas temperaturas, atividades físicas e desidratação, por exemplo, como nas condições em que o *ecstasy* é utilizado nas festas *raves*, podem contribuir para um aumento da resposta hipertérmica induzida por MDMA (CAPELA et al., 2006; COLE & SUMNALL, 2003b; IANNONE et al., 2006).

A perda da habilidade em regular a temperatura corporal e um aumento do metabolismo, após o uso de MDMA, implica em significativos efeitos na saúde. O controle da temperatura ambiente e a diminuição da atividade física nas festas seriam medidas importantes na tentativa de amenizar os efeitos decorrentes da hipertermia (FREEDMAN et al., 2005).

Em um estudo realizado na Espanha, entre 1994 e 1996, o *ecstasy* foi considerado a segunda maior causa de morte por insuficiência renal aguda entre jovens menores de 25 anos. A ingestão dessa droga pode também causar uma hepatotoxicidade por diferentes mecanismos de patogênese. A hipertermia causada pela ingestão da droga pode prejudicar a tolerância hepática frente ao estresse térmico, induzindo uma peroxidação lipídica nesse órgão. A elevação da temperatura pode potencializar a depleção de glutathione, aumentando os riscos da exposição hepática a toxicantes pró-oxidantes. Mecanismos imunológicos também estão relacionados aos problemas hepáticos, mesmo na ausência de hipertermia. É importante relatar a influência de impurezas ou de outras drogas presentes nos comprimidos de *ecstasy*, que podem induzir essas alterações no fígado (COLE & SUMNALL, 2003b).

A intoxicação por MDMA pode também ser associada com uma estimulação da secreção do hormônio antidiurético vasopressina e com a ocorrência de hiponatremia, principalmente devido à ação do metabólito HMMA. A administração de MDMA induz a secreção desse hormônio, que associada com baixos níveis séricos do íon sódio (Na^+) e ingestão exagerada de água, predisõem os usuários a esse quadro clínico (COLE & SUMNALL, 2003b; SCHIFANO et al., 2006). A ingestão exagerada de água, comportamento que normalmente acompanha o usuário de *ecstasy*, pode induzir algumas reações adversas. Edemas cerebrais são relacionados à rápida ingestão de água, que pode promover uma repentina redução da osmolaridade plasmática. Nessa situação, determinadas medidas podem exacerbar os efeitos tóxicos, sendo

assim, recomendado a administração de bebidas isotônicas e pequenas quantidades de sal (COLE & SUMNALL, 2003b).

A administração de MDMA produz rápida alteração na função imune, levando a uma redução no número de linfócitos circulantes, na supressão da proliferação de linfócitos T e na produção de imunoglobulinas, além de alterações na produção de citocinas (COLE & SUMNALL, 2003b).

O uso de *ecstasy* oferece outros efeitos, incluindo a indução de uma significativa perda de apetite que persiste por um dia ou mais após o uso. Embora esse potencial uso terapêutico da MDMA não tenha sido mencionado quando a droga foi patenteada em 1914, seu metabólito, MDA, foi posteriormente patenteado (1958) como um supressor de apetite. A perda de apetite descrita após o uso da droga está relacionada com o papel da serotonina na regulação da alimentação, onde estimulantes desse neurotransmissor reduzem a ingestão de alimentos. Desordens alimentares, como bulimia nervosa, têm sido constantemente associadas a uma perda da regularização serotoninérgica (CURRAN & ROBJANT, 2006).

2.5.3 Interação com outras drogas

O uso concomitante de outras drogas de abuso pode modular os efeitos neurotóxicos do MDMA, algumas delas por meio da termorregulação.

Drogas que atuam como agonistas dos receptores 5-HT_{2A}, por exemplo, quando administrada em conjunto com o *ecstasy*, podem aumentar a

neurotoxicidade serotoninérgica da MDMA, uma vez que contribuem para os efeitos de hipertermia dessa substância. É o caso do uso concomitante com outras drogas muito comuns em festas *raves*, como o LSD, que é um potente agonista dos receptores 5-HT_{2A}. Um aumento da neurotoxicidade do MDMA, devido a hipertermia, é descrita também quando se administra simultaneamente o *ecstasy* e a d-anfetamina ou 3,4-diidroxifenil-L-alanina (L-DOPA, um precursor da dopamina).

Em contrapartida, os antagonistas dos receptores 5-HT_{2A} podem conferir certa proteção contra neurotoxicidade do MDMA assim como certos antagonistas dos receptores NMDAR (receptores do N-metil-D-aspartato-NMDA) como alguns análogos de ketamina e o etanol, que são capazes de promover uma redução da temperatura corporal, oferecendo, também, certa proteção contra os efeitos neurotóxicos do *ecstasy* (COLE & SUMNALL, 2003b).

O número de usuários que utilizam simultaneamente *ecstasy* e *cannabis* é elevado segundo os dados da literatura. LAMERS et al. (2006) realizaram um estudo comparativo utilizando usuários de MDMA e Δ^9 THC, usuários apenas de Δ^9 THC e um grupo controle, não usuários de drogas. Os indivíduos selecionados eram de uma mesma faixa etária e grau intelectual tendo sido avaliados efeitos como sentimentos de depressão, ansiedade e prejuízo cognitivo (memória, ação e decisão). Os usuários de MDMA- Δ^9 THC apresentaram sentimentos mais intensos de depressão e ansiedade do que os usuários apenas de Δ^9 THC e dos não usuários de drogas. A memória foi prejudicada em ambos os grupos de usuários de drogas quando comparados com o grupo controle. Da mesma maneira os dois

grupos de usuários apresentaram menor velocidade psicomotora e flexibilidade mental do que o controle. Os autores observaram ainda, que os usuários de Δ^9 THC apresentaram prejuízos em algumas habilidades cognitivas, que não foram aumentados pela associação com o MDMA, sugerindo que esse efeito é oriundo, principalmente, do uso de Δ^9 THC.

Considerando que a *cannabis* apresenta algumas ações opostas às do *ecstasy* (é sedativa, hipotérmica, antioxidante, a MDMA é estimulante, hipertérmica e eleva o estresse oxidativo) é sugerido que, quando administrados juntas, a *cannabis* pode amenizar os efeitos estimulantes da MDMA, podendo reduzir a estimulação neuronal aguda, atenuando os efeitos neurotóxicos, a hipertermia induzida por MDMA e, parcialmente, a depleção de 5-HT e 5-HIAA (PARROTT, 2006).

Segundo PARROTT (2006), além de *cannabis*, os usuários de *ecstasy* utilizam diversas outras drogas ilícitas em associações com o MDMA, tais como anfetaminas (69%), LSD (60%), psilocibina (56%), cocaína (56%), barbitúricos-benzodiazepínicos (38%), opióides (23%) e solventes (21%). Essas associações são mais frequentes entre os usuários “pesados” de *ecstasy*, que consomem, ainda, grandes quantidades de álcool e tabaco. O uso de álcool promove um sentimento de euforia mais prolongado no usuário, enquanto que MDMA reduz a sedação induzida pelo álcool. Observa-se também um aumento nas deficiências de memória e da função cognitiva.

A associação com benzodiazepínicos, barbitúricos e opióides pode causar significativos prejuízos neurocognitivos/psicobiológicos (PARROT, 2006).

A cafeína, um estimulante considerado seguro e facilmente encontrado em cafés, chás e bebidas leves, pode estar presente em comprimidos de *ecstasy* e interagir com a MDMA. O resultado dessa interação são efeitos tóxicos agudos e exacerbados da droga, resultantes, principalmente do aumento da hipertermia e da depleção de serotonina, que causam sérios danos à saúde dos usuários de *ecstasy* (McNAMARA et al., 2006).

2.6 Aspectos Analíticos

2.6.1 Principais matrizes biológicas utilizadas

Diferentes tipos de matrizes biológicas são utilizados nas análises toxicológicas forenses que objetivam identificar e quantificar variadas drogas de abuso. Além das matrizes clássicas, como urina e sangue, estão disponíveis outras, alternativas, como cabelo, fluido oral (saliva e outros fluidos da cavidade bucal) e suor (MOELLER et al., 1998; WOOD et al., 2005).

Tradicionalmente, a urina é a amostra de escolha para triagem e identificação de substâncias desconhecidas, uma vez que os analitos apresentam, via de regra, concentrações urinárias relativamente elevadas quando comparada com outras matrizes biológicas. O emprego dessa matriz biológica exige o conhecimento dos possíveis metabólitos da droga, formados no organismo, que serão excretados pelos rins uma vez que a substância inalterada é, geralmente,

pouco eliminada pela urina (MOELLER et al., 1998; MOELLER & KRAEMER, 2002).

Em termos dos derivados anfetamínicos, a urina constitui um importante material biológico para a análise de *ecstasy*, pois além de apresentar aproximadamente 50% dos fármacos inalterados (MDMA, MDA ou MDEA), apresenta também proporções relativamente altas dos produtos de biotransformação dessas drogas, na forma conjugada ou livre (COLE & SUMNALL, 2003a; De la TORRE et al., 2000; SCHWARTZ & MILLER, 1997). Além disso, esse material apresenta grande proporção de água em sua constituição, facilitando o volume a ser coletado e diminuindo a presença de interferentes quando comparada, por exemplo, com o sangue. Os resultados obtidos nas análises urinárias, entretanto, estabelecem apenas que a droga foi administrada, ou seja, não apresenta boa correlação com os efeitos tóxicos observados nos indivíduos, dentre outros motivos, em função da grande influência de diversos fatores capazes de alterar a taxa de excreção e o volume urinário (COSTA, 2004).

O sangue, como plasma, soro ou sangue total, é a amostra de escolha para quantificação de drogas, quando se busca a correlação da concentração com os efeitos farmacológicos ou toxicológicos provocados pela droga, desde que a amostra seja coletada quando o equilíbrio de distribuição com todos os órgãos ou tecidos tenha sido obtido (MAURER, 2005; MOELLER et al., 1998; MOELLER & KRAEMER, 2002). Outra vantagem dessa amostra biológica é a possibilidade de detectar determinada droga, logo após sua ingestão, antes mesmo da substância ser biotransformada e excretada. Alguns problemas podem ocorrer, entretanto,

quando amostras antigas e hemolisadas são empregadas (MOELLER et al., 1998; MOELLER & KRAEMER, 2002).

Matrizes biológicas alternativas, como cabelo, fluido oral e suor apresentam certas vantagens quando comparadas às tradicionais (urina e sangue). São fáceis de serem obtidas, coletadas de maneira praticamente não invasiva e podem ser obtidas sob supervisão, prevenindo adulterações ou substituições de amostras. Algumas limitações inerentes a essas matrizes são o volume ou massa coletados frequentemente pequenos e as baixas concentrações dos analitos de interesse (CONCHEIRO et al., 2005; KINTZ et al., 2006; WOOD et al., 2005).

Atualmente, análises de cabelo são rotineiramente utilizadas para a detecção de drogas de abuso e avaliações sobre contaminação ambiental, dopagem, dentre outras (KINTZ et al., 2006). A utilização dessa matriz é justificada pela penetração do analito de interesse no cabelo através de três formas: pelo sangue durante a formação do cabelo, a partir do suor e sebo e pelo ambiente externo. A amostra padrão é obtida de cabelos na região da nuca, podendo também ser coletada da região pubiana ou axilar. Um procedimento de lavagem para remoção de contaminantes externos é necessário (KNITZ et al., 2006).

Nas análises que utilizam cabelo como amostra biológica, embora exista métodos que partem da extração direta do cabelo com solventes ou tampões de extração, é recomendada uma digestão inicial da matriz, seja de forma enzimática ou por meio de ácidos ou bases fortes, em elevadas temperaturas. Em geral, a completa dissolução do cabelo promove melhores recuperações dos analitos, do que aquelas obtidas apenas com extrações diretas da amostra com solventes.

Dentro das técnicas de digestão do cabelo, as enzimáticas em pH neutro são propostas como sendo processos de extração universal (KRONSTRAND et al., 2004).-

O fluido oral é constituído pela saliva e por outros fluidos e substâncias presentes na cavidade oral. As substâncias tendem a serem detectadas, no fluído oral, em períodos menores do que os observados nas amostras de urina, geralmente, de 12 a 24 horas após o consumo. Pode ser obtida através de um tubo coletor introduzido na boca ou por meio da fricção de um *swab* na cavidade oral (CONCHEIRO et al., 2005; MAURER, 2005). Algumas drogas, como por exemplo, as anfetaminas podem reduzir farmacologicamente a salivação, dificultando a coleta da amostra. Nesses casos pode ser necessário o uso de estimuladores salivares como dropes com sabor azedo, cristais de ácido cítrico ou chicletes de material inerte para estimular a secreção salivar (MAURER, 2005).

A utilização do suor como matriz biológica, na análise de drogas de abuso, vem aumentando nos últimos anos, após o desenvolvimento dos chamados *sweat patch*, que facilitaram, sobremaneira, a coleta da amostra. Essa técnica de coleta, além de não ser invasiva, permite fazer o controle de indivíduos internados em clínicas de tratamento e detentos em liberdade condicional (COSTA, 2004).

2.6.2 Métodos de extração

As amostras biológicas apresentam muitos componentes em sua constituição, incluindo desde macromoléculas (proteínas, carboidratos e lipídios)

até uma variedade de pequenas moléculas com diferentes polaridades. Essa complexidade associada à presença de baixas concentrações dos analitos, algumas vezes se espera encontrar traços dos mesmos nas amostras, exige frequentemente a introdução de etapas analíticas visando a eliminação de contaminantes e a pré-concentração dos analitos, de modo a se obter uma identificação e quantificação mais confiável (BOONE et al., 1999; KAWAGUCHI et al., 2006; ULRICH, 2000). O pré-tratamento da amostra é, geralmente, a etapa mais demorada de um método analítico. Assim, a busca de métodos mais rápidos e simples, com menor manipulação e maior reprodutibilidade e sensibilidade vem favorecendo a automação analítica. Acessórios acoplados *on-line* aos equipamentos de identificação e/ou quantificação, realizam a separação, extração dos analitos de interesse e os direcionam para a fase de identificação (KAWAGUCHI et al., 2006; THEODORIDIS et al., 2000).

Entre as técnicas de extração mais descritas para a análise dos derivados anfetamínicos, estão a extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*), microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *Solid Phase Microextraction*), microextração em fase líquida (LPME, do inglês, *Liquid Phase Microextraction*) e extração sortiva em barras de agitação (SBSE, do inglês, *Stir Bar Sorptive Extraction*).

A extração líquido-líquido é útil na separação dos analitos de interferentes da matriz e se baseia na partição da substância entre dois líquidos imiscíveis (uma fase aquosa e outra orgânica). Compostos mais hidrofílicos têm afinidade pela fase aquosa polar, enquanto compostos hidrofóbicos serão encontrados principalmente no solvente orgânico. Uma maior recuperação ou eliminação de

interferentes pode ser obtida pela maior ou menor afinidade do analito pelas fases utilizadas, o número de extrações realizadas, a adição de sais, de agentes complexantes ou alterando-se o pH (SNYDER et al., 1997; COSTA, 2004).

Essa técnica apresenta, entretanto, certas limitações decorrentes da possível produção de emulsões, uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, grande manipulação das amostras e contaminação do ambiente com solventes voláteis (KUMAZAWA et al., 2003; THEODORIDIS et al., 2000; ULRICH, 2000). Diversos artigos citam, no entanto, a utilização da ELL na determinação dos derivados metilenedioxianfetamínicos (COSTA & CHASIN, 2004; HERNANDEZ et al., 1996, 2001; SADEGHIPOUR & VEUTHEY, 1997).

Uma alternativa aos processos de ELL, é a utilização da extração em fase sólida (HENNION, 1999; KUMAZAWA et al., 2003). O método consiste na passagem da amostra, sob pequeno vácuo ou uma leve pressurização, por um cartucho de separação contendo uma fase sólida capaz de reter especificamente os analitos de interesse. Os compostos retidos são extraídos da fase sólida usando um solvente apropriado. A SPE apresenta algumas vantagens em relação à ELL, como o menor tempo de preparo das amostras, o pequeno consumo de solventes, a menor formação de resíduos, capacidade de extrair e purificar a amostra em uma única etapa, aumentando assim a porcentagem de recuperação e a maior possibilidade de automatizar o processo analítico, via acoplamento *on line* de acessório específico ao equipamento de identificação utilizado (HENNION, 1999; KUMAZAWA et al., 2003; THEODORIDIS et al., 2000). Essa técnica, entretanto apresenta um maior custo em relação à ELL e uma menor reprodutibilidade entre ensaios, necessitando, geralmente, da adição de um

padrão interno para maior confiabilidade do processo (MOELLER & KRAEMER, 2002). O uso da SPE é, freqüentemente, citado na extração de MDMA e seus análogos (ANDRÉS et al., 2004; BRUNNENBERG et al., 1998; FALCÓ et al., 1995, 1996, 1997; HERNANDEZ et al., 2001; LEGUA et al., 1995).

Embora muitos problemas encontrados na ELL tenham sido superados pelo uso de cartuchos de SPE, outros, inerentes às duas técnicas extrativas, permanecem, como por exemplo, o considerável tempo gasto, as diversas etapas existentes e as operações normalmente manuais. Cada etapa, especialmente a concentração (evaporação do solvente), é capaz de introduzir erros e perdas, principalmente de compostos voláteis.

Diversas limitações inerentes a essas duas técnicas de extração foram reduzidas com o surgimento da microextração em fase sólida (SPME) onde a amostra é extraída, concentrada e introduzida em um sistema analítico cromatográfico (CG ou CLAE), sem a presença de um solvente (MILLS & WALKER, 2000; ULRICH, 2000). Nessa técnica são empregadas fibras extratoras de sílica fundida recobertas com filme fino de um polímero (sorvente ou adsorvente) e colocada em um microtúbulo de aço. Os polímeros mais utilizados são polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divilbenzeno ou poliacrilato. Os polímeros de escolha são selecionados de acordo com a capacidade de extrair determinado analito, a concentração esperada do mesmo, a natureza da amostra e a presença de possíveis solventes (FLANAGAN et al., 2006; KUMAZAWA et al., 2003; MILLS & WALKER, 2000; SNOW, 2000; ULRICH, 2000).

Ao contrário da ELL, cujo objetivo é extrair todo o analito da amostra, na SPME a extração é baseada em um equilíbrio da substância de interesse entre a

fibra e a matriz em análise (FLANAGAN et al., 2006). Após a extração dos analitos, esses são termicamente desorvidos no bloco de injeção do cromatógrafo a gás ou injetados no *loop* de um aparelho CLAE, entrando em contato direto com a fase móvel. Os principais atrativos desse método são a ausência de solventes e o fato de que todo o material extraído pode ser analisado diretamente. Nessa técnica, também é necessária, via de regra, a adição de um padrão interno para reduzir as variações nas extrações (FLANAGAN et al., 2006; KAWAGUCHI et al., 2006; ULRICH, 2000).

A extração em SPME pode ocorrer de dois diferentes modos, de forma direta ou *headspace*. A forma direta consiste no contato direto da fibra com a matriz, sob condições controladas de agitação e tempo de contato, sendo indicada para amostras aquosas limpas e analitos de baixa volatilidade. Já no modo *headspace*, a fibra é exposta acima da matriz, sem entrar em contato direto com ela e é para a análise de compostos de média e alta volatilidade presentes em amostras sólidas ou líquidas, aquosas ou biológicas. A SPME na forma de *headspace* é a mais indicada, pois há menor extração de interferentes e menores danos às fibras, quando comparada a forma direta (FLANAGAN et al., 2006; LORD & PAWLISZYN, 1997; RAIKOS et al., 2003; SNOW, 2000; THEODORIDIS et al., 2000). A otimização da técnica pode ser obtida alterando-se alguns fatores, como o tipo de polímero ligado à fibra, o período de agitação e extração, o volume da amostra extraído, a dimensão do espaço *headspace* existente (espaço entre a amostra e a fibra), o pH, a presença de sais ou outros aditivos e o modo de sorção e dessorção (FLANAGAN et al., 2006; KUMAZAWA et al., 2003; SNOW, 2000; ULRICH, 2000). Diversos trabalhos na literatura empregam SPME na análise de

ecstasy e outros derivados anfetamínicos (BATTU et al., 1998; CENTINI et al., 1996; FUCCI et al., 2003; GENTILI et al., 2004; KUMAZAWA et al., 2003; LORD & PAWLISZYN, 1997, 2000; RAIKOS et al., 2003).

A necessidade de um método de automação envolvendo os princípios da ELL associada à redução do tempo de preparo das amostras levou ao desenvolvimento da microextração em fase líquida, baseada no uso de fibras descartáveis porosas e ocas (*disposable hollow fiber*) mergulhadas dentro de pequeno volume de amostra. A extração do analito ocorre por meio da sua passagem por uma fina camada de um solvente orgânico, imobilizado na parede porosa da fibra, seguido pela sua retenção em uma dada solução aceptora que se encontra no interior do lúmen dessa fibra. Após um tempo padronizado sob agitação, a solução aceptora é retirada e levada, sem qualquer tratamento prévio, diretamente para a injeção no cromatógrafo a gás ou a líquido ou ainda para uma eletroforese capilar (EC). A LPME tem se mostrado uma técnica que vem apresentando uma elevada pré-concentração do analito e excelente purificação da amostra, sugerindo um amplo potencial de aplicação em análise de drogas (FLANAGAN et al., 2006; BJERGAART & RASMUSSEN, 2005).

Outro método recente de preparo de amostras é a extração sortiva em barras de agitação (SBSE), onde pequenas barras giratórias (geralmente ímãs) são recobertas com uma camada de um polímero, por exemplo, polidimetilsiloxano e colocadas dentro da amostra a ser analisada, posta sobre um acessório eletromagnético. A barra extratora gira dentro da amostra e extrai e concentra o analito de interesse na camada polimérica. A fase extratora na SBSE pode ser a mesma da SPME, mas a capacidade de extração da barra giratória é 50 a 250

vezes maior, garantindo uma sensibilidade analítica superior do que a obtida com as fibras. Os princípios básicos das duas técnicas são, entretanto, idênticos. Após a extração SBSE, os analitos extraídos podem ser analisados de maneira idêntica à SPME (KAWAGUCHI et al., 2006).

2.6.3 Métodos de identificação

As principais técnicas de identificação dos derivados anfetamínicos e de seus produtos de biotransformação, em matrizes biológicas ou em comprimidos são os imunoenaios, a cromatografia em fase gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar.

Os testes de imunoenaios comercialmente disponíveis para identificação de anfetaminas (radioimunoensaio, enzimaensaio e imunoensaio por fluorescência polarizada) são rotineiramente empregados como métodos de triagem para os derivados metilendioxianfetamínicos. Uma das limitações dessa técnica é a presença de consideráveis reações cruzadas com compostos estruturalmente semelhantes, tais como as feniletilaminas (fenilpropanolamina, pseudoefedrina, selegina e ranitidina, por exemplo), justificando a necessidade da utilização de métodos mais específicos para a confirmação e diferenciação dessas substâncias (ENSSLIN et al., 1996; KINTZ et al., 2006; MAURER et al., 2000; NAKASHIMA, 2005; SADEGHIPOUR et al, 1997a, 1997b; SCHWARTZ & MILLER, 1997; TALWAR et al., 1999). O ponto de corte (*cut off*) estabelecido por entidades internacionais, como o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA) e o *Federal*

Workplace Drug Testing, para os testes de triagem, é de 1000 ng/mL, enquanto que para o método confirmatório esse valor deve ser de 200 ng/mL (COSTA & CHASIN, 2004; TALWAR et al., 1999).

A técnica mais empregada para a confirmação dos resultados obtidos após os testes de triagens, é a cromatografia gasosa ou líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CG/EM ou CLAE/EM), devido a sua elevada sensibilidade e especificidade. Entretanto, esse equipamento e sua manutenção são relativamente altos, além de necessitar de operadores qualificados (COSTA & CHASIN, 2004; HUANG & ZHANG, 2003; KINTZ et al., 2006; NAKASHIMA, 2005; MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005; PIETTE & PARMENTIER, 2002; SADEGHIPOUR et al., 1997a, 1997b; SCHWARTZ & MILLER, 1997).

A cromatografia gasosa acoplada a detectores de ionização de chama (DIC), de nitrogênio e fósforo (DNP) e de captura de elétrons (DCE) vem sendo empregados por alguns autores (MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005; PIETTE & PARMENTIER, 2002; SADEGHIPOUR et al., 1997a). Equipamentos como o CG/DIC são simples, reprodutíveis, apresentam ampla faixa de linearidade e menores custos, tanto de aquisição quanto de manutenção, quando comparado à CG/EM, estando presentes, geralmente, em um grande número de laboratórios de toxicologia forense (LORD & PAWLISZYN, 1997; McAVOY et al., 1999; MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005). A sensibilidade característica dos detectores de ionização de chama o torna adequado apenas para a análise das drogas presente em comprimidos (FURNARI et al., 1998; McAVOY et al., 1999; MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005; PIKKARAINEN, 1996). Para a identificação

e quantificação das substâncias em amostras biológicas, entretanto, é necessário uma pré-concentração do analito que pode ser obtida, por exemplo, na SPME (LORD & PAWLISZYN, 1997; RAIKOS et al., 2003).

Outra técnica indicada para a identificação e quantificação de *ecstasy* seria a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores espectrofotométricos com absorção na faixa do ultravioleta (UV) ou com arranjo de diodos (DAD), de fluorescência, eletroquímicos (DEQ) e de espectrometria de massas (EM) (BRUNNENBERG et al., 1998; COSTA & CHASIN, 2004; NAKASHIMA, 2005; PIETTE & PARMENTIER, 2002; SADEGHIPOUR et al., 1997b). Os detectores de UV e de fluorescência são os mais disponíveis em laboratórios de análises toxicológicas, de médio ou pequeno porte.

Os detectores de fluorescência utilizam a fluorescência natural dessas substâncias, fornecendo análises de adequada sensibilidade e especificidade, mesmo em amostras biológicas mais complexas (BRUNNENBERG et al., 1998; COSTA & CHASIN, 2004; SADEGHIPOUR & VEUTHEY, 1997). Em contrapartida, os detectores de UV apresentam-se menos sensíveis a esses analitos, devido à pequena absorvidade dos compostos nesse comprimento de onda, obrigando, geralmente, a inclusão de uma etapa de derivação na análise.

Alguns dos agentes derivantes citados na literatura para os derivados anfetamínicos são o 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) (FALCÓ et al., 1995, 1996; HERNANDEZ et al., 1996; LEGUA et al., 1995; TALWAR et al., 1999), o 9-fluorenil metil cloroformato (FMOC) (ANDRÉS et al., 2004; FALCÓ et al., 1997; HERNANDEZ et al., 2001), o cloreto de 3,5-dinitrobenzoila (DNB) (HERNANDEZ et al., 2001) e o anidrido acético (VERESS, 2000). A análise de derivados

anfetamínicos utilizando-se CLAE/UV, sem a etapa de derivação, pode ser realizada, empregando-se o modo gradiente de eluição e coluna de fase reversa, mas, mesmo assim, observa-se um maior tempo de análise e uma limitação significativa na identificação e quantificação das substâncias, quando comparada ao método com derivação (SOARES et al., 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência é, ainda, uma importante ferramenta na separação enantiomérica de MDMA e seus análogos. Essa separação pode ser obtida por meio de uma fase estacionária quiral, pela adição de um agente quiral à fase móvel ou pela adição de um agente derivante quiral em uma pré-coluna (MIŠL'ANOVÁ & HUTTA, 2003; ANDRÉS et al., 2004; ALDIRBASHI et al., 1998, 1999, 2000).

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica analítica relativamente recente, baseada na separação de analitos que apresentam carga, em um pequeno tubo capilar (20 a 100 cm de comprimento e 25 a 100 µm de diâmetro) sob influência de um campo elétrico (10 a 30 kV). A EC pode ser aplicada em diferentes modos de separação e combinada com diversos tipos de detectores (UV, DAD, fluorescência, DEQ e EM), sendo caracterizada pela alta resolução, pequena quantidade de amostra e mínimo consumo de solventes. Apresenta um mecanismo de separação diferente de outros tipos de cromatografia, apresentando-se como uma técnica alternativa potencial, capaz de realizar análises tão rápidas e eficientes como a CG ou a CLAE. A grande desvantagem da EC é o pequeno volume de amostra depositado no tubo obrigando a introdução de uma etapa de pré-concentração da amostra previamente (BOONE et al., 1999; GUZMAN et al., 1997; McAVOY et al., 1999; MOELLER et al., 1998; PIETTE &

PARMENTIER, 2002; PTOLEMY & McKIBBIN, 2006; SADEGHIPOUR et al., 1997a).

2.6.4 Avaliação do desempenho analítico

O desempenho analítico de um método cromatográfico deve ser avaliado por meio de sua resolução (R_s), ou seja, por sua capacidade em separar/distinguir as diversas substâncias presentes nas amostras analisadas. Essa separação é função de três variáveis distintas: fator de retenção (k), fator de separação ou seletividade (α) e eficiência (N) (SADEK, 2000; SNYDER et al., 1997).

Quanto menor o valor de R_s , menor a separação dos picos cromatográficos, ou seja, menor a qualidade da separação. Essa qualidade de separação pode ser quantificada pela expressão:

$$R_s = 2(t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$$

Em que, t_2 e t_1 são os tempos de retenção dos picos adjacentes.

w_1 e w_2 são as larguras das bases dos picos adjacentes.

Resoluções menores que 0,5 podem indicar a presença de duas substâncias distintas em um único pico cromatográfico. Quando isso acontece, como tentativa para solucionar o problema, devem-se mudar as condições experimentais, tentando obter uma resolução superior a 2,0.

O fator de retenção (k) representa o número de volumes mortos do sistema necessário para que o analito de interesse seja eluído. Esse deve apresentar um valor entre 0,5 e 20 sendo definido como:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Em que, t_r é o tempo de retenção do analito

t_0 é o tempo morto da coluna (tempo necessário para o analito não retido na coluna mover-se do injetor ao detector)

No presente trabalho, o cálculo de t_0 , para o método CLAE, foi realizado a partir do primeiro sinal da linha de base, caracterizado por uma rápida deflexão observada na mesma, logo após a injeção cromatográfica. No método por CG, o t_0 foi definido como o primeiro sinal apresentado pela injeção de metanol, substância que sabidamente não interage com a coluna cromatográfica utilizada.

O fator de separação (α) avalia a seletividade analítica, sendo obtido pela razão entre os fatores de retenção de dois picos compostos de eluições adjacentes, conforme a equação:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Em que, k_1 e k_2 representam o fator de retenção dos dois picos avaliados.

O número de pratos teóricos, que avalia a eficiência da coluna também é capaz de afetar a resolução, em que um aumento em seu valor promove um aumento da resolução. O número de pratos teóricos (N) pode ser definido como:

$$N = 16(tr/w)^2$$

Em que, t_r é o tempo de retenção do analito

w é a largura da base do pico

3 OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar dois métodos analíticos, um para a determinação conjunta dos derivados anfetamínicos 3,4-metilenodioxidometanfetamina (MDMA, “ecstasy” ou “Adam”) e 3,4-metilenodioxidoanfetamina (MDA), em amostras de urina, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE/UV) e o outro para a análise de MDMA, MDA e 3,4-metilenodioxidoetilanfetamina (MDEA, MDE ou “eve”), em comprimidos, utilizando-se a cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC).

Para cumprir tal objetivo, foi estabelecido o seguinte plano de trabalho:

- ✓ Revisão da literatura buscando métodos analíticos simples, econômicos e confiáveis, capazes de identificar e quantificar derivados anfetamínicos em amostras de urina e em comprimidos.
- ✓ Seleção das técnicas cromatográficas passíveis de serem validadas para a determinação de MDMA, MDA e MDEA em urina e em comprimidos.
- ✓ Validação de um método analítico que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE/UV) para a determinação de MDMA e MDA em amostras de urina.

- ✓ Validação de um método analítico que utiliza a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/DIC) para a determinação do MDMA, MDA e MDEA em comprimidos.

- ✓ Aplicação do método CLAE/UV validado, em alíquotas de amostras de urina de indivíduos usuários de drogas provenientes do Banco de Amostras do Instituto Médico Legal da Polícia Civil de Minas Gerais.

- ✓ Aplicação do método CG/DIC validado, em comprimidos clandestinos apreendidos nas ruas, cedidos pelo Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos e acessórios

- ✓ Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Hewlett Packard® modelo HP 1100 Series, equipado com bomba isocrática (G1310A Iso Pump), injetor automático (G1313A ALS), compartimento de coluna com termostato (G1316A ColComp) e detector de ultravioleta (G1314A). O sistema cromatográfico é controlado por meio do *software* ChemStation Rev.A.10.02 (Agilent® Technologies 1990-2003);

- ✓ Cromatógrafo a gás Hewlett Packard® modelo HP 5890 Series II, equipado com injetor *split/splitless* e detector de ionização em chama acoplado a integrador Hewlett Packard® modelo HP 3395 Integrator;

- ✓ Coluna cromatográfica Nucleosil 100 C₁₈ (125 x 4 mm, 5 µm);

- ✓ Coluna cromatográfica capilar Hewlett Packard® modelo HP 5, de sílica fundida (5% de fenil-polidimetilsiloxano, 50 m x 0,32 mm , 0,17 µm);

- ✓ Gases especiais para cromatografia gasosa: ar sintético, hidrogênio, nitrogênio ultra-puro e hélio ultra-puro (Air Liquide®);
- ✓ Microseringa Hamilton® de capacidade 10 µL para injeção no aparelho CG;
- ✓ Pipetas automáticas reguláveis Gilson® de 10, 100, 1000 e 5000 µL;
- ✓ Cartuchos de extração em fase sólida Accubond II ODS-C₁₈ (Agilent®);
- ✓ Agitador mecânico de tubos, tipo *vortex* – IKA –MS – Minishaker®;
- ✓ Centrífuga Excelsa Baby I® 206/1;
- ✓ Balança analítica OHAUS® modelo Explores E02140;
- ✓ Sistema de eluição a vácuo Vac Elut Vacuum Manifold (Varian®);
- ✓ Bomba de vácuo Primar® modelo 141 tipo 2VC;
- ✓ Sistema para concentração de amostras sob vazão de nitrogênio comercial,
- ✓ Banho de água com temperatura regulável, FANEM® modelo 102;

- ✓ Aparelho para banho de ultra-som Branson[®] 220;
- ✓ Conjunto para filtração a vácuo composto de funil, base e tampa em vidro borossilicato e garra de alumínio anodizado;
- ✓ Filtros com membrana HV (Durapore) em PVDF, poro de 0,45 μm , 47 mm de diâmetro, branca, lisa, Millipore[®];
- ✓ Sistema de filtração sob pressão, manual, com filtros RC15, poros de 0,45 μm ;
- ✓ Sistema de ultra-purificação de água Milipore[®] modelo MiliQ – Gradient.

4.1.2 Vidraria

- ✓ Tubos de vidro de diversas dimensões e formas;
- ✓ Béqueres;
- ✓ Almofariz.

Toda vidraria recebeu processo de descontaminação química com solução de hipoclorito de sódio 2%, seguido de lavagem com água e detergente neutro para uso em laboratório, e enxague com água ultra-purificada.

4.1.3 Padrões, reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram grau analítico ou grau cromatográfico.

- ✓ Solução padrão de 3,4-metilenodioxidoanfetamina - MDA (Cerilliant[®]);
- ✓ Solução padrão de 3,4-metilenodioxidoetilanfetamina - MDE (Cerilliant[®]);
- ✓ Solução padrão de 3,4-metilenodioxidometanfetamina - MDMA (Cerilliant[®]);
- ✓ Solução padrão de *N* metil-1-(3,4 metilenodioxifenil)-2-butamina) - MBDB (Cerilliant[®]);
- ✓ Solução metanólica de ácido hipúrico (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Solução metanólica de anfetamina (Sigma Aldrich[®]);

- ✓ Solução metanólica de catina (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Solução metanólica de efedrina (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Solução metanólica de metanfetamina (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Solução metanólica de norefedrina (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Solução metanólica de pseudoefedrina (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Padrão em pó de cloridrato de cocaína (Merck[®]);
- ✓ Fosfato de sódio dibásico (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Hidróxido de amônio (Vetec[®]);
- ✓ 1,2-naftoquinona-4-sulfonato - NQS (Sigma Aldrich[®]);
- ✓ Acetato de etila (Vetec[®]);
- ✓ Acetonitrila (J. T. Baker[®]);
- ✓ Metanol (J. T. Baker[®]);

- ✓ N-hexano (Vetec[®]).

4.1.3.1 Preparo das soluções de trabalho

As soluções metanólicas de MDMA, MDA, MDEA e MBDB, na concentração de 1,0 mg/mL foram diluídas com diferentes volumes de metanol, de modo a se obter as soluções padrões de trabalho de MDMA, MDA e MDEA em metanol, nas concentrações de 500,0, 100,0 e 25,0 µg/mL e de MBDB (utilizado como padrão interno) nas concentrações de 500,0 e 100,0 µg/mL.

As soluções metanólicas de anfetamina, metanfetamina, efedrina, norefedrina, pseudoefedrina, catina e ácido hipúrico, na concentração de 500,0 µg/mL, foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da UFMG.

Todas as soluções metanólicas, inclusive as dos padrões, foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob congelamento a -18 °C.

A solução tampão de bifosfato a 1% foi obtida por meio da adição de 1,0 g de fosfato de sódio dibásico em 100,0 mL de água ultra-pura. A solução NQS a 2% (agente derivante) foi preparada diariamente dissolvendo-se 2,0 g de NQS em 100,0 mL de água ultra-pura.

4.1.4 Amostragem

4.1.4.1 Material biológico

As amostras biológicas destinadas à validação analítica foram obtidas a partir de *pool* de urina preparado utilizando-se diversas amostras urinárias de funcionários e alunos da Faculdade de Farmácia da UFMG, que não estavam expostos aos compostos de interesse. Alíquotas homogeneizadas do *pool* de urina eram enriquecidas com solução padrão de MDMA e de MDA em diversas concentrações e, também com teores adequados dos contaminantes e adulterantes selecionados para o estudo (metanfetamina, anfetamina, MDEA, efedrina, norefedrina, pseudoefedrina, catina e ácido hipúrico), objetivando avaliar a interferência desses compostos nos resultados analíticos. Alíquotas de *pool* de urina não adicionadas dos compostos de interesse foram utilizadas como “branco”.

Alíquotas de amostras de urina de usuários de drogas foram obtidas do banco de amostras do Instituto Médico Legal da Polícia Civil de Minas Gerais, dentre aquelas cuja presença de derivados anfetamínicos havia sido triada pelo método de imunoenensaio e confirmada por imunofluorescência polarizada (n=4). Foram encaminhadas, também, amostras contendo cocaína, maconha e benzodiazepínicos para a avaliação da seletividade do método CLAE/UV. Essas amostras (n=24) foram cedidas pelo IML sem qualquer identificação dos usuários e sem especificação dos compostos presentes em cada uma delas. A doação das alíquotas do Banco de Amostras do IML foi aprovada pelo Diretor da instituição.

4.1.4.2 Comprimidos

Os comprimidos utilizados no estudo de seletividade do método CG/DIC foram obtidos por diferentes fontes. Comprimidos de anfetamina, metanfetamina, ácido dietilbarbitúrico, ácido p-aminobenzoil dietilbarbitúrico, anfepramona e femproporex foram apreendidos pela Polícia Civil de Minas Gerais e doados ao Laboratório de Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Farmácia da UFMG. Comprimidos de Aspirina[®] (ácido acetilsalicílico), Tylenol[®] (paracetamol) e Eucodrix[®] (paracetamol e cafeína) foram adquiridos em drogarias.

Os comprimidos de *ecstasy* utilizados para avaliar a adequação do método validado foram cedidos pelo Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais, dentre aqueles apreendidos nas ruas, cuja presença de derivados anfetamínicos havia sido confirmada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os comprimidos obtidos (n=4) apresentavam aspectos físicos e pesos variados, com tonalidades de marrom claro ou escuro e símbolos característicos em uma de suas superfícies. A autorização para análise dos comprimidos foi emitida pelo Chefe da Divisão de Laboratório do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais.

4.1.4.3 Outros

Alíquotas de cloridrato de cocaína (pó) foram doadas pela Polícia Civil de Minas Gerais ao Laboratório de Toxicologia Ocupacional da UFMG e, a solução de epinefrina (Dyfpne-inhal[®]) foi adquirida em drogaria.

4.2 Métodos

4.2.1 Otimização das condições cromatográficas.

4.2.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

As condições cromatográficas apropriadas para o objetivo do trabalho foram obtidas utilizando-se soluções padrões de MDMA e MDA em *pool* de urina, adicionadas de MBDB, em concentração de 1,0 µg/mL e, após extração e derivação, injetadas no aparelho CLAE em diferentes condições. Foram otimizadas a vazão e a constituição da fase móvel, a temperatura do termostato da coluna, o comprimento de onda de detecção e o volume de injeção.

4.2.1.2 Cromatografia em fase gasosa.

Na otimização das condições cromatográficas foram utilizadas soluções metanólicas de MDMA, MDA e MDEA adicionadas de padrão interno (MBDB), em concentração de 50,0 µg/mL. Foram testadas a vazão da fase móvel, a

programação de temperatura da coluna, a temperatura e a razão de divisão do injetor, a temperatura do detector, o volume de injeção e as condições do integrador.

4.2.2 Extração dos analitos de interesse

4.2.2.1 Amostras de urina

O método de LEGUA et al., 1995, proposto para determinação de anfetamina e metanfetamina em urina, com extração em fase sólida (SPE) e derivação com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS), após modificações em ambas as etapas, foi adaptado para a análise de MDMA e MDA como descrito a seguir:

- ✓ Pipetar 2,0 mL de urina, adicionar 100,0 μ L de hidróxido de amônio e 20,0 μ L de solução metanólica de MBDB 100,0 μ g/mL (padrão interno) e homogeneizar;

- ✓ Transferir a amostra biológica para cartucho C₁₈ previamente condicionado com 1,0 mL de metanol e 1,0 mL de tampão bifosfato 1% (pH 9,0). Eluir a amostra sob vácuo, pelo cartucho e em seguida lava-lo com 3,0 mL de água e 0,5 mL de acetonitrila, desprezando os eluatos;

- ✓ Extrair os compostos de interesse com 2,0 mL metanol. Recolher o eluato e evaporar até *secura* em banho de água a 40 °C, sob vazão de nitrogênio;
- ✓ Adicionar ao resíduo, 1,0 mL de tampão bifosfato 1% (pH 9,0), 1,0 mL de NQS 2% e 1,0 mL de água ultra-pura. Manter a temperatura ambiente por 20 minutos;
- ✓ Adicionar 3,0 mL de solução de n-hexano:acetato de etila (1:1), e agitar por 2 minutos em agitador de tubos tipo vórtex. Centrifugar, em seguida, por 5 minutos em 1500 rpm;
- ✓ Transferir a fase orgânica para um outro tubo e evaporar até *secura* em banho de água a 40 °C, sob vazão de nitrogênio;
- ✓ Reconstituir o resíduo com 0,5 mL de fase móvel e transferir para *vial* de vidro para a injeção automática de 50,0 µL no cromatógrafo a líquido.

Este procedimento de extração e derivação está ilustrado na Figura 5, enquanto a Figura 6 apresenta a reação entre os derivados anfetamínicos e NQS, em meio alcalino.

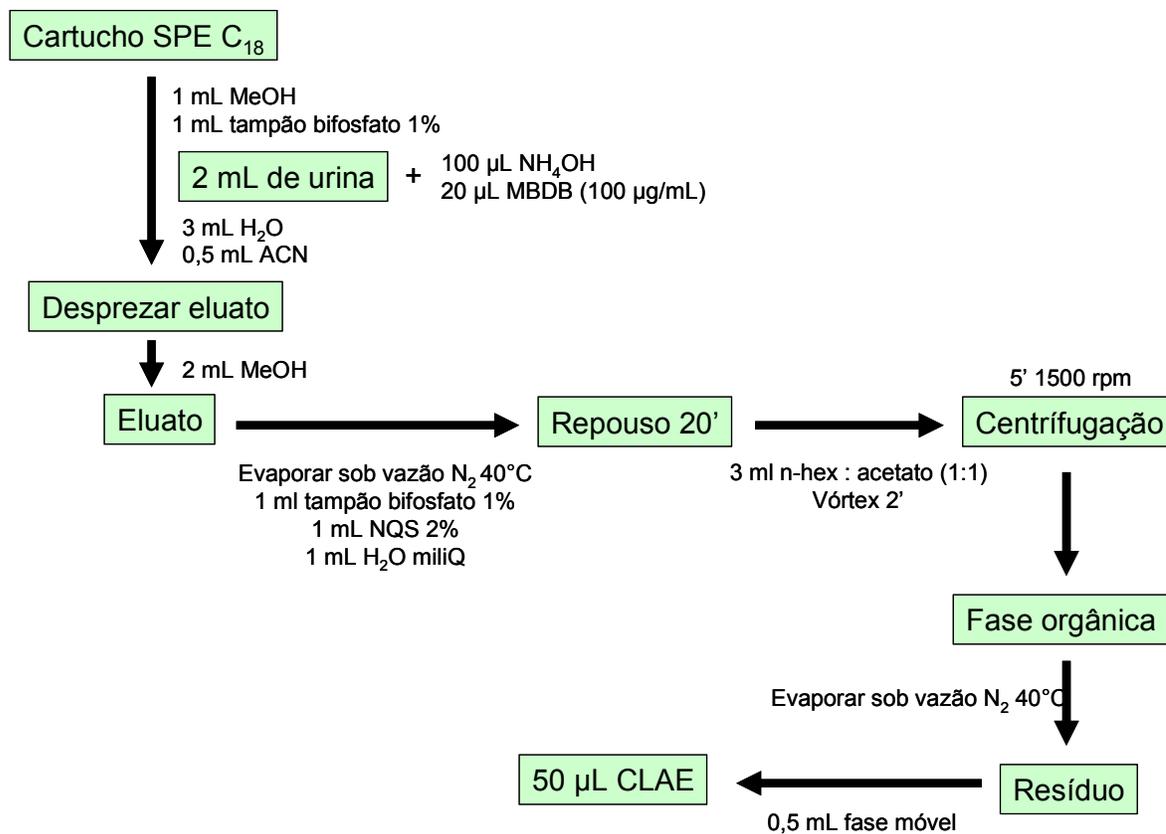


Figura 5 – Procedimento de extração e derivação dos analitos de interesse na urina para determinação por CLAE/UV.

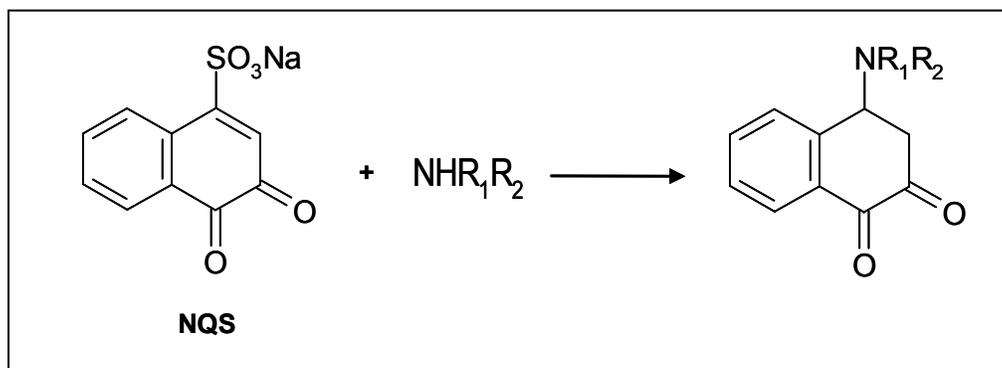


Figura 6 – Esquema da reação de derivação da anfetamina e derivados, utilizando-se NQS em meio alcalino.

4.2.2.2 Comprimidos

Foi utilizado o método proposto por MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005, com pequenas modificações e descrito a seguir:

- ✓ Pesar cada comprimido e, em seguida triturá-lo e pulverizá-lo em almofariz (pressão e fricção), até obtenção de um pó fino e homogêneo;
- ✓ Do pó fino e homogêneo obtido, pesar 10,0 mg, transferir para um béquer e adicionar 10,0 mL de metanol;
- ✓ Levar o béquer com a amostra para um banho de ultra-som por 5 minutos e, em seguida, filtrá-la com um filtro RC15, poro 0,45 µm, com o auxílio de seringa;
- ✓ Transferir 90,0 µL do filtrado para um tubo de vidro cônico, adicionar 10,0 µL da solução de MBDB (500,0 µg/mL, padrão interno) e injetar 3,0 µL no cromatógrafo a gás.

O esquema desse procedimento de extração está ilustrado na Figura 7.

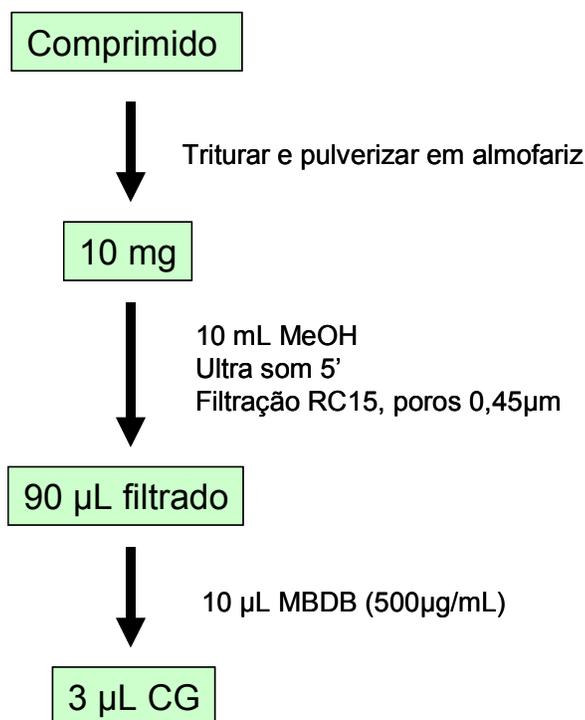


Figura 7 – Procedimento de extração dos analitos de interesse em comprimidos para determinação por CG/DIC.

4.2.3 Parâmetros de desempenho analítico

4.2.3.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico pode ser considerada como a capacidade de avaliar, com confiança, se o(s) analito(s) de interesse sofre(em) influências de outros componentes possivelmente presentes na matriz (CHASIN et al., 1994, 1998; IUPAC, 2002; RIBANI et al., 2004).

Assim, no presente trabalho, o estudo da seletividade do método CLAE, foi realizado utilizando-se alíquotas de *pool* de urina sem adição das substâncias de

interesse, enriquecidas ou não com os diversos adulterantes selecionados para serem testados, submetidas ao método de extração descrito no item 4.2.2.1 e às condições cromatográficas otimizadas (item 5.1.1). Foi avaliada a influência das seguintes substâncias: anfetamina, metanfetamina, MDEA, efedrina, norefedrina, pseudoefedrina, catina e ácido hipúrico.

A seletividade do método em cromatografia gasosa foi avaliada submetendo-se os comprimidos de anfetamina, metanfetamina, anfepramona, femproporex, ácido dietilbarbitúrico, cloridrato de p-aminobenzoil dietilbarbitúrico, ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína ao método de extração descrito no item 4.2.2.2. As soluções metanólicas obtidas da extração desses comprimidos e também do cloridrato de cocaína (pó) e soluções de epinefrina, pseudoefedrina e catina foram analisadas nas condições cromatográficas otimizadas (item 5.1.2).

4.2.3.2 Linearidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra, dentro de determinada faixa de concentração (CHASIN et al., 1994, 1998; RIBANI et al., 2004).

A análise desses dados requer o conhecimento sobre a correlação entre o sinal medido e a concentração do analito, e pode ser expressa por meio de uma equação matemática. O estudo da linearidade pode ser avaliado através da plotagem das concentrações de cada um dos analitos de interesse no eixo das

abscissas e das relações entre as áreas de cada um deles e do padrão interno no eixo das ordenadas. Aplicando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados obtém-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) ou coeficiente de determinação (R^2).

Esses parâmetros permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de correlação e determinação estimados, sendo que o ponto mais baixo da curva deve ser correspondente ao limite de quantificação (CHASIN et al., 1994, 1998; RIBANI et al., 2004).

No presente trabalho, alíquotas de *pool* de urina, em quintuplicata, foram enriquecidas com MDMA nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ e de MDA nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, todas elas adicionadas de MBDB (padrão interno), na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e submetidas às condições analíticas descritas no item 4.2.2.1 e cromatográficas apresentadas no item 5.1.1.

Do mesmo modo, quintuplicata das soluções padrões de MDMA, MDA e MDEA, nas concentrações de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 250,0 e 500,0 $\mu\text{g/mL}$, todas elas adicionadas de MBDB (padrão interno), na concentração de 50,0 $\mu\text{g/mL}$, foram injetadas no cromatógrafo a gás sob as condições analíticas especificadas no item 5.1.2.

4.2.3.3 Limite de detecção – LD

O limite de detecção é considerado como sendo a menor concentração do analito de interesse, presente na amostra, que quando submetido a todo o processo analítico produz um sinal definido como o limite de detecção do método (CHASIN et al., 1994).

Para a determinação do LD no método CLAE, alíquotas de *pool de urina* (referência negativa), em quintuplicata, enriquecidas com concentrações decrescentes dos analitos de interesse foram submetidas ao método otimizado. O LD para esse método foi estabelecido como sendo a menor concentração dos analitos que apresentou coeficiente de variação próximo, mas não superior, a 25%.

Para encontrar o LD para o método de cromatografia gasosa, soluções padrões de MDMA, MDA e MDEA em concentrações decrescentes e em quintuplicata, foram submetidas às condições cromatográficas estabelecidas no item 5.1.2. O LD foi considerado a menor concentração dos analitos que apresentou um coeficiente de variação (CV) próximo, mas não superior, a 25%.

4.2.3.4 Limite de quantificação – LQ

O limite de quantificação é, segundo CHASIN et al. (1998), a menor concentração do analito de interesse que pode ser medida com uma precisão estabelecida.

Para determinar o LQ do método CLAE, alíquotas de *pool* urina, referência negativa, enriquecidas com concentrações decrescentes dos analitos de interesse foram submetidas, em quintuplicata, às condições de extração descritas no item 4.2.2.1 e cromatográficas apresentadas no item 5.1.1. O limite de quantificação ficou estabelecido como sendo a menor concentração, dentro da curva analítica do método, que apresentou uma variação máxima igual a 18% (maior coeficiente de variação encontrado com o método CLAE).

Para o método CG, soluções padrões de MDMA, MDA e MDEA em concentrações decrescentes foram injetadas em quintuplicata no cromatógrafo à gás, sob as condições descritas no item 5.1.2. O limite de quantificação foi estabelecido como sendo a menor concentração da curva analítica do método, que apresentou uma variação máxima de 9,5% (maior coeficiente de variação encontrado para o método CG).

4.2.3.5 Precisão analítica

A precisão de um método analítico retrata o grau de dispersão entre resultados de testes independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, obtidos sob condições definidas (CHASIN et al., 1994, 1998; RIBANI et al., 2004). Pode ser expressa por meio do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo em condições de repetitividade, reprodutibilidade ou de precisão intermediária.

4.2.3.5.1 Repetitividade

A repetitividade ou precisão intra-ensaio retrata a concordância entre os resultados de várias medições sucessivas de uma mesma amostra, em diferentes preparações, sob as mesmas condições, ou seja, em condições de repetibilidade isto é: mesmo método; mesmo material; mesmo operador; mesmo laboratório; curto período de tempo (CHASIN et al., 1994, 1998; RIBANI et al., 2004).

Neste estudo, a repetitividade do método por CLAE foi determinada por meio da análise, em um mesmo dia, de cinco replicatas de *pool* de urina enriquecidas com os analitos de interesse, nas concentrações de 2,0; 1,0 e 0,1 µg/mL (MDMA) e 2,0; 1,0 e 0,05 µg/mL (MDA), adicionadas de padrão interno (1,0 µg/mL de MBDB). Todas as replicatas foram submetidas às condições de extração descritas no item 4.2.2.1 e cromatográficas apresentadas no item 5.1.1.

Para o método por CG, esse parâmetro foi avaliado injetando-se, em um mesmo dia, e em quintuplicata, soluções padrões de MDMA, MDA e MDEA nas concentrações de 1,0; 10,0 e 100,0 µg/mL, adicionadas de 50,0 µg/mL de MBDB (padrão interno). Todas as replicatas foram submetidas às condições cromatográficas otimizadas (item 5.1.2).

4.2.3.5.2 Precisão intermediária

A reprodutibilidade ou precisão interensaio retrata a concordância entre os resultados de várias medições sucessivas de uma mesma amostra, em diferentes

preparações, sob diferentes condições, ou seja, em condições de reprodutibilidade, isto é: mesmo método; operadores diferentes; laboratórios diferentes; equipamentos diferentes; longo período de tempo (ANVISA 2004; INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004). Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada, ou seja, é a medida mais eficaz para verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

No presente estudo, as condições de reprodutibilidade não puderam ser seguidas, assim o coeficiente de variação interensaio foi determinado em condição de precisão intermediária, ou seja, alterando-se apenas uma das condições de análise (CHASIN et al., 1998; RIBANI et al., 2004).

A precisão intermediária no presente estudo foi determinada por meio da análise, em quatro dias seguidos, em triplicata, de alíquotas de *pool* de urina enriquecidas com os analitos de interesse, nas concentrações de 2,0 e 0,1 µg/mL (MDMA) e 2,0 e 0,05 µg/mL (MDA), adicionadas de padrão interno (1,0 µg/mL de MBDB). Todas as replicatas foram submetidas às condições de extração descritas no item 4.2.2.1 e cromatográficas apresentadas no item 5.1.1.

A precisão intermediária do método por CG foi estudada por meio da análise, em cinco dias seguidos, em quintuplicata, de soluções padrões de MDMA, MDA e MDEA, nas concentrações de 1,0; 10,0 e 100,0 µg/mL, adicionadas de 50,0 µg/mL de MBDB (padrão interno). Todas as replicatas foram submetidas às condições cromatográficas otimizadas (item 5.1.2).

Tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária, nos dois métodos analíticos, foram avaliadas por meio da determinação do coeficiente de variação (CV). Nesse cálculo foram utilizadas as relações de áreas ou áreas relativas dos analitos que correspondeu à razão entre as áreas absolutas das substâncias de interesse e as áreas absolutas do padrão interno, para cada concentração analisada.

4.2.3.6 Robustez

A robustez de um método analítico avalia a resistência às variações nos resultados, quando pequenas diferenças ocorrem nas condições experimentais inicialmente descritas e estabelecidas. Assim, um método é considerado robusto quando seus resultados não são afetados por pequenas modificações em seus parâmetros analíticos (RIBANI et al., 2004).

Na avaliação da robustez do método CLAE, foram testadas pequenas variações na vazão da fase móvel, na temperatura da coluna cromatográfica e na proporção da fase móvel (acetonitrila e água). Para o método CG foram realizadas, também, alterações na vazão da fase móvel e na programação da temperatura da coluna cromatográfica.

4.2.3.7 Recuperação

A recuperação de um método analítico reflete a quantidade de uma determinada substância obtida no processo analítico em relação à quantidade real presente na amostra. Ela avalia a eficiência do método de tratamento da amostra (CHASIN et. al., 1998). Deve-se avaliar pelo menos três concentrações diferentes, correspondentes a um valor próximo ao limite de quantificação, próximo ao ponto mais elevado da curva analítica e uma terceira concentração próxima ao valor médio dessa curva (CHASIN et al., 1994; INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004).

Para avaliar a porcentagem da recuperação da etapa de extração (SPE) do método de cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizadas alíquotas de *pool* de urina, em quintuplicata, enriquecidas com as soluções padrão de MDMA e MDA nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 µg/mL, antes e após a extração em fase sólida, e analisadas conforme especificado no item 4.2.2.1.

As áreas dos picos obtidos após a injeção das alíquotas de *pool* de urina enriquecidas antes da extração em fase sólida foram comparadas com aquelas encontradas após a injeção do *pool* de urina enriquecido após a extração em fase sólida.

Considerando que no método que utiliza a cromatografia gasosa não existe tratamento das amostras e também os elevados teores dos analitos esperados nos comprimidos de *ecstasy*, avaliou-se ser dispensável a determinação da recuperação analítica para o referido método.

4.2.3.8 Estabilidade

Com o objetivo de gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, os analitos presentes nas amostras analisadas devem ser estáveis por um período razoável, variando de acordo com a necessidade do método (RIBANI et al., 2004).

A estabilidade do MDMA e MDA em amostra biológica foi determinada por meio da utilização de *pool* de urina adicionado das substâncias, na concentração de 2,0 µg/mL. Alíquotas das amostras foram submetidas, no mesmo dia do preparo, às condições de extração especificadas no item 4.2.2.1 e cromatográficas registradas no item 5.1.1, sendo o resultado obtido considerado como o do tempo zero do experimento. As alíquotas foram armazenadas em congelador (-18°C) e analisadas separadamente em diferentes dias após o preparo e congelamento das mesmas, de acordo com a disponibilidade do equipamento. Os resultados obtidos nesses dias foram comparados com aquele encontrado no tempo zero, aceitando-se uma variação máxima de 20% (COSTA & CHASIN et al., 2004). A estabilidade dos analitos frente aos ciclos congelamento-descongelamento foi acompanhada até um período considerável satisfatório aos objetivos do trabalho (27 dias).

4.2.3.9 Curva analítica

No preparo da curva analítica para as determinações realizadas pelo método CLAE/UV, foram selecionadas três concentrações de cada analito de interesse, dentro da faixa de linearidade obtida. Foram analisadas, em triplicata,

alíquotas do *pool* de urina enriquecidas com soluções padrões de MDMA nas concentrações de 0,1; 1,0 e 2,0 µg/mL e de MDA nas concentrações de 0,05 ; 1,0 e 2,0 µg/mL. As alíquotas de *pool* de urina enriquecidas com os analitos de interesse e com 1,0 µg/mL de MBDB foram analisadas, em triplicata e plotadas pelas relações entre as áreas de cada um deles e do padrão interno no eixo das ordenadas e pelas concentrações de cada um deles no eixo das abscissas. Foram analisadas também, alíquotas do *pool* de urina sem a adição dos compostos de interesse, considerado como branco de urina.

Na construção da curva analítica para o método CG/DIC foram injetadas, em triplicata, alíquotas de soluções padrões de MDMA, MDA e MDEA, nas concentrações 5,0; 50,0; 100,0; 250,0 e 500,0 µg/mL, adicionadas de 50 µg/mL de MBDB (padrão interno). Foram realizadas, também, injeções de metanol sem adição de analitos, considerado como branco.

4.2.3.10 Aplicação dos métodos validados nas amostras obtidas

Alíquotas de amostras de urina de indivíduos suspeitos de serem usuários de derivados anfetamínicos, obtidas como descrito no item 4.1.4.1 foram submetidas ao procedimento de extração descrito em 4.2.2.1 e às condições cromatográficas relatadas em 5.1.1.

Comprimidos apreendidos pela Polícia Civil de Minas Gerais (PCMG) com presença de derivados anfetamínicos confirmada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas realizada no Instituto de Criminalística da

PCMG, foram cedidos para a realização do presente trabalho. Esses comprimidos foram submetidos aos procedimentos especificados no item 4.2.2.2 e às condições cromatográficas relatadas no item 5.1.2. Amostras que apresentaram concentração superior aos valores pré-estabelecidos para a curva analítica foram submetidas à diluição apropriada com metanol e levadas à re-análise.

5 RESULTADOS

5.1 Condições cromatográficas

5.1.1 Método CLAE

Após os testes realizados foram otimizadas as seguintes condições cromatográficas:

Coluna: Nucleosil 100 C₁₈ (125 x 4 mm, 5 µm)

Fase móvel: Acetonitrila : água (50:50)

Vazão da fase móvel: 0,8 mL/min em sistema isocrático

Temperatura da coluna: 40 °C

Comprimento de onda de detecção: 280 nm

Volume injetado: 50 µL

Nessas condições cromatográficas, foram obtidos os parâmetros cromatográficos expressos nas Tabelas 1 e 2.

A Tabela 1 mostra os tempos de retenção médios, retenção relativa ao padrão interno (MBDB), fator de retenção e número de pratos teóricos obtidos na análise das substâncias de interesse pelo método CLAE/UV. A Tabela 2 apresenta os fatores de separação e a resolução encontrados nesse método.

Tabela 1 – Tempo de retenção médio, de retenção relativo, fator de retenção e número de pratos teóricos dos picos cromatográficos dos analitos, composto fisiológico urinário e padrão interno, após análise por CLAE/UV.

Analito	Tempo Retenção (min) *	Tempo de Retenção Relativo*	Fator Retenção	Número de Pratos Teóricos
MDA	5,42	0,67	1,84	14.637
MDMA	6,33	0,79	2,31	22.367
Composto urinário	6,72	0,84	2,52	-
MBDB	8,05	1,00	3,22	21.133

* média de 10 injeções

Tabela 2 - Fatores de separação e resolução dos picos cromatográficos dos analitos, composto fisiológico da urina e padrão interno, após análise por CLAE/UV.

Analito	Fator Separação	Resolução
MDA / MDMA	1,26	10,32
MDMA / Composto urinário	1,09	4,14
Composto urinário / MBDB	1,28	12,21

Na Figura 8 são mostrados um cromatograma referente a análise de uma alíquota de *pool* de urina sem adição das substâncias de interesse (referência negativa) e um cromatograma obtido após a análise de uma alíquota de *pool* de urina enriquecida com MDMA, MDA e MBDB (padrão interno), ambas submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.2.1 e às condições cromatográficas otimizadas (item 5.1.1).

Observa-se que, nas condições cromatográficas estabelecidas, os picos das substâncias apresentaram boa resolução e separação, confirmando os dados apresentados nas tabelas anteriores.

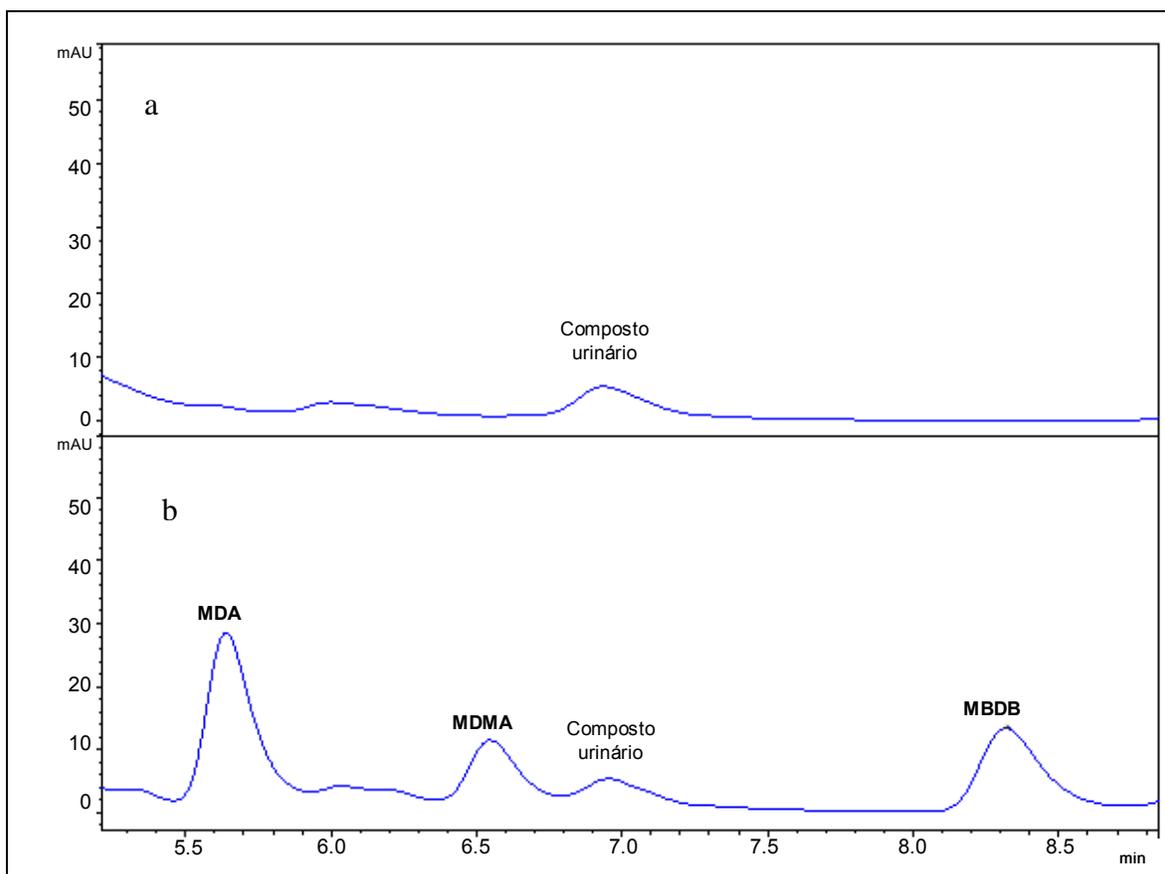


Figura 8 – Cromatogramas de alíquotas de *pool* de urina referência negativa (a) e de *pool* de urina enriquecido com 1,0 µg/mL de MDMA, MDA, e MBDB (b), analisadas pelo método CLAE/UV.

5.1.2 Método CG

Após os testes realizados foram otimizadas as seguintes condições operacionais:

Coluna capilar: HP 5 (5% de fenil-polidimetilsiloxano , 50 m x 0,32 mm , 0,17 μ m)

Fase móvel: gás hélio (He)

Vazão da fase móvel: 2,0 mL/min

Válvula de divisão: 25,0 mL/min

Válvula de purga: 1,0 mL/min

Programação da temperatura da coluna: temperatura inicial de 140 °C por 2 minutos, seguida de elevação de 5 °C/min até 190 °C e posterior elevação de 35 °C/min até 270 °C, permanecendo durante 6 minutos nessa temperatura final.

Temperatura do injetor: 260 °C

Temperatura do detector: 275 °C

Gases auxiliares: hidrogênio e ar sintético

Volume injetado: 3 μ L

As condições estabelecidas para o integrador foram:

Atenuação: 8

Velocidade do papel: 1,0

Área de rejeito: 4

Limiar de detecção do pico: 2

Largura do pico: 0,02

Tempo de corrida: 9 minutos

Os parâmetros cromatográficos obtidos nessas condições estabelecidas são mostrados nas Tabelas 3 e 4.

Na Tabela 3, podem ser observados os tempos de retenção médios, os de retenção relativos ao padrão interno (MBDB), o fator de retenção e o número de pratos teóricos encontrados na análise das substâncias de interesse, enquanto na Tabela 4 são apresentados os fatores de separação e resolução obtidos.

Tabela 3 – Tempo de retenção médio, de retenção relativa, fator de retenção e número de pratos teóricos dos picos cromatográficos dos analitos e padrão interno por CG/DIC.

Analito	Tempo Retenção (min)*	Tempo de Retenção Relativo*	Fator Retenção	Número de Pratos Teóricos
MDA	6,83	0,82	1,79	728.889
MDMA	7,42	0,89	1,94	916.651
MDE	7,90	0,95	2,14	1.109.511
MBDB	8,35	1,00	2,31	1.422.908

* média de 10 injeções

Tabela 4 – Fatores de separação e resolução dos picos cromatográficos dos compostos de interesse e padrão interno após análise pelo método CG/DIC.

Analito	Fator Separação (α)	Resolução (Rs)
MDA / MDMA	1,09	36,91
MDMA / MDE	1,10	31,00
MDE / MBDB	1,09	32,17

Na Figura 9 podem ser visualizados os cromatogramas referentes à injeção de alíquota de metanol (branco) e resultante da análise de solução contendo MDMA, MDA, MDEA e MBDB (padrão interno) nas condições estabelecidas no item 5.1.2. Nesse caso, pode ser observada, também, a boa resolução e separação dos picos dos analitos de interesse.



Figura 9 – Cromatogramas obtidos após a injeção de alíquota de metanol (a) e de solução metanólica contendo MDA, MDMA, MDEA e MBDB, em concentração de 50 µg/mL (b), no aparelho CG, nas condições estabelecidas.

5.2 Parâmetros de desempenho analítico

5.2.1 Seletividade

A análise de alíquotas de *pool* de urina sem adição dos compostos de interesse (urina referência negativa) permitiu afirmar que a matriz biológica selecionada para a validação analítica é adequada ao objetivo da mesma. Essa

matriz não apresentou qualquer substância capaz de interferir na identificação e quantificação dos analitos de interesse, como pode ser observado na Figura 7(a).

Da mesma maneira, como mostrado na Figura 8(a), pode-se afirmar que o metanol, solvente utilizado nas análises em CG, apresenta-se, também, adequado, pois não gerou sinal eletrônico (pico cromatográfico) capaz de interferir com os analitos de interesse.

Os métodos selecionados apresentaram, ainda, seletividade satisfatória frente às diversas substâncias de propriedades físicas, químicas e/ou comportamentais semelhantes aos analitos de interesse e que foram selecionadas como eventuais interferentes, no presente trabalho (item 4.2.3.1). Como mostrado nas Tabelas 5 (CLAE) e 6 (CG), todos os eventuais interferentes selecionados apresentaram tempos de retenção distintos daqueles encontrados para os analitos de interesse, MDMA, MDA e MDEA assim como para o padrão interno, MBDB. Os cromatogramas com alguns desses compostos estão mostrados nas figuras 10 (CLAE) e 11 (CG).

Tabela 5 – Tempo de retenção e de retenção relativo de alguns dos possíveis interferentes na análise do MDMA e MDA por CLAE/UV.

Analito	Tempo Retenção (min)	Tempo de Retenção Relativo
Norefedrina	3,10	0,385
Catina	3,20	0,397
Pseudoefedrina	3,21	0,398
Efedrina	3,22	0,400
Ácido Hipúrico	5,80	0,720
Anfetamina	6,10	0,758
Metanfetamina	7,30	0,907
MDEA	7,71	0,958
MBDB (PI)	8,05	1,000

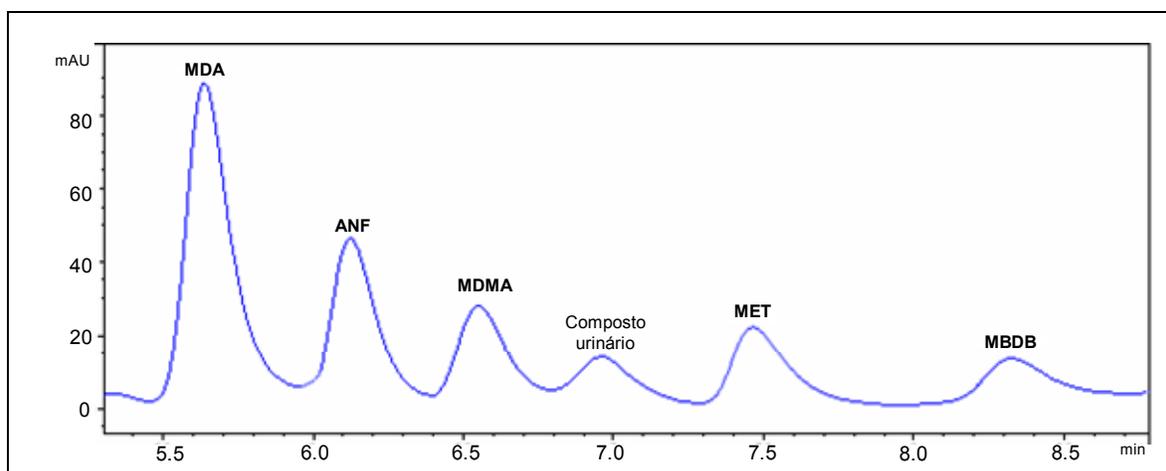


Figura 10 – Cromatograma de alíquotas de *pool* de urina enriquecido com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de MDA, anfetamina, MDMA, metanfetamina e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de MBDB, analisadas pelo método CLAE/UV.

Tabela 6 - Tempo de retenção e de retenção relativo de alguns dos possíveis interferentes na análise de MDMA, MDA e MDEA por CG/DIC.

Analito	Tempo Retenção (min)	Tempo de Retenção Relativo
Epinefrina	2,42	0,289
Cocaína	3,75	0,449
Anfetamina	4,03	0,483
AAS	4,27	0,511
Metanfetamina	4,44	0,532
Catina	5,22	0,625
Pseudoefedrina	5,89	0,704
Anfepramona	6,40	0,766
Ácido dietilbarbitúrico	7,04	0,843
p-aminobenzoil dietilbarb.	7,15	0,856
Femproporex	8,11	0,971
Paracetamol	**	**
Cafeína	**	**
MBDB (PI)	8,35	1,000

** sem sinal eletrônico (pico) detectado até 9 minutos após a injeção

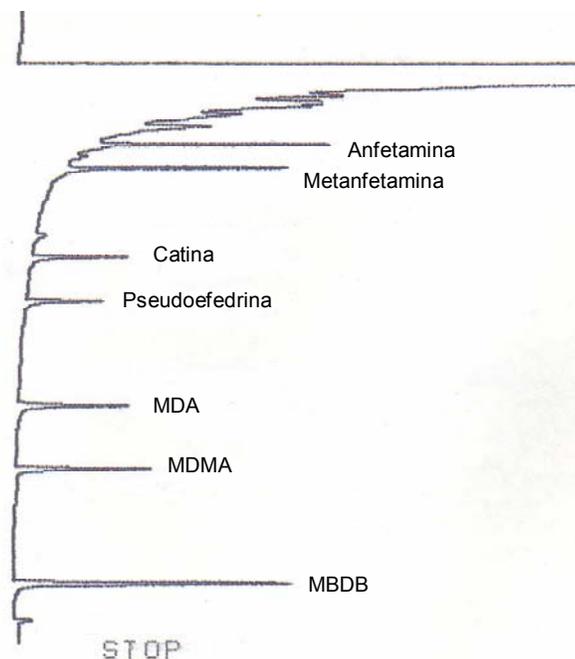


Figura 11 – Cromatograma obtido após injeção de solução metanólica contendo anfetamina, metanfetamina, catina, pseudoefedrina, MDA, MDMA e MBDB, em concentração de 71,4 µg/mL, no aparelho CG, nas condições estabelecidas.

5.2.2 Linearidade

A linearidade foi encontrada em toda a faixa de concentração estudada, como descrito no item 4.2.3.2, sendo de 0,1 a 2,0 µg/mL para o MDMA e de 0,05 a 2,0 µg/mL para o MDA. As curvas com a faixa de linearidade, equação da reta com os desvios correspondentes e coeficiente de determinação (R^2) para o MDMA e MDA são mostradas nas Figuras 12 e 13 respectivamente.

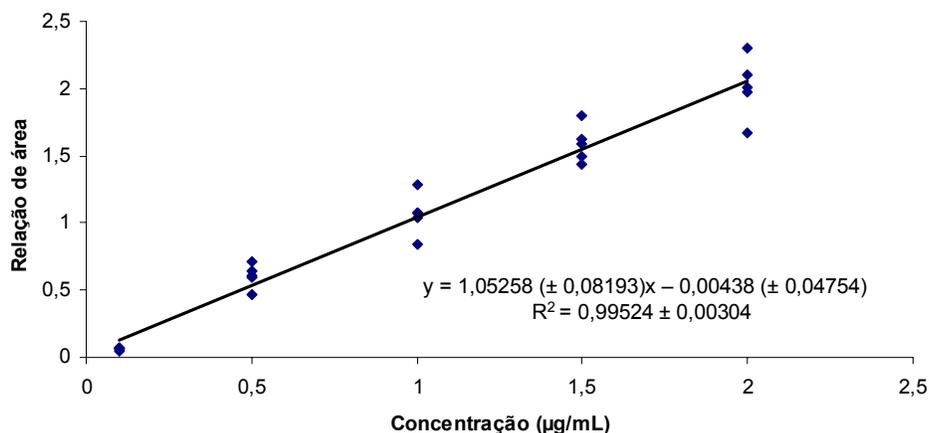


Figura 12 – Faixa de linearidade obtida para o método CLAE/UV na análise do MDMA em amostras de urina.

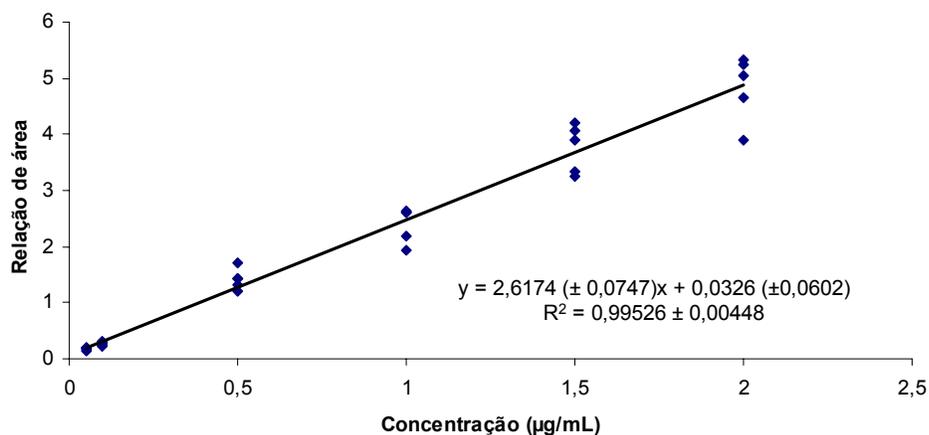


Figura 13 – Faixa de linearidade obtida para o método CLAE/UV na análise do MDA em amostras de urina.

A resposta linear do detector no método de CG, estabelecida conforme o descrito no item 4.2.3.2, foi de 1,0 a 500,0 µg/mL para todos analitos pesquisados (MDMA, MDA e MDE). Os gráficos com a faixa de linearidade, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) do método para MDMA, MDA e MDE são mostrados nas Figuras 14, 15 e 16 respectivamente.

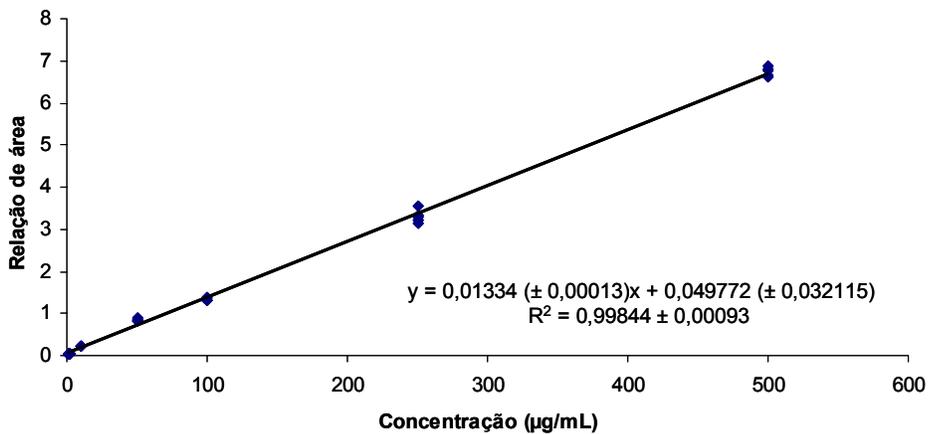


Figura 14 – Faixa de linearidade do método CG/DIC para a análise do MDMA em metanol.

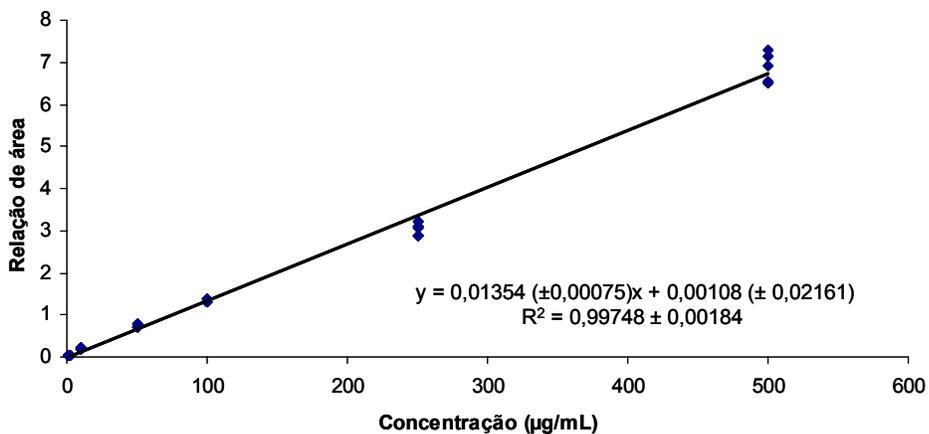


Figura 15 – Faixa de linearidade do método CG/DIC para a análise do MDA em metanol.

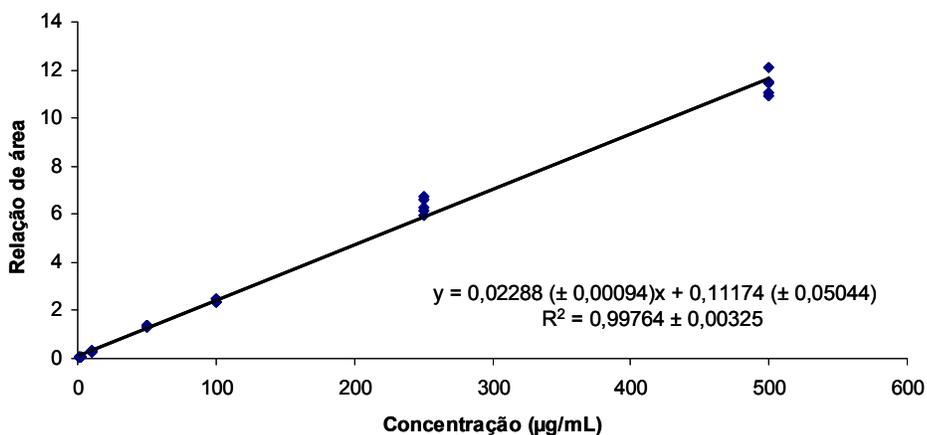


Figura 16 – Faixa de linearidade do método CG/DIC para a análise do MDEA em metanol.

5.2.3 Limite de detecção

O limite de detecção do método CLAE/UV, estabelecido como descrito no item 4.2.3.3 foi de 75 ng/mL (0,075 µg/mL) para o MDMA e de 30 ng/mL (0,030 µg/mL) para o MDA.

Para o método CG/DIC, o limite de detecção, calculado como descrito no item 4.2.3.3 foi de 0,6 µg/mL para o MDMA e MDA e de 0,5 µg/mL para o MDEA.

5.2.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método CLAE/UV, determinado conforme especificado no item 4.2.3.4, foi de 100 ng/mL (0,1 µg/mL) para o MDMA e de 50 ng/mL (0,05 µg/mL) para o MDA.

Para o método CG/DIC, o LQ determinado, conforme o descrito no item 4.2.3.4, foi de 1,0 µg/mL para os três compostos analisados (MDMA, MDA e MDE).

5.2.5 Precisão analítica

Os valores dos coeficientes de variação intra-ensaio (condição de repetitividade) e interensaio (precisão intermediária), dos dois métodos cromatográficos selecionados, calculados conforme o descrito no item 4.2.3.5 estão mostrados nas Tabelas 7 e 8 (CLAE/UV) e 9 e 10 (CG/DIC).

Tabela 7 – Coeficientes de variação intra-ensaio do método CLAE/UV utilizado para a análise de MDMA e MDA em urina (n=5).

Concentração (µg/mL)	CV (%)	
	<i>MDMA</i>	<i>MDA</i>
0,05	-	16,2
0,1	15,5	-
1,0	14,5	13,3
2,0	13,2	12,2

Tabela 8 – Coeficientes de variação interensaio (precisão intermediária) do método CLAE/UV utilizado para a análise de MDMA e MDA em urina (n=5).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	
	<i>MDMA</i>	<i>MDA</i>
0,05	-	18,1
0,1	17,1	-
2,0	15,2	14,2

Tabela 9 – Coeficientes de variação intra-ensaio da análise de MDMA, MDA e MDEA por CG/DIC (n=5).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)		
	<i>MDMA</i>	<i>MDA</i>	<i>MDEA</i>
1,0	9,46	9,25	6,24
10,0	4,54	2,91	1,62
100,0	1,51	0,97	1,07

Tabela 10 – Coeficientes de variação interensaio (precisão intermediária) do método CG/DIC para a análise de MDMA, MDA e MDEA (n=5).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)		
	<i>MDMA</i>	<i>MDA</i>	<i>MDEA</i>
1,0	7,25	7,11	4,10
10,0	4,93	3,97	3,00
100,0	3,21	3,00	2,30

5.2.6 Robustez

Conforme definido no item 4.2.3.6, a robustez do método CLAE/UV foi avaliada alterando-se o vazão da fase móvel de 0,8 mL/min para 0,7 e 0,9 mL/min e, também, a proporção acetronitila:água da sua composição (de 50:50 para 55:45 e 45:55). Essas alterações não provocaram alterações significativas nos tempos de retenção e de retenção relativos dos analitos de interesse, mantendo-se portanto, a adequada resolução cromatográfica. Outro parâmetro modificado foi a temperatura da coluna cromatográfica, modificada de 40 °C para 35 °C e 30 °C. Não foi observada, também nesse caso, qualquer alteração que pudesse comprometer a análise cromatográfica.

A robustez do método CG/DIC também foi avaliada de acordo com o item 4.2.3.6. As alterações na vazão da fase móvel (de 2 mL/min para 1,8 e 2,2 mL/min) e na programação de temperatura da coluna cromatográfica, tanto nas rampas de incremento de temperatura (elevação de 5 °C/min para 4 °C/min ou 6 °C/min) quanto no tempo de duração das etapas isotérmicas (140 °C/min durante 2 minutos para 140 °C/min durante 1,5 minuto ou 2,5 minutos) não apresentaram diferenças significativas que pudessem comprometer a identificação e quantificação dos analitos de interesse.

5.2.7 Recuperação

A porcentagem de recuperação da etapa de extração utilizada no método CLAE para a análise de MDMA e MDA conforme descrito no item 4.2.3.7, pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11 – Porcentagem de recuperação do método de extração utilizado em CLAE para a determinação de diferentes concentrações de MDMA e MDA, em amostra de urina.

Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	
	MDMA	MDA
0,5	80,7	82,7
1,0	81,5	82,2
2,0	83,9	84,2

5.2.8 Estabilidade

A Figura 17 mostra os resultados obtidos no estudo da estabilidade química do MDMA e MDA (item 4.2.3.8). Foi observado que, durante 27 dias, as amostras de MDMA e MDA, mantidas no ciclo congelamento-descongelamento, não apresentaram concentrações com variações superiores a 20%.

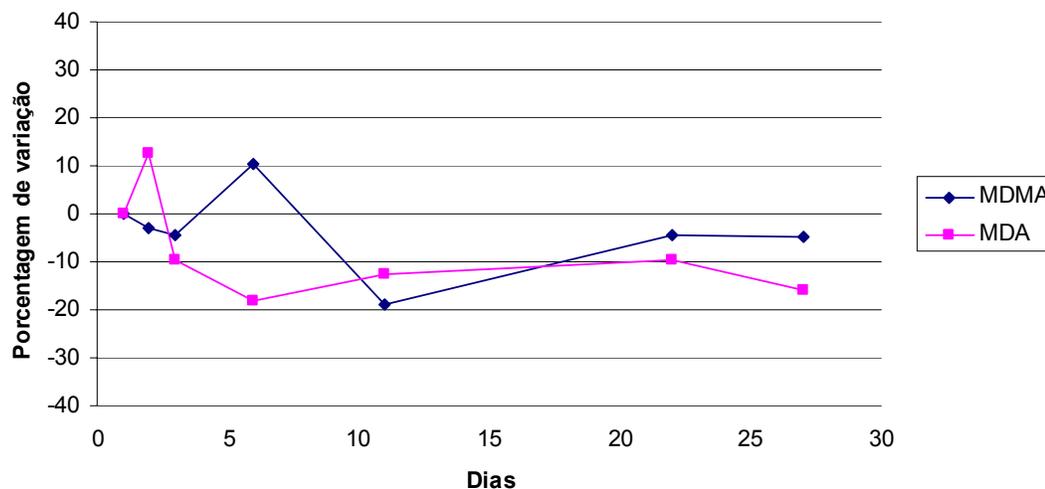


Figura 17 – Representação gráfica da variação encontrada na concentração de MDMA e MDA em amostras de urina mantidas em – 18 °C por 27 dias.

5.2.9 Curvas analíticas

A elaboração das curvas analíticas para ambos os métodos foi realizada como descrito no item 4.2.3.9.

Os gráficos com a curva analítica, equação da reta com desvio padrão e o coeficiente de determinação (R^2) do método por cromatografia líquida utilizado para a determinação do MDMA e MDA são mostrados nas Figuras 18 e 19 respectivamente.

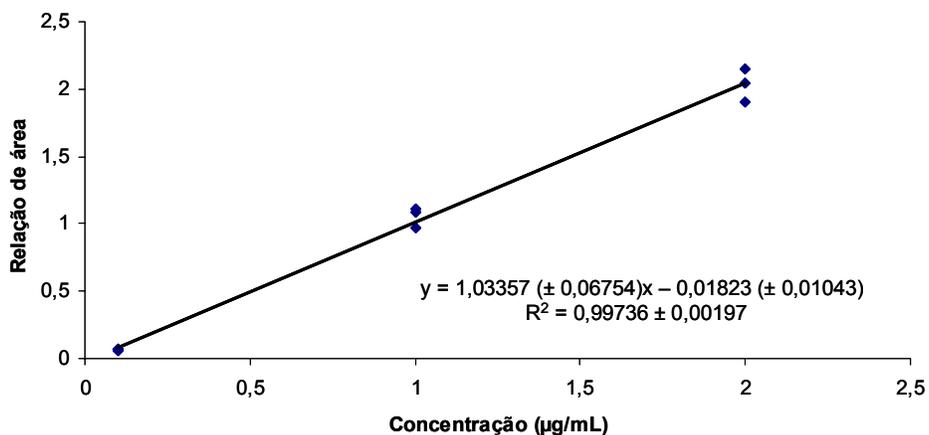


Figura 18 – Curva analítica para a determinação de MDMA em amostras de urina empregando-se o método CLAE/UV.

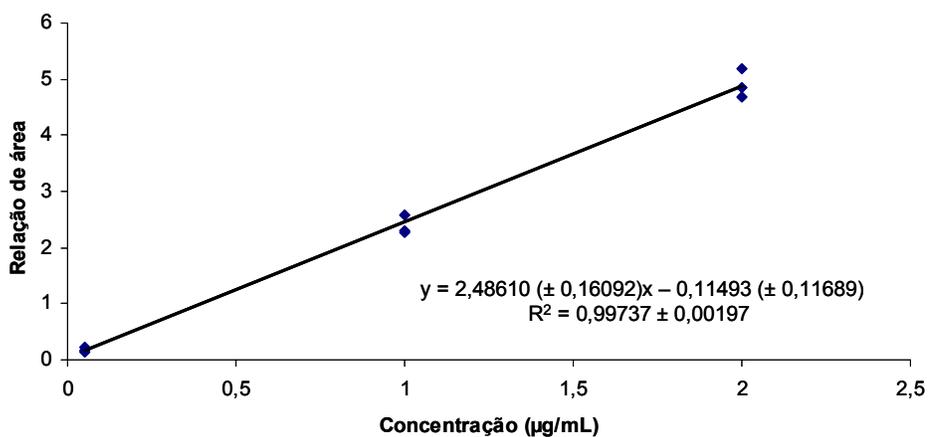


Figura 19 - Curva analítica para a determinação de MDA em amostras de urina empregando-se o método CLAE/UV.

As curvas analíticas, equações da reta com os desvios padrões e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos pelo método CG/DIC para análise do MDMA, MDA e MDEA são mostrados nas Figuras 20, 21 e 22, respectivamente.

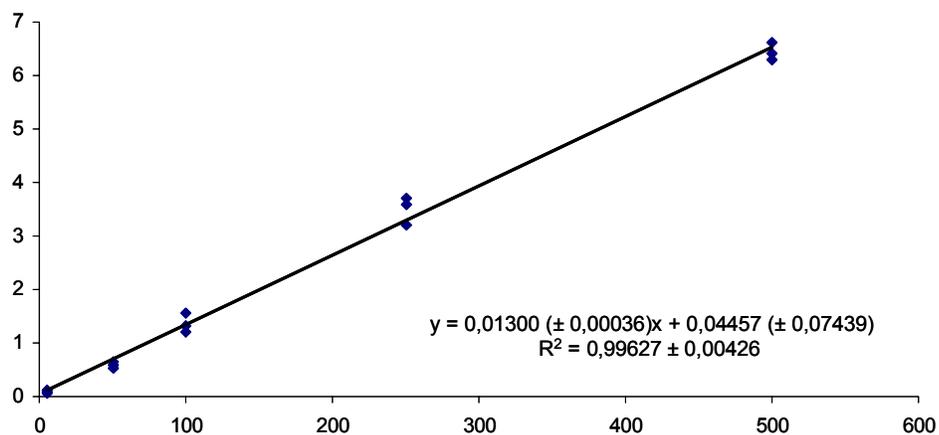


Figura 20 – Curva analítica para a determinação de MDMA em metanol, empregando-se o método CG/DIC.

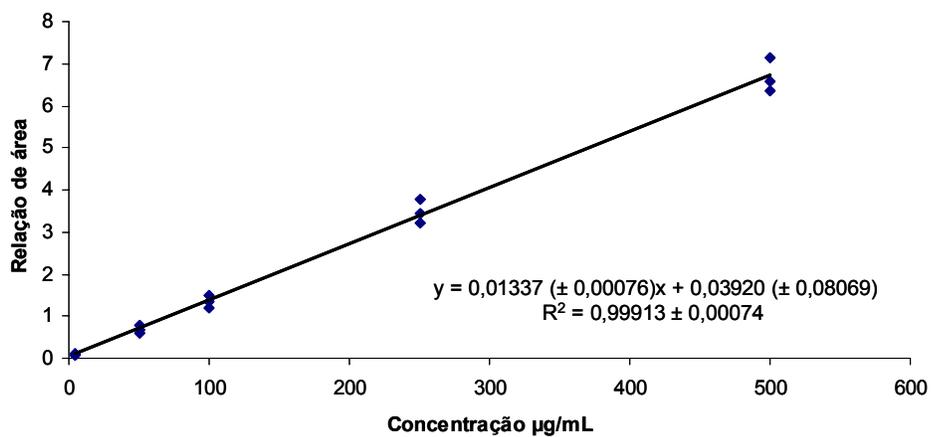


Figura 21 – Curva analítica para a determinação de MDA em metanol, empregando-se o método CG/DIC.

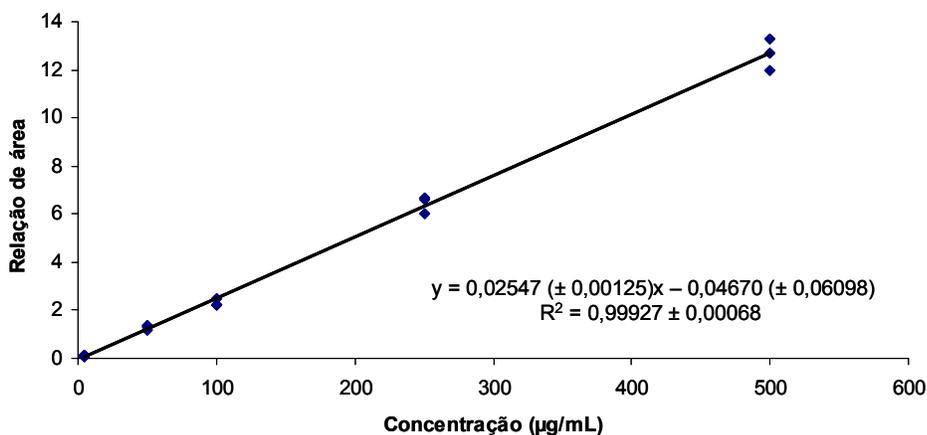


Figura 22 – Curva analítica para a determinação de MDEA em metanol empregando-se o método CG/DIC.

5.2.10 Aplicação das metodologias propostas

A análise das alíquotas de urina cedidas pelo IML de Minas Gerais não apresentou qualquer sinal que pudesse interferir na identificação dos derivados anfetamínicos, mesmo na presença de maconha, cocaína e/ou benzodiazepínicos.

Esses derivados foram detectados em apenas cinco alíquotas (Tabela 12), dentre elas, uma contendo anfetamina, e quatro com a presença de MDMA e MDA. Após a análise das alíquotas de urina, os dados obtidos foram comparados com os laudos correspondentes do Instituto Médico Legal de Minas Gerais. Todos os resultados do presente trabalho mostraram-se concordantes com aqueles encontrados pelo IML, destacando-se que em uma das alíquotas analisadas, positiva para MDMA/MDA (amostra 19), o laudo da Instituição havia detectado apenas a presença de cocaína, ressaltando a eficiência e maior sensibilidade do

método CLAE/UV otimizado no presente trabalho. Duas alíquotas (27 e 28) apresentaram uma concentração de MDMA muito acima do valor máximo da curva proposta, sendo necessário uma segunda análise, acrescida de uma etapa de diluição, o que foi inviável devido a pequena quantidade da amostra cedida. A Figura 23 mostra um cromatograma obtido após a análise de uma das alíquotas de urina que apresentaram MDA e MDMA, quando submetida ao método CLAE/UV.

Tabela 12 – Identificação ou quantificação de MDA, MDMA, MDEA, anfetamina e metanfetamina em amostras de urina cedidas pelo Instituto Médico Legal de Minas Gerais, analisadas por CLAE/UV.

Amostra	Derivados anfetamínicos ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>MDA</i>	<i>MDMA</i>	<i>MDEA</i>	<i>Anfetamina</i>	<i>Metanfet.</i>
19	abaixo do LQ	abaixo do LQ	-	-	-
22	-	-	-	+	-
26	0,06	0,76	-	-	-
27	1,95	acima de 2,0	-	-	-
28	1,05	acima de 2,0	-	-	-

(+) Presente (-) Ausente

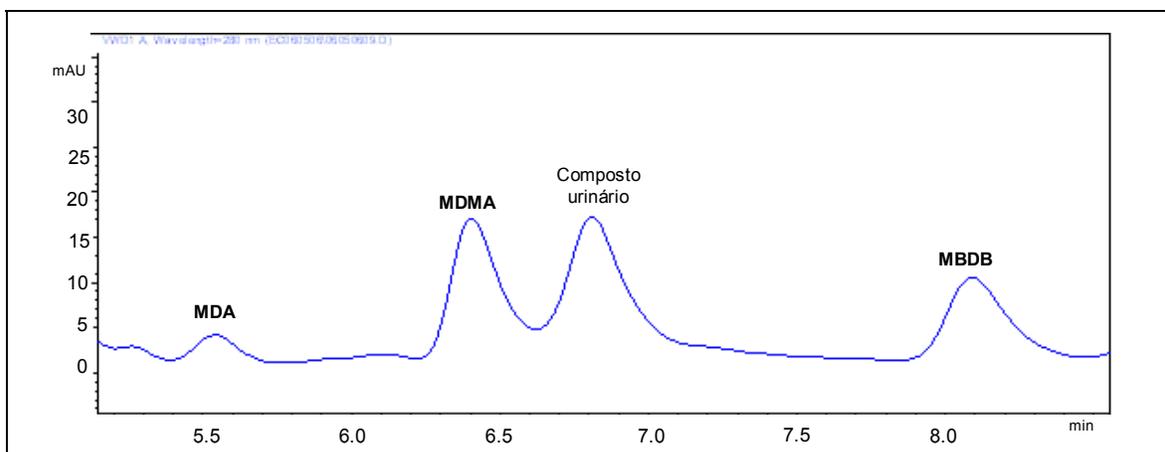


Figura 23 – Cromatograma obtido após a análise de urina de usuário de drogas, empregando-se o método CLAE/UV.

Os resultados da análise de cada um dos comprimidos apreendidos pela Polícia Civil de Minas Gerais, triados como contendo derivados anfetamínicos, e submetidos ao método CG/DIC validado, são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Teores de MDMA, MDA e MDEA encontrados nos comprimidos apreendidos pela Polícia Civil de Minas Gerais e analisados por CG/DIC.

Comprimido	MDMA (mg)	MDA (mg)	MDEA (mg)
01	218,3	3,3	1,5
02	49,1	Abaixo LD	Abaixo LD
03	53,3	Abaixo LD	Abaixo LD
04	50,0	Abaixo LD	Abaixo LD

(LD) Limite de Detecção

A Figura 24 mostra o aspecto físico de um dos comprimidos analisados e a Figura 25 apresenta o cromatograma obtido após a análise de um desses comprimidos (comprimido nº 1), submetidos ao método CG/DIC, validado no presente trabalho.



Figura 24 – Fotografia de um dos comprimidos de *ecstasy* (MDMA) apreendido pela Polícia Civil de Minas Gerais.

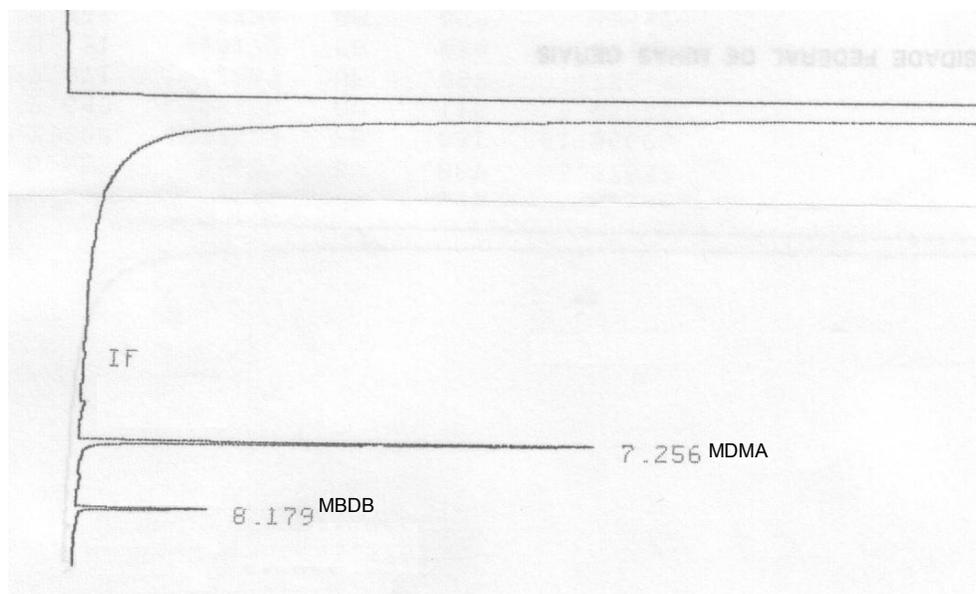


Figura 25 – Cromatograma obtido após a análise de extrato metanólico, diluído à metade, de um dos comprimidos, de *ecstasy* apreendido pela Polícia Civil de Minas Gerais, empregando-se o método CG/DIC.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram validados dois métodos para a identificação de *ecstasy* e outros derivados anfetamínicos utilizando-se equipamentos de baixo custo operacional, disponíveis em boa parte dos laboratórios forense de países em desenvolvimento como o Brasil. A opção de validar dois métodos cromatográficos em separado, um para análise de comprimidos apreendidos e outro para a avaliação de amostras de urina de usuários da droga, baseou-se na possibilidade de contemplar tanto os laboratórios de criminalística das Polícias Civil e Federal que, normalmente, não utilizam amostras biológicas, quanto os laboratórios dos Institutos Médicos Legais que analisam, geralmente, as amostras de urina dos indivíduos usuários de drogas.

Apesar dos derivados anfetamínicos serem de uso proibido e apresentarem efeitos bastante similares, a identificação correta da substância presente, e não apenas de sua classe, é de extrema importância, por exemplo, para uma análise epidemiológica do consumo de cada uma dessas drogas.

É importante lembrar que o consumo de *ecstasy* se caracteriza, geralmente, pela ingestão de outras substâncias ativas além do MDMA, presentes ou não nos comprimidos ingeridos e, por isso, especial atenção foi dada no sentido de validar um método capaz de identificar e quantificar, outros compostos psicoativos como o MDA, metabólito ativo do MDMA e o MDEA, principal princípio ativo da droga *Eve*. A possibilidade de identificar precisamente a droga utilizada quando se utiliza amostras de urina, entretanto, é praticamente inviável, uma vez que o MDMA e MDA são também metabólitos do MDEA.

A escolha da urina como amostra biológica a ser utilizada nesse trabalho foi justificada por algumas vantagens, citadas anteriormente, que ela oferece sobre outras possíveis amostras biológicas, como sangue e saliva, por exemplo.

Diversas características particulares dos derivados anfetamínicos levaram a uma certa dificuldade na obtenção de uma condição de resolução ideal, nas condições analíticas adotadas no presente trabalho, dificultando a identificação e a quantificação dos analitos de interesse, principalmente quando se empregou o método de cromatografia líquida de alta eficiência. Essas características estão relacionadas com a grande similaridade estrutural existente entre esses compostos. Várias tentativas foram feitas, no presente trabalho, no sentido de se obter uma condição analítica ideal sem a necessidade da etapa de derivação química utilizada. Os analitos de interesse foram inicialmente extraídos por SPE, tanto sob condições ácidas, como as propostas por HERNANDEZ et al. (2001), como básicas, conforme empregado por LEGUA et al. (1995) e FALCÓ et al. (1996). As extrações líquido-líquido como as utilizadas por COSTA & CHASIN (2004) e SADEGUIPOUR & VEUTHEY (1997), também foram testadas, no entanto, os melhores resultados foram obtidos pela extração em fase sólida em meio básico. Mesmo assim, a injeção desses extratos, concentrados sob vazão de nitrogênio e retomados com metanol, revelou uma separação cromatográfica inadequada, com o MDMA, MDA e o padrão interno (MBDB) sendo eluídos junto a outros componentes presentes na urina. A adição de tampão, par iônico e redução do pH na fase móvel como proposto por inúmeros autores (AL-DIRBASHI et al., 2001; ANDRÉS et al., 2004; BRUNNENBERG et al., 1998; COSTA & CHASIN, 2004; HERNANDEZ & FALCÓ, 1999; SADEGHIPOUR & VEUTHEY, 1997;

SOARES et al., 2004) não ofereceram vantagens significativas na resolução cromatográfica. Diversos artigos citam a utilização de uma fase móvel em gradiente (FALCÓ et al, 1996, 1997; HERNANDEZ et al., 2001; LEGUA et al., 1995; PISTERNICK et al., 1997; SOARES et al., 2001, 2004), entretanto, pela inexistência de bombas binárias, ternárias ou quartenárias no equipamento utilizado, somente corridas isocráticas foram testadas.

Assim, a resolução cromatográfica inadequada e, além disso, a restrita absorção desses compostos frente a uma fonte de ultravioleta, especialmente em pequenas concentrações como as esperadas nas amostras de urina, tornou indispensável o emprego de uma etapa de derivação química. Essa etapa, ao reduzir a polaridade dos analitos de interesse, permitiu que os compostos derivados fossem eluídos com um tempo de retenção maior e, portanto, separados dos interferentes urinários presentes. Outra vantagem da etapa de derivação foi a capacidade que o novo composto apresentou, de absorver com maior intensidade em comprimento de onda de 280 nm, faixa espectrofotométrica caracterizada por uma menor interferência dos compostos urinários.

É frequentemente relatada na literatura, a adição de uma solução ácida quando o extrato anfetamínico é concentrado por evaporação, antes da injeção cromatográfica ou de um processo de derivação, com o intuito de evitar ou minimizar a perda dos compostos de interesse (BRUNNENBERG et al., 1998; COSTA & CHASIN, 2004; LEGUA et al., 1995; SADEGHIPOUR & VEUTHEY, 1997; TALWAR et al., 1999). No presente trabalho essa estratégia foi inadequada uma vez que a adição ácida reduziu a eficiência da etapa de derivação que, como mencionada anteriormente ocorreu em meio básico.

Foram testadas várias condições para a realização da derivação uma vez que variações no tempo de reação, temperatura, pH e concentração do agente derivante são fatores importantes no controle do processo de derivação. Sabe-se que as amins secundárias necessitam de maiores tempos de reação (em torno de 20 minutos) do que amins primárias (10 minutos), as reações desenvolvidas em temperatura ambiente apresentam resultados semelhantes às ocorridas sob aquecimento (70°C), mas as realizadas em condições básicas (pH 9,0 ou 10,0) são mais eficientes do que as desenvolvidas em condições ácidas. A concentração do agente derivante é, também, fator importante na eficiência da reação, sendo que as concentrações maiores (2%) produzem melhores resultados quando comparados às proporções menores (0,5%) (FALCÓ et al., 1996, 1995; HERNANDEZ et al., 1996; LEGUA et al., 1995; TALWAR et al., 1999).

A injeção direta do composto derivado na coluna cromatográfica não foi indicada, pois a literatura relata uma redução na vida útil da coluna frente a elevadas concentrações do agente derivante selecionado (NQS) (FALCÓ et al., 1996; HERNANDEZ et al., 1996). Desse modo, tornou-se indispensável a realização de uma etapa de extração líquido-líquido do composto derivado, sendo descrita a utilização de n-hexano : acetato de etila (50:50) (HERNANDEZ et al., 1996; LEGUA et al., 1995).

Diversas alterações foram realizadas no método de extração e derivação proposta por LEGUA et al., 1995. A primeira modificação foi a adaptação do método para a determinação dos analitos de interesse, seguindo-se variações no tipo de tampão e volume de diversos eluentes utilizados na extração em fase

sólida, além da concentração e tempo de reação do reagente derivante, dentre outras.

Ajustes finos na vazão e proporção da fase móvel foram realizados até a obtenção de uma separação adequada de todos os picos de interesse e dos principais interferentes presentes na urina. O volume de injeção também foi otimizado, evitando-se utilizar volumes excessivos, que poderiam causar alargamento das bandas dos picos cromatográficos, ou volumes muito pequenos que reduziriam a sensibilidade do método. A temperatura da coluna também foi modificada, sem melhora na resolução, o que era esperado, pois esse parâmetro é mais efetivo para compostos iônicos, o que não era o caso.

A escolha do método cromatográfico em fase gasosa, com detecção por ionização de chama, para a análise de comprimidos de *ecstasy* foi fundamentada, inicialmente, na simplicidade da extração exigida e na elevada concentração dos compostos de interesse normalmente encontrada nos comprimidos. Esse método, que utiliza um detector com sensibilidade insuficiente para detectar níveis de *ecstasy* esperados nas amostras de urina de usuários (*cut off* de 200 ng/mL segundo COSTA & CHASIN, 2004; TALWAR et al., 1999) é adequado para a identificação e quantificação dos compostos presentes nos comprimidos, que apresentam-se, via de regra, na faixa de miligramas ou microgramas (McAVOY et al., 1999; MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005).

Foram testadas várias condições cromatográficas procurando encontrar aquelas mais adequadas para a determinação de MDMA, MDA, MDEA e MBDB (padrão interno). Modificações na programação da temperatura do forno da coluna, na vazão da fase móvel, na taxa de divisão da injeção (*split*) e no volume

de injeção foram testadas assim como diversos parâmetros do integrador, buscando sempre um máximo da relação sinal/ruído.

A extração dos analitos presentes nos comprimidos foi realizada de forma extremamente simples e rápida, sem exigir o uso de instrumentos ou reagentes dispendiosos, propiciando, praticamente, a obtenção total dos compostos de interesse. Essa constatação está de acordo com o descrito na literatura por MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI (2005). Esse método difere do proposto pelos autores em relação à quantidade de comprimido e solvente (metanol) utilizado, uma vez que no presente trabalho foi empregado proporções cinco vezes menores.

Considerando que os comprimidos de *ecstasy* apresentam várias outras substâncias além do MDMA, que poderiam interferir na adequada identificação da substância, foi decidido trabalhar com o auxílio de um padrão interno. É sabido que a utilização de um padrão interno confere uma maior garantia de reprodutibilidade ao método, já que minimiza as variações que podem ocorrer em diversas etapas, desde a extração quanto a oscilações do próprio equipamento (detector, coluna, bomba ou vazão dos gases). Assim, a identificação dos compostos por meio do tempo de retenção relativo ao padrão interno, garante maior confiabilidade à análise qualitativa, enquanto a quantificação por meio da relação de áreas dos picos cromatográficos obtidos após a análise do analito e do padrão interno assegura uma maior qualidade dos resultados.

Uma característica importante do padrão interno é sua semelhança, estrutural e físico-química, com o analito de interesse. A MBDB classificada como *designer drug*, apresenta características físico-químicas semelhantes à MDMA e

MDA, mas é raramente encontrada em comprimidos de *ecstasy*, o que tornou o seu uso como padrão interno nos métodos validados bastante apropriado. Segundo COSTA & CHASIN (2004), essa substância ainda não foi encontrada em comprimidos no Brasil.

A resolução (R_s) avalia a qualidade de separação entre dois picos adjacentes, sendo apropriada um valor acima de dois (SNYDER et al., 1997). Tanto o método por CLAE como o por CG apresentam valores de resolução acima desse limite em um tempo de retenção aceitável, sugerindo uma confiança na identificação dos analitos de interesse. Esse fato é confirmado pelos valores também coerentes do fator de separação (α).

Segundo SNYDER et al. (1997), o fator de retenção (K) de cada analito pesquisado deve apresentar valores entre 0,5 e 20, evitando assim problemas na separação das substâncias pesquisadas, como interferência de impurezas ou distúrbios da linha de base ($K < 0,5$) ou alargamento excessivo do último pico e maiores tempos de retenção ($K > 20$). Esse autor afirma ainda, que o valor preferencial de K deve estar entre 1,0 e 10, o que foi observado para os compostos de interesse, nos dois métodos estudados.

A eficiência da coluna cromatográfica pode ser descrita em função do número de pratos teóricos (N), onde quanto maior esses valores, mais separados estarão os picos presentes no cromatograma. Valores acima de 5000 são aceitos como apropriados para cromatografia líquida de alta eficiência (MEYER, 1994; RIBANI et al., 2004; SNYDER et al., 1997) e superiores a 50000 na cromatografia gasosa (MEYER, 1994). Os dois métodos validados no presente trabalho apresentaram valores de N bem acima do limite estabelecido.

Todos os dados obtidos no presente trabalho atestam, portanto, uma adequada separação das substâncias analisadas tanto por CLAE quanto por CG.

Outro parâmetro analítico essencial, especialmente em se tratando de análise forense é a seletividade ou especificidade do método, pois a identificação errônea (falso positivo ou falso negativo) de uma substância ilícita pode levar a enormes prejuízos tanto aos indivíduos suspeitos de comercializar ou utilizar essas substâncias como ao Estado. Os resultados dos testes de seletividade realizados (item 5.2.1) indicaram que as duas matrizes utilizadas não apresentaram qualquer tipo de interferência com a identificação dos analitos de interesse. A adequada seletividade dos métodos foi confirmada frente às diversas substâncias testadas como possíveis interferentes, sejam esses outros derivados anfetamínicos ilícitos (anfetamina, metanfetamina) ou legais de uso proscrito (femproporex e anfepramona). As eventuais interferências do ácido hipúrico, que pode ser formado na biotransformação da anfetamina e excretado pela urina e de diversos estimulantes, como efedrina e derivados, cafeína e epinefrina, assim como de adulterantes e associações (barbitúricos, paracetamol ácido acetilsalicílico) e de drogas não anfetamínicas com similaridade de efeitos (cocaína) também foram pesquisados e não se confirmaram. A escolha das substâncias pesquisadas como possíveis interferentes foram feitas após consulta a diversos artigos publicados na literatura (COSTA & CHASIN, 2004; MAURER et al., 2000; PARROT, 2004, 2005; RODRIGUES, 2005; SADEGHIPOUR et al., 1997b; SADEGHIPOUR & VEUTHEY, 1997; SOARES et al., 2004).

A faixa de linearidade estudada para os dois métodos apresentou uma baixa dispersão dos conjuntos de pontos experimentais, sugerindo resultados

diretamente proporcionais às concentrações dos analitos pesquisados. Tal fato é justificado pela proximidade da unidade do coeficiente de determinação (R^2), sendo sempre superior a 0,99 tanto para o método CLAE/UV como para CG/DIC. As faixas de linearidade apresentam-se adequadas às concentrações urinárias esperadas após a administração dessas drogas conforme citado na literatura especializada (COLE & SUMNALL, 2003a; FALCÓ et al., 1995, 1996; HERNANDEZ et al., 1996; KALANT, 2001; LEGUA et al., 1995; MAS et al., 1999; TALWAR et al., 1999) e àquelas presentes na maioria dos comprimidos apreendidos (BURGESS et al., 2000; MAYFRANK & DAWMANN, 2006b; McAVOY et al., 1999; MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005; PARROTT, 2004).

Algumas faixas lineares descritas para as análises de anfetamina e metanfetamina, após derivação com NQS e análise por CLAE/UV em coluna de fase reversa e eluição em gradiente, apresentaram um limite superior de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ (HERNANDEZ et al., 1996; LEGUA et al., 1995). No presente trabalho optou-se em adotar como limite superior da faixa de linearidade a ser estudada, um valor de 2,0 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que amostras com valores superiores poderiam ser diluídas e perfeitamente quantificadas.

Outras faixas de linearidade encontradas na literatura foram as citadas por FALCÓ et al. em 1995 (0,47 a 9,42 $\mu\text{g/mL}$ para anfetamina e metanfetamina) e TALWAR et al. em 1999 (0,25 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$ para anfetamina, MDMA, MDA e MDEA), ambos trabalhando com coluna de fase normal e derivação com NQS. Já em 1996, FALCÓ et al. analisaram anfetamina e metanfetamina em coluna de fase reversa e eluição em gradiente, após derivação associada à etapa de extração em

SPE, encontrando uma faixa de 0,9 a 9,5 µg/mL para anfetamina e 3,0 a 30 µg/mL para metanfetamina.

Em relação ao método CG/DIC, a faixa de resposta linear encontrada para MDMA, MDA e MDEA (1,0 a 500,0 µg/mL) apresentou-se bem mais ampla do que aquelas citadas na literatura para as três substâncias (30,0 a 500,0 µg/mL por McAVOY et al. (1999) e 0,6 a 160,0 µg/mL por MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI (2005)).

Várias referências bibliográficas foram consultadas no sentido de obter-se a maneira mais adequada para se estabelecer os limites de detecção e quantificação dos dois métodos validados. Ao final, foi decidido adotar a maneira relatada por CHASIN et al. (1998) de definir um sinal eletrônico como sendo aquele, efetivamente, gerado pela menor concentração dos compostos de interesse, após serem submetidos aos métodos analíticos selecionados. O sinal definido como sendo gerado pelo LD foi aquele que apresentou variação máxima de 25%. A escolha de uma variação bem superior à precisão analítica dos métodos cromatográficos validados foi justificada pelo objetivo primordial das análises de drogas, qual seja, detectar a presença das mesmas, mesmo quando essas não podem ser quantificadas.

Não foi possível comparar os resultados de LD encontrados no método CLAE/UV com os dados da literatura, uma vez que a maioria destes valores foi obtida para anfetamina e metanfetamina e em condições cromatográficas distintas das utilizadas no presente trabalho.

LEGUA et al. (1995) obtiveram LD de 0,004 µg/mL para anfetamina e 0,002 µg/mL para metanfetamina, HERNANDEZ et al. (1996) relataram um LD de 0,025

$\mu\text{g/mL}$ para anfetamina e $0,05 \mu\text{g/mL}$ para metanfetamina e FALCÓ et al. (1996), um limite de $0,1 \mu\text{g/mL}$ para anfetamina e $0,4 \mu\text{g/mL}$ para metanfetamina.

TALWAR et al. (1999) determinaram um LD para MDMA e MDA igual a $0,075 \mu\text{g/mL}$, trabalhando com coluna cromatográfica de fase normal.

Empregando-se a CG/DIC, MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI (2005) relatam LDs de $0,5 \mu\text{g/mL}$ para a MDMA, $1,0 \mu\text{g/mL}$ para MDA e $0,5 \mu\text{g/mL}$ para MDEA. Os resultados encontrados pelo método CG/DIC validado, encontram-se próximos àqueles relatados na literatura consultada (MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005).

Esses dados de LD demonstram que o método CLAE/UV padronizado é passível de ser empregada como técnicas de confirmação da presença de MDMA e outros derivados anfetamínicos em urina de usuários uma vez que segundo COSTA & CHASIN (2004) e TALWAR et al. (1999), espera-se um *cut off* de 200 ng/mL nesse tipo de amostra biológica de indivíduos que fizeram uso, recreacional ou não, dessas substâncias ilícitas. O mesmo pode ser dito para o método GC/DIC, em relação aos comprimidos, posto que segundo MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI (2005) e McAVOY et al. (1999), uma sensibilidade analítica capaz de detectar traços (microgramas) da substância, é suficiente para uma adequada análise desses comprimidos.

Como especificado anteriormente, os valores de LQ também não puderam ser comparados com a literatura. LEGUA et al. (1995) e HERNANDEZ et al. (1996), por exemplo, analisando anfetamina e metanfetamina encontraram LD de $0,3 \mu\text{g/mL}$ e $0,4 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, utilizando cromatografia líquida e detecção de ultravioleta em eluição em gradiente. TALWAR et al. (1999) encontraram limites de quantificação na análise de MDMA ($0,145 \mu\text{g/mL}$), MDA

(0,115 $\mu\text{g/mL}$) próximos aos obtidos nesse estudo, mesmo tendo os autores trabalhado com coluna cromatográfica de fase normal. Esses dados podem indicar certa equivalência entre esses dois tipos de coluna. COSTA (2004) encontrou limites de quantificação de 0,02 $\mu\text{g/mL}$ para MDMA e 0,015 $\mu\text{g/mL}$ para MDA utilizando detector de fluorescência, que segundo a literatura, é mais sensível para a identificação de derivados anfetamínicos que o detector de ultravioleta.

É importante destacar, portanto, a significativa vantagem do método CLAE/UV proposto ao identificar e quantificar MDMA e MDA, assim como a identificar anfetamina, metanfetamina e MDEA, utilizando-se coluna de fase reversa e eluição isocrática, condições cromatográficas de menores custos.

Em relação ao LQ estabelecido para métodos que utilizam CG, foram relatados valores de 1,2 $\mu\text{g/mL}$ para MDMA e MDE e de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ para MDA (MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005) e de 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (McAVOY et al., 1999), ou seja, limites superiores aos encontrados no presente trabalho (1,0 $\mu\text{g/mL}$ para MDMA, MDA e MDEA), mostrando uma maior sensibilidade do método proposto.

A precisão de ambos os métodos foi avaliada a partir do coeficiente de variação das áreas relativas, seja em condições iguais (intraensaio) ou alterando-se alguma condição inicial, como o período de tempo entre as análises (interensaio). Limites de 20% (COSTA & CHASIN, 2004) para CLAE ou 10% (MITREVSKI & ZDRAVKOVSKI, 2005) para CG foram estipulados e perfeitamente obtidos, sendo assim aceitos como valores adequados às análises forenses. A aceitação de coeficientes de variação mais elevados no método CLAE/UV, é justificável pela a presença de baixas concentrações dos analitos normalmente

encontradas nas amostras urinárias dos usuários (CHASIN et al., 1994, 1998; RIBANI et al., 2004) e condizentes com os objetivos do presente trabalho.

Como esperado, valores menores de CV foram obtidos para a caracterização dos derivados anfetamínicos presentes em comprimidos, fato claramente justificado pela considerável maior quantidade das substâncias encontradas nesse material.

Pequenas modificações nos parâmetros estabelecidos em cada método foram realizadas, sendo que nenhuma das citadas foi capaz de alterar significativamente a identificação ou quantificação dos analitos. Variações nas proporções do solvente orgânico, na vazão da fase móvel ou no controle da temperatura da coluna/forno não alteraram a qualidade dos resultados, sugerindo uma robustez adequada dos dois métodos, característica indispensável para o controle da precisão analítica.

A eficiência da extração foi determinada de acordo o proposto por CHASIN et al. (1994), comparando-se os valores das áreas dos picos obtidos pela injeção de *pools* de urina enriquecidos antes e após a extração em fase sólida. É desejado que valores de recuperação sejam sempre próximos de 100%, indicando mínimas perdas durante o tratamento das amostras. Entretanto, porcentagens de recuperação variáveis entre 70 a 120%, são aceitas quando se trabalha com matrizes mais complexas, métodos com várias etapas analíticas, baixas concentrações do analito na matriz biológica e, principalmente, quando as demais figuras de mérito não são comprometidas (RIBANI et al., 2004). Assim, a validação por cromatografia líquida apresenta recuperação satisfatória (sempre acima de 80%), o que pode ser comprovado pela concordância dos valores com outros

trabalhos (FALCÓ et al., 1995; 1996; LEGUA et al., 1995; TALWAR et al., 1999). Esse parâmetro não foi avaliado por cromatografia gasosa devido a ausência de uma etapa de extração que poderia ser fonte de perda dos analitos de interesse. Outro ponto que determinou a não realização do estudo de recuperação na análise de comprimidos foram as elevadas concentrações encontradas nos comprimidos o que exigiria a elaboração de soluções padrões de elevadas concentrações o que foi inviável em função da dificuldade encontrada na importação dos padrões.

É desejado que uma amostra apresente resultados confiáveis e reproduzíveis por certo período de tempo, sob determinadas condições, ou seja, é desejável que a estabilidade química dos analitos seja suficiente para que o armazenamento das amostras possa ser feito com segurança, especialmente em toxicologia forense, onde a realização de contra-provas são frequentes. Segundo COSTA & CHASIN (2004), uma variação de até 20% no resultado analítico é aceitável para cada substância de interesse. O presente trabalho avaliou a estabilidade dos analitos de interesse adicionados em amostras de urina sob ciclos de congelamento (-18 °C) e descongelamento (temperatura ambiente), durante 27 dias. Os resultados encontrados mantiveram-se dentro da variação estabelecida como adequada (20%).

A aplicação da metodologia proposta para identificação de MDMA e MDA em amostras de urina por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta indica uma adequada capacidade em identificar usuários tanto de *ecstasy* (MDMA) como de *eve* (MDEA) ou de *love pill* (MDA). Segundo SOARES et al. (2004), MDMA e MDA estão presentes na urina em uma ampla faixa de

concentração, variando de algumas centenas a milhares de nanogramas por mililitros, sendo essa faixa coberta pelo método validado. Os resultados encontrados no presente trabalho, ao analisar as alíquotas de urina cedidas pelo IML confirmam essa afirmativa. Todos os resultados encontrados nas amostras de urina analisadas foram concordantes com os dos laudos prévios do IML. Na amostra enviada sob o número 19 inclusive, a presença de MDMA/MDA foi detectada, embora as técnicas de triagem e confirmação empregadas pelo IML não tenham tido sensibilidade capaz de detectá-la. É importante destacar os resultados encontrados nas amostras identificadas com os números 27 e 28. A concentração de MDMA presente nas mesmas foi superior ao valor máximo estabelecido nas curvas de linearidade e analítica do presente trabalho. Considerando que uma diluição com fase móvel (2 vezes) foi insuficiente para incluir a concentração de MDMA nas faixas úteis dessas curvas, optou-se em manter para as duas alíquotas, na Tabela 12, o valor “acima de 2,0 µg/mL” ou seja, acima do valor máximo estabelecido na curva analítica do presente trabalho.

A aplicação da metodologia validada para identificação de *ecstasy* e outros derivados anfetamínicos em comprimidos apreendidos nas ruas pela Polícia Civil de Minas Gerais, utilizando-se a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, apresentou-se amplamente adequada aos objetivos propostos. A obtenção de picos semelhantes aos padrões, cromatogramas limpos e a pré-análise por espectrometria de massas endossam a qualidade do método desenvolvido. O método possibilitou a obtenção de uma curva analítica com uma ampla faixa linear, capaz de detectar com precisão tanto concentrações traços

(MDA e MDEA no comprimido 01) quanto concentrações mais elevadas do que aquelas rotineiramente encontradas nesses comprimidos de rua.

Os valores de MDMA encontrados nos comprimidos analisados foram em torno de 50,0 mg, quantidade semelhante às encontradas em comprimidos analisados em outros estudos (BURGESS et al., 2000; MAYFRANK & DAWMANN, 2006b; PARROTT, 2004). Exceção foi encontrada em relação ao comprimido número 01 que apresentou um valor extremamente elevado e inesperado de MDMA. Na análise desse comprimido, pode ser confirmada a adequação do método cromatográfico validado uma vez que, após diluição (2 vezes) do extrato com metanol, a quantificação do MDMA foi perfeitamente possível.

Ressalta-se, portanto, a importância da identificação da presença desses derivados anfetamínicos tanto em amostras biológicas (indicadoras de uso), quanto em comprimidos (indicadoras de comércio ilegal), auxiliando de forma única o trabalho da polícia na identificação de usuários de drogas, no esclarecimento de óbitos e no combate ao narcotráfico. É importante ressaltar novamente, a presença de diversas outras substâncias nos comprimidos traficados como *ecstasy*, além da grande variação na quantidade dos derivados anfetamínicos presentes nos mesmos. Esses comprimidos são produzidos de maneira pouco controlada, possibilitando a ocorrência de inúmeras interações e consequentemente, o aparecimento de efeitos imprevisíveis, tanto do ponto de vista biológico quanto analítico.

7 CONCLUSÕES

Após a realização do presente trabalho pode-se concluir:

- Tanto o método validado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV, quanto por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, apresentaram parâmetros de desempenho condizentes aos objetivos do trabalho.

- A MDMA e MDA apresentaram estabilidade química em alíquotas enriquecidas, o que indica a possibilidade do uso de amostras urinárias em eventuais exames de contra-prova exigidos em análises forenses como as mencionadas no presente trabalho.

- Os níveis de MDMA em alíquotas de urina dos usuários variou de traços (abaixo LQ) a valores superiores a 2,0 µg/mL (acima da limite superior da faixa linear do método).

- Os valores de MDA em alíquotas de urina dos usuários variou de traços (abaixo LQ) a 1,95 µg/mL.

- A determinação de drogas nas alíquotas de urina de usuários, analisadas sem prévio conhecimento do laudo médico-legal, foi completamente concordante com os resultados expressos nos mencionados laudos.

- Os teores de MDMA em comprimidos apreendidos variaram de 49,3 a 218,3 mg/comprimido.

- Os baixos custos operacionais e a possibilidade de ser realizado na maioria dos laboratórios forenses de médio porte de países em desenvolvimento

como o Brasil, justificam a etapa de derivação exigida para a análise dos analitos em urina, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta.

- Os dois métodos validados podem ser utilizados como métodos confirmatórios em laboratórios forenses, integrando laudo toxicológico, na ausência do detector de massas acoplado aos aparelhos cromatográficos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DIRBASHI, O.; KURODA, N. MENICHINI, F.; NODA, S.; MINEMOTO, M.; NAKASHIMA, K. Enantioselective high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of methamphetamine and its metabolites in human urine. **Analyst**, v.123, p.2333-7, 1998.

AL-DIRBASHI, O.; WADA, M.Sc.; KURODA, N.; INDUKA, S.; NAKASHIMA, K. Enantiomer-specific high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of methamphetamines in abusers hair and urine. **Biomedical Chromatography**, v.13, p.543-7, 1999.

AL-DIRBASHI, O.; WADA, M.Sc.; KURODA, N.; TAKAHASHI, M.; NAKASHIMA, K. Achiral and chiral quantification of methamphetamine and amphetamine in human urine by semi-micro column high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Forensic Sciences**, v.45 (3), p.708-14, 2000.

AL-DIRBASHI, O. Y.; IKEDA, K.; TAKAHASHI, M.; KURODA, N.; IKEDA, S.; NAKASHIMA, K. Drugs of abuse in a non-conventional sample; detection of methamphetamine and its main metabolite, amphetamine in abusers' clothes by HPLC with UV and fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, v.15 (7), p.457-63, 2001.

ANDRÉS, V. J.; FALCÓ, P. C.; HERNANDEZ, R. H. Enantioselective analysis of amphetamine-related designer drugs in body fluids using liquid chromatography and solid-phase derivatization. **Chromatographia**, v.60 (9-10), p.537-44, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries Temáticas: Laboratório-guia para qualidade em química analítica. Uma assistência a acreditação 2004. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acessado em : jul. 2006.

BATTU, C., MARQUET, P., FAUCONNET, A. L., LACASSIE, E., LACHATRE, G. Screening procedure for 21 amphetamine-related compounds in urine using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatography Science**, v.36 (1), p.1-7, 1998.

BJERGAARD, S. P.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B**, v.817, p.3-12, 2005

BOONE, C. M.; WATERVAL, J. C. M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W. J. M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs—a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.20, p. 831-63, 1999.

BRUNNENBERG, M.; LINDENBLATT, H.; MAYFRANK, E. M.; KOVAR, K. A. Quantification of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v.719, p.79-85, 1998.

BUCHERT, R.; THOMASIU, R.; PETERSEN, K.; WILKE, F.; OBROCKI, J.; NEBELING, B.; WARTBERG, L.; ZAPLETALOVA, P.; CLAUSEN, M. Reversibility of ecstasy-induced reduction in serotonin transporter availability in polydrug ecstasy users. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v.33, p. 188-99, 2006.

BURGESS, C.; O'DONOHUE, A.; GILL, M. Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity. **European Psychiatry**, v.15, p. 287-94, 2000.

CAPELA J. P.; MEISEL, A. ABREU, A. R.; BRANCO, P. S.; FERREIRA, L. M.; LOBO, A. M.; BASTOS, M. L. CARVALHO, F. Neurotoxicity of Ecstasy Metabolites in Rat Cortical Neurons, and Influence of Hyperthermia. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.316 (1), 53-61, 2006.

CARUSO, M.; JESUS, D. A nova era do ecstasy. **Revista Isto É**, São Paulo, 20 abril 2005. Caderno Comportamento, nº1853, p 62-5.

CENTINI, F., MASTI, A., COMPARINI, I. B. Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by head-space/solid phase micro-extraction (SPME) and GC/MS. **Forensic Science International**, v.83, p.161-6, 1996.

CHASIN, A.M.; CHASIN, M.; SALVADOR, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.30 (2), p.49-53, 1994.

CHASIN, A.M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L. M. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADOR, M. C.; FERNÍCOLA, N. A.G.; GORNI, R.;

SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas : uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11 (1), p.1-6, 1998.

COLE, J. C.; SUMNALL, H. R. The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.27, p.199–217, 2003a.

COLE & SUMNALL. Altered states: the clinical effects of Ecstasy. **Pharmacology & Therapeutics**, v.98, p.35– 58, 2003b.

CONCHEIRO, M.; CASTRO, A.; QUINTELA, O.; RIVADULLA, M.L.; CRUZ, A. Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection. **Forensic Science International**, v.150, 221-6, 2005.

COPELAND, J.; DILLON, P.; GASCOIGNE, M. Ecstasy and the concomitant use of pharmaceuticals. **Addictive Behaviors**, v.31, p. 367-70, 2006.

COSTA, J.L. **Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - Ecstasy), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA - Eve) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência: aspecto forense.** 2004. 121f. (Dissertação para obtenção de grau de Mestre) - Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas. São Paulo, 2004.

COSTA, J. L.; CHASIN, A. A.M. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v.811, p.41-5, 2004.

CURRAN, H. V.; ROBJANT, K. Eating attitudes, weight concerns and beliefs about drug effects in women who use ecstasy. **Journal of Psychopharmacology**, v.20 (3), p.425-31, 2006.

De la TORRE, R.; FARRÉ, M.; ORTUNO, J.; BRENNEISEN, R.; ROSET, P.N.; SEGURA, J.; CAMI, J. Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. **Journal Clinical Pharmacological**, v.49, p.104-9, 2000.

De WIN, M.L.; CCHILT, T.; RENEMAN, L.; VERVAEKE, H.; JAGER, G.; DIJKINK, S.; BOOIJ, S.; BRINK, W. Ecstasy use and self-reported depression, impulsivity, and sensation seeking: a prospective cohort study. **Journal of Psychopharmacology**, 20(2), p.226-35, 2006.

DEGENHARDT, L.; DILLON, P.; DUFF, C.; ROSS, J. Driving, drug use behaviour and risk perceptions of nightclub attendees in Victoria, Australia. **International Journal of Drug Policy**, v.17, p. 41-6, 2006.

ENSSLIN, H.; KOVAR, K. A.; MAURER, H. H. Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, "Eve") and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. **Journal of Chromatography B**, v.683, p.189-97, 1996.

FALCÓ, P.; LEGUA, C. M.; HERNANDEZ, R. H.; CABEZA, A. S.; Improved amphetamine and methamphetamine determination in urine by normal-phase high performance with sodium 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate as derivatizing agent and solid-phase extraction for sample clean-up. **Journal of Chromatography B**, v.663, p.235-45, 1995.

FALCÓ, P. C.; CABEZA, A. S.; LEGUA, C. M.; KOHLMANN, M.; Amphetamine and methamphetamine determination in urine by reversed-phase high performance liquid chromatography with simultaneous sample clean-up and derivatization with 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate on solid-phase cartridges. **Journal of Chromatography B**, v.687, p.239-46, 1996.

FALCÓ, P.C.; HERNANDEZ, R. H.; CABEZA, A.D.; TRUMPLER, I. Derivatization of amines in solid-phase extraction supports with 9-fluorenylmethyl chloroformate for liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.344, p.125-36, 1997.

FLANAGAN, R. J.; MORGAN, P. E.; SPENCER, E. P.; WHELPTON, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v.20, p.530-38, 2006.

FREEDMAN, R. R.; JOHANSON, C. E., TANCER, M. E. Thermoregulatory effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. **Psychopharmacology**, v.183, p.248-56, 2005.

FUCCI, N., GIOVANNI, N., CHIAROTTI, M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. **Forensic Science International**, v.134, p.40-5, 2003.

FURNARI, C.; OTTAVIANO, V.; ROSATI, F.; et al. Identification of 3,4-methylenedioxyamphetamine analogs encountered in clandestine tablets. **Forensic Science International**, v.92 (1), p.49-58, 1998.

GENTILI, S., CORNETTA, M., MACCHIA, T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. **Journal of Chromatography B**, v.801, p.289-96, 2004.

GUZMAN, N. A.; PARK, S.; SCHAUFELBERGER, D.; HERNANDEZ, L.; PAEZ, X.; RADA, P.; TOMLINSON, A. J.; NAYLOR, S. New approaches in clinical chemistry: on-line analyte concentration and microreaction capillary electrophoresis for the determination of drugs, metabolic intermediates, and biopolymers in biological fluids. **Journal of Chromatography B**, v.697, p.37-66, 1997.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.856, p.3–54, 1999.

HERNANDEZ, R. H.; FALCÓ, P. C.; CABEZA, A. S. On line derivatization into precolumns for the determination of drugs by liquid chromatography and column switching : determination of amphetamines in urine. **Analytical Chemistry**, v.68, p.734-9, 1996.

HERNANDEZ, R. H.; FALCÓ, P. C.; ANDRÉS, J.V. Sensitive determination of methylenedioxyated amphetamines by liquid chromatography. **Analyst**, v.126, p.581-6, 2001.

HOSHI, R.; PRATT, H.; MEHTA, S. BOND, A. J.; CURRAN, H.V. An investigation into the sub-acute effects of ecstasy on aggressive interpretative bias and aggressive mood – are there gender differences? **Journal of Psychopharmacology**, v.20 (2), p.291–301, 2006.

HUANG, Z.; ZHANG, S. Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas

chromatography–mass spectrometry after immunoassay screening. **Journal of Chromatography B**, v.792, p.241-7, 2003.

IANNONE, M.; BULOTTA, S. PAOLINO, D.; ZITO, M. C.; GRATTERI, S.; COSTANZO, F. S.; ROTIROTI, D. Electrocortical effects of MDMA are potentiated by acoustic stimulation in rats. **BMC Neuroscience**, p.7-13, 2006.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**, 2003.

IUPAC, Harmonized guidelines for single laboratory validation of method of analysis, **Pure and Applied Chemistry**, 2002, v.74 (5), p.835-55, 2002.

KALANT, H. The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs. **Canadian Medical Association Journal**, v.165 (7), p.917-28, 2001.

KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.500-8, 2006.

KINTZ, P.; VILLAIN, M.; CIRIMELE, V. Hair Analysis for Drug Detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.28 (3), p.56-89, 2006.

KRAEMER, T.; MAURER, H. M. Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine. **Journal of Chromatography B**, v.713, p. 163-87, 1998.

KRONSTRAND R.; NYSTRO, I.; STRANDBERG, J.; DRUID, H. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC–MS–MS. **Forensic Science International**, v.145, p.183–90, 2004.

KUMAZAWA, T.; LEE, X. P.; SATO, K.; SUZUKI, O. Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. **Analytica Chimica Acta** , v.492, p.49–67, 2003.

LAMERS, C. T. J.; BECHARA, A.; RIZZO, M.; RAMAEKERS, J. G. Cognitive function and mood in MDMA/THC users, THC users and non-drug using controls. **Journal of Psychopharmacology**, v.20 (2), p.302-11, 2006.

LAPACHINSKE, S. F. **Quantificação de amostras de MDMA por cromatografia em fase gasosa (CG/NPD)**. 2004. 93f.(Dissertação para obtenção de grau de Mestre) - Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas. São Paulo, 2004.

LEGUA, C. M.; FALCÓ, P. C.; CABEZA, A. S. Amphetamine and methamphetamine determination in urine by reversed-phase high performance liquid chromatography with sodium 1,2-naphthoquinone 4-sulfonate as derivatizing agent and solid-phase extraction for sample clean-up. **Journal of Chromatography B**, v.672, p.81-8, 1995.

LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v.69 (19), p.3899-906, 1997.

LORD, H., PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v.902, p.17-63, 2000.

MAS, M.; FARRÉ, M.; De la TORRE, R.; ROSET, P.N.; ORTUÑO, J.; SEGURA, J.; CAMÍ, J. Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of MDMA in humans. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.290, p.136-45, 1999.

MAURER, H.H.; FRIEDRICH, J.B.; KRAEMER, T.; PETERS, F. T. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'). **Toxicology Letters**, v.112-113, p.133-42, 2000.

MAURER, H. H. Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.381, p.110-8, 2005.

MAYFRANK, E. G.; DAWMANN, J. Neurotoxicity of methylenedioxyamphetamines (MDMA; ecstasy) in humans: how strong is the evidence for persistent brain damage? **Addiction**, v.101, p.348-61, 2006a.

MAYFRANK E. G.; DAWMANN, J. The confounding problem of polydrug use in recreational ecstasy/MDMA users: a brief overview. *Journal of Psychopharmacology*, v.20 (2), p.188-93, 2006b.

McAVOY, Y.; COLE, M. D.; GUENIAT, O. Analysis of amphetamines by supercritical fluid chromatography, high-performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary zone electrophoresis; a preliminary comparison. *Forensic Science International*, v.102 (1), p.13-22, 1999.

McNAMARA, R.; KERANS, A.; O'NEILL, B.; HARKIN, A. Caffeine promotes hyperthermia and serotonergic loss following co-administration of the substituted amphetamines, MDMA ("Ecstasy") and MDA ("Love"). *Neuropharmacology*, v.50, p.69-80, 2006.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons, 1994. 376p.

MILLS, G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*, v.902, p..267–87, 2000.

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

MIŠL'ANOVÁ, C.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.797, p.91–109, 2003.

MOELLER, M. R.; STEINMEYER, S.; KRAEMER, T. Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B*, v.713, p.91–109, 1998.

MOELLER, M. R.; KRAEMER, T. Drugs of Abuse Monitoring in Blood for Control of Driving Under the Influence of Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.24, p.210–21, 2002.

MONKEN, M.H. PF apreende 31 mil pílulas de ecstasy. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 16 abril 2005. Caderno Folha Cotidiano, p C1.

MURPHY, P.N.; WAREING, M.; FISK, J.E. Users' perceptions of the risks and effects of taking ecstasy (MDMA): a questionnaire study. **Journal of Psychopharmacology**, v.20(3), p.447-55, 2006.

NAKASHIMA, K. High-performance liquid chromatography analysis of drugs of abuse in biological samples. **Journal of Health Science**, v.51(3), p.272-7, 2005.

PARROTT, A. C. Human psychopharmacology of Ecstasy (MDMA): a review of 15 years of empirical research. **Hum. Psychopharm. Clin.** V.16 (8), p.557-77, 2001.

PARROTT, A.C. Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. **Psychopharmacology**, v.173, p.234-41, 2004.

PARROT, A. C. Chronic tolerance to recreational MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) or Ecstasy. **Journal of Psychopharmacology**, v.19 (1) , p.71-83, 2005.

PARROTT, A.C. MDMA in humans: factors which affect the neuropsychobiological profiles of recreational ecstasy users, the integrative role of bioenergetic stress. **Journal of Psychopharmacology**, v.20 (2), p.147-63, 2006.

PIETTE, V.; PARMENTIER, F. Analysis of illicit amphetamine seizures by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.979, p.345-52, 2002.

PIKKARAINEN, A. L. Systematic approach to the profiling analysis of illicit amphetamine. **Forensic Science International**, v.82 (2), p.141-52, 1996.

PISTERNICK, W.; KOVAR, K. A.; ENSSLIN, H. High-performance thin-layer chromatographic determination of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its major metabolites in urine and comparison with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.688 (1), p.63-9, 1997.

POLÍCIA FEDERAL. Estatísticas de apreensões. Disponível em <<http://www.dpf.gov.br>>, Acesso em : 21 nov. 2006

PTOLEMY, A. S.; McKIBBIN, P.B. Sample preconcentration with chemical derivatization in capillary electrophoresis Capillary as preconcentrator, microreactor and chiral selector for high-throughput metabolite screening. **Journal of Chromatography A**, v.1106, p.7–18, 2006.

RAIKOS, N.; CHRISTOPOULOU, K.; THEODORIDIS, G.; et al. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.789 (1), p.59-63, 2003.

RANGEL, N.; PRAGEL, A. C. Austrália apreende 5 milhões de pílulas de ecstasy. **Revista Isto É**, São Paulo, 20 abril 2005. n° 1853, p 24.

RENEMAN, L.; BOOIJ, J.; BRUIN, K.; REITSMA, J.B.; WOLFF, F. A.; GUNNING, W. B.; HEETEN, G.J.; BRINK, W. Effects of dose, sex, and long-term abstention from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons. **Lancet**, v.358, p.1864-69, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I.C.S.F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova** v.27 (5), p.771-80, 2004.

RODRIGUES, G. Novidade no mundo das drogas. **Revista Isto É**, São Paulo, 20 abril 2005. Seção Comportamento, p 65.

SAADAT, K.; ELLIOTT, J. M.; COLADO, M. I.; GREEN, A. R. The acute and long-term neurotoxic effects of MDMA on marble burying behaviour in mice. **Journal of Psychopharmacology**, v.20 (2), p.264–71, 2006.

SADEGHIPOUR, F.; VARESIO, E.; GIROUD, C.; RIVIER, L.; VEUTHEY J.L. Analysis of amphetamines by capillary electrophoresis and liquid chromatography: Application to drug seizures and cross-validation. **Forensic Science International**, v.86 (1-2), p.1-13, 1997a.

SADEGHIPOUR, F.; GIROUD, C.; RIVIER, L.; et al. Rapid determination of amphetamines by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v.761 (1-2), p.71-8, 1997b.

SADEGHIPOUR, F.; VEUTHEY, J. L. Sensitive and selective determination of methylenedioxyated amphetamines by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v.787, p.137-43, 1997.

SADEK, P. C. **Troubleshooting HPLC systems. A bench manual**. New York : John Wiley & Sons, 2000. 306p.

SANDERS, B. In the Club: Ecstasy Use and Supply in a London Nightclub. **Sociology**, v.39(2), p.241-58, 2005.

SARDINHA, L.S.; GARCIA, A.L. Um estudo sobre a psicodinâmica do usuário de ecstasy. **Psicologia: Teoria e Prática** v. 2 (2), p.70-87, 2000.

SCHIFANO, F. A bitter pill. Overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities. **Psychopharmacology** v.173 (3-4), p.242-8, 2004.

SCHIFANO, F.; CORKERY, J.; DELUCA, P.; OYEFESO, A.; GHODSE, A. H. Ecstasy (MDMA, MDA, MDEA, MBDB) consumption, seizures, related offences, prices, dosage levels and deaths in the UK (1994–2003). **Journal of Psychopharmacology**, v.20 (3), p.456-63, 2006.

SCHWARTZ, R. H.; MILLER, N. S. MDMA (Ecstasy) and the Rave: A Review. **Pediatrics**, v.100, p.705-8, 1997.

SNOW, N. H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v.885, p.445-55, 2000.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. Heidelberg : Springer verlag, 1999. 320p.

SOARES, M. E.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. L. Determination of amphetamine and its metabolite p-hydroxyamphetamine in rat urine by reversed-phase high-

performance liquid chromatography after dabsyl derivatization. **Biomedical Chromatography**, v.15 (7), p.452-6, 2001.

SOARES, M. E.; CARVALHO, M.; CARMO, H.; REMIAO, F.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. L. Simultaneous determination of amphetamine derivatives in human urine after SPE extraction and HPLC-UV analysis. **Biomedical Chromatography**, v.18 (2), p.125-31, 2004.

TAGLIARO, F.; VALENTINI, R.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; CARLI, G.; MARIGO, M. Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licence. **Forensic Science International**, v.107 (1-3), p.121-8, 2000.

TALWAR, D.; WATSON, I. D.; STEWART, M. J. Routine analysis of amphetamine class drugs as their naphthaquinone derivatives in human urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.735 (2), p.229-41, 1999.

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E. H. M.; JONG, G. J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. **Journal of Chromatography B**, v.745, p.49-82, 2000.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v.902, p.167-94, 2000.

UNODC. Global Illicit Drug Trends 2003. Office on Drug and Crime - United Nations. Disponível em: <http://www.unodc.org/pdf/trends2003_www_E.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2006.

VERESS, T. Determination of amphetamine by HPLC after acetylation. **Journal Forensic Science**, 45 (1), p.161-6, 2000.

WOOD, M.; LALOUP, M.; FERNANDEZ, M. M. R.; JENKINS, K. M.; YOUNG, M. S.; RAMAEKERS, J. G.; BOECK, G.; SAMYN, N. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v.150, p.227-38, 2005.

ZAKZANIS, K. K.; CAMPBELL, Z. Memory impairment in now abstinent MDMA users and continued users: A longitudinal follow-up. **Neurology**, v.66, p.740-1, 2006.