

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de metilenodioxi derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidentes de trânsito

Aline Akemi Ishikawa

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de metilenodioxi derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidentes de trânsito

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia
Orientada: Aline Akemi Ishikawa
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Ribeirão Preto
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ishikawa Akemi, Aline

Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de metilenodioxí derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidentes de trânsito. Ribeirão Preto, 2011.

67 f. : Il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa.

1. Metilenodioxí derivados. 2. Humor vítreo. 3. GC/MS 4. Acidentes de trânsito.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Aline Akemi Ishikawa

Título do trabalho: Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de metilenodioxi derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidentes de trânsito.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em

Banca Examinadora

Prof Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente pela minha vida.

Aos meus pais, que mesmo distantes me apoiaram muito.

Aos meus irmãos pela compreensão.

Ao meu orientador pela paciência e atenção.

Aos meus amigos do laboratório: Marcela, Mariana, Thiago, Fabrício, Rafael Pereira, Ângela e em especial ao Rafael Bazzarella pelos ensinamentos e pela paciência e a minha grande amiga Lulis pela amizade e parceria.

A todas as pessoas do Centro de Medicina Legal de Ribeirão Preto (CEMEL), em especial a todos os técnicos do IML e do SVOI

A todas as pessoas envolvidas diretamente e indiretamente na concretização de mais uma etapa na minha vida.

RESUMO

ISHIKAWA, A. A. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de metilenodioxí derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidentes de trânsito**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Os metilenodioxí derivados estão entre as drogas sintéticas de uso ilícito mais consumidas no ocidente, são substâncias que causam alterações motoras e psíquicas e tem causado grande ameaça a segurança no trânsito, pois estes efeitos afetam o desempenho dos condutores, podendo causar acidentes de trânsito. O humor vítreo é uma matriz biológica disponível apenas nas análises *postmortem*, e é de grande relevância para toxicologia forense. Constitui uma matriz simples, de fácil coleta e manuseio, boa estabilidade, muito indicada principalmente nos casos de corpos politraumatizados, parcialmente carbonizados ou em estado de decomposição. Isto porque o humor vítreo localiza-se em uma área anatomicamente isolada, relativamente protegida contra a contaminação externa e invasão de microorganismos. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica para detectar e quantificar metilenodioxí derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidentes de trânsito. Para desenvolvimento do método foi utilizado 1 mL de humor vítreo, extração líquido-líquido com solvente acetato de etila, derivatização com anidrido heptafluorobutírico (HFBA) e detecção por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). A metodologia foi validada de acordo com os parâmetros preconizados pela ANVISA e demonstrou linearidade de 10 a 400 ng/mL. Os limites de detecção variaram entre 1 a 2,5 ng/mL, a exatidão variou entre 97,1% -103,7%, na precisão intra-ensaio foram obtidos valores entre 4,54%-9,14% e na precisão inter-ensaio, valores entre 6,92%-10,59%. A recuperação encontrada foi superior a 57,87%. A metodologia validada foi aplicada em humor vítreo de vítimas fatais de acidentes de trânsito coletadas no Centro de Medicina Legal de Ribeirão Preto (CEMEL).

Palavras-chave: Metilenodioxí derivados, Humor vítreo, GC/MS, Acidentes de trânsito

ABSTRACT

Ishikawa, A. A. **Development of analytical methodology for the investigation of methylenedioxy derivatives in samples of vitreous humor in fatal traffic accident.** 2011. 67 f. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The methylenedioxy derivatives are among synthetic drugs of illicit use most consumed in the occident, these are substances cause mental and motor disorders and has caused major threat to traffic safety, these effects affect the performance of drivers and may lead to traffic accidents. The vitreous humor is a biological matrix available in postmortem analysis, and has great relevance to forensic toxicology. It is a simple matrix, clean, easy collection and handling, good stability, highly recommended especially in cases of body injuries, partially carbonization or in a state of decomposition. This is because the vitreous humor is located in an anatomically isolated area, relatively protected from external contamination and invasion of microorganisms. The purpose of this study was to develop and validate an analytical methodology to detect and quantify methylenedioxy derivatives in samples of vitreous humor in fatal traffic accidents. To develop the method we used 1 mL of vitreous humor, liquid-liquid extraction with ethyl acetate solvent, derivatization heptafluorobutyric anhydride (HFBA) and detection by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The methodology was validated according to the parameters established by ANVISA and demonstrated linearity from 10 to 400 ng /mL. The limits of detection were between 1,0 ng/mL and 2,5 ng / mL. The accuracy had values between 97.1% -103.7%, the intra-assay precision was 4.54% -9.14% and inter assay precision between 6.92% -10.59%. The recovery was higher than 57.87%. The methodology validated was applied in vitreous humor of victims of fatal traffic accidents collected in the Centre of Forensic Medicine of Ribeirão Preto (CEMEL)

Keywords: Methylenedioxy derivatives, Vitreous humor, GC / MS, Traffic accidents

FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas da anfetamina, mescalina e dos metilenodioxi derivados.....	18
Figura 2 - Biotransformação dos metilenodioxi derivados	20
Figura 3 - Humor vítreo e sua localização.....	23
Figura 4 - Fluxograma do procedimento experimental para análise de metilenodioxi derivados em amostras de humor vítreo.....	34
Figura 5 - Cromatograma dos íons selecionado para MDA e o seu respectivo espectro de massas	36
Figura 6 - Cromatograma dos íons selecionado para MDMA e o seu respectivo espectro de massas	37
Figura 7 - Cromatograma dos íons selecionado para MDEA e o seu respectivo espectro de massas	38
Figura 8 - Cromatograma dos íons selecionado para MDA-d5 e o seu respectivo espectro de massas	39
Figura 9 - Cromatograma de uma amostra de humor vítreo fortificada com 100 ng/mL de metilenodioxi derivados (9a) e 50 ng/mL de padrão interno MDA-d5 (9b)	47
Figura 10 - Cromatogramas de uma amostra fortificada com 100 ng/mL de metilenodioxi derivados e 50 ng/mL do padrão interno MDA-d5 (10a) e amostra de humor vítreo branco (isenta dos analitos pesquisados) (10b).....	48
Figura 11 - Cromatogramas da água deionizada (10a) e humor vítreo (10b) fortificadas com 100 ng/mL de padrões de metilenodioxi derivados e 50 ng/mL de padrão interno MDA-d5	49
Figura 12 - Linearidade obtida pela análise cromatográfica de uma amostra fortificada com padrão de MDA no intervalo de 10 ng/mL a 400 ng/mL.....	50
Figura 13 - Linearidade obtida pela análise cromatográfica de uma amostra fortificada com padrão de MDMA no intervalo de 10ng/mL a 400 ng/ mL.....	51
Figura 14 - Linearidade obtida pela análise cromatográfica de uma amostra fortificada com padrão de MDEA no intervalo de 10 ng/mL a 400 ng/mL.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programação da temperatura da coluna.....	35
Tabela 2 - Íons de identificação, quantificação e tempo de retenção dos analitos.....	35
Tabela 3 - Limite de Detecção (LD), Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e Limite Superior de Quantificação (LSQ)	49
Tabela 4 - Valores de precisão intra-ensaio (%)	52
Tabela 5 - Valores de precisão inter-ensaio (%)	52
Tabela 6 - Valores de exatidão (%)	52
Tabela 7 - Valores de recuperação (%).....	53
Tabela 8 - Valores de especificidade (valores aceitáveis 20 ng/mL- 30ng/mL ou 80%-120%).....	54
Tabela 9 - Valores de estabilidade de curta duração	55
Tabela 10 - Valores da estabilidade de longa duração	55
Tabela 11 - Valores da estabilidade de congelamento e descongelamento.....	56
Tabela 12 - Valores da estabilidade pós-processamento.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MDA	3,4 - metilendioxianfetamina
MDMA	3,4 - metilendioximetanfetamina
MDEA	3,4 - metilendioxietilanfetamina
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HFBA	Anidrido heptafluorobutírico
PFPA	Pentafluoropropiônico anidro
TEA	Trietilamina
CQ	Controle de qualidade
CV	Coefficiente de variação
DPR	Desvio padrão relativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Metilenodioxi derivados	16
1.1.1 Histórico	16
1.1.2 Aspectos químicos e farmacológicos dos metilenodioxi derivados	17
1.1.3 Aspectos toxicológicos dos metilenodioxi derivados	19
1.1.4 Amostra biológica alternativa: humor vítreo.	21
1.1.5 Drogas ilícitas e acidentes de trânsito	23
2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	26
3 OBJETIVOS.....	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Materiais.....	30
4.2 Equipamentos e acessórios	30
4.3 Preparação de soluções e reagentes.....	30
4.3.1 Preparação de soluções padrões de calibradores e padrões internos.....	30
4.3.2. Preparação da solução de trietilamina 0,1m em heptano.....	31
4.3.3 Preparação do tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ de pH 9,3	31
4.3.4 Preparação do tampão TRIS de pH 7,4	32
4.4 Desenvolvimento da metodologia	32
4.5 Determinação dos metilenodioxi derivados em amostras de humor vítreo	33
4.6 Avaliação da substituição da matriz humor vítreo por água deionizada para a realização dos parâmetros de validação	40
4.7 Curva de calibração.....	40
4.8 Parâmetros utilizados para a validação.....	40
4.8.1 Limite de detecção	40
4.8.2 Limite de quantificação.....	41
4.8.3 Linearidade.....	41
4.8.4 Precisão	41
4.8.5 Exatidão	42
4.8.6 Recuperação	43
4.8.7 Especificidade	43
4.8.8 Estabilidade.....	44
4.8.9 <i>Carry over</i>	44
4.9 Casuística.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Separação cromatográfica geral dos analitos	47
5.2 Análise da amostra branca (insenta dos analitos pesquisados).....	47
5.3 Avaliação da substituição da matriz humor vítreo por água deionizada para a realização dos parâmetros de validação	48
5.4 Limites de detecção e quantificação.....	49
5.5 Linearidade.....	50
5.6 Precisão	51
5.7 Exatidão	52
5.8 Recuperação	53
5.9 Especificidade	53

5.10 Estabilidade.....	54
5.10.1 Estabilidade de curta duração.....	54
5.10.2 Estabilidade de longa duração.....	55
5.10.3 Estabilidade de congelamento e descongelamento.....	55
5.10.4 Estabilidade pós-processamento.....	56
5.11. Carry over.....	57
5.12 Aplicações da metodologia na análise de humor vítreo em vítimas fatais (motoristas) envolvidas em acidentes de trânsito.....	57
7 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	43

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de substâncias psicoativas em diversos segmentos da sociedade é um fenômeno mundial que tem causado grande preocupação por parte de especialistas. Diferenças quanto ao padrão de uso e ao tipo de droga podem ser observadas para cada país, entretanto, os impactos sobre a saúde pública, a segurança individual e a estrutura social são universalmente negativos (YONAMINE, 2004).

Os metilenodioxí derivados estão entre as drogas sintéticas de uso ilícito mais consumidas no ocidente, sendo as principais representantes desta classe: 3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA, *ecstasy*), 3,4 metilenodioxietilanfetamina (MDEA, *Eve*) e 3,4 metilenodioxianfetamina (MDA) (CAZENAVE, 2003; NICHOLS, 1986).

O MDMA e seus análogos são comercializados de forma ilegal e clandestina, geralmente na forma de comprimidos dos mais variados aspectos, dimensões e cores, contendo um logotipo sulcado. Cápsulas gelatinosas são menos freqüentes, mas mesmo assim têm sido encontradas (LAPACHINSKE; YONAMINE; MOREAU, 2004).

O uso recreacional dos metilenodioxí derivados, consumidos sozinhos ou combinados com outras drogas, tais como álcool e cannabis têm se tornado cada vez mais popular entre os jovens. O *ecstasy* é a droga mais conhecida e consumida junto com a cannabis em festas com músicas eletrônicas conhecidas como “raves” (ZHAO et al., 2001). O principal representante dos metilenodioxí derivados, o MDMA, é mundialmente conhecido como *ecstasy*, mas também é conhecido por XTC, ADAM, E, pílula do amor (ALMEIDA; SILVA, 2000; KALANT, 2001). No Brasil é comumente conhecido como “pastilha” e “bala”.

Nos últimos anos o consumo de *ecstasy* vem aumentando consideravelmente, ocupando o segundo lugar entre as drogas mais consumidas na maioria dos países da Europa (COLE; SUMNALL, 2003a; LANDRY, 2002).

Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas, publicado em 2010 pelo Escritório das Nações Unidas contra Crimes e Drogas (UNODC), o consumo e o tráfico de drogas sintéticas tais como, anfetaminas do tipo estimulantes (anfetaminas, metanfetaminas) e o grupo *ecstasy* (MDMA, MDA, MDEA e outros análogos) aumentaram geometricamente desde a década de 90.

Aproximadamente 250 milhões de pessoas ou 5,7% da população mundial entre 15 e 64 anos usaram drogas pelo menos uma vez no ano de 2008. Foi estimado que nesse ano, 14 a 53 milhões de pessoas consumiram anfetaminas e de 11 a 26 milhões no mundo utilizaram o *ecstasy* (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC), 2010).

Na América do Sul estes números são de 1,3 a 1,8 milhões para as anfetaminas e de 510 a 530 mil para o *ecstasy*. O consumo de drogas sintéticas vem crescendo muito, principalmente na África e na Ásia. Esses dados refletiram que o consumo de drogas sintéticas em breve deverá ultrapassar o consumo dos opiáceos e cocaína juntos (UNODC, 2010).

De acordo com a Europol (*European Police Office*), agência de inteligência criminal da União Européia foram apreendidos 17,4 milhões de comprimidos de *ecstasy* nos países membros durante o ano de 2000, o que corresponde a um aumento de quase 50% quando comparado com o ano de 1999 (GIMENO; BESACIER; CHAUDRON-THOZET, 2003). No Brasil segundo informações fornecidas pelo Núcleo de Exames em Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo, durante o ano de 2001 foram apreendidos 1061 comprimidos de *ecstasy* pela Polícia Civil do Estado de São Paulo; no ano seguinte 5677. E durante o período de janeiro a março de 2005, a Polícia Federal apreendeu 31.623 comprimidos de *ecstasy* (COSTA et al., 2009).

O aumento no número de apreensões desta classe de drogas de abuso é indicativo do aumento no consumo da substância. As apreensões de forma geral têm aumentado de forma considerável. Essa tendência é motivo de grande preocupação, uma vez que o combate às drogas sintéticas é considerado muito mais difícil quando comparados às drogas tradicionais (maconha, cocaína e heroína), pois oferecem maiores vantagens aos traficantes: são relativamente fáceis de fabricar, não há necessidade de um conhecimento aprofundado de química e principalmente, não há necessidade de amplos espaços para o cultivo de plantas utilizadas como matéria-prima, as matérias primas utilizadas para fabricação dos metilenodioxí derivados são legais e amplamente disponíveis. Além do mais, apresentam rota de tráfico curto (fabricados próximos aos principais mercados de consumo), são também facilmente transportadas e comercializadas com maior discrição (COSTA et al., 2009).

Os laboratórios clandestinos onde são produzidas as drogas sintéticas de uso ilícito, segundo a UNODC, apresentaram um aumento de 20% no ano de 2008, inclusive em países onde esses laboratórios nunca haviam sido detectados, revelando pela primeira vez o surgimento no Brasil, Argentina, entre outros. Estas drogas são produzidas sem nenhum controle de qualidade e, as análises nos comprimidos de *ecstasy* evidenciaram não apenas a presença MDMA, mas a presença de outras feniletilaminas, como MDA, MDEA, cetamina, efedrinas e analgésicos (salicilatos, paracetamol) (COSTA et al., 2009; LASMAR; LEITE, 2007). Em consequência dessa variabilidade encontrada na sua composição ativa, a *World Health Organization* (WHO), em 1997, concluiu que o termo genérico *ecstasy* representa uma gama extensa de compostos e não apenas a MDMA (COLE; SUMNALL, 2003b).

1.1 Metilenodioxi derivados

1.1.1 Histórico

O MDA foi sintetizado em 1910 pelos químicos alemães Mannich e Jacobsohn. O MDA foi patenteado como antitussígeno (1958), calmante (1960) e supressor de apetite (1961). Em 1970 foi declarado como droga ilícita nos Estados Unidos, elevando a difusão do MDMA (HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999; WILLS, 2002).

O MDMA foi patenteado pela empresa farmacêutica alemã Merck® em 1914, como inibidor de apetite, mas não se tornou comercialmente viável principalmente em razão de vários efeitos adversos apresentados. Em 1953 ressurgiu sendo usados para fins militares. Em seguida, em 1970, começou a ser usado como complemento nas psicoterapias e iniciou-se o uso como droga recreacional (DORNAN; KATZ; RICAURTE, 1991; GREER; TOLBERT, 1998; HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999; XAVIER et al., 2007; WILLS, 2002).

O período compreendido entre os anos de 1977 e 1984 ficou conhecido como a *áurea ecstasy*. Em 1985, depois de comprovados os potenciais de abuso e toxicidade do MDMA nos Estados Unidos, este se tornou restrito, fazendo parte da Lista 1 (*schedule I*) do convênio de substâncias psicotrópicas, que inclui substâncias com elevado potencial abusivo, sem benefício terapêutico e de uso inseguro, mesmo

com supervisão médica. Somente após a inclusão do MDMA na Lista 1, é que os análogos do *ecstasy*, como MDEA teve uma breve expansão até 1986, quando finalmente foi criada uma lei que controlou também a comercialização dos análogos do MDMA, como MDEA com efeitos menores, porém similares. No Brasil é considerada substância de uso proscrito, definida pela Portaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde de número 344, de 12 de maio de 1998 (ALMEIDA; SILVA, 2000; CAZENAVE, 2003; HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999; KALANT, 2001; XAVIER et al., 2008).

1.1.2 Aspectos químicos e farmacológicos dos metilenodioxí derivados

O termo anfetamínicos refere-se a um grupo de substâncias que são compostos pela anfetamina e seus derivados. Quimicamente apresentam esqueleto básico da β -feniletilamina e farmacologicamente agem como aminas simpatomiméticas. Tentativas de diminuir os efeitos colaterais indesejáveis bem como o potencial de abuso da anfetamina levaram à produção de análogos com substituições no anel aromático e na cadeia lateral (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2003).

Os metilenodioxí derivados são drogas sintéticas estruturalmente semelhantes às substâncias estimulantes anfetamina e a alucinógena mescalina (um alucinógeno extraído do cacto peiote (*Lophophora williamsii*)) (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2003; LAPACHINSKE; YONAMINE; MOREAU, 2004; ZHAO et al., 2001).

As inserções dos grupamentos metilenodioxí nas posições 3 e 4 no anel aromático confere aos metilenodioxí derivados propriedades alucinógenas. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas da anfetamina, mescalina e dos metilenodioxí derivados.

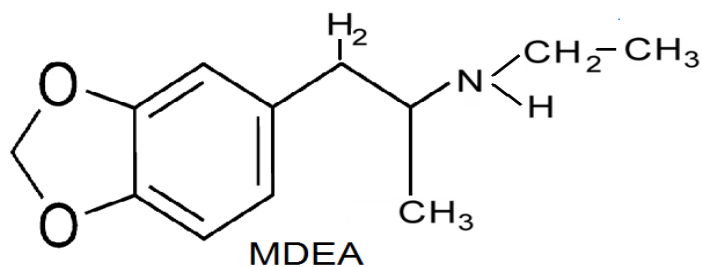
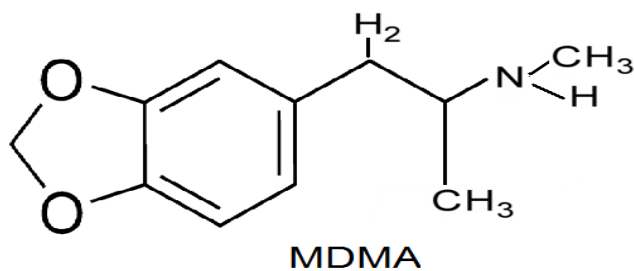
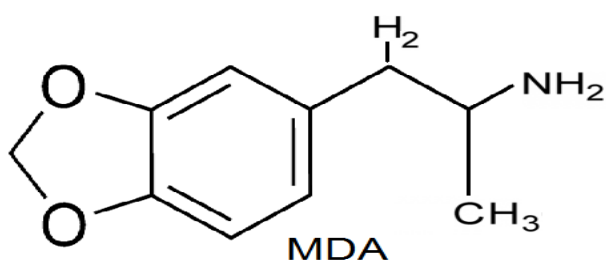
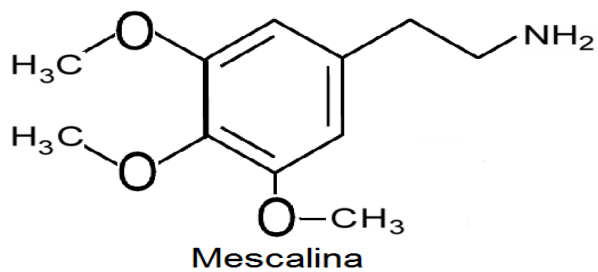
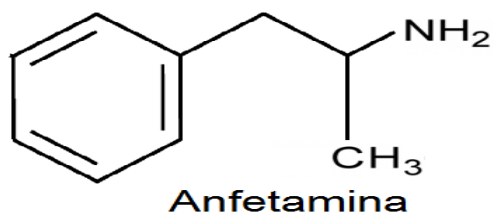


Figura 1- Estruturas químicas da anfetamina, mescalina e dos metilenodioxi derivados (modificado de ZHAO et al., 2001; PUBCHEM COMPOUND, 2011)

Os metilenodioxí derivados são classificados como substâncias entactógenas (nome que designa substâncias cujos efeitos estão relacionados com a indução de um estado emocional agradável, com um aumento da empatia, comunicabilidade e sociabilidade) (HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999; ZHAO et al., 2001). Os efeitos farmacológicos em humanos podem variar consideravelmente, dependendo das características físicas, idade, dose administrada, frequência e duração de uso e também da variedade de substância encontradas nos comprimidos (LASMAR; LEITE, 2007).

Os efeitos nas doses de 60-120 mg para o MDA e de 100-200 mg para o MDMA e MDEA, têm início em 30 minutos para o MDMA e MDEA e 60 minutos para o MDA e persistem aproximadamente oito horas para MDA, seis horas MDMA e de três a quatro horas MDEA (HEGADOREN; BAKER; BOURIN, 1999).

Usuários descrevem como efeitos: sensação de euforia, aumento de energia, desejo de socialização, melhora na comunicabilidade e um aumento na auto-estima, devido a estes efeitos, os derivados de metilenodioxí vêm sendo usados desde 1980 até os dias de hoje (MAURER et al., 2000; PARROT, 2004).

1.1.3 Aspectos toxicológicos dos metilenodioxí derivados

Os metilenodioxí derivados são absorvidos rapidamente pelo trato gastrointestinal e produzem um pico plasmático máximo de duas horas após a administração oral. São substâncias lipossolúveis, atravessam facilmente as barreiras hematoencefálica e placentária. O tempo de meia de vida plasmática do MDMA e análogos é aproximadamente de oito horas. São necessárias aproximadamente cinco meias-vidas (40 h) para que 95% do MDMA seja eliminado do organismo. Alguns metabólitos do MDMA, principalmente o MDA, ainda possuem atividade farmacológica, o que torna a duração da ação do MDMA mais prolongada do que a permanência do próprio composto no organismo (GREENE; KERR, F.; BRAITBERG, 2008; KALANT, 2001; XAVIER et al., 2007).

Os metilenodioxí derivados são biotransformados primordialmente no fígado, principalmente pela enzima CYP2D6 do citocromo p450, e a despeito das diferenças estruturais apresentam como principais vias de biotransformação degradações das cadeias laterais: N-desalquilação para formar os metabólitos N-desalquilados (MDA e HMA (hidróxi-3-metoxitanfetamina)), por O-desmetilação para metabólitos

dihidroxilados (HHMA, 3,4 dihidroximetanfetamina e HHA, 3,4 dihidroxianfetamina) e por O-metilação para metabólitos (HMMA, 4 hidróxi-3-metoximetanfetamina e HMA, 4 hidróxi-3-metoximetanfetamina), (DE MARTINIS et al., 2007; XAVIER et al., 2007; KALANT, 2001) apresentados na Figura 2.

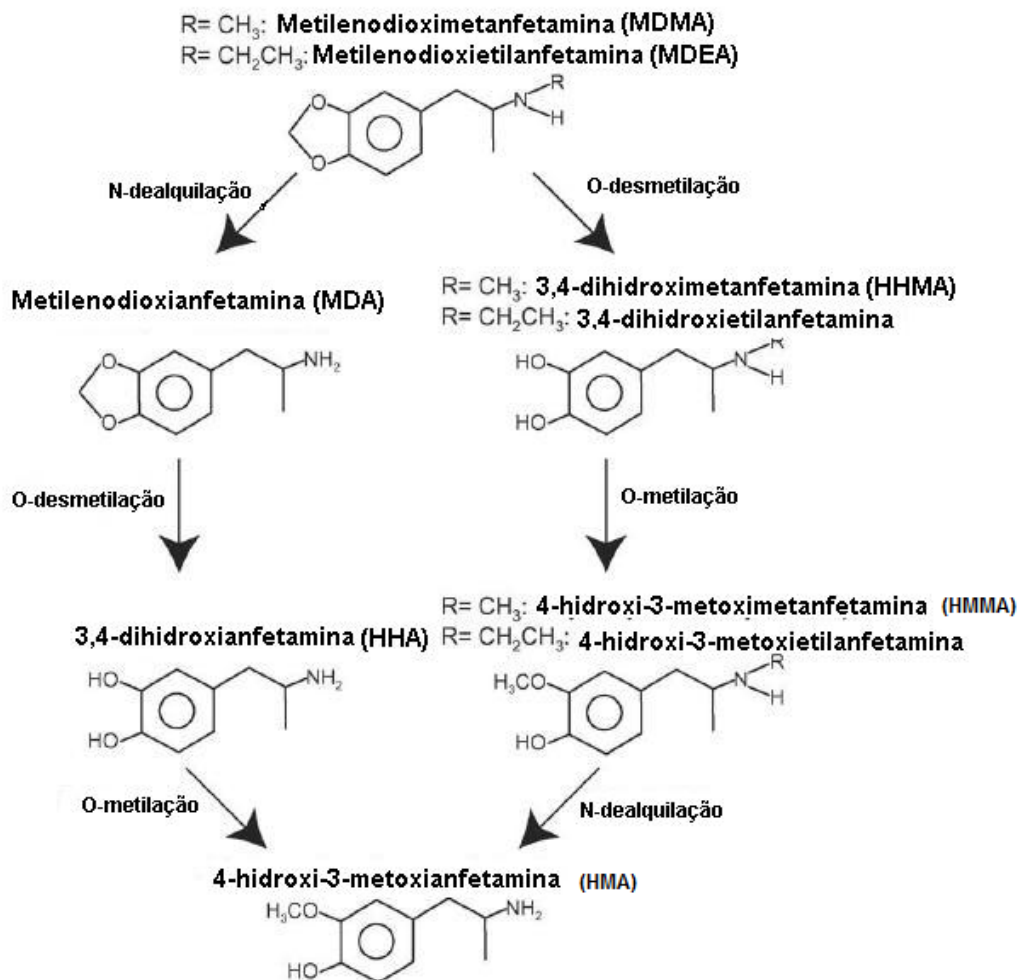


Figura 2 – Biotransformação dos metilenodioximetanfetaminas (modificado de SCHEIDWEILER, 2006).

A partir da dose administrada aproximadamente 7% do MDMA sofre biotransformação para MDA, um metabólito ativo que ainda apresenta efeitos como duração maior do que o próprio MDMA. Através da via renal, cerca de 65% podem ser eliminadas sem biotransformação (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2003; XAVIER et al, 2007; WILLS, 2002)

Embora o mecanismo de ação dos metilenodioxí derivados não esteja totalmente esclarecido, a maioria dos estudos focaliza as ações nos sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos e existem evidências do envolvimento com o sistema noradrenérgico (XAVIER et al., 2008). Além disso, somada às dificuldades para se esclarecer as etapas neuroquímicas em humanos, ainda são observadas variações dependentes da espécie animal utilizada nos ensaios experimentais (SIMANTOV, 2004).

Inicialmente, os metilenodioxí derivados aumentam a liberação e inibem a recaptação de serotonina, ocasionando um aumento da serotonina na fenda sináptica. No entanto, em longo prazo o uso continuado produz decréscimo da atividade triptofano hidroxilase, responsável pela síntese da serotonina (KALANT, 2001; STEELE; MCCANN; RICAURTE, 1994).

Dentre as reações mais graves inerentes ao uso do MDMA está hipertermia, responsável por falências nos sistemas cardiovasculares, nos rins e no fígado. Outros sintomas associados ao MDMA: aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, sudorese excessiva, tensão muscular, ranger dos dentes, náuseas, desmaios, entre outros (KOLBRICH et al., 2008).

Os metilenodioxí derivados são compostos geralmente utilizados como racematos. Com relação às atividades, alguns estudos indicam que R(-) MDMA é mais estimulante e se assemelha a anfetamina e S(+) é mais alucinógeno e se assemelha a mescalina (KALANT, 2001; XAVIER et al, 2007).

1.1.4 Amostra biológica alternativa: humor vítreo.

Nos últimos anos, as amostras biológicas alternativas ou não convencionais (saliva, suor, cabelo, unhas, humor vítreo, entre outras) em relação a amostras convencionais sangue e urina, vêm sendo utilizadas com sucesso nas áreas de toxicologia forense, toxicologia clínica, controle de doping e toxicologia ocupacional (COSTA, 2008; GALLARDO; QUEIROZ, 2008).

O humor vítreo é uma matriz biológica disponível apenas nas análises *postmortem*, e é de grande relevância para toxicologia forense. Constitui uma matriz simples em termos analíticos quando comparada à urina, ao sangue e derivados (plasma e soro). É muito indicada principalmente nos casos que envolvem corpos politraumatizados, parcialmente carbonizados ou em estado de decomposição, isto

porque o humor vítreo localiza-se em uma área anatomicamente isolada, relativamente protegida contra a contaminação externa e invasão de microorganismos (COSTA, 2008; LEVINE; JUFER, 2008).

Esta matriz está localizada na cavidade posterior do olho preenchendo o espaço entre o cristalino e a retina, em quantidade de 2,0 a 2,5 mL. Trata-se de um fluido gelatinoso, transparente e incolor, composto de cerca de 99% de água, além de colágeno e ácido hialurônico; devido a grande porcentagem de água propicia a troca por difusão passiva de determinadas substâncias com o sangue, circunstância que permite uma boa correlação entre os níveis encontrados em ambos os fluidos (COSTA, 2008; RIORDAN-EVA, 2003).

Apresenta como vantagens: matriz simples, boa estabilidade química, menos susceptível a contaminação, facilidade na obtenção e facilidade no manuseio (adere pouco a vidro e plástico). Durante muitos anos vêm sendo usado na confirmação da alcoolemia, uma vez que a formação endógena do etanol não ocorre nesta espécie biológica (COSTA, 2008; LEVINE; JUFER, 2008). A Figura 3 apresenta a localização e o humor vítreo.

O humor vítreo é coletado através da perfuração com uma agulha fina do globo ocular e armazenado em *vacutainer* sem conservantes a -20 °C (COSTA, 2008).

Há muitos estudos de metilenodioxí derivados em matrizes não convencionais como saliva, cabelo e suor (CONCHEIRO et al., 2005; DE MARTINIS, 2008; KINTZ; SAMYN, 1999; PUJADAS et al., 2003; SCHEIDWEILER; HUESTIS, 2006; SNOW, 2000; VILLAMOR et al., 2005), entretanto, há poucos estudos de detecção de metilenodioxí derivados em humor vítreo, sendo que as poucas publicações se restringem à análise direta da amostra (CLAUWAERT et al., 2000; DE LETTER et al., 2002, 2004; DECAESTECKER et al., 2001; LEVINE; JUFFER, 2008).

Além dos metilenodioxí derivados, o humor vítreo permite a detecção de outras drogas tais como canabinóides, cocaína e seus metabolitos e opióides (BERMEJO et al., 1992; FERNÁNDEZ et al., 2006; FURNARI et al., 2002; LIN; LIN, 2005; MACKEY-BOJACK; KIOSS; APPLE, 2000).

A maioria dos métodos de análises de drogas desenvolvidas para sangue e urina tem sido aplicada com sucesso em humor vítreo (LEVINE; JUFER, 2008). Geralmente as concentrações encontradas de metilenodioxí derivados no humor vítreo são baixas, necessitando de técnicas sensíveis e seletivas para sua detecção,

sendo as mais utilizadas às técnicas cromatográficas acopladas á espectrometria de massas (CLAUWAERT et al., 2000; DAMS et al., 2003; DE LETTER et al., 2004; ELLIOTT; WOOLACOTT; BRAITHWAITE, 2009; LASMAR; LEITE, 2007).

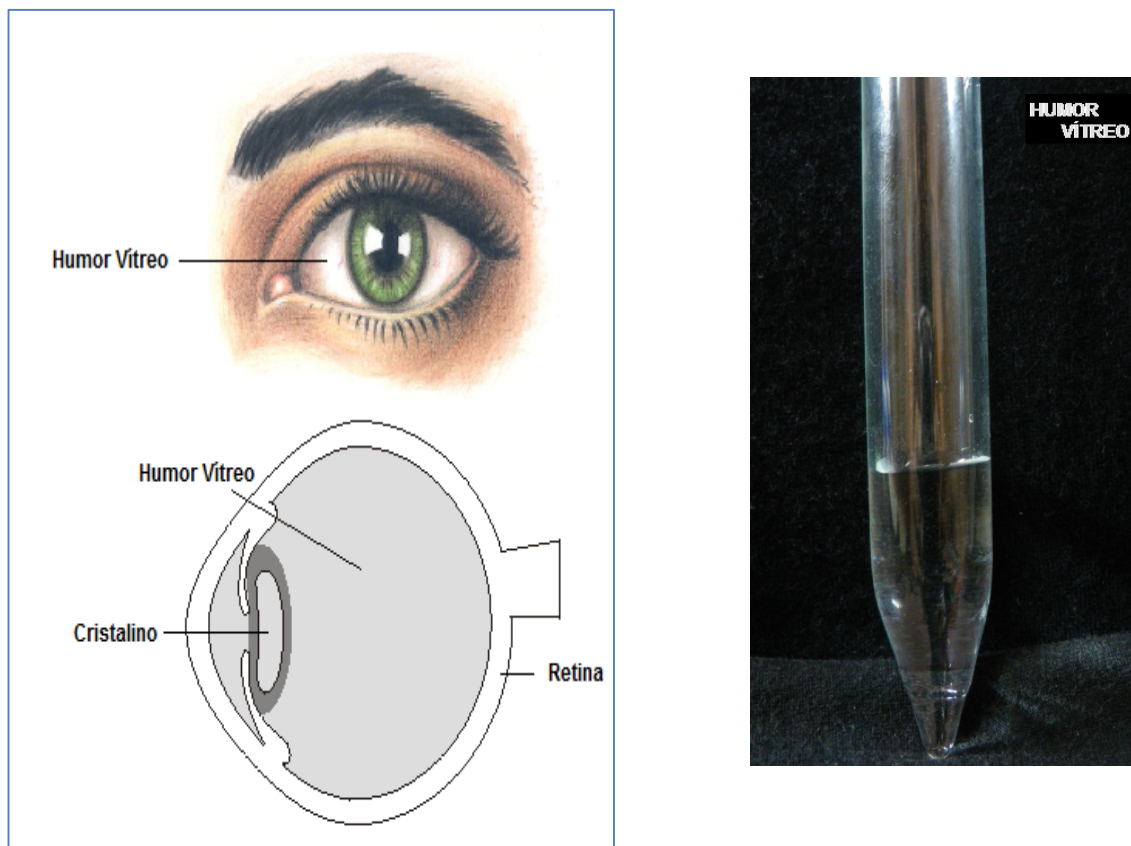


Figura 3 - Humor vítreo e sua localização

1.1.5 Drogas ilícitas e acidentes de trânsito

Segundo estudos técnicos realizado pela CNM (Confederação Nacional dos Municípios) um mapeamento das mortes por acidentes de trânsito no Brasil realizado no ano de 2007, indica que ocorreram 66.837 mortes segundo os seguros DPVAT (Danos Pessoais Causados por Veículos Auto Motores de Via Terrestre), um número extremamente elevado e alarmante, que coloca o Brasil entre os países com mais mortes no trânsito no mundo, uma média de 183 mortes por dia no trânsito brasileiro (7,6 por hora).

Em 2008 surgiu a Lei 11.705/08, que endureceu as penas para os condutores que dirijam sob a influência de álcool ou de qualquer outra substância psicoativa.

Mas, ao mesmo tempo, devemos considerar um fato que veio de encontro a essa política de segurança no trânsito, a redução do IPI (Imposto sobre Produtos Industrializados) para carros que aumentou consideravelmente a frota de veículos nas ruas do país, o que eleva os índices de acidentes. Nos países desenvolvidos vêm sendo aplicada uma política contrária, que busca reduzir, a cada ano, a frota de veículos nas ruas (CNM, 2009).

Uma comparação com os países desenvolvidos mostrou que, proporcionalmente à população, o trânsito brasileiro mata 2,5 vezes mais do que nos Estados Unidos, e 3,7 vezes mais do que na União Européia. Em 2008, enquanto os Estados Unidos obtiveram uma taxa de 12,5 mortes a cada 100.000 habitantes, o Brasil obteve uma taxa de 30,1, sendo que a frota de carros norte americana é o triplo da brasileira (CNM, 2009).

Substâncias que influenciam nas funções cerebrais ou em processos mentais certamente irão afetar o desempenho na condução. Alterações motoras provocadas por drogas ilícitas têm demonstrado grande ameaça no trânsito, muitas pesquisas indicam presença de drogas psicoativas em mortos e feridos em acidentes de trânsito (PONCE; LEYTON, 2008).

Existem estudos que mostram que o uso de metilenodioxí derivados pode aumentar perigosamente a confiança do condutor, levar a dilatação da pupila o que causa maior sensibilidade à luz, dificultando a visualização do caminho. Mas o que maior causa debilidade no condutor é a fadiga, efeito gerado após a estimulação (PONCE; LEYTON, 2008).

Como o Código Nacional de Trânsito Brasileiro não exige a investigação de drogas de abuso ilícitas em vítimas fatais de acidentes de trânsito, os dados epidemiológicos que correlacionam à presença de metilenodioxí derivados em amostras biológicas *postmortem* coletadas de motoristas são desconhecidos.

Assim, a determinação da presença de metilenodioxí derivados em amostras biológicas *postmortem* coletadas de motoristas é de extrema importância para o conhecimento do padrão de consumo da droga nesta situação.

No presente trabalho foi, desenvolvida e validada uma metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa de metilenodioxí derivados em humor vítreo de vítimas fatais de acidentes de trânsitos ocorridos em Ribeirão Preto e região, empregando a extração líquido-líquido e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), para a revisão dos aspectos éticos, tendo sido aprovado conforme consta do documento anexo (Anexo A).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a investigação de metilenodioxí derivados em amostras de humor vítreo, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Aplicar a metodologia desenvolvida e validada em amostras coletadas de vítimas de acidentes de trânsito ocorridos na cidade de Ribeirão Preto e região e que foram periciadas no Centro de Medicina Legal (FMRP/USP).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os padrões analíticos certificados 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina deuterado (MDA – d5) e 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA) foram obtidos da Cerilliant (EUA); acetato de etila e metanol foram obtidos da J. T. Baker (EUA); heptano, trietilamina (TEA) e anidrido heptafluorbutírico (HFBA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

4.2 Equipamentos e acessórios

Cromatógrafo em fase gasosa (CP 3800) acoplado ao espectrômetro de massas (Saturn 2000) da Varian[®] (EUA), coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme da J & W Scientific[®] (EUA), cilindro de gás hélio 5.0 analítico da White Martins[®] (Brasil), amostrador automático CombiPal da CTC Analytics[®] (Suíça), seringas de injeção cromatográfica Hamilton (EUA), centrífuga Universal 32 da Hettich[®] (Alemanha), evaporador de amostras TurboVap LV da Caliper[®] (EUA); banho seco TE-21 da Tecnal (Brasil), mesa de agitação TE-140 da Tecnal[®] (Brasil), vórtex AP-56 da Phoenix[®] (Brasil), deionizador de água Simplicity da Millipore[®] (EUA), balança analítica BP211D da Sartorius[®] (Alemanha), tubos *vacutainer*, seringas 10 mL e agulhas 30x8.

4.3 Preparação de soluções e reagentes

4.3.1 Preparação de soluções padrões de calibradores e padrões internos

Para a preparação dos calibradores e controles de qualidade, ampolas dos padrões analíticos de MDA, MDMA e MDEA na concentração de 1 mg/mL foram transferidas individualmente com o auxílio de pipetas de Pasteur para 3 balões volumétricos distintos de 10 mL, e os volumes completados com metanol para

originarem concentrações de 100 µg/mL em cada balão volumétrico. Em seguida, com o auxílio de pipeta volumétrica, 1 mL de cada solução contida nos balões volumétricos foi transferido para um único balão volumétrico de 10 mL e o volume ajustado 10 mL com metanol, resultando na concentração de 10 µg/mL da mistura de padrões. Dessa solução foi retirado 1 mL para obter uma solução da mistura de padrões a uma concentração de 1 µg/mL em novo balão volumétrico de 10 mL. O procedimento de diluição foi novamente repetido para se obter a solução da mistura de padrões na concentração de 200 ng/mL.

Procedimento semelhante foi empregado para se obter a solução de padrão interno deuterado. Ampola do padrão interno de MDA – d5 de 100 µg/mL teve o conteúdo transferido para um balão volumétrico de 10 mL separadamente com o auxílio de pipeta de Pasteur e completado com metanol, originando uma solução na concentração de 10 µg/mL. Posteriormente, 1 mL foi retirado do balão volumétrico e adicionado em um único balão volumétrico 10 mL, sendo este completado com metanol para originar uma solução de concentração de 1 µg/mL. Todas as soluções preparadas de padrões e o padrão interno foram armazenadas a -20°C. em tubos com tampa de rosca e envolvidos em papel alumínio.

4.3.2. Preparação da solução de trietilamina 0,1m em heptano

Para preparação da solução de trietilamina foi pipetado 70 µL de trietilamina e dispensado em um balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com heptano e agitado. A solução foi mantida sob refrigeração e utilizada no período máximo de uma semana.

4.3.3 Preparação do tampão Na₂CO₃/NaHCO₃ de pH 9,3

Para preparação da solução tampão foi preparada uma solução saturada de bicarbonato de sódio (60 g/L de água deionizada). E o pH foi ajustado para 9,3 adicionando-se carbonato de sódio anidro à solução e agitando-a continuamente. A solução foi mantida sob refrigeração.

4.3.4 Preparação do tampão TRIS de pH 7,4

Para preparação do tampão TRIS foi pesado 0,66 g do sal cloridrato de TRIS hidroximetil amino metano e 0,1 g de TRIS base em um balão volumétrico de 100 mL, o volume foi completado com água deionizada e agitado. Foi adicionado ácido clorídrico a 0,1M gota a gota para ajustar o pH para 7,4. A solução foi armazenada em frasco de vidro à temperatura ambiente.

4.4 Desenvolvimento da metodologia

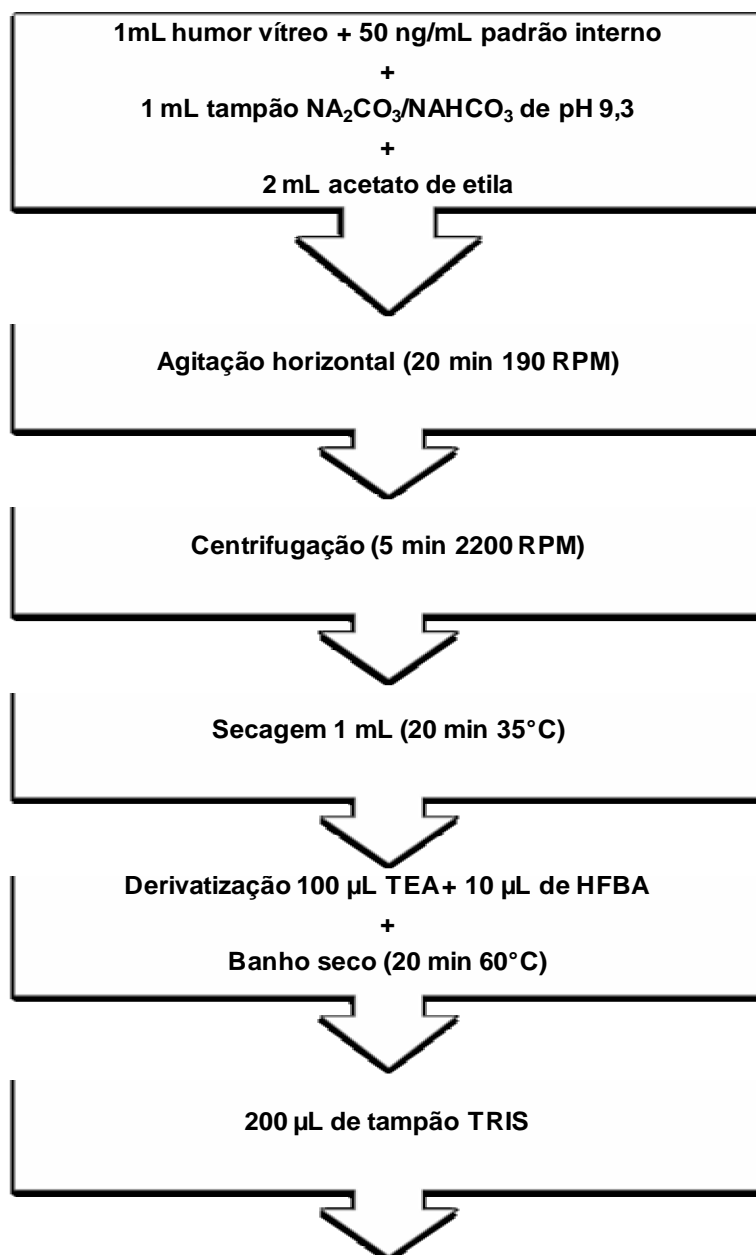
Inicialmente foi testada uma metodologia desenvolvida por KAKAANPÄÄ et al., 2004 onde a extração é feita juntamente com a derivatização, a técnica consiste na fortificação de 100 µL de humor vítreo com os padrões dos metilenodioxo derivados e deuterado MDA-d5, em seguida foi adicionado uma solução tampão NaHCO₃/KOH e uma mistura do solvente extrator (tolueno) e derivatizante (HFBA), que foram agitados e injetados no cromatógrafo em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas. Os resultados obtidos não foram muito satisfatórios, pois a recuperação de todos analitos se apresentaram muito baixas. Ainda com esta mesma técnica foram testadas quantidades de amostras diferentes 300 µL, 500 µL e 1000 µL e outros solventes extratores, tais como, clorobutano, diclorometano e acetato de etila, mas mesmo assim a resposta dos analitos se manteve muito baixas.

Como técnica de extração, optou-se em realizar um procedimento simples com o uso de solventes orgânicos, o que foi motivado pela simplicidade da matriz biológica, que é o humor vítreo. Assim, decidiu-se por utilizar a técnica de extração líquido-líquido que consiste na extração exaustiva, baseada na partição dos analitos em dois solventes imiscíveis de polaridades diferentes (CLAUWAERT et al., 2000; CRISAFI; LONG, 1996). Após a escolha da extração líquido-líquido como técnica extratora foram testados solventes para observar qual apresentava melhor capacidade de extração (acetato de etila, diclorometano, tolueno, clorobutano e hexano), o acetato de etila e o tolueno apresentaram boa capacidade de extração. Mas, o solvente que apresentou boa capacidade de extração e tempo relativamente curto de evaporação, características estas desejáveis para um bom solvente extrator, foi o acetato de etila.

Para aumentar a sensibilidade e seletividade na detecção os analitos foram testados dois derivatizantes o pentafluoropropiônico anidro (PFPA), e o heptafluorbutírico anidro (HFBA). O derivatizante de escolha foi o HFBA que resultou em uma resposta cromatográfica mais abundante.

4.5 Determinação dos metilenodioxí derivados em amostras de humor vítreo

O método de análise desenvolvido para a determinação de metilenodioxí derivados foi inicialmente baseado em outro procedimento já desenvolvido e validado no nosso laboratório para a determinação de anfetaminas em amostras de saliva (BAZZARELA, 2010). A Figura 4 apresenta um fluxograma do procedimento experimental.



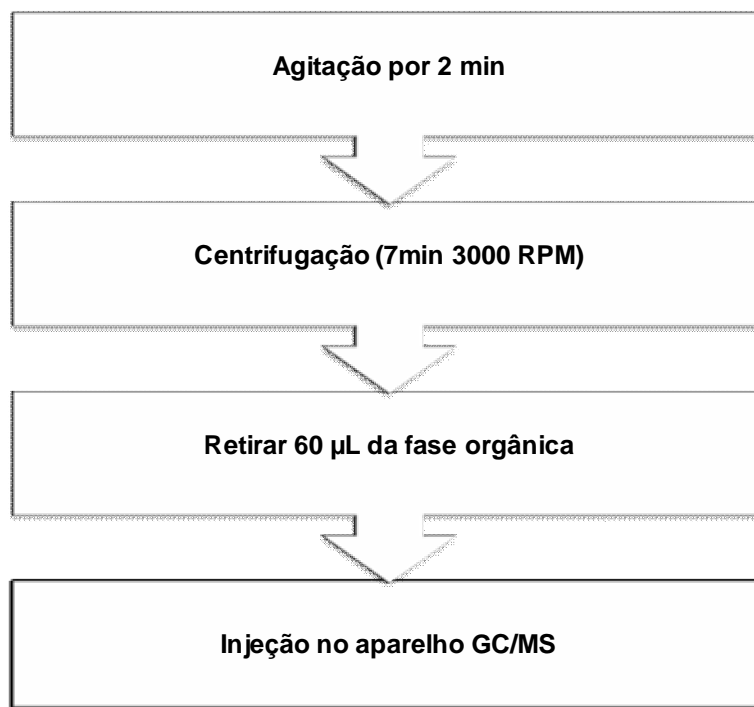


Figura 4 - Fluxograma do procedimento experimental para análise de metilenodioxí derivados em amostras de humor vítreo.

Para a extração, 1 mL de humor vítreo livre das drogas de interesse, foi transferido para um tubo de ensaio, onde foi fortificado com 50 ng de MDA-d5. O tubo foi agitado em vórtex e a solução diluída com 1 mL de tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ de pH 9,3. Em seguida foi empregada a técnica de extração líquido-líquido, adicionando 2 mL de acetato de etila e submetendo o tubo a agitação branda em mesa agitadora por 20 minutos a 190 RPM. O tubo foi então centrifugado (3000 RPM por 7 minutos) e 1,0 mL da fase orgânica foi transferido para outro tubo de fundo cônico e o solvente eliminado em evaporador sob fluxo de N_2 . Os analitos presentes no resíduo foram então ressuspensos com 100 µL da solução trietilamina a 0,1M em heptano e derivatizado com 10 µL do agente derivatizante HFBA (anidrido heptafluorbutírico) a 60°C por 20 minutos. Ao término da incubação foram adicionados 200 µL de tampão TRIS de pH 7,4. O tubo foi agitado intensamente em vórtex e posteriormente centrifugado (2200 RPM por 5 minutos). A fase orgânica (60 µL) foi transferida para um *vial* de amostrador automático e 1 µL foi injetado no cromatógrafo.

As concentrações do metilenodioxí derivados foram determinadas utilizando um cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas com

analisador do tipo *ion trap* no modo *Full Scan* de detecção. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS (5% de fenil/95% dimetilpolisiloxano), 30 m de comprimento x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme. As amostras foram injetadas no modo *splitless* e gás hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min.

As condições cromatográficas estão descritas abaixo:

- ❖ Temperatura do injetor: 250°C
- ❖ Temperatura do *trap*: 200°C
- ❖ Temperatura do *transfer line*: 230°C
- ❖ Temperatura do *manifold*: 40°C

Tabela 1 - Programação da temperatura da coluna

Temperatura inicial (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Tempo de permanência (min)	Tempo de análise (min)
70	15	2	0
280	25	3	11

A Tabela 2 apresenta os íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos.

Tabela 2 - Íons de identificação, quantificação e tempo de retenção dos analitos

Íons monitorados			
Analitos	Identificação (m/z)	Quantificação (m/z)	Tempo de retenção (min)
MDA-d5	167, 380	167	8.359
MDA	135, 162, 375	135	8.374
MDMA	162, 210, 254	254	9.014
MDEA	162, 240, 268	268	9.186

As Figuras de 5 a 8 representam os picos cromatográficos dos íons selecionados de cada analito, seguido dos respectivos espectros de massas. Nos cromatogramas podem ser observados os íons de maior abundância de cada analito que foram usados como íons de quantificação na análise das amostras.

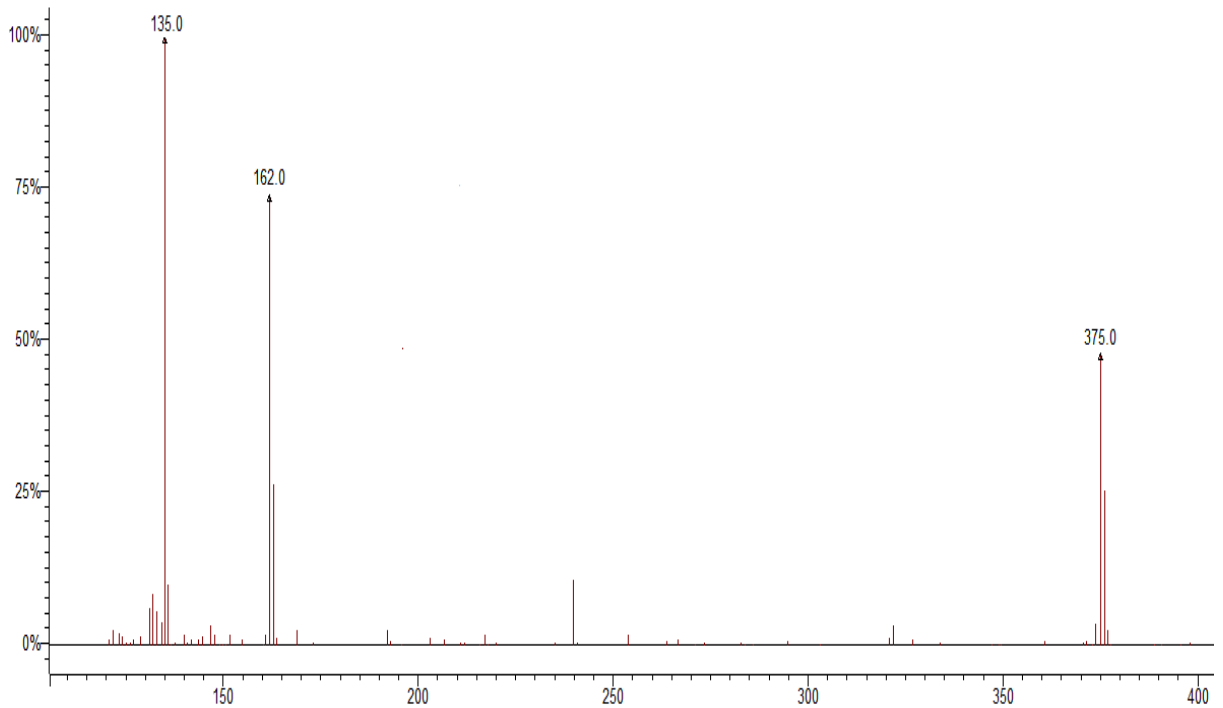
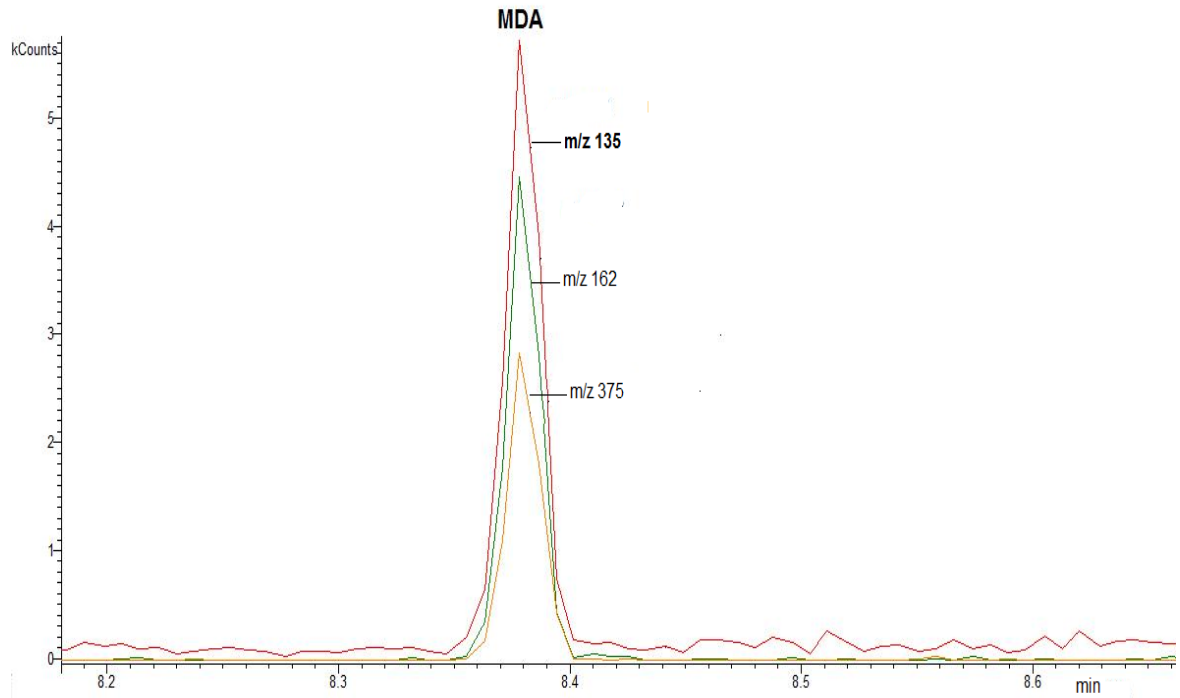


Figura 5 - Cromatograma dos íons selecionado para MDA e o seu respectivo espectro de massas.

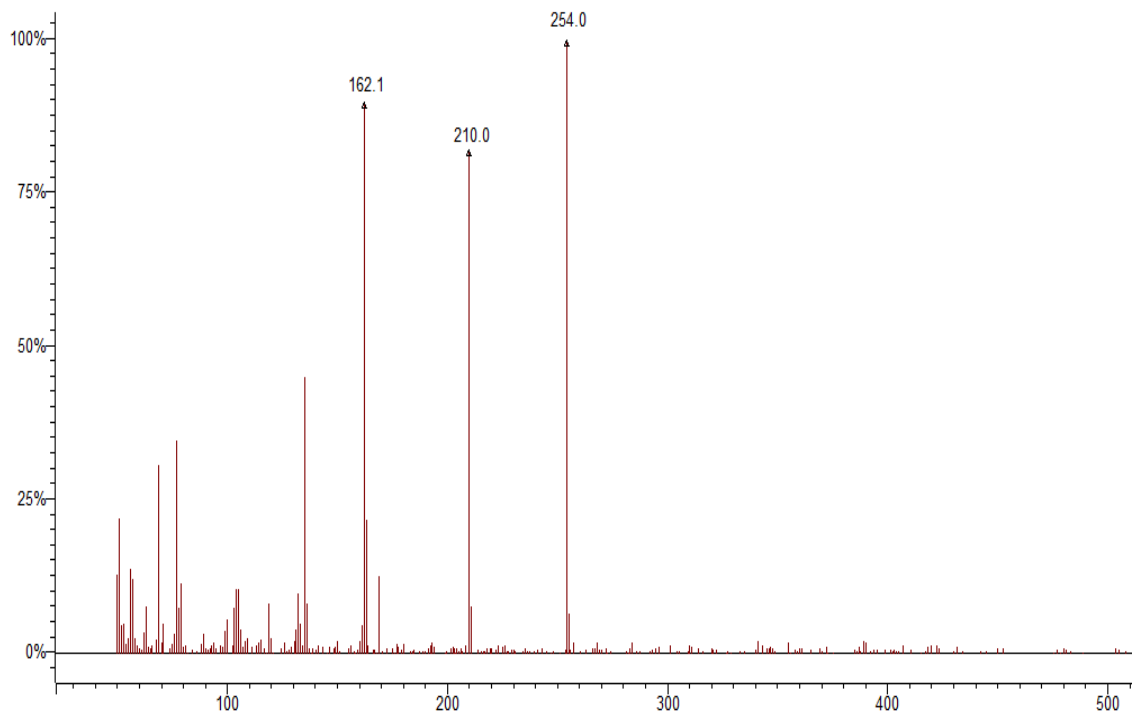
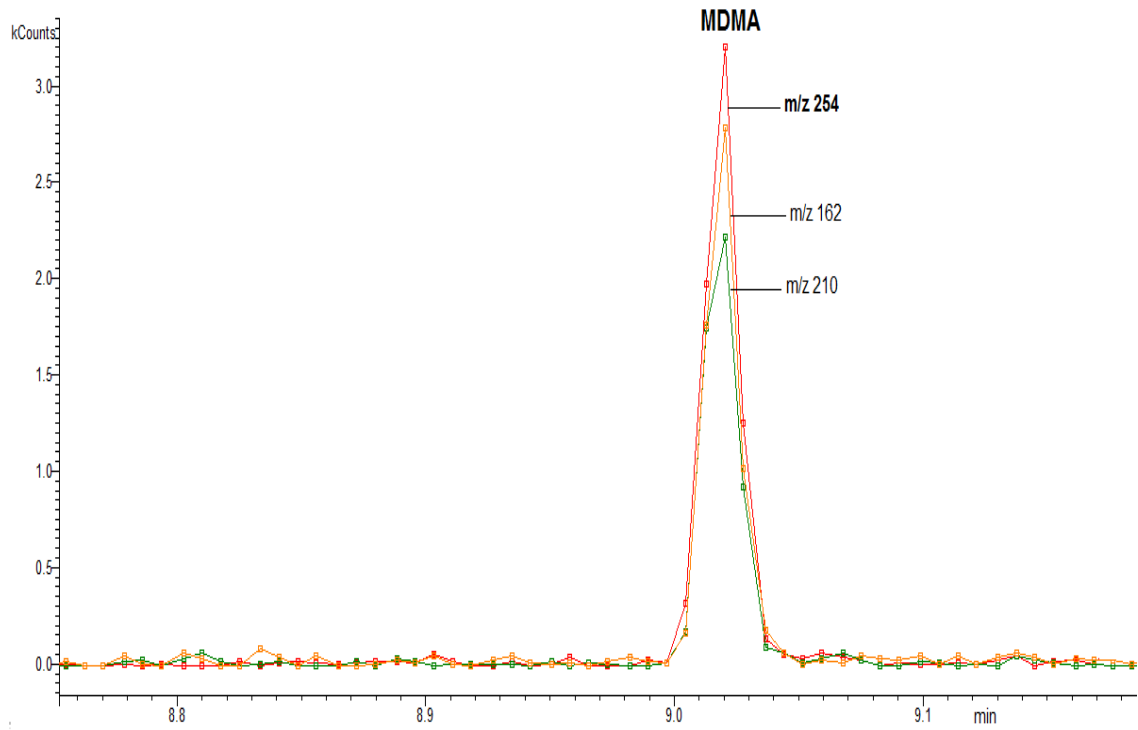


Figura 6 - Cromatograma dos íons selecionado para MDMA e o seu respectivo espectro de massas.

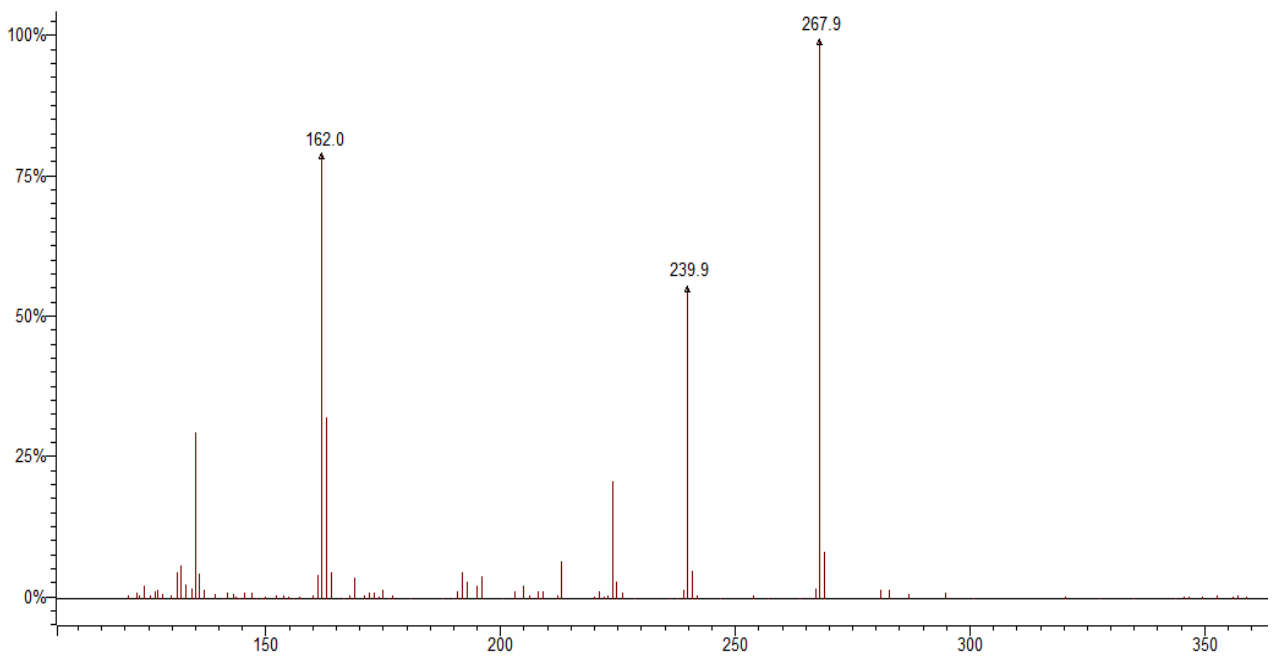
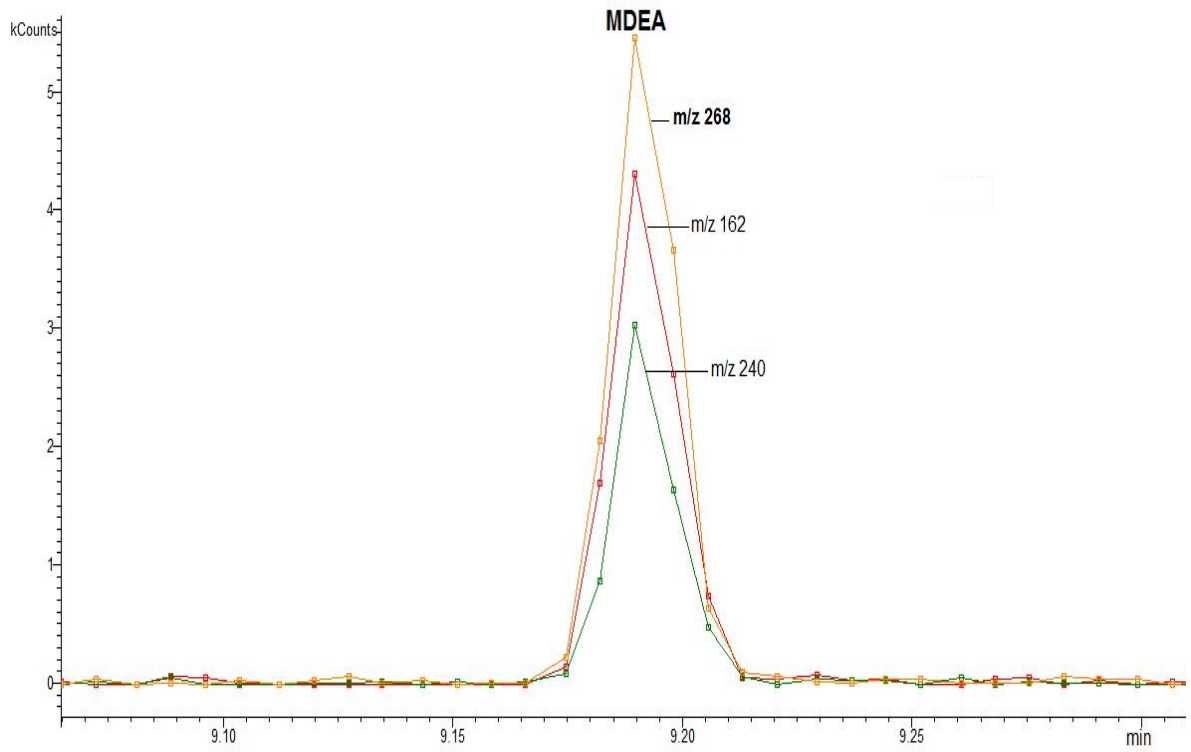


Figura 7 - Cromatograma dos íons selecionado para MDEA e o seu respectivo espectro de massas.

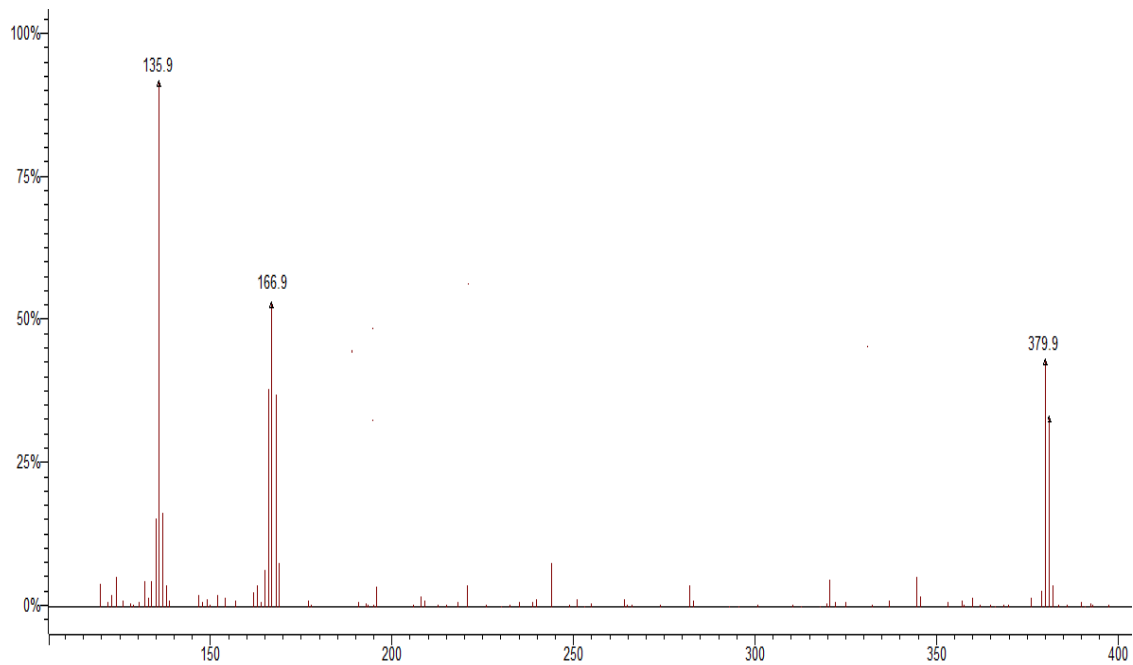
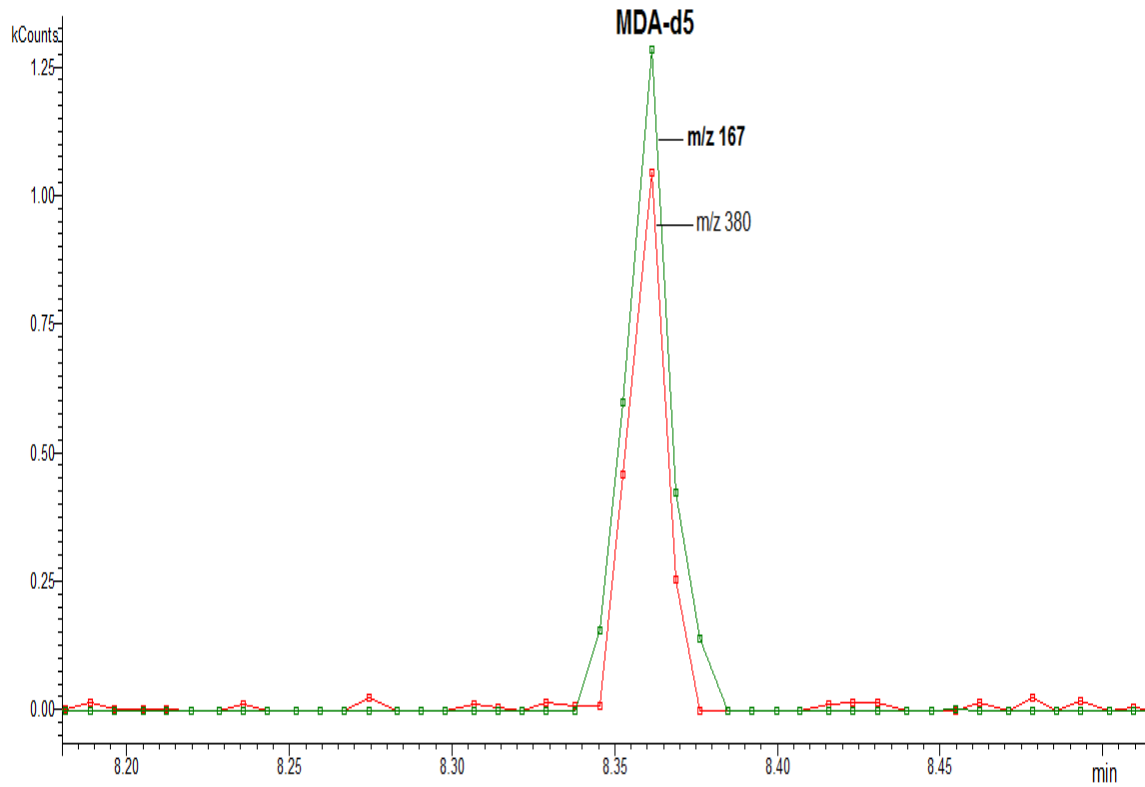


Figura 8 - Cromatograma dos íons selecionado para MDA-d5 e o seu respectivo espectro de massas.

4.6 Avaliação da substituição da matriz humor vítreo por água deionizada para a realização dos parâmetros de validação

Como a quantidade de humor vítreo disponível é pequena (aproximadamente 2 mL para cada olho), a utilização desta matriz para fortificação na realização de todos os parâmetros de validação fica bastante complicada. Assim, como a composição do humor vítreo é de aproximadamente 99% de água, decidimos por realizar alguns testes na tentativa de substituir o mesmo por água deionizada.

4.7 Curva de calibração

Após definida e otimizada a metodologia, foi estabelecida uma curva de calibração para cada analito utilizando-se 8 concentrações diferentes: 10 ng/mL, 30 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 150 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 400 ng/mL. As concentrações dos controles de qualidades (CQs) foram 25 ng/mL (baixo), 210 ng/mL (médio) e 350 ng/mL (alto) para os metilenodioxido derivados. Tanto para construção da curva como para o CQs foram utilizados 50 ng/mL de padrão interno.

Na curva de calibração, foi necessário aplicar métodos matemáticos de ponderação, neste caso foi utilizado o fator de ponderação $1/x$.

4.8 Parâmetros utilizados para a validação

Os parâmetros utilizados para validação da metodologia foram preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na RE nº 899 de 29 de maio de 2003.

4.8.1 Limite de detecção

É estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, porém não necessariamente quantificado. Deve-se estabelecer a relação sinal/ruído de 3:1 para se determinar o limite de detecção.

Para determinação deste parâmetro, amostras de humor vítreo foram fortificadas em duplicata com concentrações decrescentes de 7,5 ng/mL, 5 ng/mL,

2,5 ng/mL, 1 ng/mL. O limite de detecção foi determinado pela menor concentração que obteve razão sinal/ruído maior ou igual a três nas duas análises.

4.8.2 Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação é a menor concentração na qual os analitos podem ser detectados e quantificados com precisão de até 20% e exatidão entre 80 e 120%. O limite superior de quantificação é a maior concentração que pode ser determinada com precisão de até 15% e exatidão entre 85 a 115%.

O limite inferior de quantificação foi estabelecido através das análises de humor vítreo fortificados com concentrações decrescentes dos analitos até o menor nível quantificado e o limite superior de quantificação foi avaliado através das fortificações crescentes do humor vítreo até concentração em que todos analitos apresentaram boa linearidade em relação ao limite inferior. Ambos os valores de limite inferior e superior foram determinados dentro dos intervalos de precisão e exatidão aceitáveis, considerando-se a razão sinal/ruído de 10:1.

4.8.3 Linearidade

É a capacidade que a metodologia analítica tem de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra analisada dentro de um intervalo especificado. Neste parâmetro é construída uma curva analítica, baseada nos resultados obtidos das injeções das amostras em concentrações crescentes, no qual são calculados por meio da área do padrão dividido pela área do padrão interno. Em seguida é feita a regressão linear, a fim de observar se intervalo de concentrações dos compostos apresenta disposição linear na reta; este é calculado pelo R^2 (coeficiente de correlação linear) que quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

4.8.4 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra

homogênea, em idênticas condições de ensaio. É determinada utilizando-se, no mínimo três concentrações (baixa, média e alta), contemplando o intervalo adotado na curva de calibração de maneira uniforme, realizando-se, no mínimo, cinco determinações por concentração.

Precisão Intra-Corrida: é a concordância entre os resultados obtidos em análises dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Precisão Inter-Corridas (Precisão Intermediária): é a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo laboratório em dias diferentes, com analista diferente e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias de diferença entre as análises.

Pode ser expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%), não admitindo valores superiores a 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. O DPR pode ser calculado segundo a fórmula abaixo:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde:

DPR = Desvio Padrão Relativo

DP = Desvio Padrão

CMD = Concentração Média Determinada

4.8.5 Exatidão

É a proximidade obtida entre o resultado da análise em relação a um valor verdadeiro. É calculada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CMD}/\text{CT}) \times 100$$

Onde:

CT: Concentração Teórica

O parâmetro de exatidão é validado juntamente com a precisão, utilizando-se no mínimo três concentrações (baixa, média e alta), ao longo da faixa de variação da curva de calibração, com um mínimo de cinco determinações por concentração. Deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas). Os valores de exatidão aceitos podem variar de 80 a 120% para o limite inferior de quantificação e de 85 a 115% para os demais pontos. A exatidão da metodologia foi avaliada juntamente com a precisão, aplicando-se o cálculo nas médias das concentrações dos cinco dias de análises para cada controle de qualidade.

4.8.6 Recuperação

A recuperação avalia capacidade da metodologia de extrair o analito da amostra biológica dentro de um limite de variação. Recuperações próximas a 100% para o analito e para o padrão interno são desejáveis, embora se admita valores de recuperações menores desde que a metodologia seja precisa e exata e apresente limites de detecção e quantificação apropriados para as análises propostas.

Foi determinada comparando-se os resultados de quantificação de amostras que foram fortificadas posteriormente a extração, com os resultados de quantificação das amostras que foram fortificadas anteriormente a extração. Os padrões internos foram adicionados anteriormente à extração nas duas situações, de forma que os resultados de quantificação obtidos pudessem avaliar a capacidade do solvente de extrair os analitos do humor vítreo quando fossem comparados com uma situação que, teoricamente, equivale a 100% de eficiência de extração. A recuperação foi avaliada nos três controles de qualidade (baixo, médio e alto).

4.8.7 Especificidade

É a capacidade do método em detectar e quantificar com exatidão aceitável um analito em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de decomposição, metabólitos, medicamentos e os próprios componentes da matriz.

Este parâmetro foi determinado fortificando amostras de humor vítreo com o limite inferior de quantificação (25 ng/mL) e uma quantidade elevada (1000 ng/mL) de possíveis interferentes que possam estar presentes em situações reais de

análises. O limite inferior de quantificação não deve variar mais do que 20% quando calculado na presença dos interferentes investigados. Os interferentes analisados foram: ácido acetilsalicílico, alprazolam, benzoilecgonina, cafeína, clomipramina, clonazepam, cocaína, Δ^9 -THC, diazepam, dipirona, efedrina, fenilefrina, fluoxetina, lorazepam, nicotina, norfluoxetina, paroxetina e sertralina.

4.8.8 Estabilidade

Permite avaliar a propriedade que o analito e o método apresentam de resistir a condições normalmente exigidas durante a análise. Devem ser avaliadas as seguintes estabilidades:

Estabilidade de curta duração: A estabilidade de curta duração avalia o tempo em que o composto pode resistir à temperatura à qual normalmente está exposto sobre a bancada de análise. Foi determinada expondo uma triplicata do controle baixo por 8 horas à temperatura ambiente, analisando-as em seguida.

Estabilidade de longa duração: Avalia o tempo em que o analito pode permanecer em uma matriz biológica quando congelado a -20°C . Foi determinada após cinco semanas em que as amostras foram congeladas.

Estabilidade de congelamento e descongelamento: A estabilidade de congelamento e descongelamento avalia a capacidade do composto de resistir à degradação quando submetido a vários ciclos de congelamento e descongelamento.

Foi avaliada submetendo triplicatas dos controles baixos (25 ng/mL) e dos controles altos (350 ng/mL) a três ciclos de congelamento e descongelamento de 24 horas.

Estabilidade pós-processamento: avalia o tempo em que as amostras podem ser analisadas após preparadas. Foi determinada por meio de reinjeções das triplicatas dos controles de qualidade baixos e altos dez horas após o término da preparação destes.

4.8.9 Carry over

O parâmetro *carry over* avalia a influência de uma análise anterior no resultado da análise seguinte, devido a resquícios que podem ficar retidos em alguns componentes do cromatógrafo, como *liner*, injetor, coluna e detector. Sua

avaliação foi feita submetendo-se uma amostra extraída de humor vítreo isenta dos analitos investigados, logo após a análise do ponto mais alto (400 ng/mL) da curva de calibração.

4.9 Casuística

As amostras foram coletadas no Centro de Medicina Legal (CEMEL/FMRP/USP) durante os exames necroscópicos de vítimas fatais de acidentes de trânsito que ocupavam a posição de condutor do veículo no período de setembro a dezembro de 2010.

Os critérios de inclusão foram: ambos os sexos e idade entre 18 e 70 anos. Os critérios de exclusão foram: vítimas de mortes naturais, idade menor que 18 anos e maior que 70 anos e internação prévia.

As amostras de humor vítreo (aproximadamente 2 mL de cada olho) foram obtidas através do puncionamento com seringa no globo ocular, transportados em frascos sem anticoagulante ou conservante e armazenados a – 20°C. Após a retirada do humor vítreo, por motivos estéticos, foi introduzida água para a reconstituição do volume ocular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados de cada parâmetro utilizado para a otimização e validação do método.

5.1 Separação cromatográfica geral dos analitos

A Figura 9 representa a separação cromatográfica dos analitos em uma amostra de humor vítreo fortificada com 100 ng/mL de metilenodioxido derivados (**9a**) e 50 ng/mL de padrão interno MDA-d5 (**9b**) para observação do sinal e seus respectivos tempos de retenção.

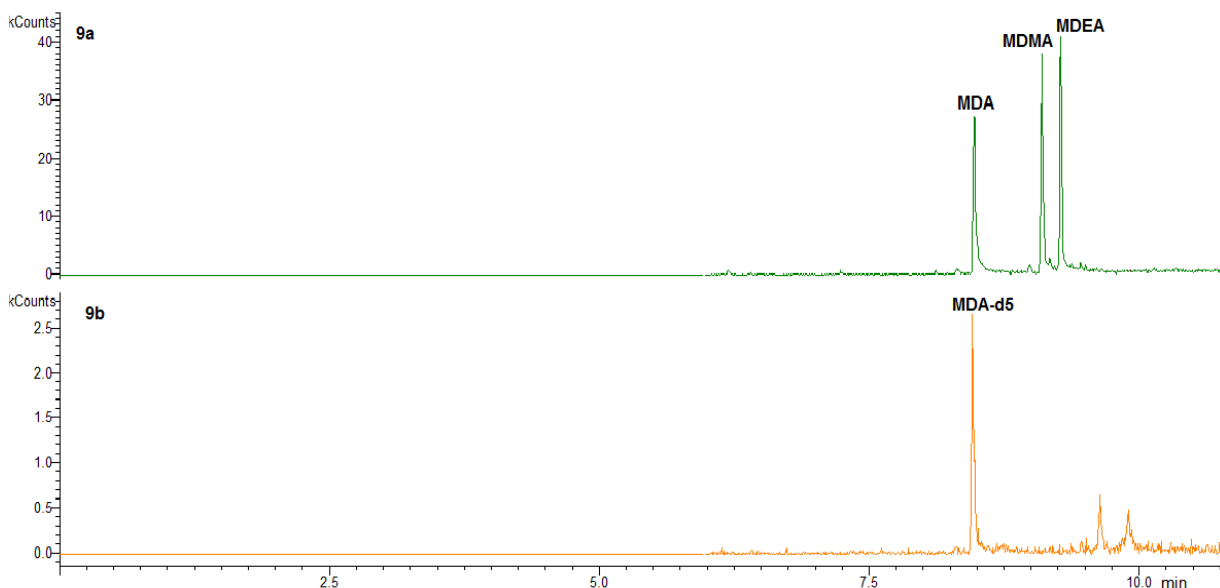


Figura 9 - Cromatograma de uma amostra de humor vítreo fortificada com 100 ng/mL de metilenodioxido derivados (**9a**) e 50 ng/mL de padrão interno MDA-d5 (**9b**)

5.2 Análise da amostra branca (isenta dos analitos pesquisados)

A Figura 10 representa um cromatograma de uma amostra de humor vítreo branca (isenta dos analitos pesquisados), comprovando que a matriz biológica não apresenta nenhum componente endógeno interferindo nos tempos de retenção dos analitos estudados.

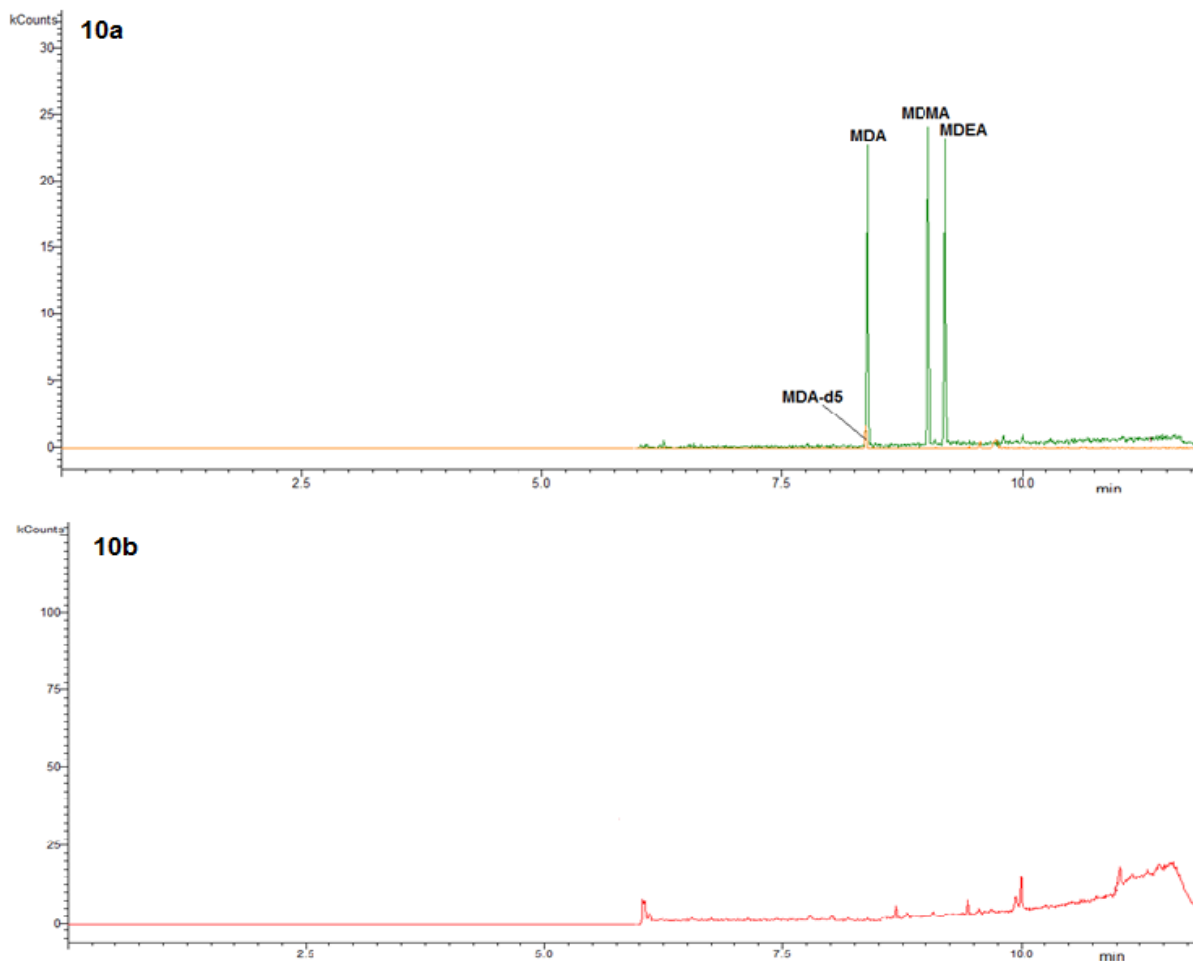


Figura 10 - Cromatogramas de uma amostra fortificada com 100 ng/mL de metilendioxi derivados e 50 ng/mL do padrão interno MDA-d5 (10a) e amostra de humor vítreo branco (isenta dos analitos pesquisados) (10b)

5.3 Avaliação da substituição da matriz humor vítreo por água deionizada para a realização dos parâmetros de validação

A Figura 11 apresenta amostras de humor vítreo (10a) e água deionizada (10b) fortificadas com os padrões dos metilendioxi derivados e padrão interno MDA-d5. Pode ser observado que não há diferenças entre os cromatogramas, indicando que a amostra de humor vítreo pode ser substituída por água deionizada nas etapas de validação do método (preparação e extração das amostras). O uso da água deionizada para validação do método apresentou-se como uma boa alternativa para o baixo volume de matriz.

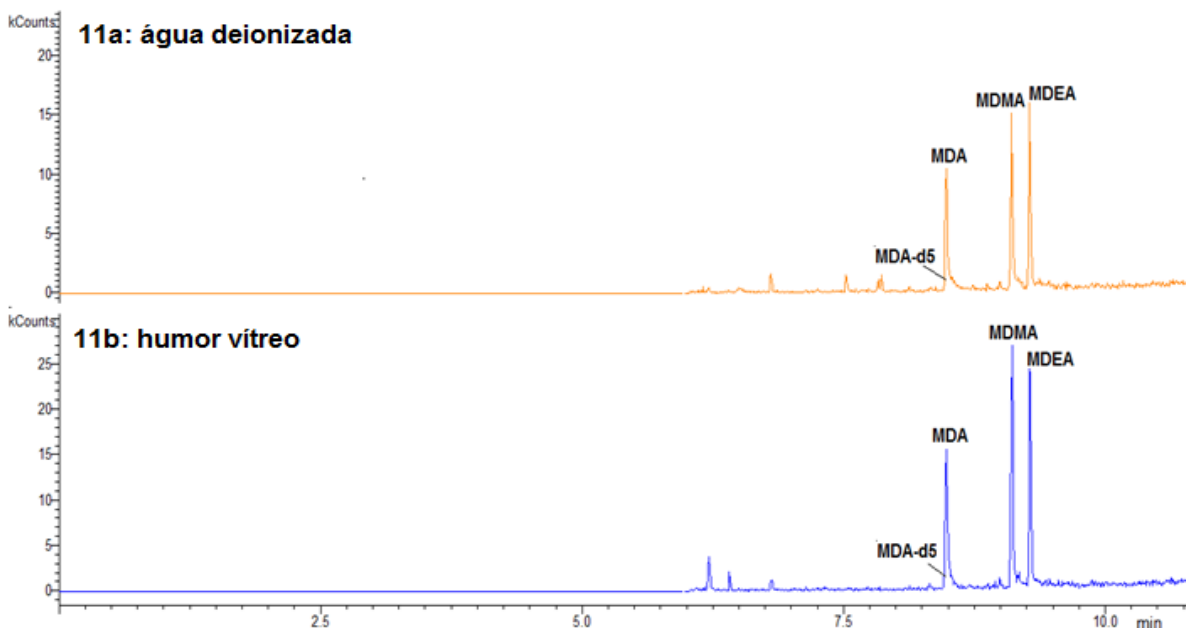


Figura 11 - Cromatogramas da água deionizada (11a) e humor vítreo (11b) fortificadas com 100 ng/mL de padrões de metilenodioxo derivados e 50 ng/mL de padrão interno MDA-d5

5.4 Limites de detecção e quantificação

Os valores determinados para limite de detecção (LD), limite inferior (LIQ) e superior de quantificação (LSQ) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Limite de Detecção (LD), Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e Limite Superior de Quantificação (LSQ)

Analito	LD (ng/mL)	LIQ (ng/mL)	LSQ (ng/mL)
MDA	2,5	10	400
MDMA	1	10	400
MDEA	1	10	400

No método desenvolvido por Clauwaert et al. (2000), que consiste na administração intravenosa de 1mg/kg dos metilenodioxo derivados em coelhos e análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC), os valores de LD e LIQ dos metilenodioxo derivados encontrados em amostras de humor vítreo foram 0,8 ng/mL e 2 ng/mL respectivamente, para todos os analitos. O presente trabalho apresentou valores de LD próximos aos encontrados por Clauwaert e colaboradores.

5.5 Linearidade

A linearidade do método demonstrou a homogeneidade de variância no intervalo de concentrações de 10 ng/mL a 400 ng/mL para todos os analitos e o R^2 para o MDA, MDMA e MDEA foi de 0,9992, 0,9990 e 0,9994 respectivamente.

Clauwaert et al. (2000) obtiveram uma linearidade na faixa de 2 ng/mL a 1000 ng/mL para todos os analitos e valores de R^2 para o MDA, MDMA e MDEA na faixa entre 0,9970-0,9977, 0,9978-0,9992 e 0,9969-0,9997 respectivamente.

As Figuras de 12 a 14 representam as curvas de calibração. No qual podemos observar a linearidade. O eixo Y representa a razão entre a área do padrão pela área do padrão interno e o eixo X representa a concentração do analito expressa em nanogramas por mL de humor vítreo.

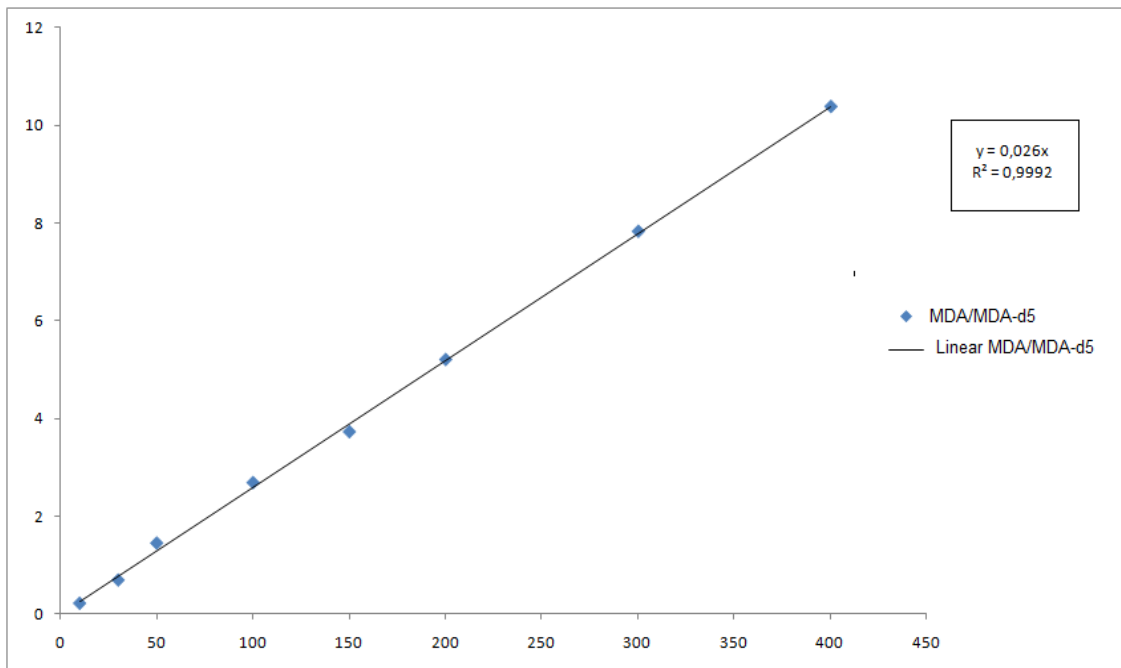


Figura 12 - Linearidade obtida pela análise cromatográfica de uma amostra fortificada com padrão de MDA no intervalo de 10ng/mL a 400 ng/mL.

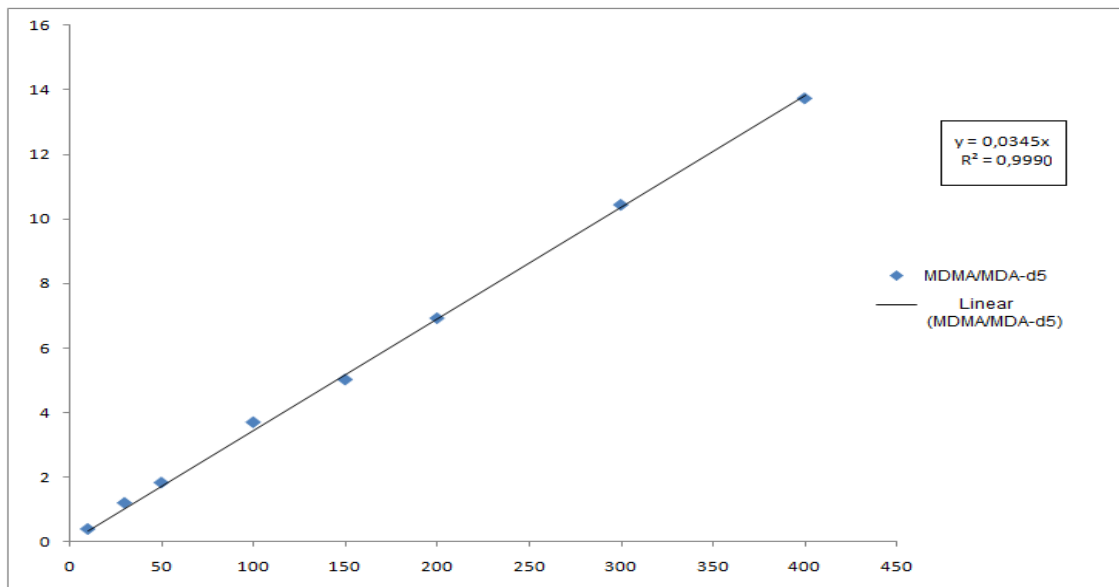


Figura 13 - Linearidade obtida pela análise cromatográfica de uma amostra fortificada com padrão de MDMA no intervalo de 10ng/mL a 400 ng/mL.

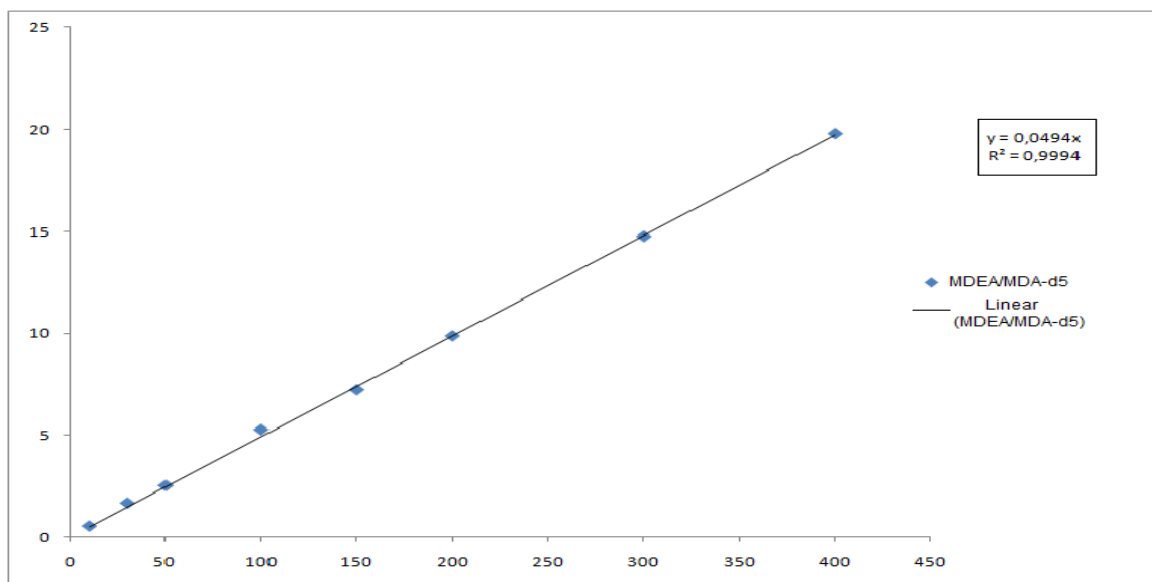


Figura 14 - Linearidade obtida pela análise cromatográfica de uma amostra fortificada com padrão de MDEA no intervalo de 10ng/mL a 400 ng/mL.

5.6 Precisão

As análises foram realizadas em cinco dias alternados. As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores médios de precisão intra-ensaio e inter-ensaio, respectivamente. A precisão intra-ensaio obtida para todos os analitos apresentou

uma variação de 4,54% a 9,14%, sendo o menor valor correspondente ao CQ2 do MDA e o maior valor correspondente ao CQ1 do MDEA. Para precisão inter-ensaio os valores médios encontrados variaram de 6,92% encontrado para o CQ3 do MDA e 10,59% para o CQ1 do MDMA. Todos os valores se encontram dentro dos limites de variação aceitáveis preconizados pela ANVISA, sendo para o CQ1 (baixo) até 15% e de até 20% para os CQ2 (médio) e CQ3 (alto).

Tabela 4 - Valores de precisão intra-ensaio (%)

Controles	MDA	MDMA	MDEA
CQ1	7,83	6,15	9,14
CQ2	8,12	7,01	5,82
CQ3	4,54	8,99	6,82

Tabela 5 - Valores de precisão inter-ensaio (%)

Controles	MDA	MDMA	MDEA
CQ1	8,35	10,59	7,43
CQ2	7,59	7,64	7,93
CQ3	6,92	7,80	8,49

Clauwaert et al. (2000) determinaram uma precisão intra ensaio de 6.7%-10%, sendo menor para o MDEA e inter ensaio 16%-19% sendo o menor para MDA.

5.7 Exatidão

Nos cinco dias de análises, os controles de qualidades foram quantificados dentro dos limites de variação aceitáveis, sendo 80% a 120% para os controles inferiores (CQ1) e de 85% a 115% para os controles intermediários (CQ2) e controles superiores (CQ3). Os valores da exatidão variaram de 97,01% para o valor intermediário (CQ2) do MDA a 103,76% para o valor superior (CQ3) do MDA. A Tabela 6 apresenta os valores médios de exatidão obtidos para os três controles de qualidade.

Tabela 6 - Valores de exatidão (%)

Controles	MDA	MDMA	MDEA
CQ1	99,76	99,76	98,04
CQ2	97,01	98,79	99,01
CQ3	103,76	100,71	97,95

5.8 Recuperação

Os valores médios de recuperação dos analitos variaram entre 57,87% para o MDMA e 63,50% para o MDA.

Como descrito no item 4.8.6, recuperações próximas a 100% são desejáveis, mas admitem-se valores menores, desde que a metodologia seja precisa e exata, e os limites de identificação e quantificação estejam apropriados para as análises propostas. A metodologia desenvolvida apresentou-se precisa (item 4.8.4) e exata (item 4.8.5) e com limites apropriados. A Tabela 7 mostra os valores obtidos da recuperação para os 3 controles de qualidades de todos os compostos.

Tabela 7 - Valores de recuperação (%)

Controles	MDA	MDMA	MDEA
CQ1	47,22	44,48	43,64
CQ2	81,52	62,72	66,41
CQ3	61,78	66,41	73,49
Média	63,50	57,87	61,18

Clauwaert et al. (2000), determinaram uma recuperação de 95,5% - 104,4%, essa diferença pode ter ocorrido devido a diferenças na realização do método e também no modo de análise com diferentes aparelhos utilizados.

5.9 Especificidade

A Tabela 8 apresenta os valores dos controles inferiores na presença dos possíveis interferentes. Alguns destes interferentes têm sido encontrados com muita frequência em análises de *ecstasy*, principalmente os analgésicos para aliviar o uso pós efeito. Todos os controles inferiores mantiveram exatidões aceitáveis (variações até 20% do CQ1) na presença dos interferentes.

Tabela 8 - Valores de especificidade (valores aceitáveis 20 ng/mL- 30ng/mL ou 80%-120%)

INTERFERENTES	MDA (ng/mL)	MDA (%)	MDMA (ng/mL)	MDMA (%)	MDEA (ng/mL)	MDEA (%)
AAS	24,4	97,6	23,15	92,6	26,78	92,6
ALPRAZOLAM	25,49	101,96	26,47	105,88	26,91	105,88
BENZOILECGONINA	27,04	108,16	25,58	102,32	22,88	102,32
CAFEÍNA	22,38	89,52	22,52	90,08	22,07	90,08
CLOMIPRAMINA	25,49	101,96	24,34	97,36	23,84	97,36
CLONAZEPAM	25,25	101	24,21	96,84	20,65	96,84
COCAÍNA	25,56	102,24	24,81	99,24	25,87	99,24
DELTA 9 THC	25,09	100,36	25,69	102,76	24,33	102,76
DIAZEPAM	25,88	103,52	23,18	92,72	23,65	92,72
DIPIRONA	23,55	94,2	25,88	103,52	22,51	103,52
EFEDRINA	26,11	104,44	21,3	85,2	24,88	85,2
FELINEFRINA	25,95	103,8	26,92	107,68	26,74	107,68
FLUOXETINA	20,76	83,04	26,82	107,28	21,58	107,28
LORAZEPAM	25,32	101,28	22,09	88,36	25,03	88,36
NICOTINA	25,57	102,28	27,83	111,32	26,67	111,32
NORFLUOXETINA	20,51	82,04	24,02	96,08	27,18	96,08
PAROXETINA	28,73	114,92	27,76	111,04	21,87	111,04
SERTRALINA	23,23	92,92	23,51	94,04	27,92	94,04

5.10 Estabilidade

Os experimentos realizados para avaliar as estabilidades, não demonstraram perdas significativas durante os períodos estipulados. As Tabelas de 9 a 11 apresentam as concentrações médias dos três controles de qualidade baixos (25 ng/mL) e três altos (350 ng/mL) com seus respectivos coeficientes de variação (C.V) e valores de exatidão.

5.10.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi analisada após exposição das amostras à temperatura ambiente por oito horas. A Tabela 9 apresenta os valores obtidos para os controles baixos (25 ng/mL) que variaram de 94,24% para MDMA e 99,16 % para

MDA e para os controles altos (350 ng/mL) variaram de 95,50% para o MDMA e 98,10% para MDEA.

Tabela 9 - Valores de estabilidade de curta duração

Analito	25 ng/mL	C.V	Exatidão (%)	350 ng/mL	C.V	Exatidão (%)
MDA	24,79	4,60	99,16	334,25	2,29	95,50
MDMA	23,56	6,01	94,24	342,36	6,30	97,81
MDEA	24,53	10,03	98,12	343,35	1,70	98,10

5.10.2 Estabilidade de longa duração

Para análises de estabilidade de longa duração, os compostos foram armazenados no freezer a -20°C por cinco semanas. A Tabela 10 apresenta os valores obtidos que variaram de 97,56% para o MDA à 109,80% para o MDEA nos controles baixos (25 ng/mL) e 89,64% para o MDMA à 103,47% para o MDEA nos controles altos (350 ng/mL).

Tabela 10 - Valores da estabilidade de longa duração

Analitos	25 ng/mL	C.V	Exatidão (%)	350 ng/mL	C.V	Exatidão (%)
MDA	24,39	5,22	97,56	323,29	5,96	92,36
MDMA	21,57	3,91	86,28	313,75	5,40	89,64
MDEA	27,45	6,74	109,80	362,16	3,05	103,47

5.10.3 Estabilidade de congelamento e descongelamento

Triplicatas dos controles baixos (25 ng/mL) e dos controles altos (350 ng/mL) foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento de 24 horas. Na Tabela 11 observa-se que os valores variaram de 89,64% a 91,80% para os controles baixos (25 ng/mL) e de 94,28% a 100,69% para os controles altos (350 ng/mL)

Tabela 11 - Valores da estabilidade de congelamento e descongelamento

Analito	25 ng/mL	C.V	Exatidão (%)	350 ng/mL	C.V	Exatidão (%)
MDA	22,95	11,21	91,80	336,67	7,25	96,19
MDMA	21,88	13,5	87,52	329,98	6,06	94,28
MDEA	22,41	7,28	89,64	352,44	8,61	100,69

5.10.4 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi determinada injetando novamente triplicatas dos controles de qualidade baixos e altos dez horas após o término das preparações destes. A Tabela 12 apresenta os valores médios que variaram de 87,52% para MDEA e de 100,04% para MDMA nos controles baixos (25 ng/mL) e de 102,01% para MDEA e de 103,43 para MDMA nos controles altos (350 ng/mL).

Tabela 12 - Valores da estabilidade pós-processamento

Analitos	25 ng/mL	C.V	Exatidão (%)	350 ng/mL	C.V	Exatidão (%)
MDA	22,87	1,20	91,48	359,26	3,03	102,64
MDMA	25,01	10,23	100,04	362,02	3,49	103,43
MDEA	21,88	13,24	87,52	357,02	6,93	102,01

De Letter et al, (2000) publicaram que a 2°C por 25 horas o MDMA apresentou-se estável e que em 17°C por 73 horas apresentou uma elevação na concentração que pode ser explicada pela evaporação ocorrida, neste artigo foi demonstrado que o humor vítreo é muito mais estável e representativo do que sangue em caso de intervalo prolongado *postmortem*.

O estudo de Clauwaert et al. (2001), que avaliou a estabilidade dos metilenodioxí derivados em água deionizada, apresentou na análise de curta duração (quatro dias) um coeficiente de variação para MDA, MDMA e MDEA de 10,3%, 6,43% e 14,5% respectivamente para o CQ1 e valores de 5,43%, 9,39% e 7,92%, respectivamente, para o CQ3. Na análise de longa duração (21 semanas) foi obtido valores de 10,2%, 11,7% e 16,3% para os controles baixos e 5,03%, 5,23% e 5,17% para os controles altos.

5.11. Carry over

Este parâmetro foi realizado injetando uma amostra livre dos analitos após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração (400 ng/mL). Não foi observado o efeito de *carry over* relativo aos analitos.

5.12 Aplicações da metodologia na análise de humor vítreo em vítimas fatais (motoristas) envolvidas em acidentes de trânsito.

Foram coletadas 12 amostras de humor vítreo de vítimas fatais de acidentes de trânsito (motoristas), coletadas no CEMEL (Centro de Medicina Legal de Ribeirão Preto) no período de setembro a dezembro de 2010.

Nestes meses morreram de acidente de trânsito 53 pessoas. A justificativa para o baixo número de amostras coletadas está relacionada aos critérios de exclusão do projeto, que não contemplava a amostragem em crianças e idosos fora da faixa etária pesquisada, vítimas com internação prévia (infusão de soro fisiológico, dilui a droga, podendo gerar um resultado falso) e, a falta de dados nos boletins de ocorrências da polícia, que dificultava a identificação do condutor do veículo nos casos de acidentes envolvendo muitas vítimas fatais.

A amostra de número 9 foi considerada positiva para o MDMA, porém, não foi possível a quantificação, pois sua concentração estava abaixo dos limites determinados para o método validado.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O método simples, rápido e de baixo custo utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas demonstrou ser sensível e específico para determinação e quantificação de metilenodioxi derivados.

O humor vítreo demonstrou ser uma matriz simples, de fácil coleta e manuseio, boa estabilidade devido a sua localização anatômica, pois está menos susceptível a influências de microorganismos, sendo uma amostra útil em caso de análise com um amplo intervalo *postmortem*.

A metodologia desenvolvida pode ser incorporada às análises de rotina, com o objetivo de determinar com segurança o uso de metilenodioxi derivados por vítimas fatais de acidentes de trânsito.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; SILVA, M. T. A. Histórico, efeitos e mecanismo de ação do êxtase (3-4 metilendioxi metanfetamina): revisão da literatura. **Rev. Panam. Salud Públ.**, Washington, v. 8, n. 6, p. 393-402, 2000.
- BAZZARELA, R. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica para investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.** 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- BERMEJO, A. M.; RAMOS, I.; FERNANDEZ, P.; LOPEZ-RIVADULLA, M.; CRUZ, A.; CHIAROTTI, M.; FUCCI, N.; MARSILLI, R. Morphine determination by gas chromatography/mass spectroscopy in human vitreous humor and comparison with radioimmunoassay. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 16, p. 372-374, 1992.
- CAZENAVE, S. O. S. Alucinógenos. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 4.9, p. 320-332.
- CHASIN, A. A. M.; SILVA, E. S.; CARVALHO, V. M. Estimulantes do sistema nervoso central. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 4.3, p. 355-374.
- CLAUWAERT, K. M.; BOCXLAER, J. F. V.; DE LETTER, E. A.; CALENBERGH, S. V.; LAMBERT, W. E.; LEENHEER, A. P. Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor and urine. **Clin. Chem**, Baltimore, v. 46, n. 12, p. 1968-1977, 2000.
- COLE, J. C.; SUMNALL, H. R. Altered states: the clinical effects of ecstasy. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 98, p. 35-58, 2003a.
- COLE, J. C.; SUMNALL, H. R. The pre-clinical behavioral pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA). **Neurosci. Biobehav. Rev.**, New York, v. 27, p. 199-217, 2003b.
- CONCHEIRO, M.; CASTRO, A.; QUINTELA, O.; LÓPEZ-RIVADULLA, M.; CRUZ, A. Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v. 50, p. 221-226, 2005.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE MUNICÍPIOS (CNM). **Mapeamento das mortes por acidentes de trânsito no Brasil.** 2009. p. 1-23. Disponível em: <<http://www.portaldotransito.com.br/estatisticas/mapeamento-das-mortes-por-acidentes-de-transito-no-brasil.html>>. Acesso em: mar. 2011.

COSTA, J. L. Características das amostras convencionais e não convencionais. In: MOREA, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 4, p. 40-45.

COSTA, J. L.; PINTAO, E. R.; CORRIGLIANO, C. M. C.; NEGRINI NETO, O. Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de *ecstasy* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 965-969, 2009.

CRISAFI, J.; LONG, C. Traffic fatality related to the use of methylenedioxymethamphetamine. **J. Forensic Sci.**, Chicago, v. 41, p. 1082-1084, 1996.

DAMS, R.; DE LETTER, E. A.; MORTIER, K. A.; CORDONNIER, J. A.; LAMBERT, W. E.; PIETTE, M. H. A.; VAN CALENBERGH, S.; DE LEENHEER, A. P. Fatality due to combined use of the designer drugs MDMA and PMA: a distribution study. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 27, p. 318-322, 2003.

DECAESTECKER, T.; DE LETTER, E. A.; CLAUWAERT, K. M.; BOUCHE, M. P.; LAMBERT, W.; VAN BOCXLAER, J.; PIETTE, M.; VAN DEN EECKHOUT, E.; VAN PETEGHEM, C.; DE LEENHEER, A. Fatal 4-MTA intoxication: development of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for multiple matrices. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 25, p.705-710, 2001.

DE LETTER, E. A.; DE PAEPA, P.; CLAUWAERT, K. M.; BELPAIRE, F. M.; LAMBERT, W. E.; BOCXLAER, J. F. V.; PIETTE, M. H. A. Is vitreous useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood levels? **Int J Legal Med** Heidelberg, v 114, p. 29-35, 2000.

DE LETTER, E. A.; CLAUWAERT, K. M.; BELPAIRE, F. M.; LAMBERT, W. E.; BOCXLAER, J. F. V.; PIETTE, M. H. A. *Postmortem* redistribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") in the rabbit. Part one: Experimental approach after in vivo intravenous infusion. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v. 116, p. 216-224, 2002.

DE LETTER, E. A.; BOUCHE, M. P. L. A.; BOCXLAER, J. F. V.; LAMBERT, W. E.; PIETTE, M. H. Interpretation of a 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities. **Forensic Sci. Int.**, Heidelberg, v. 141, n. 2-3, p. 85-90, 2004.

DE MARTINIS, B. S.; BARNES, A.; SCHEIDWEILER, K.; HUESTIS, M. Development and validation of a disk solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry method for MDMA, MDA, HMMA, HMA, MDEA, methamphetamine and amphetamine in sweat. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.** Amsterdam, v. 852, p. 450-458, 2007.

DE MARTINIS, B. S. Sweat as an alternative matrix for amphetamines and methylenedioxy derivatives analysis. **Curr. Pharm. Anal.**, Baltimore, v. 4, p. 274-278, 2008.

DORNAN, W. A.; KATZ, J. L.; RICAURTE, G. A. The effects of repeated administration of MDMA on the expression of sexual behaviour in the male rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.** Phoenix, v. 39, p. 813-816, 1991.

ELLIOTT, S.; WOOLACOTT, H.; BRAITHWAITE, R. The prevalence of drugs and alcohol found in road traffic fatalities: a comparative study of victims. **Sci. Justice**, Harrogate, v. 49, p. 19-23, 2009.

FERNÁNDEZ, P.; ALDONZA, M.; BOUZAS, A.; LEMA, M.; BERMEJO, A. M.; TARBENEIRO, M. J. GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. **J. Appl. Toxicol.**, Philadelphia, v. 26, p. 253-257, 2006.

FURNARI, C.; OTTAVIANO, V.; SACCHETT, I. G.; MANCINI, M. A. fatal case of cocaine poisoning in a body packer. **J Forensic Sci.** Chicago, v. 47, p. 208-210, 2002.

GALLARDO, E.; QUEIROZ, J. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **Biomed. Chromatogr.**, London, v. 8, p. 795-821, 2008.

GIMENO, P.; BESACIER, F.; CHAUDRON-THOZET, H. Optimization of extraction parameter for the chemical profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets. **Forensic Sci. Int.**, Limerick, v. 132, p. 182-194, 2003.

GREENE, S. L.; KERR, F.; BRAITBERG, G. Review article: Amphetamines and related drugs of abuse. **Emerg. Med. Australas.**, Wes Melbourne, Victoria, v. 20, n. 5, p. 391-402, 2008.

GREER, G. R.; TOLBERT, R. A method of conducting therapeutic sessions with MDMA. **J. Psychoactive Drugs**, San Francisco, v. 30, n. 4, p. 371-379, 1998.

HEGADOREN, K.; BAKER, G.; BOURIN, M. 3, 4-methylenedioxy analogues of amphetamine: Defining the risks to humans. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, New york v. 23, p. 539-553, 1999.

KALANT, H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. **CMAJ.** Ottawa, v. 165, n. 7, p. 917-928, 2001.

KAKAANPÄÄ, A.; GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P.; MYKÄÄNEN, S.; SEPPÄLÄ, T.; Single-step procedure for gas chromatography-mass spectrometry screening and quantitative determination of Amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 810, p. 57-68, 2004.

KINTZ, P.; SAMYN, N. Determination of "Ecstasy" components in alternative biological specimens. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 733, p. 137-143, 1999.

KOLBRICH, E. A.; GOODWIN, R. S.; GORELICK, D. A.; HAYES, R. J.; STEIN, E. A.; HUESTIS, M. A. Physiological and subjective responses to controlled oral and 3,4

methylenedioxymethamphetamine administration. **J. Clin Psychopharmacol.** Baltimore, v. 28, p. 432-40, 2008.

LASMAR, M. C.; LEITE, E. M. A. Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico em fase gasosa para análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina (*ecstasy*) e outros derivados anfetamínicos em comprimidos. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 223-230, 2007.

LANDRY, M. J. MDMA: a review of epidemiological data. **J Psychoactive Drugs**, San Francisco, v. 34, p. 163–169, 2002.

LAPACHINSKE, F. S; YONAMINE, M.; MOREAU, R. L. M. Validação de método para determinação de 3,4 metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de *ecstasy* por cromatografia em fase gasosa. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 75-83, 2004.

LEVINE, B. S.; JUFER, R. A. Drugs of abuse testing in vitreous humor. In: JENKINS, A. J. (Ed.). **Drug testing in alternate biological specimens**. Pinesville: Human Press, 2008. cap. 7. p. 117-128.

LIN, D. L.; LIN, R. L. Distribution of 11- Nor- 9- Carboxy-9-tetrahydrocannabinol in Traffic Fatality Cases. **J. Anal. Toxicol.** Niles v. 29, p. 201-203, 2005.

MAURER, H. H.; BICKEBOELLER-FRIEDRICH, J.; KRAEMER, T; PETERS, F. T. Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy'). **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 112-113, p. 133-142, 2000.

MACKEY-BOJACK, S.; KIOSS, J.; APPLE, F. Cocaine, cocaine metabolite, and ethanol concentrations in postmortem blood and vitreous humor. **J. Anal. Toxicol.** Niles, v. 24, p. 59-65, 2000.

NICHOLS, D. E. Differences between the mechanisms of action of MDMA, MDD and the classical hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. **J. Psychoactive Drugs**, San Francisco, v. 18, p. 305–313, 1986.

PARROT, A. C. MDMA (3, 4-Methylenedioxymethamphetamine) or Ecstasy: the neuropsychobiological implications of taking it at dances and raves. **Neuropsychobiology**, Basel, v. 50, p. 329-335, 2004.

PONCE, J. C.; LEYTON, V. Drogas ilícitas e trânsito: problema discutido no Brasil. **Rev. Psiquiatr. Clin.** São Paulo, v. 35, p. 65-69, 2008.

PUBCHEM COMPOUND. **Mescaline**. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pccompound&term=mescaline>. Acesso em: mar. 2011.

PUJADAS, M.; PICHINI, S.; POUDEVIDA, S.; MENOYO, E.; ZUCCARO, P.; FARRÉ, M.; TORRE, R. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, methamphetamine and

methylenedioxy derivatives. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 798, p. 249-255, 2003.

RIORDAN-EVA, P. Anatomia e embriologia do olho. In: VAUGHAN, D.; ASBURY, T.; RIORDAN-EVA, P. **Oftalmologia geral**. 15. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 1, p. 1-26.

SCHEIDWEILER, K. B.; HUESTIS, M. A. A validated gas chromatographic–electron impact ionization mass spectrometric method for methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and metabolites in oral fluid. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 835, p. 90–99, 2006.

SIMANTOV, R. Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). **Life Sci.**, Oxford, v. 74, p. 803-814, 2004.

SNOW, N. H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 885, p. 445-455, 2000.

STEELE, T. D.; MCCANN, U. D.; RICAURTE, G. A. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans. **Addiction**, Oxford, v. 89, p. 539-551, 1994.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **World drug report 2010**. Viena: United Nations Publication Sales, 2010. 307 p.

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais**. 2004. 126 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VILLAMOR, J. L.; BERMEJO, A. M.; FERNANDÉZ P.; TABERNERO, M. J. A new CG-MS method for the determination of Five amphetamines in human hair. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 29, p. 135-139, 2005.

XAVIER, C. A. C.; LOBO, P. L. D.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Êxtase (MDMA): efeitos farmacológicos e tóxicos, mecanismo de ação e abordagem clínica. **Rev. Psiquiatr. Clín**, São Paulo, v. 35, p. 96-103, 2007.

WILLS, S. Amphetamines and *ecstasy*. In: _____. **Drugs of abuse**. 3rd ed. Cambridge: The Pharmaceutical Press, 2002. cap. 6, p. 61-77.

ZHAO, H.; BRENNEISEN, R.; SCHOLER, A.; MCNALLY, A. J.; ELISOHLY, M. A.; MURPHY, T. P.; SALAMONE, S. J. Profiles of urine samples taken from ecstasy users at rave parties: analysis by immunoassays, HPLC, and GC–MS. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 25, p. 258-269, 2001.