UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de
anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em
fase gasosa acoplada a espectrometria de massas**

Rafael Barcellos Bazzarella

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

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

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Rafael Barcellos Bazzarella
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Ribeirão Preto

2010

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

Barcellos Bazzarella, Rafael

Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Ribeirão Preto, 2010.

82 p. : Il. ; 30 cm

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

Orientador: Bruno Spinosa De Martinis

1. Anfetaminas, 2. Saliva, 3. Cromatografia em fase gasosa

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Rafael Barcellos Bazzarella

Título do trabalho: Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

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: _____

RESUMO

O uso de drogas estimulantes por motoristas é reconhecidamente responsável por um aumento significativo na quantidade de acidentes nas estradas e rodovias. A própria exigência do trabalho muitas vezes acaba direcionando-os para a busca de algo que lhes proporcione maior estado de vigília e atenção nas estradas. Com base na importante correlação entre a profissão e o uso de substâncias anfetamínicas, foi proposta uma metodologia analítica para a determinação de anfetamina, metanfetamina, 3,4 – metilenodioxianfetamina, 3,4 – metilenodioximetanfetamina e 3,4 – metilenodioxietilanfetamina em amostras de saliva através de técnica de extração líquido-líquido e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Para o desenvolvimento do método foi utilizado 1 mL de saliva, extração líquido-líquido com o solvente acetato de etila, derivatização com anidrido heptafluorobutírico (HFBA) e detecção com GC-MS. A metodologia foi validada e demonstrou linearidade de 10 a 400 ng/mL de saliva para todos os compostos. Os limites de detecção estabelecidos se encontraram entre 2,5 ng/mL e 7,5 ng/mL, enquanto os de quantificação foram de 10 ng/mL para todos os compostos. A exatidão apresentou valores entre 93,8% e 108,3%, a precisão intra-ensaio valores entre 4,05% e 9,34% e a precisão inter-ensaio valores entre 5,28% e 9,90%. A metodologia validada foi aplicada em amostras de saliva de caminhoneiros que trafegavam na região da cidade de Roseira – SP em um evento de atendimento ao público promovido pela Sest/Senat (Serviço Social do Transporte/ Serviço Nacional de Aprendizagem do Transporte) em parceria com a Polícia Rodoviária Federal. Duas amostras de saliva de um total de 40 amostras analisadas apresentaram resultado positivo para anfetamina.

Palavras-chave: Anfetaminas, Saliva, Cromatografia em fase gasosa

ABSTRACT

The use of stimulants by professional drivers is known as an increasing risk of accidents on the roads. The type of work itself induces the drivers to look out for something that provides better state of alertness and reduced sleep. Based on this important correlation between the occupation and use of stimulants, an analytical methodology was proposed for the determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives 3,4 – methylenedioxyamphetamine, 3,4 – methylenedioxymethamphetamine and 3,4 – methylenedioxyethylamphetamine on oral fluid samples using solvent extraction and gas chromatography coupled with mass spectrum for detection and quantification of these analytes. The developed methodology used 1 mL of oral fluid, liquid-liquid extraction, heptafluorobutyric anhydride and gas chromatography-mass spectrometry for the detection and quantification. The methodology was validated and showed good linearity within the limits of 10 ng/mL and 400 ng/mL of oral fluid. The limits of detection were between 2.5 ng/mL and 7.5 ng/mL, while the limits of quantification were 10 ng/mL for all analytes. The accuracy showed values between 93.8% e 108.3%, the intra-assay precision between 4.05% e 9.34% and the inter-assay precision between 5.28% e 9.90%. The validated methodology was tested in oral fluid samples collected from truck drivers near the city of Roseira – São Paulo during an event of health assistance fomented by SEST/SENAT in partnership with Federal Police. It was collected 40 saliva samples and two of them presented positive result for amphetamine.

Keywords: Amphetamines, Saliva, Gas chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esqueleto básico da β -fenetilamina	13
Figura 2.	Esquema demonstrando a biotransformação de algumas drogas para produzir anfetamina e metanfetamina.....	17
Figura 3.	Esquema demonstrando principais mecanismos de biotransformação de anfetamina e metanfetamina	18
Figura 4.	Estrutura da mescalina.....	22
Figura 5.	Metabolismo do MDMA.....	23
Figura 6.	Cromatograma com a abundância de íons da ANF	43
Figura 7.	Cromatograma com abundâncias de íons da ANF – d11	43
Figura 8.	Cromatograma com a abundância de íons da MET	44
Figura 9.	Cromatograma com a abundância de íons da MET – d14.....	44
Figura 10.	Cromatograma com a abundância de íons do MDA	45
Figura 11.	Cromatograma com a abundância de íons do MDA – d5.....	45
Figura 12.	Cromatograma com a abundância de íons do MDMA	46
Figura 13.	Cromatograma com a abundância de íons do MDMA – d5.....	46
Figura 14.	Cromatograma com a abundância de íons do MDEA	47
Figura 15.	Separação cromatográfica dos analitos	59
Figura 16.	Linearidade da anfetamina.....	61
Figura 17.	Linearidade da metanfetamina.....	62
Figura 18.	Linearidade do MDA	62
Figura 19.	Linearidade do MDMA.....	63
Figura 20.	Linearidade do MDEA	63
Figura 21.	Resultado cromatográfico da análise da amostra de saliva positiva para anfetamina na concentração de 204,4 ng/mL.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos .	42
Tabela 2.	Soluções utilizadas para preparação da curva de calibração e controles de qualidade.....	48
Tabela 3.	Analitos com seus respectivos tempos de retenção	58
Tabela 4.	Limites de detecção e de quantificação dos analitos em amostras de saliva	60
Tabela 5.	Valores de precisão intra-ensaio.....	64
Tabela 6.	Valores de precisão Inter-ensaio	64
Tabela 7.	Valores de exatidão	65
Tabela 8.	Recuperação dos analitos	66
Tabela 9.	Especificidade dos analitos.....	67
Tabela 10.	Valores de estabilidade de curta duração.....	68
Tabela 11.	Valores de estabilidade de longa duração	69
Tabela 12.	Valores de estabilidade de congelamento e descongelamento.....	69
Tabela 13.	Valores de estabilidade pós-processamento	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF	Anfetamina
MET	Metanfetamina
MDA	3,4, - metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4, - metilenodioximetanfetamina
MDEA	3,4, - metilenodioxietilanfetamina
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HFBA	Anidrido heptafluorobutírico
SEST	Serviço Social do Transporte
SENAT	Serviço Nacional de Aprendizagem do Transporte

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Anfetamina/Metanfetamina	13
1.1.1. Uso no Brasil.....	16
1.2. Anfetaminas alucinógenas.....	20
1.3. Amostras alternativas	24
1.3.1. Saliva	25
1.4. Determinação de anfetamina e derivados: revisão bibliográfica.....	28
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Materiais	35
3.2. Equipamentos e acessórios.....	35
3.3. Preparação de soluções e reagentes	36
3.3.1. Preparação de soluções padrões de calibradores, controles de qualidade e padrões internos.....	36
3.3.2. Preparação dos reagentes	37
3.3.2.1. Preparação da solução de Trietilamina 0,1M	

3.3.2.2. Preparação do tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$	
3.3.2.3. Preparação do tampão Tris de pH 7,4.....	37
3.4. Desenvolvimento da metodologia.....	39
3.4.1. Escolha do solvente de extração.....	39
3.5. Determinação das anfetaminas, metilenodioxido derivados e metabólitos em amostras de saliva.....	40
3.6. Curva de Calibração	47
3.7. Validação da metodologia de análise das anfetaminas, metilenodioxido derivados e metabólitos em saliva por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas	48
3.7.1. Limites de detecção	49
3.7.2. Limites de quantificação.....	49
3.7.3. Linearidade	50
3.7.4. Precisão	50
3.7.5. Exatidão: é a proximidade obtida entre o resultado da análise em relação a um valor verdadeiro. É calculada pela fórmula:.....	52
3.7.6. Recuperação.....	52
3.7.7. Especificidade	53
3.7.8. Estabilidade.....	54
3.7.9. <i>Carry Over</i>	55
3.8. Casuística	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Limites de detecção e quantificação.....	59
4.2. Linearidade	60
4.3. Precisão.....	64
4.4. Exatidão.....	65
4.5. Recuperação	65
4.6. Especificidade.....	66

4.7. Estabilidade	68
4.7.1. Estabilidade de curta duração	68
4.7.2. Estabilidade de longa duração	69
4.7.3. Estabilidade de congelamento e descongelamento	69
4.7.4. Estabilidade pós-processamento	70
4.8. <i>Carry Over</i>	70
4.9. Aplicação da metodologia na análise da saliva dos motoristas	70
5. CONCLUSÕES	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	81
Anexo 1 - Questionário	81
Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	82

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O termo anfetamínicos refere-se a um grupo de substâncias de ações simpatomiméticas que possuem em suas estruturas o esqueleto básico da β -feniletilamina, demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Esqueleto básico da β -feniletilamina

A anfetamina é a substância precursora desse importante grupo de estimuladores do sistema nervoso central, mas muitos outros derivados já foram sintetizados e podem ser facilmente encontrados em vários medicamentos, como em formulações farmacêuticas contendo efedrina, fenilefrina, femproporex, anfepramona, sibutramina, entre outros (Oga, 2003). Além dessas, existem anfetaminas de uso proscrito no Brasil definido pela portaria 344 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Lista F), como a 3,4 – metilenodioximetanfetamina (MDMA) e a 2,5 – dimetoxibromoanfetamina (DOB).

1.1. Anfetamina/Metanfetamina

A anfetamina foi sintetizada primeiramente em 1887, mas apenas quatro décadas depois teve seus efeitos farmacológicos estudados, sendo largamente utilizada para tratamento de narcolepsia, obesidade, hipertensão e síndrome de

hiperatividade em crianças. Na década de 30, além da busca por suas propriedades estimulantes e reforçadoras, utilizava-se a anfetamina para vários outros fins, como descongestão nasal, tratamento para esquizofrenia, dependência de morfina, nicotina, cafeína, hipotensão, enjôos e soluços intensos (Yonamine, 2004).

A anfetamina e a metanfetamina são consideradas estimulantes de ação indireta, já que atuam liberando a norepinefrina das vesículas de armazenamento. Além disso, são inibidoras da enzima monoaminoxidase (MAO), responsável pelo catabolismo das catecolaminas. O uso contínuo da anfetamina e metanfetamina podem acarretar depleção de dopamina em longo prazo, além de perda de transportadores para esse neurotransmissor. A metanfetamina possui ação central mais potente que a anfetamina, e ações periféricas menos proeminentes. Exposições crônicas à metanfetamina descritas acarretaram decréscimo da capacidade de locomoção e prejuízo no aprendizado verbal. Outros estudos recentes também revelaram severas alterações funcionais e estruturais associadas com aprendizado e memória (Volkow *et al.*, 2001a e 2001b).

Devido a essas propriedades estimulantes e de acréscimo nas capacidades de atenção, concentração e raciocínio já bastante difundidas em várias partes do mundo, as anfetaminas são, ainda hoje, uma classe de substâncias de uso freqüente, sobremaneira entre estudantes e motoristas de caminhão. Além desses efeitos desejáveis, elevam a freqüência respiratória e cardíaca, a pressão arterial, a capacidade de desempenhar atividade física, provocam decréscimo no apetite e podem causar hipertermia. Exposições longas podem causar excessiva perda de peso, problemas dentários, ansiedade, confusão, insônia, alterações do humor e comportamento violento. Além desses, há ainda distúrbios psicóticos, entre eles a paranóia, alucinações visuais e auditivas e ilusões (Matsumoto, *et al.* 2002).

Embora a prevalência do uso de metanfetamina no Brasil ainda seja bem reduzida, ela representa um sério problema social nos Estados Unidos, onde é classificada como um estimulante *Schedule II*, que indica alta capacidade para abuso e sua compra somente pode ser feita com receita médica controlada. Na forma de “droga de rua” é conhecida como *ice* ou *speed*, que é uma solução saturada e alcalinizada de cloridrato de metanfetamina que, após aquecida e resfriada, forma cristais denominados *ice drops* que podem ser fumados, à semelhança do que ocorre com o crack (Levine, 1999).

O uso ilícito em práticas esportivas também ficou bastante conhecido. Atletas das mais variadas atividades esportivas já fizeram uso de anfetaminas buscando a melhoria no desempenho atlético. Entre as ações que se almejam obter com as anfetaminas estão: melhora no tempo de reação em competições que exijam melhor condicionamento físico; acréscimo na força muscular e agressividade; aumento da aceleração; elevação dos níveis de ácido láctico durante exercício máximo; aumento da capacidade aeróbica; estímulo do metabolismo através da indução da perda de gordura corporal. Atualmente o percentual do uso de estimulantes como agentes de dopagem vêm gradativamente decrescendo. Outros agentes de dopagem estão aos poucos ocupando o espaço antes pertencente aos estimulantes. Todavia, o uso ilícito de estimulantes anfetamínicos ainda persiste e deve ser sempre investigado em triagens antidoping, pois além da indevida vantagem conferida ao usuário, oferece riscos sérios à saúde, devido principalmente à elevação da temperatura corporal a níveis perigosos e ao risco maior de ocorrência de infarto do miocárdio durante a prática do exercício físico (Avois *et al.*, 2006).

1.1.1. Uso no Brasil

O Brasil na última década se destacou no uso de anfetamínicos prescritos como supressores de apetite. O *International Narcotic Control Board* no ano de 1996 divulgou o Brasil como quarto maior consumidor de supressores de apetites no mundo (International Narcotic Control Board, 1996).

Com relação à utilização dos anfetamínicos como redutores de sonolência, um estudo realizado com motoristas profissionais na região de Ponta Grossa no Paraná indicou alto consumo destas substâncias durante a jornada de trabalho. Apenas 3,12% dos motoristas entrevistados afirmaram nunca terem usado algum tipo de medicamento para reduzir o sono. O restante (96,88%) afirmou ter usado pelo menos uma vez ou utilizam rotineiramente medicamentos com a finalidade de aumentar o estado de vigília (Wendler, *et al.* 2003).

Em um trabalho realizado com motoristas do estado de São Paulo por Yonamine *et al.*, (2004), 558 motoristas foram avaliados quanto ao uso de anfetamina, metanfetamina, cocaína, etanol e delta-9-tetrahidrocanabinol através de análise em urina e saliva. Dentre as amostras de urina analisadas, 39 (7%) forneceram resultado positivo para as drogas avaliadas, sendo que 7 resultaram positivo para a anfetamina. A análise das amostras de saliva apresentou 17 (3%) resultados positivos para esses compostos, sendo 4 para anfetamina. Não foi observado resultado positivo para metanfetamina tanto na urina quanto na saliva (Yonamine, 2004).

A análise das anfetaminas e a interpretação subsequente de seus resultados requerem alguns cuidados. Um deles se refere à origem da anfetamina ou metanfetamina que forneceu o resultado como positivo. Um número relativamente

grande de precursores pode ser metabolizado a anfetamina e metanfetamina: anfetaminil, benzfetamina, clobenzorex, deprenil, famprofazona (conversão para metanfetamina), fencamina, femproporex, furfenorex, mefenorex, prenilarina (Liu *et al.*, 1995).

A Figura 2 representa um esquema da biotransformação dos medicamentos femproporex, selegilina e clobenzorex.

Figura 2 - Esquema demonstrando a biotransformação de algumas drogas para produzir anfetamina e metanfetamina (Yonamine, 2004).

A anfetamina e metanfetamina possuem 6 principais processos de metabolização: Hidroxilação aromática (posição *para*), cujos metabólitos são geralmente excretados conjugados com sulfatos; hidroxilação alifática no carbono *beta*, catalizada pela enzima dopamina-beta-hidroxilase (enzima responsável para a

conversão da dopamina em noradrenalina) estericamente seletiva para os enantiômeros S (+) da anfetamina e metanfetamina; N-dealquilação, responsável pela conversão de metanfetamina em anfetamina; desaminação oxidativa; N-oxidação e conjugação do nitrogênio.

Figura 3 - Esquema demonstrando principais mecanismos de biotransformação da Anfetamina e Metanfetamina. A: Metanfetamina, B: Anfetamina, C: 4-hidroximetanfetamina, D: 4 - hidroxianfetamina, E: 4 - hidroxinorefedrina, F: Norefedrina, G: Fenilacetona, H: Ácido benzóico, I: Glicina, J: Ácido Hipúrico (Liu e Goldberger, 1995).

Os enantiômeros da anfetamina apresentam diferenças com relação a sua atividade e metabolização. A atividade do isômero R(-) é discretamente mais potente

na produção de efeitos periféricos, enquanto que o isômero S(+) é 3 a 4 vezes mais potente na estimulação do sistema nervoso central. Com relação ao metabolismo das anfetaminas em geral, o isômero S(+) é metabolizado mais rapidamente. A enzima CYP2D6 é enantioseletiva e cataliza a β -hidroxilação na anfetamina. Esse fato resulta na razão entre os enantiômeros R/S maior que 1 quando a anfetamina é consumida como racematos (De La Torre, *et al.*, 2004; Pizarro, *et al.*, 2003).

A análise dos enantiômeros das anfetaminas pode auxiliar na interpretação laboratorial com relação à origem do resultado positivo observado. Por exemplo, um resultado positivo apenas para um dos enantiômeros não é condizente com o uso de femproporex, já que este quando metabolizado produz anfetamina nas duas formas enantioméricas (Cody, 1996).

A meia-vida de eliminação das anfetaminas é totalmente dependente do pH urinário. Exemplificando com a anfetamina, em pH ácido (5,5 – 6,0), 60% do composto é excretado de forma inalterada em 48 horas, enquanto que em pH básico (7,5 – 8), somente 3 a 7% é excretado nesse mesmo intervalo de tempo. Isso é explicado pela natureza básica dos compostos anfetamínicos. Em pH urinário ácido a maior parte da anfetamina se encontra na forma ionizada, logo, não é bem reabsorvida pelos rins. Em pH alcalino, entre 7,5 e 8, a forma não ionizada da anfetamina, mesmo não sendo preponderante, pode ser constantemente reabsorvida pelos rins e, conseqüentemente, elevar consideravelmente a meia-vida do composto (Oga, 2003).

Em pH alcalino, o mecanismo principal de eliminação da anfetamina do organismo é por metabolismo, devido à intensa reabsorção renal da anfetamina nesse pH. Nessas condições, o enantiômero R(-) é encontrado em maiores concentrações quando comparado à mesma dose administrada e metabolizada sob

condições ácidas, situação em que a taxa mais elevada de excreção da droga intacta não permite que o metabolismo estereoespecífico provoque alteração significativa na relação entre os enantiômeros (Liu e Goldberger, 1995).

1.2. Anfetaminas alucinógenas

As anfetaminas alucinógenas são uma classe de drogas sintéticas estruturalmente semelhantes à anfetamina e à mescalina (Figura 4), e atualmente classificadas como “drogas recreacionais”. Estas propriedades alucinógenas se devem aos grupamentos metilenodioxí nas posições 3 e 4 no anel aromático (Oga, 2003). O principal representante desse subgrupo de anfetaminas é o 3,4 – metilenodioximetanfetamina (MDMA), popularmente conhecido como *ecstasy*, patenteado em 1912 pela *Merck Pharmaceuticals* na Alemanha. Apenas no final da década de 60 constam as primeiras sínteses em comprimidos. Em 1970 houve o primeiro caso publicado de uso recreacional da substância e em 1977, o início da comercialização do MDMA como “droga de rua”. Na década de 80 teve seu uso bastante difundido em freqüentadores de festas de música eletrônica em todo o mundo. Apenas em 1985, após comprovados os potenciais de abuso e toxicidade do MDMA nos Estados Unidos, ele foi incluído na lista *Schedule I*, proibindo sua comercialização. Até então já era uma droga bastante conhecida e com muitos adictos. Somente após a inclusão do MDMA na *Schedule I* é que análogos do *ecstasy*, como o 3,4 – metilenodioxietilamfetamina (MDEA), tiveram um breve período de expansão até 1986, quando finalmente foi criada a lei que controlou também a comercialização dos compostos análogos aos já proibidos anteriormente (“*designer drug*” legislation de 1986) (Hegadoren *et al.*, 1999).

Os efeitos do MDMA duram aproximadamente de 3 a 5 horas e incluem euforia, relaxamento, diminuição de ansiedade, sentimentos de aproximação e empatia com outras pessoas e maior facilidade para comunicação. Tem uso associado a festas de música eletrônica, as conhecidas *raves*. Estas possuem como características o longo período de duração e hiperatividade física. A ação estimulante da droga e seus efeitos alucinógenos tornaram o MDMA uma opção bastante atrativa para os frequentadores desse tipo de festa (Gouzouliz-Mayfrank *et al.*, 2006).

A ação principal do MDMA é inibir a recaptação da serotonina, ocasionando um aumento da concentração desta na fenda sináptica. No entanto, em longo prazo o uso continuado produz um decréscimo da atividade da enzima triptofano hidroxilase, responsável pela síntese de serotonina (Steele, *et al.*, 1994). Há ainda outros mecanismos de ação verificados no MDMA comuns a outras anfetaminas, como inibição na recaptação de dopamina, embora consideravelmente menos intensa que a inibição provocada na recaptação de serotonina, e liberação de noradrenalina e dopamina das vesículas de armazenamento (Kalant, 2001).

O decréscimo em funções cognitivas já foi descrito em usuários, embora se acredite que possa ser resultante de combinação de efeitos do MDMA com outras drogas. Dentre as reações mais graves inerentes ao MDMA está a hipertermia, responsável por falências no sistema cardiovascular, nos rins, e no fígado. Outros sintomas associados ao MDMA são: aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, sudorese excessiva, tensão muscular, ranger de dentes, náuseas, desmaios (Kolbrich *et al.*, 2008).

Assim como as anfetaminas não-alucinógenas, o MDMA é um composto quiral utilizado normalmente como racemato. Com relação à atividade, alguns estudos (mas não todos), indicam que o R(-) MDMA é mais alucinógeno (*mescaline-*

like), enquanto o S(+) produz efeito mais estimulante (*amphetamine-like*) (Kalant 2001). Os enantiômeros do MDMA também diferem quanto a metabolização. A enzima CYP2D6 também é enantioseletiva para o MDMA S(+) e catalisa as desmetilações no metabolismo do MDMA, responsável pela conversão do MDMA em MDA. Assim, o enantiômero S(+) possui uma meia-vida menor que o enantiômero R(-), por ser preferencialmente metabolizado para S(+) MDA (De La Torre, *et al.* 2004; Pizarro, *et al.* 2003);

Figura 4 - Estrutura da Mescalina.

Acredita-se que o isômero S(+) do MDMA seja mais neurotóxico. No entanto, para o MDA, ambos os enantiômeros produzem neurotoxicidade no sistema serotoninérgico. A maior parte da neurotoxicidade atribuída ao MDMA, na realidade, é devida ao seu metabólito MDA (produzido por N-desmetilação do MDMA), por ser um composto mais neurotóxico (Levine, 1999).

O MDMA é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e produz o pico de concentração no plasma em aproximadamente 2 horas após a administração oral. A eliminação da droga é relativamente lenta, com meia-vida de eliminação por volta de 8 horas. São necessárias aproximadamente 5 meias-vidas para que 95% do

MDMA seja eliminado do organismo. Alguns metabólitos do MDMA, especialmente o primeiro deles (MDA), ainda possuem atividade farmacológica, o que torna a duração de ação do MDMA mais prolongada do que a permanência do próprio composto no organismo (Kalant, 2001).

O MDMA e compostos análogos são metabolizados principalmente por:

1) Degradação da cadeia lateral para formar metabólitos N-desaquilados e 2) o-desmetilação para formar metabólitos dihidroxilados, seguido por metilação de um dos grupamentos hidroxila (De Martinis *et al.*, 2007). A Figura 5 apresenta um esquema das vias de metabolização do MDMA.

Figura 5 - Metabolismo do MDMA (De Martinis *et al.*, 2007).

Pizarro, ao analisar a urina de 6 usuários recreacionais de MDMA, encontrou que 44% da dose do composto foi excretada em 24 horas na urina como MDMA, MDA, HMMA e HMA. Dos 44% excretados foram encontrados para o MDMA, MDA, HMMA e HMA respectivamente 23,9%; 1,8%; 17,1%; e 1,9% (Pizarro *et al.*, 2002). Em torno de 65% do MDMA é excretado na forma inalterada pelos rins em 72h. 3% a 7% do MDMA é transformado em MDA e 28% em outros metabólitos (Camí *et al.*, 1997; Verebey *et al.*, 1988).

1.3. Amostras alternativas

A utilização de matrizes biológicas alternativas ao sangue e urina tem ganhado cada vez mais importância em áreas como toxicologia forense, toxicologia clínica, controle antidoping e toxicologia ocupacional. Os recentes avanços em técnicas analíticas foram determinantes para que os progressos nas pesquisas em matrizes alternativas fossem possíveis, já que, em muitos casos, é necessário lidar com concentrações bastante reduzidas dos analitos, a principal desvantagem ao se analisar amostras alternativas (Gallardo e Queiroz, 2008).

As amostras alternativas mais comumente utilizadas são: saliva, cabelo, suor e mecônio. Em geral, oferecem vantagens por serem consideradas não invasivas e serem mais facilmente coletáveis quando comparadas ao sangue, que apresenta a desvantagem de invasividade na coleta e a necessidade de profissional qualificado, e à urina, que requer local apropriado para a coleta além de esta não poder ser supervisionada diretamente, permitindo possíveis adulterações ou trocas de amostras. Além disso, algumas amostras alternativas, como cabelo, apresentam janelas de detecção maiores, que permitem utilização para investigação de uso ou

exposição a drogas muito maior que as amostras convencionais (Gallardo e Queiroz, 2008).

1.3.1. Saliva

Alguns fluidos são combinados para formar o que é comumente referido como saliva. Na realidade, a saliva é o fluido de cada glândula salivar, livre de outros constituintes, ao passo que fluido oral é uma mistura de saliva produzida pelas glândulas salivares e sulcos gengivais, e contém outros materiais que podem estar presentes na cavidade oral, como células mucosas e resto alimentares (Schramm *et al.*, 1993).

A composição salivar é formada, em sua maior parte, pela secreção das células serosas e mucosas das glândulas parótidas (25%), submandibulares (71%) e sublinguais (4%). Há ainda produção salivar por sulcos gengivais (área entre os dentes e a gengiva), e glândulas salivares menores contidas na língua, mucosa bucal e no palato (com um número estimado entre 450-750 glândulas), além de secreções oro-naso-faríngeas (Veerman *et al.*, 1996).

Cada glândula salivar produz uma secreção típica. A glândula parótida produz um fluido seroso; a glândula submandibular produz uma secreção seromucosa; e a glândula sub-lingual produz uma saliva mucosa; as glândulas menores secretam uma saliva mais viscosa. Células serosas secretam um fluido aquoso e incolor rico em eletrólitos, enquanto as células mucosas, um fluido mais viscoso contendo amilases, mucoproteínas e mucopolissacaridasas (Veerman *et al.*, 1996).

A saliva é geralmente hipotônica em relação ao sangue. Os íons mais abundantes na saliva são sódio, potássio, cloreto e bicarbonato. Cálcio, magnésio e

fosfato estão presentes em menores concentrações. São todos originados do sangue, de onde são transportados ativamente para dentro dos ácinos e ductos estriados. Os componentes orgânicos encontrados na saliva, como proteínas e glicoproteínas, são sintetizados pelas células secretoras. Algumas proteínas como lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, cistatinas e histatinas desempenham um papel importante como agentes antifúngicos e antibacterianos. Mucinas, além de contribuírem para a característica viscosa da saliva desempenham um papel antiviral. Alfa-amilase, lipase, proteinase, DNAase e RNAase são importantes no processo digestivo. O fluido oral ainda contém bactérias e seus metabólitos, células epiteliais, eritrócitos, leucócitos e restos de alimentos (Johan *et al.*, 2005).

O fluxo salivar é controlado por estímulo hormonal e por neurotransmissores e pode variar de 0 a 10 mL/minuto, resultando em um total de 500 a 1500 mL/dia. Fatores como o ritmo circadiano, estímulos do paladar e olfato, estímulo mecânico, drogas que atuam nos sistemas simpático e parassimpático, variação hormonal relacionados com gravidez ou menopausa, stress e dor podem alterar a produção salivar. Tanto o estímulo simpático como o parassimpático podem induzir a salivação, apesar da distinção entre as secreções em constituição e volume. O estímulo simpático tende a produzir uma saliva mais viscosa devido ao estímulo maior à produção de mucinas e outras proteínas, embora não seja um estímulo que produza aumento de volume da saliva. Já o estímulo parassimpático induz à produção de uma saliva de volume maior e com viscosidade mais baixa (Johan *et al.*, 2005).

A taxa de secreção salivar, concentração dos eletrólitos e concentração protéica na saliva foram relatadas não variarem no decorrer da vida, embora a atividade da amilase sofra considerável decréscimo no decorrer dos anos (Ben-Aryeh *et al.*, 1986).

O pH salivar é levemente acidificado (pH 5,5), mas se eleva quando há estímulo salivar, podendo alcançar valores de pH 7,9. O conteúdo salivar também sofre variação de acordo com o fluxo, mas consiste basicamente de 90% de água, e 10% de eletrólitos, amilase, glicose, uréia, lipídeos, proteínas e hormônios. Para drogas básicas, com o decréscimo do pH, uma porção maior da droga será ionizada e a concentração da droga no fluido oral deverá aumentar, ocorrendo o inverso em pH básico (O'neal *et al.* 2000). No entanto, se o pKa de um fármaco é maior que 8,5 para substâncias de caráter básico, ou menor que 5,5 para substâncias de caráter ácido, ou se o fármaco não for ionizável, a variação de pH salivar praticamente não interferirá na concentração do fármaco na saliva. Esse tipo de fármaco tende a apresentar uma melhor correlação saliva/plasma (Kidwell *et al.*, 1998). A anfetamina, apesar de ser um fármaco de caráter levemente básico, possui pKa em torno de 9,9, e, conseqüentemente, subtende-se que sofra pouca variação em sua concentração na saliva com variação de fluxo salivar.

As drogas são incorporadas à saliva por difusão passiva, ultrafiltração, e/ou secreção ativa do sangue. Difusão passiva é o caminho mais comumente utilizado para as drogas serem incorporadas à saliva, exceto para substâncias com reduzido peso molecular, que podem se incorporar à saliva por ultrafiltração. A passagem através das membranas celulares é limitada para moléculas com elevado peso molecular e restrita para drogas ionizadas ou ligadas a proteínas. As drogas não metabolizadas são mais comumente encontradas na saliva do que seus metabólitos, pois são mais lipofílicas e tendem a atravessar mais facilmente os capilares e membranas das células ácinas até o fluido oral. Assim, os valores de pH sanguíneo e salivar, o pKa da droga, o grau de ligação desta às proteínas plasmáticas e sua lipofilicidade irão determinar a partição da droga entre o plasma e a saliva (Wood, *et al.* 1982).

O tempo para detecção de substâncias no fluido oral é, em geral, similar ao sangue. Ambas as amostras são referidas para se investigar uso recente da substância de interesse. No entanto, a grande vantagem da utilização de saliva em relação ao sangue é a coleta não invasiva e não necessitar de profissional especializado para a realização da coleta (Drummer, 2006).

Uma variedade de formas estão disponíveis para a coleta de fluido oral. Uma dessas formas é a coleta não estimulada, em que a saliva é coletada através do ato de deixá-la escorrer diretamente da cavidade oral para um recipiente de coleta. Várias técnicas já foram descritas para se estimular a produção de saliva. Entre as mais simples estão os movimentos realizados com a língua, bochechas e lábios sem a utilização de estímulo externo. Mastigação de cera de parafina, parafilm®, teflon®, gomas e gotejar limão ou ácido cítrico sobre a língua são exemplos de estímulos externos para a produção de saliva. Após produzida, a saliva pode ser succionada, absorvida ou coletada com o auxílio de *swab*. Algumas técnicas de coleta combinam estimulação com coleta utilizando-se materiais absorventes como algodão. Após a saturação do material absorvente, o fluido oral é coletado através de centrifugação ou aplicação de pressão. Um dispositivo que combina estimulação com extração é o *Salivette*®, que utiliza algodão para absorver fluido oral da cavidade oral e centrifugação para separar o fluido oral do algodão (Crouch, 2005).

1.4. Determinação de anfetamina e derivados: revisão bibliográfica

Várias metodologias já foram desenvolvidas para a determinação de anfetaminas e derivados em amostras biológicas, tanto para cromatografia em fase gasosa para cromatografia em fase líquida. A maioria dos trabalhos publicados

utiliza amostras convencionais como sangue e urina. Há entanto algumas publicações referindo-se à amostras alternativas como saliva, cabelo e suor.

Peters *et al.* (2007), determinaram anfetamina e derivados e seus respectivos enantiômeros em saliva. Utilizaram um volume bastante reduzido de amostra (entre 10 e 50 μL) e derivatização com reagente quiral anteriormente à extração líquido-líquido. Para detecção e quantificação dos analitos, foi utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas no modo de ionização química negativa.

Scheidweiller e Huestis (2006), determinaram metanfetamina, MDMA e seus metabólitos em saliva utilizando 400 μL de amostra, extração em fase sólida para preparação das amostras, derivatização com o reagente HFBA e a técnica de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas para detecção dos compostos.

Gunnar *et al.* (2005), desenvolveram metodologia para identificar 30 compostos, entre eles estimulantes anfetamínicos, utilizando 250 μL de saliva, extração em fase sólida e detecção por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas. As anfetaminas foram derivatizadas com o reagente acilante HFBA.

Kankaanpaa *et al.* (2004), determinaram estimulantes anfetamínicos em amostras de sangue total, plasma, saliva e urina. O procedimento para saliva utilizou 100 μL de amostra e a extração é realizada juntamente com a derivatização pelo reagente acilante HFBA. Foi utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas para a detecção e quantificação das amostras.

Yanomine (2004) determinou anfetamina e metanfetamina em amostras de saliva aplicando microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras e cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas.

Wood *et al.* (2003), desenvolveram uma metodologia para investigação de anfetamina, metanfetamina, efedrina, MDA, MDMA e MDEA em 50 µL de saliva. A preparação das amostras foi realizada apenas com precipitação por metanol e, para detecção, foi utilizada cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS-MS).

Mortier *et al.* (2002), determinaram opióides, anfetaminas, cocaína e benzoilecgonina em amostras de saliva utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para detecção.

Navarro *et al.* (2001), analisaram MDMA e metabólitos em amostras de plasma e saliva para se investigar se há correlação entre as concentrações dessas duas amostras após administração controlada de ecstasy em voluntários. Foi utilizado 1 mL de saliva, extração em fase em fase sólida e detecção e quantificação cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Concluíram que a saliva é uma boa matriz alternativa ao sangue para a investigação de ecstasy.

Rasmussen *et al.* (2006), determinaram anfetaminas e derivados e seus respectivos enantiômeros em amostras de sangue total utilizando extração líquido-líquido, derivatização com reagente quiral e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Pizarro, *et al.* (2002), analisou MDMA e metabólitos em plasma e urina e utilizou extração em fase sólida para extração dos compostos e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, além de eletroforese capilar para análises dos respectivos enantiômeros.

Jenkins *et al.* (2004), determinaram MDMA e metabólitos em urina utilizando extração em fase sólida para extração dos analitos. Para detecção foram comparados cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida com detector de UV e cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo.

De Martinis *et al.* (2007), determinaram MDMA e derivados com seus respectivos metabólitos em amostras de suor. Utilizaram a extração em fase sólida para preparação das amostras e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

No presente trabalho, foi desenvolvida e validada uma metodologia para a determinação qualitativa e quantitativa de anfetaminas, metilenodioxido derivados e metabólitos em amostras de saliva, empregando a extração líquido-líquido e detecção por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. A metodologia desenvolvida foi aplicada na investigação do consumo de anfetaminas e metilenodioxido derivados por motoristas profissionais.

Objetivos

2. OBJETIVOS

1) Desenvolver e validar metodologia analítica para a investigação de anfetaminas e metilenodioxí derivados em amostras de saliva, empregando as técnicas de extração líquido-líquido e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas;

2) Aplicar a metodologia na análise de anfetaminas e derivados em amostras de saliva coletadas de motoristas de caminhões;

3) Verificar as informações constantes no questionário preenchido pelos motoristas sobre a utilização de anfetaminas durante as jornadas de trabalho na estrada com as determinações analíticas.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Padrões analíticos certificados de Anfetamina (ANF), Anfetamina - d11 (ANF - d11), Metanfetamina (MET), Metanfetamina – d14 (MET - D14), MDA, MDA – d5, MDMA, MDMA – d5 e MDEA foram obtidos da Cerilliant (EUA); acetato de etila e metanol foram obtidos da J. T. Baker (EUA); heptano, trietilamina e anidrido heptafluorbutírico (HFBA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). As amostras de saliva, utilizadas para o desenvolvimento e validação da metodologia, foram coletadas do próprio pesquisador.

3.2. Equipamentos e acessórios

Cromatógrafo em fase gasosa (CP 3800) acoplado a 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® (Suiça); 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); Vortex AP-56 da Phoenix® (Brasil); Deionizador de água Simplicity da Millipore® (EUA); Balança analítica BP211D da Sartorius® (Alemanha), dispositivos coletores Salivette® foram obtidos da Sarstedt® (Alemanha).

3.3. Preparação de soluções e reagentes

3.3.1. Preparação de soluções padrões de calibradores, controles de qualidade e padrões internos

Para a preparação dos calibradores e controles de qualidade, ampolas dos padrões analíticos de Anfetamina (ANF), Metanfetamina (MET), MDA, MDMA e MDEA na concentração de 1 mg/mL foram transferidas individualmente com o auxílio de pipetas de Pasteur para 5 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 100 ng/mL.

Procedimento semelhante foi empregado para se obter soluções dos padrões internos deuterados. Ampolas dos padrões internos de Anfetamina - d11 (ANF - d11), Metanfetamina – d14 (MET - D14), MDA – d5 e MDMA – d5 tiveram o conteúdo transferido para balões volumétricos de 10 mL separadamente com o auxílio de pipetas de Pasteur, originando soluções na concentração de 10 µg/mL. Posteriormente, 1 mL foi retirado de cada um dos balões volumétricos e adicionados em um único balão volumétrico. Completou-se o volume com metanol para originar a

concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de uma solução da mistura de padrões internos deuterados.

Todas as soluções preparadas de padrões e padrões internos foram armazenadas a -20°C . em tubos com tampa de rosca e envolvidos em papel alumínio.

3.3.2. Preparação dos reagentes

3.3.2.1. Preparação da solução de Trietilamina 0,1M em heptano

Pipetar 140 μL de Trietilamina e dispensar em um balão volumétrico de 10 mL. Completar o volume com heptano e agitar. A solução deve mantida sob refrigeração e utilizada no período máximo de uma semana.

3.3.2.2. Preparação do tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ de pH 9,3

Preparar uma solução saturada de bicarbonato de sódio (60 g/L de água deionizada). Ajustar o pH para 9,3 adicionando-se carbonato de sódio anidro à solução e agitando-a continuamente. Caso haja presença de sólido no fundo, removê-lo. A solução deve mantida sob refrigeração.

3.3.2.3. Preparação do tampão Tris de pH 7,4

Pesar 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, completar com água deionizada, tampar

e agitar. Adicionar ácido clorídrico a 0,1M gota a gota para ajustar o pH para 7,4. Armazenar em frasco de vidro à temperatura ambiente.

3.4. Desenvolvimento da metodologia

3.4.1. Escolha do solvente de extração

Inicialmente foi avaliada a possibilidade de se realizar extração com solvente (extração líquido-líquido), já que esta é uma metodologia mais simples, de baixo custo e pela saliva não ser considerada uma matriz biológica muito complexa. Foram realizados experimentos com vários solventes. Primeiramente foram testadas diluições da saliva fortificada com as substâncias de interesse utilizando-se tampões de diferentes valores de pH, que foram submetidos a subsequente extração com o solvente acetato de etila. Os tampões utilizados foram: tampão fosfato de pH 6,0; tampão Tris de pH 7,4; e tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ em pH 9,3. Como já era previsto, o tampão que melhor contribuiu para extração das substâncias foi o tampão de pH básico, pois as anfetaminas, sendo substâncias de caráter básico, tendem a permanecer na forma não-ionizada (mais lipofílica) quando presentes em pH também básico e a migrar para o meio de caráter mais apolar (solvente orgânico). Testou-se o uso de tampão fosfato em pH 10 para se investigar melhor a influência do pH na recuperação da metodologia, porém, além do aumento da formação de emulsão, não houve ganho na recuperação da extração.

Após estabelecido o pH do tampão mais apropriado, foram testados diferentes volumes de tampão adicionados à amostra. Em 500 μL de saliva foram adicionados diferentes volumes de tampão para se avaliar qual melhor relação entre

volume de saliva/volume de tampão para se realizar a extração. Foram testados 0,5 mL, 1,0 mL e 1,5 mL de tampão para a diluição da saliva, mas, não foi verificada alteração muito significativa quanto à capacidade de extração empregando-se diferentes volumes de tampão. Assim, decidiu-se por utilizar o volume de 1,0 mL de tampão, pois demonstrou ser um volume suficiente para deixar a saliva mais fluida para permitir melhor mistura entre as fases aquosa e orgânica e uma menor formação de emulsão.

Em testes utilizados com agitação mais intensa foi necessária a adição de NaCl após a centrifugação para reduzir a formação de emulsão. Após a adição, repetiu-se a centrifugação e a formação de emulsão foi reduzida. Contudo, as agitações mais brandas já se mostraram suficientes para proporcionar adequada mistura entre a fase aquosa e a fase orgânica com pouquíssima formação de emulsão e sem a necessidade da adição de NaCl.

Os solventes que foram testados para se verificar as capacidades de extração foram: éter etílico, acetato de etila, diclorometano, éter de petróleo, hexano, tolueno e clorobutano.

O éter etílico não pôde ser utilizado, pois uma pequena porção deste solvente se dissolve no meio aquoso, reduzindo o volume da fase orgânica e dificultando seu isolamento da fase aquosa.

Os solventes que apresentaram melhor capacidade de extração das substâncias de interesse foram: acetato de etila, diclorometano, tolueno, clorobutano e hexano. Após definidos os melhores solventes quanto à capacidade de extração, foi avaliada a velocidade de evaporação desses, essencial para a redução do tempo de análise. Os solventes que reuniram as duas características desejadas (boa capacidade de extração e tempo relativamente curto para evaporação) foram o

clorobutano e o acetato de etila. Entre os dois solventes preferiu-se utilizar o acetato de etila.

Foram comparadas extrações utilizando-se volumes de saliva diferentes. Os volumes testados foram de 1 mL e 0,5 mL de saliva e estes foram fortificados com a mesma quantidade em massa dos analitos. O método de extração líquido-líquido, por ter como característica a extração exaustiva do analito da matriz, apresentou resultado equivalente para os diferentes volumes de saliva. Assim, optou-se por utilizar o volume de 1 mL para o aumento da sensibilidade da metodologia.

3.5. Determinação das anfetaminas, metilenodioxí derivados e metabólitos em amostras de saliva

O volume de 1 mL de saliva isenta das substâncias a serem estudadas, é transferido para um tubo de ensaio, onde são adicionados 50 µL da solução de padrões internos (ANF-d11; MET-d14; MDA-d5 e MDMA-d5) na concentração de 1000 ng/mL. As amostras são então agitadas em vortex e diluídas com 1 mL de tampão Na₂CO₃/NaHCO₃ de pH 9,3. Após, adiciona-se 2 mL de acetato de etila, e submete-se o tubo a agitação branda em mesa agitadora por 20 minutos. O tubo é então centrifugado (3000 RPM por 7 minutos) e 1,0 mL da fase orgânica é transferido para outro tubo de fundo cônico e o solvente eliminado em evaporador sob fluxo de N₂. Os analitos presentes no resíduo foram então derivatizados de acordo com a metodologia descrita por (Scheidweiler, *et al.* 2006), na qual as anfetaminas são ressuspendidas com 100 µL da solução trietilamina a 0,1M em heptano e 10 µL do derivatizante anidrido heptafluorbutírico (HFBA). O tubo é então tampado, agitado brevemente em vortex e incubado em banho seco a 60°C por 20

minutos. Ao término da incubação adiciona-se 200 µL de tampão Tris de pH 7,4. O tubo é agitado intensamente em vortex (2 minutos com pequenas pausas a cada 10 segundos) e posteriormente é centrifugado (2200 RPM por 5 minutos). A fase orgânica (60 µL) são transferidos para um *vial* de amostrador automático e 1 µL é injetado no cromatógrafo.

As concentrações de anfetaminas, metilenodioxí derivados e metabólitos foram determinados utilizando cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de massas *ion trap* no modo SIS (*Single Ion Selected*). Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS de 30 m de comprimento x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme. As amostras são injetadas no modo splitless. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min.

A temperatura do injetor é de 250 °C. A rampa de aquecimento utilizada na coluna analítica é de 70 °C (2 min), 15 °C/min, 280 °C (3 min).

A temperatura utilizada no *trap* é de 200 °C, no *transfer line* é de 230 °C e no *manifold* é de 40 °C.

A Tabela 1 apresenta os íons monitorados na identificação e quantificação das anfetaminas, metilenodioxí derivados e metabólitos.

Tabela 1. Íons utilizados na identificação e quantificação dos analitos

Íons monitorados		
Analitos	Identificação	Quantificação
ANF	91, 118, 240	240
ANF-d11	126, 244	244
MET	118, 210, 254	254
MET-d14	213, 261	261
MDA	135, 162, 380	135
MDA-d5	167, 380	167
MDMA	162, 210, 254	254
MDMA-d5	213, 258	258
MDEA	162, 240, 268	268

As Figuras de 6 a 14 apresentam os picos cromatográficos correspondentes de cada íon de todos os compostos analisados.

Figura 6. Cromatograma com a abundância de íons da ANF

Figura 7. Cromatograma com abundâncias de íons da ANF – d11

Figura 8. Cromatograma com a abundância de íons da MET

Figura 9. Cromatograma com a abundância de íons da MET – d14

Figura 10. Cromatograma com a abundância de íons do MDA

Figura 11. Cromatograma com a abundância de íons do MDA – d5

Figura 12. Cromatograma com a abundância de íons do MDMA

Figura 13. Cromatograma com a abundância de íons do MDMA – d5

Figura 14. Cromatograma com a abundância de íons do MDEA

3.6. Curva de Calibração

Após definida a metodologia, foi estabelecida a curva de calibração utilizando-se 8 pontos: 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 qualidade (CQs) utilizados foram de 25 ng/mL, 210 ng/mL e 350 ng/mL. Para obter essas concentrações foram utilizadas 3 soluções da mistura de padrões nas concentrações de 100 ng/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL. A concentração utilizada da mistura de padrões internos foi de 50 ng/mL saliva e foi obtida pipetando-se 50 µL da solução de 1 µg/mL da mistura de padrões internos. A Tabela 2 apresenta a concentração dos padrões e o volume utilizado para preparação dos calibradores e controles de qualidade.

Tabela 2. Soluções utilizadas para preparação da curva de calibração e controles de qualidade.

Concentrações	Solução 1	Solução 2	Solução 3
	100 ng/mL	1 µg/mL	10 µg/mL
10 ng/mL	100 µL	-	-
30 ng/mL	-	30 µL	-
50 ng/mL	-	50 µL	-
100 ng/mL	-	100 µL	-
150 ng/mL	-	-	15 µL
200 ng/mL	-	-	20 µL
300 ng/mL	-	-	30 µL
400 ng/mL	-	-	40 µL
CQ1 25 ng/mL	-	25 µL	-
CQ2 210 ng/mL	-	-	21 µL
CQ3 350 ng/mL	-	-	35 µL

Na curva de calibração, foi necessário aplicar métodos matemáticos de ponderação da curva de calibração. Foi utilizado o fator de ponderação 1/X na curva de calibração.

3.7. Validação da metodologia de análise das anfetaminas, metilenodioxiterivados e metabólitos em saliva por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas

Os parâmetros avaliados durante a validação da metodologia foram selecionados conforme a resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.7.1. Limites de detecção

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

Para a determinação dos limites de detecção, utilizou-se a relação de 3:1 do sinal em relação ao ruído. Foram obtidos fortificando-se amostras de saliva em duplicata com 1 ng, 2,5 ng, 5 ng e 7,5 ng dos analitos. O limite de detecção foi determinado pela menor concentração em que os compostos obtiveram picos cromatográficos maiores ou iguais à relação sinal:ruído 3:1 nas duas análises da duplicata.

3.7.2. Limites 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% e 115%.

O limite de inferior de quantificação foi estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O limite superior de quantificação foi determinado analisando-se as amostras em concentrações cada vez maiores até

o valor em que foi provocado declínio do ponto em relação à curva de calibração que prejudicou significativamente a quantificação do limite inferior.

3.7.3. Linearidade

É a capacidade que a metodologia deve possuir de produzir picos cromatográficos com áreas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra analisada dentro de um intervalo especificado. Este parâmetro é avaliado através da injeção de amostras em concentrações crescentes para se obter um gráfico cujos pontos são determinados correlacionando-se cada concentração com o valor obtido na razão entre a área do íon de quantificação do padrão sobre a área do íon de quantificação do padrão interno. Posteriormente, faz-se uma regressão linear a fim de se observar o intervalo de concentrações em que o composto apresenta disposição linear na reta determinada pela regressão linear.

3.7.4. 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 verificada utilizando-se, no mínimo 3 concentrações (baixa, média e alta), contemplando o intervalo adotado na curva de calibração de maneira uniforme, realizando-se, no mínimo, 5 determinações por concentração.

Precisão Intra-Ensaio: 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-Ensaio (Precisão Intermediária): é a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo laboratório em dias diferentes, com analista diferente e/ou equipamentos diferentes.

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

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

Onde:

DPR = Desvio Padrão Relativo

DP = Desvio Padrão

CMD = Concentração Média Determinada

Foram necessários cinco dias para a validação da precisão. Foram avaliadas as precisões intra-ensaio e inter-ensaio com utilização de 5 replicatas para cada um dos três controles de qualidade (baixo, médio e alto). A precisão intra-ensaio foi calculada obtendo-se os coeficientes de variação dos controles de qualidade de cada composto dividindo-se o desvio padrão pela média aritmética em cada dia de análises. Para a precisão inter-ensaio foi calculado o coeficiente de variação de todas as análises nos cinco dias, que forneceram ao todo 25 ensaios.

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

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

Onde:

CME: Concentração Média Experimental

CT: Concentração Teórica

O parâmetro de exatidão é validado utilizando-se no mínimo 3 concentrações (baixa, média e alta) ao longo da faixa de variação da curva de calibração, com um mínimo de 5 determinações por concentração. Os valores de concentração obtidos para os controles de qualidade não devem originar resultados abaixo de 85% ou acima de 115%, exceto para o limite inferior de quantificação, que permite que sejam aceitos valores entre 80% e 120%. A exatidão da metodologia foi avaliada juntamente com a precisão. O cálculo da exatidão foi aplicado nas médias das concentrações dos cinco dias de análises para cada controle de qualidade.

3.7.6. Recuperação

A recuperação avalia a 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, exata e apresente limites de identificação e quantificação apropriados para as análises propostas. Foi

determinada comparando-se os resultados de quantificação obtidos em amostras fortificadas posteriormente à extração (fortificação do extrato) com os resultados de quantificação obtidos pelo procedimento padrão de fortificação com posterior 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 da saliva quando fossem comparados com uma situação que, em tese, equivale à situação de 100% de eficiência de extração (fortificação posterior do extrato obtido na extração dos padrões internos). As recuperações foram avaliadas nos 3 controles de qualidade (baixo, médio e alto).

3.7.7. Especificidade

É a capacidade do método de detectar e quantificar com exatidão aceitável um composto em presença de outros componentes, tais quais impurezas, produtos de decomposição, metabólitos, medicamentos possíveis de utilização concomitante e componentes da matriz biológica. O limite inferior de quantificação não deve ser quantificado fora do intervalo entre 80% e 120% quando calculado na presença dos interferentes investigados. Foi determinada através da fortificação das amostras de saliva na concentração dos controles de qualidade inferiores juntamente com quantidades elevadas de possíveis compostos interferentes que podem estar presentes em situações reais de análises. Os interferentes foram avaliados a uma concentração de 500 ng/mL. Os interferentes avaliados foram: ácido acetilsalicílico, alprazolam, benzoilecgonina, cafeína, clomipramina, clonazepam, cocaína, Δ^9 -THC, diazepam, dipirona, efedrina, fenilefrina, fluoxetina, lorazepam, nicotina, norfluoxetina, paroxetina e sertralina.

3.7.8. Estabilidade

É a propriedade que o analito, e conseqüentemente a metodologia, deve possuir de resistir a condições normalmente exigidas durante a análise. Deve ser avaliada a estabilidade do analito após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento.

Para a avaliação das estabilidades, foram utilizados 6 tubos de ensaio contendo 1 mL de saliva em cada. Foram fortificados com os compostos, sendo três controles de qualidade baixos e três altos.

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-se os controles de qualidades durante 6 horas à temperatura ambiente analisando-os em seguida.

Estabilidade de longa duração: A estabilidade de longa duração avalia o tempo em que o composto pode permanecer em uma matriz biológica quando congelado a -20 °C. A estabilidade de longa duração não pôde ser determinada em um intervalo grande de tempo, pois houve modificações da curva de calibração no decorrer da validação e conseqüentemente dos respectivos controles de qualidade. Assim, a estabilidade de longa duração foi determinada em apenas duas semanas após as amostras terem sido 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 determinada submetendo-se os controles de qualidades a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, com um intervalo de 24 horas entre cada ciclo.

Estabilidade pós processamento: A estabilidade pós-processamento avalia o tempo em que as amostras podem ser analisadas após preparadas. Foi determinada reinjetando-se os seis controles de qualidade 12 horas após o término da preparação destes.

3.7.9. Carry Over

O parâmetro *carry over* avalia a influencia de uma análise anterior no resultado na análise seguinte, devido a resíduos que podem permanecer retidos em alguns componentes do cromatógrafo, como *liner*, injetor, coluna, seringa e detector. Sua avaliação foi feita submetendo-se uma amostra de saliva sem a presença dos compostos à análise, logo após a análise do ponto mais alto da curva de calibração.

3.8. Casuística

A metodologia desenvolvida e validada foi empregada nas análises anfetaminas, metilenodioxido derivados e metabólitos em amostras de saliva coletadas de motoristas profissionais (caminhoneiros) que trafegavam pela região da cidade de Roseira – São Paulo. A coleta ocorreu no dia 18 de março de 2009, durante o evento “Comandos da Saúde” promovido pelo Sest/Senat em parceria com a Polícia Rodoviária Federal. Na ocasião, os motoristas participantes do evento foram convidados a participarem do estudo, assinando inicialmente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) e preenchendo um questionário com

10 perguntas (Anexo 2). Em seguida foi solicitado ao sujeito da pesquisa a doação de uma amostra de saliva (aproximadamente 1 mL), que foi coletada em Salivete[®], um recipiente que contém em seu interior algodão, que deve ser mastigado pelo doador da amostra. Após esse procedimento, as amostras obtidas foram armazenadas em isopor com gelo até a chegada ao laboratório onde foram armazenadas em *freezer* a -20°C. No laboratório os tubos Salivete[®] contendo os algodões com as amostras de saliva foram centrifugados para que a saliva presente no algodão se transfira para um compartimento inferior do Salivete[®].

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados de cada parâmetro utilizado para a validação da metodologia.

A Tabela 3 mostra os tempos de retenção de cada substância e a figura 15, a separação cromatográfica.

Tabela 3 - Analitos com seus respectivos tempos de retenção

Analitos	Tempos de retenção
	(min)
ANF	6,13
ANF-D11	6,08
MET	7,11
MET-D14	7,05
MDA	8,75
MDA-D5	8,73
MDMA	9,48
MDMA-D5	9,46
MDEA	9,70

Figura 15. Separação cromatográfica dos analitos

4.1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção para os analitos ANF, MET, MDA, MDMA e MDEA nas amostras de saliva fortificadas foram avaliados nas concentrações de 1 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL e 7,5 ng/mL. A Tabela 4 apresenta os limites de detecção e os limites inferior e superior de quantificação dos analitos.

Tabela 4. Limites de detecção e de quantificação dos analitos em amostras de saliva

Analito	LD	LIQ	LSQ
ANF	7,5 ng/mL	10 ng/mL	400 ng/mL
MET	2,5 ng/mL	10 ng/mL	400 ng/mL
MDA	5 ng/mL	10 ng/mL	400 ng/mL
MDMA	2,5 ng/mL	10 ng/mL	400 ng/mL
MDEA	2,5 ng/mL	10 ng/mL	400 ng/mL

LD – Limite de detecção

LIQ – Limite inferior de quantificação

LSQ – Limite superior de quantificação

4.2. Linearidade

A linearidade do método verificada foi de 10 ng/mL a 400 ng/mL para todos os compostos.

Para o analito MDA, os 3 íons mais abundantes fornecidos pelo espectrômetro de massas foram: 135, 162, 375; e para o seu padrão interno (MDA – d5) foram: 136, 167, 380. Inicialmente os íons mais abundantes de cada composto foram utilizados para a quantificação. O íon 135, por ser o mais abundante, foi utilizado para quantificação do MDA e o 136, para a quantificação do MDA – d5. No entanto, por ambos possuírem tempos de retenção muito próximos um do outro, foram encontrados alguns problemas na linearidade do MDA. O íon 135 do MDA produz naturalmente íons 136 no espectro, originados por isótopos dos átomos constituintes do fragmento, principalmente os carbonos 13. Dessa forma, quanto mais altos os pontos da curva de calibração, mais influência o íon 135 do MDA exerceu no íon 136 do MDA-d5, aumentando o valor da área deste o suficiente para

que os pontos mais altos da curva (a partir do ponto de 150 ng/mL) ficassem cada vez mais abaixo da curva de calibração, já que cada ponto da curva é determinado pela razão entre a área do íon de quantificação do padrão e a área do íon de quantificação do padrão interno. Assim, para solucionar esse inconveniente, decidiu-se utilizar o íon 167 para quantificação do padrão interno. Após essa alteração, a linearidade do composto MDA pôde ser consideravelmente estendida.

As Figuras de 16 a 20 apresentam as curvas de calibração e linearidade para cada analito.

Figura 16. Linearidade da anfetamina

Figura 17. Linearidade da metanfetamina

Figura 18. Linearidade do MDA

Figura 19. Linearidade do MDMA **Figura 20.** Linearidade do MDEA

4.3. Precisão

As análises foram realizadas em cinco dias alternados. A Tabela 5 apresenta os valores médios durante os 5 dias de análises. A Tabela 6, os valores de precisão inter-ensaio dos cinco dias. A precisão intra-ensaio obtida para os analitos foi de 4,05 a 9,34, sendo o menor valor corresponde ao CQ superior da anfetamina e o maior valor, ao CQ médio do MDMA. Para a precisão inter-ensaio os valores obtidos ficaram entre 5,28 para o CQ superior da anfetamina e 9,90 para o CQ inferior do mesmo composto.

Tabela 5. Valores de precisão intra-ensaio

Controles	ANF	MET	MDA	MDMA	MDEA
CQ 1	5,12	6,21	6,49	5,70	5,92
CQ 2	4,27	7,58	5,05	9,34	7,28
CQ 3	4,05	4,76	7,12	8,66	9,09

Tabela 6. Valores de precisão Inter-ensaio:

Controles	ANF	MET	MDA	MDMA	MDEA
CQ 1	9,90	6,48	8,55	7,38	6,28
CQ 2	5,28	7,78	6,03	9,43	7,52
CQ 3	5,40	6,02	7,48	8,29	8,93

4.4. Exatidão

Nenhum dos controles de qualidade dos compostos foi quantificado fora do intervalo de 85% a 115% das concentrações teóricas para os controles intermediários e superiores, ou 80% a 120% para os controles inferiores nos cinco dias de análises. A tabela 7 apresenta os valores médios de exatidão obtidos nos cinco dias para os três controles de qualidade de cada um dos compostos.

Tabela 7. Valores de exatidão

Controles	ANF	MET	MDA	MDMA	MDEA
CQ 1	104,8%	108,3%	105,7%	107,9%	105,5%
CQ 2	99,1%	96,3%	97%	97,5%	93,8%
CQ 3	96,8%	100,2%	94,6%	95,3%	94,3%

4.5. Recuperação

A recuperação verificada para os compostos variou de 45,1% a 61,4%, sendo o MDEA o composto que obteve a menor recuperação e o MDMA o composto que obteve a maior. A Tabela 8 apresenta os valores de recuperação para cada controle de qualidade e a média dos 3 controles para cada composto.

Tabela 8. Recuperação dos analitos

Analitos	25 (ng/mL)	210 (ng/mL)	350 (ng/mL)	MÉDIA
ANF	33,6%	52,5%	54,7%	46,9%
MET	39,2%	53,5%	55,3%	49,2%
MDA	39,1%	42,4%	62,5%	48,0%
MDMA	56,7%	79,6%	47,7%	61,4%
MDEA	25,2%	66,8%	43,4%	45,1%

4.6. Especificidade

Todos os controles de qualidade inferiores dos analitos avaliados mantiveram exatidões desejáveis em presença dos interferentes analisados a uma concentração de 500 ng/mL, conforme pode ser verificado na Tabela 9.

Tabela 9. Especificidade

Interferentes	ANF (ng/mL)	MET (ng/mL)	MDA (ng/mL)	MDMA (ng/mL)	MDEA (ng/mL)
AAS	25,79	23,63	23,72	21,25	21,64
Alprazolam	24,27	25,39	23,28	20,01	23,32
Benzoilecgonina	25,88	27,30	26,57	22,93	25,09
Cafeína	24,99	25,78	23,93	20,58	22,11
Clomipramina	26,29	25,54	23,80	21,84	24,11
Clonazepan	26,25	28,49	25,94	20,15	22,30
Cocaína	27,31	24,71	22,77	24,14	24,25
Δ9-THC	24,70	26,19	21,78	25,64	26,32
Diazepam	27,12	26,36	27,74	20,18	23,04
Dipirona	26,02	27,49	25,98	21,24	24,10
Efedrina	20,97	22,46	26,33	20,43	22,08
Fenilefrina	23,36	27,13	22,82	20,07	23,01
Fluoxetina	24,58	25,72	25,38	21,69	24,40
Lorazepam	24,54	27,12	23,31	20,70	22,74
Nicotina	24,65	24,65	21,35	23,23	24,26
Norfluoxetina	24,09	25,45	23,49	22,25	21,67
Paroxetina	25,74	28,38	25,02	22,65	24,95
Sertralina	25,83	22,99	23,71	21,03	23,35

4.7. Estabilidade

O estudo da estabilidade, apesar de ter sido realizado em pequena escala, demonstrou não haver perdas significativas dos compostos durante o período estipulado. As Tabelas de 10 a 13 demonstram as concentrações médias dos controles de qualidade obtidas em triplicata, com seus respectivos coeficientes de variação e valores de exatidão.

4.7.1. Estabilidade de curta duração

Tabela 10. Valores de estabilidade de curta duração

Compostos	25 ng/mL	C.V.	Exatidão	350 ng/mL	C.V.	Exatidão
ANF	24,53	10,77	98,12%	315,99	4,62	90,28%
MET	24,35	4,67	97,39%	358,07	11,64	102,31%
MDA	27,44	6,69	109,78%	348,10	10,81	99,46%
MDMA	25,27	12,94	101,09%	375,44	10,63	107,27%
MDEA	22,62	9,74	90,48%	387,46	2,23	110,70%

4.7.2. Estabilidade de longa duração

Tabela 11. Valores de estabilidade de longa duração

Compostos	25 ng/mL	C.V.	Exatidão	350 ng/mL	C.V.	Exatidão
ANF	20,56	2,33	82,24%	301,77	1,67	86,22%
MET	20,64	4,55	82,55%	309,68	4,59	88,48%
MDA	21,09	2,93	84,35%	306,53	2,83	87,58%
MDMA	21,74	1,74	86,96%	349,51	6,11	99,86%
MDEA	23,78	8,44	95,13%	379,32	4,67	108,38%

4.7.3. Estabilidade de congelamento e descongelamento

Tabela 12. Valores de estabilidade de congelamento e descongelamento

Compostos	25 ng/mL	C.V.	Exatidão	350 ng/mL	C.V.	Exatidão
ANF	21,23	9,56	84,89%	305,1	1,11	87,17%
MET	28,56	5,96	114,24%	361,74	10,96	103,35%
MDA	28,63	4,21	114,51%	324,12	7,91	92,61%
MDMA	27,56	11,95	110,24%	353,64	13,18	101,04%
MDEA	26,89	11,14	107,57%	354,05	11,08	101,16%

4.7.4. Estabilidade pós-processamento

Tabela 13. Valores de estabilidade pós-processamento

Compostos	25 ng/mL	C.V.	Exatidão	350 ng/mL	C.V.	Exatidão
ANF	25,43	12,43	101,72%	306,42	0,72	87,55%
MET	24,26	11,69	97,05%	362,78	0,95	103,65%
MDA	26,49	8,60	105,97%	329,79	5,70	94,23%
MDMA	26,62	12,35	106,46%	354,08	13,48	101,17%
MDEA	27,84	11,44	111,37%	390,46	1,67	111,56%

4.8. Carry Over

A metanfetamina foi o único analito que apresentou carry over. Ainda assim, em pequena extensão e não prejudicou a quantificação e validação da metodologia. Além disso, quando foram injetadas amostras para se investigar o uso de anfetaminas, foi injetada anteriormente uma amostra livre dos compostos, ou mesmo de solvente puro, para eliminar qualquer possibilidade de um resultado falso positivo.

4.9. Aplicação da metodologia na análise da saliva dos motoristas

Foram analisadas 40 amostras de saliva de motoristas que trafegavam na região de Roseira – SP no dia 18 de março de 2009 das 9:00 às 13:00. Duas amostras apresentaram resultado positivo para anfetamina, na concentração de 204,4 ng/mL e 76,4 ng/mL. Posteriormente as amostras foram injetadas no modo *full*

scan do GC-MS para avaliar a possibilidade de uma medicação ter produzido a anfetamina por meio de metabolização. Encontrou-se o femproporex nas duas amostras. Além disso, os dois resultados positivos coincidiram com a resposta afirmativa ao questionário referente ao uso de rebite, especificamente o desobesi[®], nomenclatura comercial do femproporex, e também com os resultados positivos obtidos nas triagens das urinas dos caminhoneiros, apesar de que os resultados da triagem na urina não necessariamente deveriam coincidir com os resultados obtidos na saliva, pois as duas amostras apresentam janelas de detecção distintas. No entanto, foi um dado importante que permitiu elevar a confiabilidade do resultado. A Figura 21 mostra o resultado cromatográfico da análise de uma das amostras positivas para anfetamina na concentração de 204,4 ng/mL. Além das amostras de saliva foram coletadas também amostras de urina dos mesmos motoristas, que foram analisadas empregando técnicas de imunoensaio. As amostras de saliva que apresentaram resultado positivo para anfetaminas resultaram também em positividade na triagem das amostras de urina.

Figura 21. Resultado cromatográfico da análise da amostra de saliva positiva para anfetamina na concentração de 204,4 ng/mL.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- A metodologia desenvolvida e validada empregando a técnica de extração líquido-líquido demonstrou ser eficiente, simples e de baixo custo para as análises qualitativas e quantitativas de anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA e MDEA em amostras de saliva, podendo ser implantando em análises de rotina;

- Os limites de detecção e quantificação encontrados foram inferiores ao *cut off* recomendado pelo *Substance Abuse and Mental Health Service Administration* (SAMHSA) de 50 ng de anfetamina por mL de saliva;

- O tempo de análise gasto durante a preparação das amostras foi de aproximadamente 2 horas para cada análise e de 8 horas para um total de 24 análises;

- Nas análises toxicológicas das amostras de saliva dos motoristas profissionais foi possível detectar e quantificar anfetamina e, ainda, confrontar com as respostas do questionário referente ao uso de rebites e com a triagem positiva na urina;

- A aplicação do método nas amostras de saliva, demonstrou que é possível realizar coleta dessa amostra nas estradas e rodovias, com o auxílio de dispositivos de coleta e transporte apropriados, e se investigar o uso de anfetamina e derivados nessa amostra biológica alternativa, com a vantagem de não expor o motorista a risco algum de contaminação durante a coleta, como ocorre com o sangue.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avois, L.; Robinson, N.; Saudan, C.; Baume, N.; Mangin, P.; Saugy, M; **Central nervous system stimulants and sport practice**. *British Journal of Sports Medicine*, 40 (Suppl I) i16-i20 2006.
- Ben-Aryeh, H.; Shalev, A.; Szargel, R.; Laor, A.; Laufer, D.; Gutman, D.; **The salivary flow rate and composition of whole and parotid resting and stimulated saliva in young and old healthy subjects**. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 36, 260-265, 1986.
- Camí, J.; De La Torre, R.; Ortuño, J.; Farré, M.; Mas, M.; Roset, P.N.; Segura, J. **Pharmacokinetics of ecstasy (MDMA) in healthy subjects**. *European Journal of Clinical Pharmacology* 52 (Suppl.), 168, 1997.
- Cody, J.; Valtier, S.; **Detection of amphetamine following administration of fenproporex**. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 425-431, 1996.
- Crouch, D.; **Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing**. *Forensic Science International*, 150, 165-173, 2005.
- De La Torre, R.; Farré, M.; Navarro, M.; Pacifici, R.; Zuccaro, P.; Pichini, S; **Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices**. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(3), 157 – 185, 2004.
- De Martinis, B.; 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**. *Journal of Chromatography B*, 852, 450-458, 2007.
- Drummer, O.; Review: **Drug Testing in oral fluid**. *Clinical Biochemistry*, 27, 147-159, 2006.
- Gallardo, E.; Queiroz, J.; **The role of alternative specimens in toxicological analysis**. *Biomedical Chromatography*, 8, 795-821, 2008.
- Gouzoulis-Mayfrank, E.; Daumann, J.; **Neurotoxicity of methylenedioxymphetamines (MDMA; ecstasy) in humans: how strong is the evidence for persistent brain damage?** *Addiction*, 101 348-361, 2006.

- Gunnar, T.; Ariniemi, P.; Lillsunde.; **Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral fluid by long column fast gas chromatography/ electron impact mass spectrometry**, *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (6), 739-753, 2005.
- Hegadoren, K.; Baker, G.; Bourin, M.; **3,4-methylenedioxy analogues of amphetamine: Defining the risks to humans**. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 539-553, 1999.
- International Narcotic Control Board. Psychotropic substances: statistics for 1996, s.n.t. 258 p.
- Jenkins, K.; Young, M.; Mallet, C.; **Mixed-mode solid phase extraction procedures for the determination of MDMA and metabolites in urine using LC-MS, LC-UV, or GC-NPD**, *Journal of Analytical Toxicology*, 28, 50-58, 2004.
- Johan, K.; Martens, L.; Review: **The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva**. *Forensic Science International*, 150, 119–131, 2005.
- 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**. *Journal of Chromatography B*, 810 (1), 57-68, 2004.
- Kalant, H.; **The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs**. *Canadian Medical Association Journal*, 165 917-928, 2001.
- Kidwell, D.A.; Holland, J.C.; Athanaselis, S. **Testing for drugs of abuse in saliva and sweat**. *Journal of Chromatography, B* 713, 1, 111-135, 1998.
- 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 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration**. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28(4), 432-440, 2008.
- Levine, B. **Principles of Forensic Toxicology**, 1^a edição, American Association for Clinical Chemistry, 1999.
- Liu, R.; Goldberger, B.; **Handbook of workplace drug testing**, 1^a edição, American Association for Clinical Chemistry, 1995.

- Matsumoto, T.; Kamijo, A.; Miyakawa, T.; Endo, K.; Yabana, T., Kishimoto H. **Methamphetamine in Japan: the consequences of methamphetamine abuse as a function of route of administration.** *Addiction*, 97, 809, 2002.
- Mortier, K.; Maudens, K.; Lambert, W.; Clauwaert, K.; Van Bocxlaer, J. ; Deforce, D.; Van Peteghem, C.; De Leenheer. A.; **Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B*, 779 (2), 321-330, 2002.
- Navarro, M.; Pichini, S.; Farre, M.; Ortuno J., Roset, P.; Segura J.; De La Torre, R.; **Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methoxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH.** *Clinical Chemistry*, 47 (10), 1788–1794, 2001.
- Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 2ª edição – São Paulo – Editora Atheneu, 2003.
- O'Neal, C. L.; Crouch, D.J.; Rollins, D. E.; Fatah, A.A.; **The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations.** *Journal of Analytical Toxicology*, 23 (6), 536–542, 2000.
- Peters, F.; Samyn, N.; Kraemer, T.; Riedel, W.; Maurer, H.; **Negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry assay for enantioselective measurement of amphetamines in oral fluid: application to a controlled study with MDMA and driving under the influence cases.** *Clinical Chemistry*, 53 (4), 702-710, 2007.
- Pizarro, N.; Ortuño, J.; Farré, M.; Hernández-Lopez, C.; Pujadas, M.; Llebaria, A.; Joglar, J.; Roset, P.; Mas, M.; Segura, J.; Camí, J.; De La Torre, R.; **Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gás chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis.** *Journal of Analytical Toxicology*, 26, 157-165, 2002.
- Pizarro, N.; Llebaria, A.; Cano, S.; Joglar, J.; Farré, M.; Segura, J.; De La Torre, R.; **Stereochemical analysis of 3,4 – methylenodioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17(4), 330-336, 2003.
- Rasmussen, L.; Olsen, K.; Johansen, S.; **Chiral Speration and Quantification of R/S – amphetamine, R/S – methamphetamine, R/S – MDA, R/S – MDMA, R/S – MDEA.** *Journal of Chromatography B* 842, 136-141, 2006.
- 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. *Journal of Chromatography B*, 835, 90–99, 2006.

Schramm, W.; Smith, R.; Craig, P.; **Methods of simplified saliva collection for the measurement of drugs of abuse, therapeutic drugs, and other molecules.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694, 311-313, 1993.

Steele, T.D.; McCann, U.D.; Ricaurte, G.A.; **3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans.** *Addiction*, 89, 539-551, 1994.

Veerman, E.C.I.; Van Den Keijbus, P.A.M.; Vissink, A.; Van Nieuw Amerongen, A. **Human glandular salivas: their separate collection and analysis,** *European Journal of Oral Sciences*, 104, 346–352, 1996

Verebey, K.; Alrazi, J.; Jaffe, J.H. **The complications of "ecstasy" (MDMA).** *The Journal of the American Association*, 259: 1649-1650, 1988.

Volkow, N. D.; Chang, L.; Wang, G.J.; Fowler, J.; Franceschi, D.; Sedler, M. **Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence.** *Journal of Neurosciences*, 21:9414 –9418, 2001a.

Volkow, N.D.; Chang, L.; Wang, G.J.; Fowler, J.S.; Leonido-Yee, M.; Franceschi, D. **Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers.** *The American Journal of Psychiatry*, 158:377–382, 2001b.

Wendler, E. A.; Busato, C. R.; Miyoshi, E.; **Uso de anfetaminas por motoristas de caminhão para reduzir o sono.** *Ci. Biol. Saúde* 9 (3/4), 7-14, 2003.

Wood, M.; De Boeck, G.; Samyn, N.; Morris, M.; Cooper, D.; Maes, R.; De Bruijn, E.; **Development of rapid and sensitive method for the quantification of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS.** *Journal of Analytical Toxicology*, 27(2), 78-87, 2003.

Wood, J. H.; Flora, K. P.; Narasimhachari, A; Baker, C. A.; **Dependence of salivary drug concentration on salivary flow rate.** *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 4, 255-260, 1982.

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

Anexos

ANEXOS

Anexo 1 - Questionário

IDENTIFICAÇÃO	
Número de Controle Laboratorial: _____ Entrevistador: _____	
Participante: () Aceitou participar () Recusou participar, motivo: _____	
Idade: _____ Sexo: Feminino () Masculino ()	
Naturalidade (Cidade/UF): _____ / _____	
Estado civil: Solteiro () Casado () Viúvo () Divorciado () Amasiado ()	
Etnia: Branca () Negro () Amarelo () Pardo ()	
Escolaridade: Nunca estudou () 2º grau () Outro: 1º a 4º série () 2º Grau Incompleto () 5º a 8º série () Superior () Curso técnico () Superior Incompleto ()	
Tempo de Profissão: _____ anos	
Serviço: Contratado () Autônomo () Aposentado ()	
Modelo do caminhão: _____	Horas viajadas (até agora): _____ h
Ano do caminhão: _____	Dirige direto quantas horas _____ h
Percurso (Cidade/UF)	Nº de ocupantes no veículo: _____
Origem: _____/ _____	Tipo de carga: _____
Destino: _____/ _____	
INFORMAÇÕES SOBRE A SAÚDE	
Pressão alta () Diabete () Estresse () Outro () Nenhum ()	
Uso de medicamentos: Sim () Não ()	
Qual? _____ Motivo: _____	
Faz uso de bebidas alcoólicas?	Sim () Não () Local de consumo? Casa () Bar () Outro: _____ Frequência nos últimos 12 meses (vezes por semana): () diariamente () 1 vez por semana () 2-3 vezes por semana () 4-5 vezes por semana Tipo de bebida: Cerveja () Destilados () Vinho () Outros: _____
Fumante?	Sim () Ex-fumante () Não () Tempo de uso: _____ Quantidade de cigarros por dia: _____
Usa rebite?	Sim () Já usei () Não () Qual? _____ Frequência (vezes por semana): () diariamente () 1 vez por semana () 2-3 vezes por semana () 4-5 vezes por semana Quando foi a última vez? _____ Onde adquiriu? () Posto de gasolina () Amigos () Outros _____ Motivo para uso? () Manter acordado () Outro motivo _____
Usa outro tipo de droga?	Uso () Nunca () Já usei () Frequência (vezes por semana): () diariamente () 1 vez por semana () 2-3 vezes por semana () 4-5 vezes por semana Quando foi a última vez? _____
Outras informações relevantes: _____ _____	

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Patologia
Centro de Medicina de Ribeirão Preto – CEMEL
Laboratório de Toxicologia Forense

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – Dados de identificação do sujeito da pesquisa ou legal responsável

1. Nome _____
Documento de Identidade Nº _____ Sexo: () M () F
Data de Nascimento: ____/____/____
Endereço: _____ Nº _____ Apto _____ Bairro: _____
Cidade: _____ Telefone: _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar como voluntário do projeto de pesquisa *Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas e derivados em amostras de saliva empregando a técnica de cromatografia em fase acoplada a espectrometria de massas*, de responsabilidade do pesquisador Rafael Barcellos Bazzarella, cujo objetivo é o desenvolvimento e validação de metodologia para a análise laboratorial de anfetaminas e derivados em amostras de saliva.

O voluntário que aceitar participar deverá fornecer uma amostra de saliva (2 mL), que será coletada através de um recipiente adequado após a mastigação de algodão para o estímulo da salivação. A amostra fornecida será submetida a análise por uma nova metodologia analítica laboratorial, que irá informar se houve uso das substâncias em estudo (anfetaminas e derivados). Os resultados obtidos serão analisados juntamente com as respostas dos questionários.

A coleta de saliva é um procedimento sem risco algum para o voluntário, que poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo. Sua identidade será preservada sob confidencialidade, sigilo e privacidade. O benefício obtido pelo voluntário é, exclusivamente, o de colaborar para o desenvolvimento da metodologia mais rápida e segura, que poderá ser aplicada para a detecção do consumo de anfetaminas.

Eu, _____, RG nº _____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Voluntário

Pesquisador responsável

(assinatura, nome e CPF)

(assinatura, nome e CPF)

Pesquisador Participante

(assinatura, nome e CPF)

Informações de nomes, endereços e telefones dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa:

Pesquisadores responsáveis: Rafael Barcellos Bazzarella / Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Endereço: Universidade de São Paulo / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Av. Bandeirantes, 3.900 - Ribeirão Preto – SP **Fone:** (16) 3602 3359