UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Investigação de alcaloides β -carbolinas, Triptaminas presentes na Ayahuasca
(Santo Daime) em amostras de suor”

Lidiane Silva Tavares

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Investigação de alcaloides β -carbolinas, Triptaminas presentes na Ayahuasca
(Santo Daime) em amostras de suor”

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Lidiane Silva Tavares

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Ribeirão Preto
2014

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.

Tavares, Lidianne Silva

“Investigação de alcaloides β -carbolinas, Triptaminas presentes na Ayahuasca (Santo Daime) em amostras de suor” Ribeirão Preto, 2014.

76 p.: II; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

1. Ayahuasca. 2. DMT. 3. Suor. 4. Cromatografia em fase gasosa. 5. Espectrometria de massas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lidianne Silva Tavares

Título do trabalho: “Investigação de alcaloides β -carbolinas, Triptaminas presentes na Ayahuasca (Santo Daime) em amostras de suor”

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, por guiar meus passos, por me proteger, me dar forças e sempre trazer luz nos momentos de angústia e desespero;

A minha mãe Maria Angela, a qual é fonte inesgotável de incentivo, inspiração e amor eterno;

Ao meu pai José e meu irmão Fábio por sempre terem acreditado em mim;

Ao Prof. Bruno Spinosa De Martinis pela paciência, por não ter dito nos momentos de aflição o que eu queria ouvir, ...mas ter dito o que era preciso ouvir;

Aos amigos e colegas de laboratório Fabi, Fer Monedeiro, Marcela, Day, Mari, Thiago, Laís, Fer "FID", Eduardo, Bruno IC, Brenda, Cassio, Mércia, pelo auxílio, amizade, paciência, pelos momentos de descontração, pelo companheirismo, pelas boas risadas e principalmente por terem aguentado minha teimosia;

Ao meu sobrinho Miguel Angelo pelo amor incondicional e alegria;

Ao meu noivo Marcel, que por todo esse período teve que me dividir com mais duas filhas: "Harmina" e "Harmalina", as quais me tiravam o sono e me deixavam sem tempo pra dar a atenção e o carinho que precisa, obrigada pela compreensão;

Ao Pelicano e a todos os membros do grupo religioso CEFLUPENCOS pela acolhida e pela prestatividade nas coletas das amostras;

As minhas queridas amigas e irmãs, Miriã, Grazi, Elidi e Jana, por existirem, por serem as pessoas com as quais posso contar sempre;

À FAPESP pelo apoio financiamento, auxílio e suporte durante o desenvolvimento do projeto;

E a todos aqueles que me apoiaram e que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho, deixo os meus sinceros Agradecimentos!

"As justificativas diminuem nosso valor"

Autor desconhecido

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SPE	Extração em fase sólida
GC/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
GC/FID	Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização por chama
HPLC-ESI-SRM	High Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization – tandem mass spectrometry (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência conectada a Espectrometria de Massas com interface de Ionização por Electrospray)
ng/mL	Nanograma por mililitro
ng/adesivo	Nanograma por adesivo
DMT	N, N-DimetilTriptamina
HRM	Harmina
HRL	Harmalina
THH	Tetrahidroharmina
DIF	Difenildramina
5-HT	5-hidroxiTriptamina (Serotonina)
5-MeO-DMT	5-methoxidimetilTriptamina
GC/TSD	Cromatografia Gasosa/Detector Termiônico Específico
CONAD	Conselho Nacional Antidrogas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Food and Drug Administration
UDV	União do Vegetal
CEFLUPENCOS	Centro Fluente Luz Universal Pedro Nunes Costa
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LIQ	Limite inferior de Quantificação

PI	Padrão interno
CQ	Controle de qualidade
MAO	Monoaminoxidase
SNC	Sistema nervoso central
R^2	Coeficiente de determinação
CV	Coeficiente de variação
DPR	Desvio padrão relativo

RESUMO

TAVARES, L.S. **“Investigação de alcaloides β -carbolinas, Triptaminas presentes na Ayahuasca (Santo Daime) em amostras de suor”**. 2014. 76f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Os alcaloides β -carbolinas, Harmina e Harmalina, e o potente alucinógeno N, N-dimetiltriptamina são os principais componentes da Ayahuasca, uma bebida típica, utilizada na forma de chá e amplamente empregada em rituais religiosos na América do Sul. Embora seu uso ocorra desde períodos pré-colombianos ainda são poucas as informações sobre suas possíveis aplicações clínicas, assim como seus efeitos toxicológicos. Nos últimos anos, o uso da Ayahuasca se difundiu para vários países: Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra, França e Espanha, com isso houve o aumento do interesse em estudos científicos acerca do chá. Em decorrência do aumento no consumo do chá, é importante o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos validados na rotina laboratorial e a utilização de uma matriz biológica que seja de fácil coleta e possibilite um número representativo de amostras. No presente trabalho, o suor foi utilizado como uma amostra biológica não convencional, pois possui algumas vantagens em relação às amostras convencionais como, por exemplo, o sangue; possui uma coleta não invasiva, indolor e sem constrangimentos para o voluntário, fácil aquisição de um registro cumulativo da exposição de substâncias, e janela de detecção mais longa, tornando-se uma ferramenta útil, pois permite a realização de uma coleta com maior frequência e sem atrapalhar o ritual religioso do voluntário. Embora vários métodos já tenham sido publicados para determinação de diferentes substâncias utilizando o suor como matriz biológica, tais como: ecstasy, cocaína, anfetamina, codeína, MDMA e Δ 9-Tetrahydrocannabinol, até a presente data, não foram encontrados métodos descritos na literatura utilizando o suor como matriz biológica para identificação de DMT, HRM e HRL em voluntários usuários da bebida. O método desenvolvido apresentou linearidade de 50 a 1500 ng/adesivo e o limite de detecção encontrado foi de 15 ng/adesivo para Harmina, 15 ng/adesivo para Harmalina e 10 ng/adesivo para o DMT. O coeficiente de variação intra-ensaio variou de 3,92% a 9,06% e o inter-ensaio variou entre 3,34% a 9,85%; a exatidão variou entre 87,5% a 105%. A recuperação encontrada foi superior a 70%.

Palavras-chave: Ayahuasca, DMT, Suor, GC-MS, desenvolvimento, validação.

ABSTRACT

TAVARES, L. S. "Investigation of β - carbolines alkaloids, tryptamine present in Ayahuasca (Santo Daime) in samples of sweat." 2014. 76f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The β - carbolines alkaloids, and Harmina Harmalina, and the potent hallucinogen N, N - dimethyltryptamine are the main components of Ayahuasca, a typical drink used in tea form widely used in religious rituals in South America. Although its use occurs from preoperative - Colombians are still little information about their possible clinical applications, as well as their toxicological effects. In recent years, the use of Ayahuasca has spread to many countries: United States, Germany, England, France and Spain, it was the increased interest in scientific studies about tea. Due to the increase in the consumption of tea, it is important the development and application of validated analytical methods for routine monitoring and the use of a biological matrix that is easily collected and allow a representative number of samples. In the present work , sweat was used as a biological sample unconventional because it has some advantages as compared to conventional samples, such as blood; have a non-invasive, painless and without constraints for voluntary, easy acquisition of a cumulative record of exposure of substances, and longer detection window, making it a useful tool collects as it allows the realization of a collection more frequently and without disturbing the religious ritual of voluntary. Although several methods have been published for the determination of different substances using sweat as a biological matrix, such as ecstasy, cocaine, amphetamine, codeine, MDMA and Δ^9 - Tetrahydrocannabinol, to date, no methods have been described in the literature using the sweat as a biological matrix for identification of DMT, HRL and HRM in volunteer users of the drink. The developed method was linear 50-1500 ng / patch and the limit of detection was 15 ng / patch Harmina, 15 ng / patch Harmalina and 10 ng / patch for DMT. The ceficiente intra -assay variation ranged from 3.92 % to 9.06 % and inter -assay ranged from 3.34 % to 9.85%; the accuracy ranged from 87.5 % to 105 %. The recovery was found to exceed 70%.

Keywords: Ayahuasca, DMT, Sweat, GC- MS, development, validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas moleculares da Harmina (HRM), Harmalina (HRL), Tetrahydroharmina (THH), N, N-dimetiltriptamina (DMT) e 5-Hidroxitriptamina (5-HT), ilustrando a semelhança das estruturas químicas com a serotonina.	xx
Figura 2	Tempo de detecção relativa em várias espécies	xx
Figura 3	. Adesivo para coleta de suor <i>PharmCheck</i> TM	xx
Figura 4	<i>Manifold</i> utilizado na extração em fase sólida.	xx
Figura 5	Esquema das etapas extrativas dos principais alcalóides da Ayahuasca: N, N-Dimetiltriptamina (DMT), Harmalina (HRL) e Harmina (HRA) de amostras de suor através de cartuchos de extração em fase sólida (SPE).	xx
Figura 6	Etapas da coleta de suor dos voluntários. (A) limpeza do local com álcool isopropílico; (B), (C) e (D) fixação do adesivo; (E) retirada do adesivo; (F) armazenamento do adesivo após coleta.	xx
Figura 7	Perfil cromatográfico de amostra fortificada submetida ao método de extração em fase sólida (1) N, N-Dimetiltriptamina; (2) Difenildramina; (3) Harmalina e (4) Harmina, através de injeção por GC-MS.	xx
Figura 8	Cromatogramas sobrepostos de uma amostra de suor fortificada e de uma amostra branco. (1) Perfil cromatográfico de uma amostra de suor branco em vermelho. (2) Perfil cromatográfico de uma amostra de suor fortificada em verde.	xx
Figura 9	Espectro de massas, seguido dos íons característicos da N, N-Dimetiltriptamina (DMT).	xx
Figura 10	Espectro de massas, seguido dos íons característicos do padrão interno Difenildramina (DIF).	xx
Figura 11	Espectro de massas, seguido dos íons característicos da Harmalina (HRL).	xx
Figura 12	Espectro de massas, seguido dos íons característicos da Harmina (HRA).	Xx
Figura 13	Representação gráfica da curva de calibração da N, N-Dimetiltriptamina (DMT) em amostra de suor.	xx

Figura 14	Representação gráfica da curva de calibração da Harmalina (HRL) em amostra de suor.	xx
Figura 15	Representação gráfica da curva de calibração da Harmina (HRM) em amostra de suor.	xx
Figura 16	Cromatograma da análise de um extrato de uma amostra de suor branco, após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração.	xx
Figura 17	Cromatograma obtido da análise de um extrato de uma amostra de suor fortificada com 500ng/adesivo dos padrões (DMT, HRA e HRL), após seleção dos íons.	Xx
Figura 18	Cromatograma obtido da análise de uma amostra de voluntário positivo para todos analitos pesquisados. (1) N, N-DimetilTryptamina; (2) Difenildramina; (3) Harmalina e (4) Harmina.	xx

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fases extratoras testadas.	Xx
Tabela 2	Condições cromatográficas empregadas para determinação dos alcaloides da Ayahuasca.	Xx
Tabela 3	Programação da temperatura da coluna	Xx
Tabela 4	Íons de identificação e quantificação dos analitos.	Xx
Tabela 5	Resultados dos limites de detecção e quantificação do método desenvolvido.	Xx
Tabela 6	Valores da precisão intra-ensaio (%) obtido em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.	Xx
Tabela 7	Valores da precisão inter-ensaio (%) obtido em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.	Xx
Tabela 8	Valores de exatidão (%) obtidos em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.	Xx
Tabela 9	Valores de recuperação (%) encontrados em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.	Xx
Tabela 10	Variação nos valores de recuperação do CQB para DMT, HRL e HRA, na presença dos interferentes.	Xx
Tabela 11	Variação da concentração dos analitos, DMT, HRM e HRL pós-processamento, após 8 horas para controle de qualidade baixo.	Xx
Tabela 12	Variação da concentração dos analitos, DMT, HRM e HRL pós-processamento, após 8 horas para controle de qualidade alto.	Xx

SUMÁRIO

SUMÁRIO	viii
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Alcaloides da Ayahuasca e ações farmacológicas	12
1.2. Aspectos terapêuticos e toxicológicos da Ayahuasca	15
1.2.1. Relatos de casos	17
1.3. Amostra biológica alternativa: Suor	18
1.3.1. Incorporação de drogas no suor	20
1.3.2. Adesivo para coleta de suor <i>Pharmchek</i> ™	20
2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	23
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Materiais	27
4.1.1. Reagentes e padrões	27
4.1.2. Equipamentos e Acessórios	27
4.1.3. Preparação de soluções e reagentes	28
4.2. Métodos	29
4.2.1. Curva de calibração	29
4.2.2. Validação	29
4.2.3. Parâmetros utilizados na validação	30
4.2.4. Preparo das amostras para desenvolvimento e validação do método	35
5. CASUÍSTICA	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1. Desenvolvimento do método	42
6.1.1. Extração em fase sólida (SPE)	42
6.1.2. Escolha do tipo de detector para determinação dos alcalóides em amostras de suor.	44
6.2. Validação do método	52
6.2.1. Limites de detecção e quantificação	52
6.2.3. Precisão	54

6.2.4. Exatidão	55
6.2.5. Recuperação.....	56
6.2.6. Especificidade.....	56
6.2.7. <i>Carry over</i>	57
6.2.8. Estabilidade	59
6.3. Aplicação do método desenvolvido na análise das amostras de suor	60
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
ANEXOS.....	72
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)	72
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Ayahuasca é um chá de plantas psicoativas originalmente usadas por xamãs ao longo da bacia Amazônica, a qual foi amplamente utilizada em práticas mágico-religiosas, medicina popular dos povos indígenas e propósitos recreativos (MCKENNA; TOWERS; ABBOTT, 1984; GAMBELUNGHE et al., 2008; SALUM PIRES et al., 2009).

A palavra Ayahuasca significa "vinho das almas", "vinho dos mortos" ou "cipó dos mortos", onde a palavra *Aya* quer dizer "pessoa morta", "alma", "espírito" e *waska* significa "corda", "vinha", "liana" (DOS SANTOS et al., 2007). Esta bebida é também conhecida pelos nomes: Santo Daime, Daime, Hoasca, Yajé, Natema e Vegetal (MOURA et al., 2010; RIBA et al., 2003).

O interesse em práticas xamânicas vem se propagando pela Europa e América do Norte (YRITIA et al., 2002), e a expansão do chá em todo o mundo tem atraído a atenção de pesquisadores interessados em seus aspectos farmacológicos e toxicológicos (SALUM PIRES et al., 2009; RIBA et al., 2003).

No Brasil, a Ayahuasca foi incorporada em rituais sincréticos dos modernos grupos religiosos, principalmente o Santo Daime e a União do Vegetal (UDV) (OLIVEIRA et al., 2010).

Acredita-se que o chá proporciona à pessoa que o consome poderes visionários, tal particularidade é empregado por xamãs para chegar a estados oníricos onde possam encontrar antepassados e espíritos, para descobrir a causa de feitiços e doenças, e para ver o passado e o futuro (GAMBELUNGHE et al., 2008).

Embora uma das substâncias psicoativas contida no chá pertença a Lista F, lista das substâncias de uso proscrito no Brasil, da portaria nº 344, de 12 de maio de 1998, em resolução, o Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas (CONAD), legitimou o uso da Ayahuasca dentro de um contexto religioso (CONAD, 2004; ANVISA, 1998).

Normalmente a bebida é preparada na forma de chá por infusão ou imersão das cascas trituradas do cipó *Banisteriopsis caapi* (contendo os derivados β -carbolinas: Harmina, Harmalina, Tetrahydroharmina), juntamente

com as folhas de *Psychotria viridis*, as quais contêm o N, N -dimetilTryptamina (DMT) (SALUM PIRES et al., 2009; GAMBELUNGHE et al., 2008; YRITIA et al., 2002).

Os alcaloides β -carbolinas ainda são encontrados em outras plantas, incluindo *Peganum harmala* e *Passiflora incarnata* (FRISON et al., 2008). Na literatura, até o momento, existem poucos métodos analíticos descritos para a determinação desses alcaloides em amostras biológicas. A DMT tem sido determinada em plasma por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo GC/NPD (SALUM PIRES et al., 2009; YRITIA et al., 2002); DMT e as β -carbolinas em plasma através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência (YRITIA et al., 2002; CALLAWAY et al., 1996) e mais recentemente os alcaloides da ayahuasca foram determinados em sangue e urina por LC-ESI-MS/MS (MCILHENNY et al., 2010, 2011).

1.1. Alcaloides da Ayahuasca e ações farmacológicas

Como pode ser observado na Figura 1, os principais componentes Ayahuasca as β -carbolinas (Harmina, Harmalina e Tetrahydroharmina) e a Tryptamina N, N-dimetilTryptamina (DMT) são estruturalmente similares à serotonina (5-hidroxiTryptamina ou 5-HT), um neurotransmissor presente no sistema nervoso da maioria das espécies animais (DOS SANTOS et al., 2007).

Figura 1. Estruturas moleculares da Harmina (HRM), Harmalina (HRL), Tetrahydroharmina (THH), N, N-dimetiltriptamina (DMT) e 5-Hidroxitriptamina (5-HT), ilustrando a semelhança das estruturas químicas com a serotonina.

As propriedades psicotrópicas da bebida são atribuídas principalmente ao fato da bebida conter quantidades significativas do alucinógeno indólico DMT (DOS SANTOS, 2010; YRITIA et al., 2002).

O DMT, quando administrado por via oral isoladamente não produz efeitos psicoativos, provavelmente devido à degradação de primeira passagem pela enzima monoamina oxidase visceral, o que inviabiliza seu acesso ao sistema circulatório (YRITIA et al., 2002).

A combinação com as β -carbolas presentes na Ayahuasca, as quais realizam a inibição da monoamina oxidase periférica, inibindo a degradação do DMT através da desaminação oxidativa, e consequentemente permitindo o acesso do DMT ao sistema circulatório e ao Sistema Nervoso Central (SNC), em quantidades suficientes para induzir efeitos psicotrópicos.

A monoamina oxidase (MAO) encontrada no sistema digestivo é responsável por quebrar as monoaminas presentes na dieta, ao passo que a

MAO encontrada no SNC é responsável por parte do *clearance* sináptico de vários neurotransmissores (DOS SANTOS, 2010; MCKENNA, 2004;).

DMT por ser estruturalmente semelhante ao neurotransmissor serotonina age de forma agonista nos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (YRITIA et al., 2002). As ações da serotonina (5-HT) são numerosas e complexas, tendo como principais locais de ação: trato gastrointestinal, músculo liso, vasos sanguíneos, plaquetas, terminações nervosas e sistema nervoso central (RANGE et al., 2007).

Essa ação agonista serotoninérgica da DMT produz uma série de alterações cognitivas, sensoriais e emocionais momentâneas quando administrada por via parenteral. As modificações na percepção parecem ser bastante intensas, porém com um período de tempo bastante curto em sua duração. Por via oral, através do chá os efeitos produzidos pela DMT são menos intensos que por via parenteral (SALUM PIRES; OLIVEIRA; YONAMINE, 2010).

As β -carbolinas também podem apresentar alguma propriedade alucinógena e contribuir para a atividade psicotrópica da bebida da ayahuasca, entretanto a caracterização dessas substâncias como psicodélicas ou alucinógenas é inexata (MCKENNA, 2004).

Os alcaloides da harmala agem principalmente como inibidores específicos e reversíveis da monoamina oxidase Tipo-A (MAO-A), particularmente a Harmina e Harmalina são as mais potentes. Embora não seja um forte inibidor da MAO, a terahidroHarmina (THH) contribui na atividade neural, por inibir fracamente a captação de serotonina em locais pré-sinápticos. Posteriormente, ambas as ações aumentam a atividade serotoninérgica central e periférica, facilitando simultaneamente a psicoatividade da DMT (CALLAWAY et al., 1999).

Entre outros efeitos das β -carbolinas podemos incluir a inibição competitiva da recaptação da 5-HT, dopamina, epinefrina e norepinefrina dentro de sinaptossomas, inibição da membrana Na⁺ATPase dependentes, interferência com a biossíntese de aminas biogênicas e efeitos semelhantes a vasopressina no transporte de Na⁺ e água (MCKENNA, 2004).

A ação da bebida se deve, portanto, à interação das β -carbolinas com o DMT presentes nas plantas, que juntas potencializam as propriedades alucinógenas de ambas isoladas, levando-se em consideração que as β -

cartolinas aumentem as concentrações de DMT (COSTA; FIGUEIREDO; CAZENAVE, 2005).

1.2. Aspectos terapêuticos e toxicológicos da Ayahuasca

Embora dados farmacológicos e toxicológicos sobre o uso da Ayahuasca em humanos sejam escassos (BALÍKOVÁ, 2002), sabe-se que efeitos adversos podem ocorrer quando a bebida é utilizada concomitantemente com substâncias serotoninérgicas (GABLE, 2006).

As β -carbolinas da Ayahuasca são inibidores reversíveis e altamente seletivos da MAO. O bloqueio da MAO, presumivelmente, permite que uma grande quantidade de serotonina se acumule nos terminais nervosos. O acúmulo excessivo pode produzir uma série de efeitos adversos, tais como: tremor, diarreia, instabilidade autonômica, hipertermia, sudorese, espasmos musculares e possivelmente morte. Esse conjunto de sinais e sintomas é conhecido como síndrome serotoninérgica (GABLE, 2007; CALLLAWAY et al., 1999).

Devido a maior suscetibilidade da ocorrência desses efeitos adversos em pessoas que estão em tratamento com substâncias químicas pro-serotoninérgicas, especialmente antidepressivos, o uso da Ayahuasca não é recomendado devido a possibilidade da ocorrência da síndrome serotoninérgica (DOS SANTOS, 2010).

Em testes de toxicidade aguda não se verificaram evidências de efeitos adversos graves ou o abuso potencial da Ayahuasca. Além disso, estudos separados com animais da dose letal média da N, N-DimetilTryptamina (DMT) e dos alcaloides Harmina e Harmalina indicaram que uma dose letal dessas substâncias em humanos, provavelmente é superior a 20 vezes a dose típica cerimonial (GABLE, 2007).

No entanto, o critério de uma dose única de letalidade aguda é uma estimativa extremamente limitada de toxicidade para o homem porque ela não leva em conta variáveis como diferenças entre espécies, a administração repetida, condições ambientais, estado de saúde e fatores psicológicos. Tais variáveis podem ter influência sobre uma relação dose-resposta (GABLE, 2007).

Estudos realizados sobre os efeitos cardiovasculares da Ayahuasca constataram alterações nos batimentos cardíacos, assim como o aumento da pressão arterial sistólica e diastólica (RIBA et al, 2001; CALLAWAY et al, 1999). Embora estes aumentos sejam moderados, deve-se ter cuidado em pessoas que têm pressão arterial elevada ou outros problemas cardiovasculares. Isso se torna mais relevante considerando os recentes relatos na mídia sobre as mortes inexplicáveis de pessoas participantes de rituais da Ayahuasca. Deve-se notar que os dados clínicos que tenham sido publicadas até o momento são de jovens voluntários saudáveis. Resultados de segurança podem ser diferentes em pessoas idosas ou pessoas com condições pré-existentes (BOUSO; RIBA, 2011).

Por outro lado, em estudo realizado por McKenna e colaboradores (2004) apresenta que a Ayahuasca pode ter aplicações terapêuticas, o estudo foi conduzido com voluntários norte-americanos usuários do chá, e foi possível notar a remissão de neoplasias e outras doenças graves com o uso regular da bebida.

Estudo realizado por Grob e colaboradores (1996) indica que indivíduos com distúrbios de uso abusivo de drogas, transtorno depressivo maior, transtorno de ansiedade fóbica, e histórias de comportamento violento associado ao alcoolismo tiveram diminuição na recorrência de suas desordens após a entrada na União do Vegetal (UDV).

O “Projeto Hoasca”, estudo realizado com brasileiros que consomem a Ayahuasca, conduzido pelo Centro de Estudos de médicos da União do Vegetal (UDV), evidenciou desempenho significativamente melhor em teste de memória de indivíduos que fazem uso do chá (DOS SANTOS, 2010).

Em estudo realizado por Osorio et al., (2011) sugere que Ayahuasca apresenta propriedades antidepressivas mediadas por sua ação nas vias serotoninérgicas, as quais parecem ter um perfil agudo de ação. No entanto, essa prova deve ser considerada com cautela devido às limitações intrínsecas dos estudos exploratórios envolvendo pequenas amostras.

Os resultados obtidos do trabalho realizado por Samoylenko e colaboradores (2010), aponta a possível aplicação do extrato de *Banisteriopsis caapi* para o tratamento do parkinsonismo e outras doenças neurodegenerativas.

Um volume considerável de evidências indica que a Ayahuasca pode ser útil para o tratamento da dependência do álcool e de outras drogas de abuso, como a cocaína. (THOMAS et al., 2013; BRIERLEY; DAVISON, 2013).

1.2.1. Relatos de casos

Problemas associados com o crescente abuso de substâncias derivadas de plantas psicoativas têm chamado atenção da mídia (BJÖRNSTAD et al., 2009). Vários relatos de casos de intoxicação decorrentes do uso dos principais alcalóides da Ayahuasca tem sido descritos na literatura (FRISON et al., 2008; Mahmoudian; JALILPOUR; SALEHIAN, 2002).

Balíkova (2002), relatou um incidente em que mais de 30 indivíduos foram intoxicados com uma infusão de ervas durante uma sessão de meditação. As características clínicas observadas foram: alucinação, agressividade, agitação, amnesia, midríase, pele seca, taquicardia, hipotensão, hipertermia, colapso, coma e depressão respiratória. Na infusão de ervas foi encontrado: atropina (hiosciamina), escopolamina (hioscina), harmina, e outros alcalóides.

A divisão de toxicologia do departamento de emergência médica de Massachusetts, Estados Unidos, relatou a intoxicação de um adolescente por uma mistura de substâncias comprada através da internet. Após análise por GC-MS da urina do indivíduo, foi confirmado positivo para 5-methoxidimetiltriptamina (5-MeO-DMT), assim como para Harmalina e Harmina (BRUSH; BIRD; BOYER, 2004).

Durante uma investigação de 103 casos suspeitos de intoxicação com materiais vegetais de plantas psicoativas, em conformidade com a suspeita clínica e após confirmação bioanalítica, um paciente testou positivo para Harmina, Harmalina e DMT (BJÖRNSTAD, 2009).

O relato mais grave foi descrito por Sklerov e colaboradores (2005), onde um jovem de 25 anos foi encontrado morto após ingerir uma preparação feita a partir da casca de uma árvore da América do Sul, "Ayahuasca".

No ano 2010, no Brasil, o assassinato de um cartunista, 53 anos, fundador do grupo religioso Céu de Maria, pertencente a vertente Santo Daime, e de seu

filho, 25 anos, cometido por um adolescente frequentador da seita Santo Daime, obteve repercussão nacional (VEJA, 2010).

O assassino confesso, o qual é esquizofrênico, segundo membros da família, depois que começou a frequentar a seita Santo Daime e fazer uso do chá Ayahuasca, passou a apresentar sinais de distúrbios psíquicos (VEJA, 2010).

Pelo fato da bebida conter o alcaloide N, N- Dimetiltryptamina (DMT), o qual é um agonista serotoninérgico, promove o aumento da atividade serotoninérgica no sistema nervoso central (SNC), o que pode desencadear em portadores de esquizofrenia, os quais já possuem um aumento na atividade dopaminérgica, alterações no SNC, e tais alterações poderiam ter feito com que o assassino perdesse a noção da realidade (VEJA, 2010).

1.3. Amostra biológica alternativa: Suor

A análise de suor tornou-se uma ferramenta útil em toxicologia clínica e forense como dispositivo de monitoramento para pessoas no tratamento de drogas de abuso, sob supervisão judicial ou liberdade condicional (KINTZ; SAMYN, 1999).

A utilização do suor como matriz biológica para identificação de drogas apresenta vantagens em relação a outras matrizes como, por exemplo, o sangue e urina. As vantagens do suor incluem: fácil aquisição de um registro cumulativo da exposição de drogas, coleta não invasiva e indolor, redução das chances de adulteração da amostra, facilitação de um registro cumulativo da exposição de drogas, e em alguns casos apresenta janela de detecção mais longa (KOSTER et al., 2013; DE MARTINIS et al., 2008; BARNES et al., 2008).

* Fluido Oral

Figura 2. Tempo de detecção relativa em várias espécies (adaptado de Caplan & Goldberger, 2001).

Contudo, a coleta desta matriz apresenta limitações, nas quais, incluem a variabilidade intra e inter indivíduos na produção de suor, possibilidade de contaminação do meio ambiente, perda de droga como resultado da degradação do dispositivo de coleta ou reabsorção através durante o uso, sensibilidade ocasional da pele causada pelo uso do adesivo (KACINKO et al., 2005).

Vários analitos tem sido investigados em amostra de suor, tais como ecstasy (SAMYN et al., 2002), cocaína (KACINKO et al., 2005; SPIEHLER, et al., 1996), anfetamina (BARNES et al., 2008), codeína (SCHWILKE et al., 2006), MDMA, MDA, HMMA, HMA, MDE, metanfetamina e anfetamina (BARNES et al., 2009; DE MARTINIS et al., 2007) e Δ 9-Tetrahydrocannabinol (SAITO et al., 2004).

1.3.1. Incorporação de drogas no suor

Múltiplos mecanismos parecem estar operantes na incorporação de drogas e metabólitos no suor incluindo difusão passiva da droga presente no sangue para as glândulas sudoríparas e a migração transdérmica da droga para a epiderme. Outros fatores importantes são as propriedades físico-químicas do analito, características específicas do dispositivo de coleta de suor, local de coleta do suor, entre outros (HUESTIS et al., 1999).

A deposição de drogas em suor depende da massa molecular, pka, extensão da ligação às proteínas plasmáticas, e lipofilicidade. O pH do suor varia entre 4 a 6,8 assim, para drogas básicas com baixa capacidade de ligação proteica, a excreção através do suor pode ser uma rota importante de eliminação (DE MARTINIS, 2008; SCHWILKE et al., 2006; SPIEHLER et al., 1996).

Outro fator importante na transferência de drogas para o suor é a lipofilicidade do analito e, geralmente, compostos menos polares têm uma maior capacidade de atravessar membranas biológicas (DE MARTINIS, 2008).

1.3.2. Adesivo para coleta de suor *Pharmchek*™

A coleta de suor é realizada através de adesivos específicos para coleta dessa matriz biológica, liberados para uso pela *Food and Drug Administration* (FDA), que são geralmente usados por 1 semana (BARNES et al., 2008)

A utilização do suor como matriz biológica nas análises toxicológicas sempre se deparou com dificuldades de coleta inerentes a esse fluido biológico, problema que só foi solucionado no final do século XX, com o desenvolvimento e a comercialização de coletores do tipo “*sweat patch*” (COSTA, 2008).

Desde então, uma variedade de dispositivos tem sido utilizada para a coleta de suor, entretanto o mais amplamente empregado e estudado é o adesivo *PharmCheck*™ (*PharmChem Laboratories, Inc.*). Outro adesivo, o *Fast Patch*, recentemente desenvolvido pela *Sudormed*™ (Santa Ana, CA), promove uma estimulação de suor, requerendo apenas 30 min para coleta (ROUEN; DOLAN; KIMBER, 2001).

Figura 3. Adesivo para coleta de suor *PharmCheck*TM
(<http://www.pharmchem.com>)

O adesivo para coleta de suor consiste em uma almofada absorvente de celulose, localizada no centro do adesivo e coberta por uma membrana protetora transparente semelhante a uma bandagem. Antes da aplicação, a área deve ser limpa com álcool isopropílico, e depois o adesivo é fixado na pele, geralmente no braço, abdômen, ou na região lombar (BARNES et al., 2009). Substâncias não-voláteis do meio ambiente não penetram pela membrana semipermeável transparente sobre a camada, porém permite que o oxigênio, vapor de água e dióxido de carbono escapem pelo adesivo, deixando a pele saudável, enquanto os constituintes não-voláteis presentes no suor são retidos na camada absorvente (BARNES et al., 2008; KACINKO et al., 2005; KINTZ et al., 1997).

Aspectos Éticos da Pesquisa

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Atendendo à Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto (FCFRP – USP).

A aprovação do Comitê de Ética segue em anexo (Anexo 1).

Objetivos

3. OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo o desenvolvimento e validação de método para identificação e quantificação dos principais alcalóides presentes na Ayahuasca (Harmina, Harmalina, DMT) em amostras de suor, utilizando a Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Aplicação do método desenvolvido e validado na detecção de Harmina, Harmalina e DMT em amostras de suor coletados de voluntários durante rituais religiosos onde é consumido o chá Ayahuasca.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes e padrões

Padrões de Harmina (cloridrato), Harmalina (cloridrato), e Difenildramina foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Milwaukee, EUA). A solução padrão do analito N, N-dimetiltriptamina (DMT) foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Mauricio Yonamine do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Os reagentes empregados na preparação e análise das amostras foram: metanol, acetonitrila, cloreto de metileno e acetato de etila da JT Baker (EUA), isopropanol, hidróxido de amônio da Mallinkrodt (EUA); ácido clorídrico, acetato de sódio, cloreto de amônio, ácido láctico, ureia, ácido acético, cloreto de sódio e hidróxido de amônio foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (EUA).

4.1.2. Equipamentos e Acessórios

Para realização das análises foi utilizado cromatógrafo em fase gasosa CP3800 acoplado a um espectrômetro de massas, modelo Saturn 2000, ambos da empresa Varian (EUA), equipado com amostrador automático CombiPal da CTC *Analytics* (Suíça); coluna capilar de sílica fundida 5% fenilmetilsilicone DB-5MS com as dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm da J&W Scientific (EUA); cilindro de gás hélio 5.0 analítico da White Martins (Brasil).

Para coleta de suor dos voluntários utilizou-se adesivos específicos para coleta de suor, adesivos *PharmCheck*TM (PharmChem, EUA).

Na extração dos analitos empregaram-se cartuchos de extração em fase sólida (SPE) Bond Elut Certify LCR (Varian®, EUA), realizado com o auxílio de um *manifold* 12 posições de pressão negativa da Supelco (EUA) e bomba de vácuo da Tecnal TE 058 (Brasil).

Concentrador de amostras Caliper LifeScience Turbo Vap (EUA); Banho seco TE – 021, Tecnal (Brasil); Agitador TE - 140 Tecnal (Brasil); Vórtex AP - 56 Phoenix (EUA); Balança analítica BL1500S e BP211D Sartorius (EUA); Deionizador de água da Simplicity Millipore (EUA), também foram empregados.

Parafilm Pechinery Plastic Packaging (Wisconsin, EUA), foi utilizado no armazenamento das soluções e reagentes.

4.1.3. Preparação de soluções e reagentes

4.1.3.1. Preparação das soluções padrão de calibradores, controle de qualidade e padrão interno

Para preparação das soluções padrão de calibradores e controle de qualidade de Harmina, Harmalina e Difenildramina, foram pesados separadamente 5 mg de cada padrão analítico em balões volumétricos de 5 ml, o volume foi completado com metanol dando origem a uma solução de 1 mg/mL.

A partir da solução inicial de 1 mg/ml, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 100 µg/ml e 10 µg/ml da seguinte forma: pipetou-se 1 mL da solução inicial de 1 mg/mL em um balão de 10 mL e o volume foi completado com metanol, originando a solução de 100 µg/mL. Em seguida, 1 mL dessa solução foi transferido para outro balão de 10 mL originando a solução de 10 µg/mL.

O padrão analítico N, N-Dimetiltriptamina possui concentração inicial de 1 mg/ml, sendo este diluído para concentrações menores de 100 µg/ml e 10 µg/ml.

As diluições foram realizadas da seguinte forma: 1 mL do padrão inicial de 1 mg/mL foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol, originando a solução de concentração 100 µg/mL. A partir da solução de 100 µg/ml, transferiu-se 1 mL para outro balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol obtendo-se uma solução com concentração de 10 µg/mL.

Todas as soluções preparadas foram devidamente identificadas, armazenadas em frascos com tampa rosqueável, vedadas com *parafilm*, envolvidas por papel alumínio e armazenadas sob refrigeração a -20°C.

4.1.3.2. Preparação da solução tampão fosfato pH 6,0

Preparou-se uma solução 0,1 M de fosfato de potássio monobásico, dissolveu 13,61 g de KH_2PO_4 em 900 mL de água deionizada. Em seguida o pH foi ajustado a 6,0 com solução 1 M de hidróxido de potássio, após completou-se o volume para 1 L.

4.2. Métodos

4.2.1. Curva de calibração

A curva de calibração foi construída utilizando as concentrações de 50 ng; 100 ng; 250 ng; 500 ng; 1000 ng e 1500 ng por adesivo, para todos os analitos do estudo (DMT, HRL e HRM), sendo cada concentração feita em triplicata. O padrão interno utilizado foi a difenildramina (DIF), sempre na concentração de 100 ng/adesivo.

Os controles de qualidade foram feitos nas seguintes concentrações: nível baixo (CQB) 50 ng; nível médio (CQM) 500 ng; nível alto (CQA) 1000 ng.

4.2.2. Validação

A validação de um método é um processo contínuo o qual se inicia no planejamento da estratégia analítica e segue ao longo de todo seu desenvolvimento (RIBANI et al., 2004). Tem como finalidade atestar por meio de ensaios que o método é adequado ao uso pretendido.

Para a realização de tal procedimento foram utilizadas amostras adicionadas com concentrações pré-determinadas de cada uma das substâncias de interesse: DMT, HRL e HRM.

4.2.3. Parâmetros utilizados na validação

Os parâmetros utilizados para validação do método foram os recomendados pelo guia para validação de métodos bioanalíticos disponibilizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), resolução RE 27, de 17 de maio de 2012.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação recuperação, precisão intra e interensaio, exatidão, estabilidade pós processamento e *carry over*.

4.2.3.1. Seletividade

Seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito de interesse e o Padrão Interno (PI) na presença de outros componentes da amostra (metabólitos, produtos de degradação, fármacos coadministrados ou compostos endógenos).

O parâmetro foi determinado fortificando-se amostras de suor com o limite inferior de quantificação (LIQ), DMT: 20 ng/adesivo; HRA: 25 ng/adesivo; HRL: 25 ng/adesivo, em triplicata, com uma concentração alta (1 µg/adesivo) de possíveis compostos interferentes que podem estar presentes em situações reais de análise.

A seletividade foi avaliada comparando-se os tempos de retenção dos analitos com a resposta de picos interferentes.

As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% e inferiores a 20% em relação ao tempo de retenção dos analitos de interesse.

Os interferentes avaliados foram: ácido acetil salicílico, cafeína, nicotina, diazepam, dipirona, sertralina, fluoxetina, paroxetina, clonazepam, metanfetamina, metilenodioxianfetamina (MDMA), metoclopramida, canabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC), morfina, codeína, cocaína.

4.2.3.2. Linearidade

É a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma determinada faixa de concentração.

Este parâmetro foi analisado através do coeficiente de determinação (r^2) estabelecido através dos resultados de ensaios de 6 pontos de calibração de diferentes concentrações de cada analito, com 5 determinações por concentração. Valores do coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,99 são aceitáveis.

4.2.3.3. Limite de detecção (LOD)

É definido como a menor quantidade ou concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada pelo método e diferenciado com segurança do ruído da linha de base. O limite de detecção (LOD) foi determinado empiricamente através da análise de amostras branco fortificadas com quantidades decrescentes de cada um dos analitos, em seis replicatas de amostras até obter-se o menor nível de concentração que apresentou um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

4.2.3.4. Limite de quantificação (LOQ) ou limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação (LOQ) ou limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os mesmos critérios empregados para determinar o LOD utilizou-se para determinar o LOQ, ou seja, a relação sinal-ruído. Para tanto, fortificou-se amostras branco com concentrações decrescentes dos analitos, sendo estas analisadas em sextuplicata, até obter-se o menor valor de concentração que apresentou um sinal de dez vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

4.2.3.5. Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de extração dos analitos de uma matriz biológica dentro de um limite de variação. A ANVISA recomenda que a percentagem de recuperação seja próxima a 100%, no entanto, admite-se valores menores desde que a recuperação seja precisa e exata.

A avaliação da recuperação foi realizada mediante a comparação dos resultados de amostras fortificadas em três níveis controle (baixo, médio e alto), com os resultados de quantificação das amostras que foram fortificadas posteriormente à extração, que representam 100% de recuperação. O padrão interno foi adicionado anteriormente à extração nas duas situações, de forma que os resultados de quantificação obtidos pudessem avaliar a capacidade do solvente de extrair os analitos dos adesivos para coleta de suor quando fossem comparados com uma situação que teoricamente, equivale a 100% de eficiência de extração.

4.2.3.6. Precisão

Precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

Considerou-se 2 níveis de precisão:

Precisão Intra-ensaio: determinada pela concordância entre resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação.

Precisão Inter-ensaio: determinada pela concordância entre resultados obtidos em dias diferentes, no mesmo laboratório.

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas, se admitindo valores inferiores a 20% para o limite inferior de quantificação (LIQ), e para os demais

pontos valores menores ou iguais a 15%. O DPR pode ser calculado pela fórmula abaixo:

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

Onde:

DPR= Desvio padrão relativo

DP= Desvio padrão

CMD= Concentração média determinada

Este parâmetro foi validado utilizando três níveis controle (baixo, médio e alto), com 5 determinações por concentração, contemplando o intervalo adotado na curva de calibração.

4.2.3.7. Exatidão

Representa o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência. É calculada pela fórmula a seguir:

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

Onde:

CME = Concentração média experimental

CT = Concentração Teórica

Para validar o parâmetro utilizou-se três níveis controle (baixo, médio e alto), ao longo da faixa de variação da curva de calibração, com no mínimo 5 determinações por concentração. A exatidão do método foi avaliada juntamente com a precisão, aplicando-se o cálculo nas médias das concentrações dos cinco dias de análises para cada controle de qualidade. Os valores de exatidão admitidos podem variar de 80% a 120% para o limite inferior de quantificação e de 85% a 115% para controles intermediários e superiores.

4.2.3.8. Estabilidade

Esse parâmetro tem por finalidade avaliar o comportamento do analito nas condições exigidas durante todo processo: coleta e manuseio, armazenamento, ciclos de congelamento e descongelamento.

Estabilidade de curta duração: avalia a variação da concentração do analito na amostra biológica exposta à temperatura ambiente por um período de 24 horas.

Estabilidade de longa duração: avalia a variação da concentração do analito em função do tempo na amostra biológica sob congelamento a -20°C.

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: avalia a capacidade do analito resistir à degradação quando submetido a vários ciclos de congelamento e descongelamento.

Estabilidade pós-processamento: avalia a variação da concentração do analito, na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno (PI), na temperatura sob a qual o teste é realizado e por período de tempo superior à duração total da corrida.

4.2.3.9. Carry over

Avalia o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. O parâmetro foi avaliado injetando uma amostra branco (livre de analito e PI), imediatamente após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração.

4.2.4. Preparo das amostras para desenvolvimento e validação do método

Devido à dificuldade de se conseguir grandes volumes de suor para o desenvolvimento e validação do método, a matriz foi substituída por uma amostra de suor artificial, preparado no laboratório seguindo o método descrito por DE MARTINIS *et al.*, 2007. Suor artificial contém 327 mmol/L de cloreto de amônio, 166 mmol/L de ácido láctico, 83 mmol/L de ureia, 42 mmol/L de ácido acético, 34 mmol/L de cloreto de sódio, em água deionizada e o pH ajustado para 4,7 com hidróxido de sódio 2 mol/L.

Primeiramente adicionou-se em cada adesivo para coleta de suor *Pharmcheck*TM 650 µL de suor artificial, distribuídos por todo adesivo, posteriormente estes foram fortificados com os padrões de Harmina, Harmalina, DMT e o padrão interno Difenildramina, permanecendo em temperatura ambiente por 30 min para secar, em seguida os adesivos foram colocados em tubos cônicos de vidro.

Adicionou-se aos tubos cônicos 3 mL de metanol e em seguida os tubos foram submetidos a agitação no vórtex por 3 min, posteriormente transferiu-se 2,5 mL para outro tubo e levado à evaporação, no concentrador de amostras a 45°C até secar. O extrato foi ressuspendido com 2 mL de tampão fosfato pH 6,0.

Após extração dos analitos dos adesivos, o tratamento das amostras foi realizado em cartuchos de extração em fase sólida SPE Bond Elut Certify LCR acoplados a um *manifold* ligado a uma bomba de vácuo (Figura 4).

Figura 4. *Manifold* utilizado na extração em fase sólida.

Inicialmente, os cartuchos foram condicionados com 1 mL de metanol e 1 mL de água deionizada, em seguida foi realizada a passagem da solução da amostra pelo cartucho. A lavagem foi realizada com 700 μ L de tampão fosfato pH 6,0 e 400 μ L de acetonitrila, deixando secar por 5 minutos sob compressão. Por fim, os analitos foram eluidos com duas alíquotas de 1 mL de solução de eluição; Acetato de etila: Metanol: Hidróxido de amônia (78:20:2 v/v/v).

O eluato foi coletado em tubo cônico e evaporado a 45°C no concentrador de amostras, ressuspensão com 50 μ L de acetonitrila, agitado no vórtex por 10 segundos e transferidos para o *vial*, 1 μ L foi injetado no cromatógrafo.

Procedimento esquematizado na Figura 5.

Figura 5. Esquema das etapas extrativas dos principais alcaloides da Ayahuasca: N,N-Dimetiltriptamina (DMT), Harmalina (HRL) e Harmina (HRA) de amostras de suor através de cartuchos de extração em fase sólida (SPE).

Casuística

5. CASUÍSTICA

Amostras de suor foram coletadas de voluntários, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, participantes de uma comunidade sincrética religiosa que faz uso da Ayahuasca; Centro Fluente Luz Universal Pedro Nunes Costa (CEFLUPENCOS), localizada na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo.

Através de dispositivo específico para coleta de suor, o adesivo *PharmChek*TM, o suor foi coletado fixando-se o dispositivo na pele do voluntário na região lombar, antes da ingestão da Ayahuasca. Anteriormente a aplicação do adesivo, a pele do voluntário (local onde será colocado o adesivo) foi limpa com álcool isopropílico, para remover contaminação externa e melhorar a aderência do adesivo, ilustrado na Figura 6. Foram colocados dois adesivos por voluntário, os quais foram removidos após 24 h da ingestão do chá.

Após serem retirados, os adesivos foram armazenados separadamente em sacos plásticos selados e colocados sob refrigeração até a análise. Antes de participarem dos experimentos, os voluntários que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos em anexo (Anexo 2).

Figura 6. Etapas da coleta de suor dos voluntários. (A) limpeza do local com álcool isopropílico; (B), (C) e (D) fixação do adesivo; (E) retirada do adesivo; (F) armazenamento do adesivo após coleta.

Resultados e Discussão

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento do método

6.1.1. Extração em fase sólida (SPE)

A técnica de extração em fase sólida (SPE), diferentemente da extração líquido-líquido não requer que a fase extratora seja imiscível no fluido que contém o analito a ser extraído. Nessa técnica, o processo de separação baseia-se na interação dos analitos por uma fase estacionária (fase extratora), a qual é geralmente constituída de sílica quimicamente ligada a diferentes tipos de radicais orgânicos, escolhidos de acordo com o tipo de substância que se pretende extrair.

Inicialmente foram realizados vários testes para a escolha da fase extratora do cartucho. As fases extradoras testadas estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1 - Fases extradoras testadas.

Fase Extratora	Mecanismo Separação	Grupo Funcional
NH ₂	Polar/ Troca iônica	Aminopropil
C18	Apolar	Octadecil
Certify	Modo misto	Octil / SCX*
Certify II	Modo misto	Octil / SAX**

* Troca catiônica forte

** Troca aniônica forte

A fase estacionária de sílica ligada quimicamente a octadecil (C-18), útil na extração de compostos apolares ou moderadamente polares, embora foi capaz de isolar os compostos de interesse da matriz, apresentou baixa recuperação dos analitos HRA e HRL, isto pode ser explicado pelo fato das β-

carbolinas possuírem um volumoso grupo apolar, provavelmente ficaram retidas no cartucho.

Os testes realizados com cartuchos NH₂ e Certify II não apresentaram bons resultados, já que estas fases extratoras apresentam baixa interação com compostos apolares, sendo comumente empregadas na extração de drogas ácidas.

O cartucho Bond Elut Certify, coluna de fase mista (grupamento octil e troca iônica), possibilitou a interação tanto pela parte hidrofóbica do analito, como pela parte hidrofílica. A extração através dessa fase extratora possibilitou purificação da amostra e recuperação dos analitos. Na Figura 7, observa-se um cromatograma da análise de amostra de concentração conhecida dos analitos pesquisados após processo de extração.

Figura 7. Perfil cromatográfico de amostra fortificada submetida ao método de extração em fase sólida (1) N, N-Dimetiltriptamina; (2) Difenildramina; (3) Harmalina e (4) Harmina, através de injeção por GC-MS.

6.1.2. Escolha do tipo de detector para determinação dos alcalóides em amostras de suor.

Inicialmente, baseado em método descrito por Pires et al., 2009, foi adaptado e desenvolvido um método para a determinação dos analitos (N, N-dimetiltriptamina, Harmalina e Harmina) em amostras de suor por cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector termiônico específico (GC-TSD).

Apesar de serem realizados vários testes, modificação de diversos parâmetros experimentais, tais como: modificações nas temperaturas do detector, injetor e coluna de separação, otimização dos fluxos dos gases (nitrogênio, hidrogênio, ar sintético e do gás *make up*), os analitos HRL e HRA, apresentaram baixa sensibilidade.

Com base em trabalhos realizados empregando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), tais como, Gaujac et al., (2013), Gambelunghe et al., (2008), Kikura-Hanjiri et al., (2005), passamos a realizar experimentos utilizando a mesma técnica e comparamos os resultados considerando dois tipos de analisadores de massas; *ion trap* e *quadrupolo*.

A princípio o cromatógrafo em fase gasosa série 7890A acoplado a um espectrômetro de massas 5975C (Agilent, EUA), com analisador do tipo *quadrupolo*, apresentou melhor resolução nos picos cromatográficos, especialmente das beta-carbolinas, porém, tal resolução não foi suficiente para uma completa separação dos analitos; Harmina e Harmalina.

O desenvolvimento de condições cromatográficas para detecção dos alcaloides da Ayahuasca tornou-se um grande desafio e felizmente, após várias tentativas foram estabelecidas condições cromatográficas que proporcionaram a separação precisa dos analitos através de cromatógrafo em fase gasosa CP3800 acoplado a um espectrômetro de massas, modelo Saturn 2000 (Varia, EUA).

A Tabela a seguir apresenta as condições cromatográficas estabelecidas para a determinação dos alcaloides (N, N-dimetiltriptamina, Harmalina e Harmina).

Tabela 2 – Condições cromatográficas empregadas para determinação dos alcaloides da Ayahuasca.

	CG/MS com analisador de massas do tipo <i>ion trap</i>
Coluna	sílica fundida DB – 5MS 30m x 0,25mm x 0,25m
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Fluxo do Gás (Hélio)	1,5 mL/min
Temperatura injetor	280°C
Temperatura Detector	220°C
Temperatura <i>transfer line</i>	230°C
Temperatura Coluna	Tabela 3
Tempo total de análise cromatográfica	13,33 minutos

Tabela 3 - Programação da temperatura da coluna

Temperatura inicial (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Tempo de permanência (min)
120	-	-
220	15	1
300	30	3

6.1.2.1. Determinação de N,N-Dimetiltriptamina, Harmalina e Harmina por GC-MS *ion trap* em amostras de suor

Na análise por GC/MS como padrão interno é utilizado preferencialmente substâncias deuteradas, no entanto, padrões analíticos deuterados das substâncias estudadas não são encontradas disponíveis no mercado Brasileiro.

Desta maneira, seguindo método descrito por Pires *et al.*, 2009, optamos por usar como padrão interno a Difenildramina, a qual apresentou boa precisão (CV<10%) e boa linearidade tanto em relação a DMT quanto as β -carbolinas.

As concentrações de N, N – Dimetiltriptamina, Harmina e Harmalina foram determinadas empregando cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo *ion trap* no modo Full Scan de detecção. As condições de análise foram descritas na Tabela 3.

Como dito anteriormente, dos métodos testados o que possibilitou detecção simultânea dos analitos DMT, HRA e HRL em amostras de suor e apresentou boa reprodutibilidade nos resultados foi a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador do tipo *ion trap*.

Na Tabela 4 são apresentados os íons monitorados na identificação e quantificação dos analitos:

Tabela 4 - Íons de identificação e quantificação dos analitos.

Analitos	Íons de Identificação (m/z)	Íon de Quantificação (m/z)
DMT	130, 77	58
Difenildramina	44, 165	58
Harmina	169, 197	212
Harmalina	170, 198	213

A determinação dos íons de identificação e quantificação foi realizada através da injeção de solução contendo os padrões de cada substância, no modo *full scan* de detecção.

Conforme trabalhos já apresentados, Gaujac *et al.*, (2012) e Gambelunghe *et al.*, (2008), a determinação dos alcalóides da Ayahuasca por cromatografia em fase gasosa mostrou ser um método seletivo e capaz de separar e identificar os compostos de interesse.

A Figura 8 apresenta cromatogramas sobrepostos de uma amostra de suor fortificada com 200 ng/adesivo DMT, HRM e HRL e 250 ng/adesivo do

padrão interno difenildramina e, cromatograma de uma amostra de suor branco (isenta dos analitos pesquisados), comprovando que a matriz biológica não apresentou nenhum componente endógeno interferindo nos tempos de retenção dos analitos estudados.

Figura 8. Cromatogramas sobrepostos de uma amostra de suor fortificada e de uma amostra branco. (1) Perfil cromatográfico de uma amostra de suor branco em vermelho. (2) Perfil cromatográfico de uma amostra de suor fortificada em verde.

Nas Figuras de 9 a 12 são apresentados os espectros de massas de cada analito estudado, seguido dos íons selecionados de cada analito e do padrão interno, ilustrando a abundância de cada íon. Como íon de quantificação para análise das amostras foi utilizado o íon mais abundante.

Figura 9. Espectro de massas, seguido dos íons característicos da N, N-Dimetiltriptamina (DMT).

Figura 10. Espectro de massas, seguido dos íons característicos do padrão interno Difenildramina (DIF).

Figura 11. Espectro de massas, seguido dos íons característicos da Harmalina (HRL).

Figura 12. Espectro de massas, seguido dos íons característicos da Harmina (HRA).

6.2. Validação do método

6.2.1. Limites de detecção e quantificação

Os resultados referentes à LOD e LIQ podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados dos limites de detecção e quantificação do método desenvolvido.

Parâmetros	Alcalóides		
	DMT	HRM	HRL
LOD (ng/adesivo)	10	15	15
LOQ (ng/adesivo)	20	25	25

Salum Pires et al., (2009) em análise através da cromatografia em fase gasosa encontraram limites de detecção e quantificação de 0,01 e 0,02 mg/mL (10 ng/mL e 20 ng/mL) para Dimetiltriptamina, Harmina, Harmalina e Tetrahydroharmina, respectivamente.

Mcilhenny et al., (2010) utilizando HPLC-ESI-SRM em seu trabalho obteve valores inferiores aos encontrados no presente trabalho para LOD e LOQ em urina, os quais foram de 0,12 e 5,0 ng/mL para DMT, 0,07 e 5,0 ng/mL para HRM, e 0,18 e 5,0 ng/mL para HRL, respectivamente.

Em outro trabalho, também empregando HPLC para análise, foram encontrados respectivamente os seguintes valores para os limites de detecção e quantificação em plasma, 0,5 e 1,6 ng/mL para DMT, 0,1 e 0,5 ng/mL para HRM e 0,1 e 0,3 ng/mL HRL (YRITIA et al., 2002).

6.2.2. Linearidade

Foram obtidas curvas de calibração lineares para todos analitos, com coeficiente de correlação maior que 0,99. Os pontos de calibração foram: 50, 100, 250, 500, 850, 1000 e 1500 ng/adesivo.

As curvas de calibração e as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação estão apresentadas nas Figuras de 13 a 15.

Figura 13. Representação gráfica da curva de calibração da N, N-Dimetiltriptamina (DMT) em amostra de suor.

Figura 14. Representação gráfica da curva de calibração da Harmalina (HRL) em amostra de suor.

Figura 15. Representação gráfica da curva de calibração da Harmina (HRM) em amostra de suor.

Os coeficientes de correlação linear estão de acordo com o recomendado pela ANVISA (2003), indicando a relação de proporcionalidade direta entre as concentrações das soluções padrões e a área do pico.

6.2.3. Precisão

As análises foram realizadas em cinco dias diferentes. As Tabelas 6 e 7 apresentam os valores médios de precisão intra-ensaio e inter-ensaio. A precisão intra-ensaio obtida para todos analitos apresentou uma variação de 3,92% a 9,06% que foram os valores encontrados respectivamente para o CQB da DMT e o CQA da HRL. Para a precisão inter-ensaio os valores médios encontrados variaram de 3,34% a 9,85%, que correspondem aos valores respectivamente do CQM da HRM e CQA da DMT. Todos os valores encontrados estão dentro do limite de variação aceitável, até 20% para o CQB e até 15% para os CQM e CQA.

Tabela 6. Valores da precisão intra-ensaio (%) obtido em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

Analitos	CQB (%)	CQM (%)	CQA (%)
DMT	3,926	3,068	1,854
HRM	9,012	6,799	5,420
HRL	9,442	7,124	9,068

Tabela 7. Valores da precisão inter-ensaio (%) obtido em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

Analitos	CQB (%)	CQM (%)	CQA (%)
DMT	8,230	6,477	9,850
HRM	8,181	3,340	8,982
HRL	8,823	6,736	7,314

Observando os resultados apresentados podemos dizer que o método mostrou ter boa reprodutibilidade (inter-ensaios) e boa repetitividade (intra-ensaios).

6.2.4. Exatidão

Os valores de exatidão encontrados para todos os analitos estavam dentro dos limites de variação aceitáveis, ou seja, 80 a 120% para o controle baixo (CQB) e 85 a 120% para os controles de qualidade médio e alto (CQM e CQA). Os valores de exatidão encontrados variaram de 87,5% (CQB da DMT) a 105% (CQM da DMT). A Tabela 8 apresenta os valores médios de exatidão obtidos nos cinco dias de análise para os 3 controles de qualidade de cada um dos analitos.

Tabela 8. Valores de exatidão (%) obtidos em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

Níveis controle	DMT	HRM	HRL
CQB (%)	87,5	102,4	99
CQM (%)	105	99,7	101
CQA (%)	99,2	100,2	93,1

6.2.5. Recuperação

Os valores de recuperação encontrados para a determinação dos analitos em suor variaram de 72,1% (CQA da HRL) até 90,1% (CQB da DMT), conforme são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de recuperação (%) encontrados em amostras de suor adicionadas com três níveis de concentração de cada analito.

Níveis controle	DMT	HRM	HRL
CQB (%)	90,1	80,5	83,6
CQM (%)	89,5	77,2	89,3
CQA (%)	80,9	83,7	72,1
MÉDIA	86,84	80,47	81,67

Conforme descrito anteriormente, valores de recuperação próximas a 100% são desejáveis, mas são admitidos valores inferiores, desde que o método mostre ser preciso e exato. O método desenvolvido mostrou ser preciso (item 6.2.3.) e exato (item 6.2.4).

6.2.6. Especificidade

Na Tabela 10, estão apresentados os valores de recuperação do controle de qualidade baixo (CQB) dos analitos na presença dos interferentes. Os interferentes analisados foram: ácido acetil salicílico (AAS), alprazolam,

anfetamina, metanfetamina, metilenodioxianfetamina (MDMA), diazepam, bromazepam, lorazepam, flurazepam, nortriptilina, fenobarbital, cafeína, dipirona, nicotina, efedrina, fenilefrina, fluoxetina, metoclopramida e tetrahydrocannabinol (THC).

Tabela 10. Variação nos valores de recuperação do CQB para DMT, HRL e HRA, na presença dos interferentes.

	DMT	HRL	HRM
Variação da concentração final	89,5%	80,1%	83,6%

O método desenvolvido mostrou ser seletivo e específico, não apresentando alteração nos tempos de retenção dos analitos pesquisados, foi capaz de detectar e quantificar os analitos na presença de interferentes mantendo as concentrações dentro do intervalo aceitável, ou seja, de 80 a 120%.

6.2.7. Carry over

Para avaliar o *carry over* uma amostra branco (isento dos analitos pesquisados) foi analisada imediatamente após a injeção da maior concentração da curva de calibração. Para nenhum dos analitos pesquisados foi observado *carry over*, conforme pode ser visto na Figura 16.

Podemos visualizar melhor a ausência de *carry over*, ao comparar com a figura 17 que apresenta o cromatograma dos ions extraídos de extrato de uma amostra de suor fortificada com 500 ng/adesivo dos padrões (DMT, HRA e HRL)

Figura 16: Cromatograma da análise de um extrato de uma amostra de suor branco, após a injeção do ponto mais alto da curva de calibração.

Figura 17: Cromatograma obtido da análise de um extrato de uma amostra de suor fortificada com 500ng/adesivo dos padrões (DMT, HRA e HRL), após seleção dos íons.

6.2.8. Estabilidade

Segundo Peters et al., (2007), a estabilidade do analito durante todo o processo analítico é um pré-requisito para a quantificação confiável, sendo este parâmetro imprescindível na validação do método.

A estabilidade de curta duração pós-processamento foi determinada através da injeção em triplicata do controle de qualidade baixo (CQB), 50 ng/adesivo de DMT, HRM e HRL, e do controle de qualidade alto (CQA), 1500 ng/adesivo de DMT, HRM e HRL; comparadas com injeções realizadas 8 horas após a primeira injeção da mesma solução armazenada em temperatura ambiente e em freezer a -20°C. A Tabela 11 e 12 apresenta os valores de variação da concentração do analito, na amostra processada para análise obtidos pós-processamento para DMT, HRM e HRL.

Tabela 11. Variação da concentração dos analitos, DMT, HRM e HRL pós-processamento, após 8 horas para controle de qualidade baixo.

Analitos	Temperatura ambiente	Freezer -20°C
DMT	102,53	92,70
HRM	94,72	83,10
HRL	87,55	94,57

Tabela 12. Variação da concentração dos analitos, DMT, HRM e HRL pós-processamento, após 8 horas para controle de qualidade alto.

Analitos	Temperatura ambiente	Freezer -20°C
DMT	100,88	92,70
HRM	101,42	83,16
HRL	98,55	107,57

6.3. Aplicação do método desenvolvido na análise das amostras de suor

O cromatograma apresentado na Figura 18 foi obtido a partir da análise de uma amostra de suor real, onde foram identificados todos os analitos pesquisados.

Figura 18: Cromatograma obtido da análise de uma amostra de voluntário positivo para todos analitos pesquisados. (1) N, N-Dimetiltriptamina; (2) Difenildramina; (3) Harmalina e (4) Harmina.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

1. O método analítico desenvolvido e validado para determinação dos principais alcaloides da Ayahuasca: DMT, HRM e HRL, empregando a extração em fase sólida (SPE) e a cromatografia em fase gasosa (GC/MS) apresentou eficiência, reprodutibilidade e sensibilidade para identificação e quantificação em amostras de suor, podendo assim, ser empregado para um registro cumulativo da exposição aos alcaloides da Ayahuasca.
2. Através dos resultados obtidos desse trabalho foi possível concluir que a matriz biológica alternativa estudada; o suor, pode ser empregado para a análise simultânea dos alcaloides: DMT, HRM e HRL.
3. O método poderá ser empregado em várias áreas da Toxicologia:
 - Forense – Auxiliar monitorização de detentos em liberdade condicional;
 - Clínica – Contribuir no acompanhamento do tratamento de toxicodependente;
 - Ocupacional – Facilitar o monitoramento nos locais de trabalho, principalmente nas profissões que exigem maior atenção, as quais podem oferecer riscos para o indivíduo e para população; como por exemplo: caminhoneiros.

Embora no Brasil a monitorização do uso de drogas na área forense, clínica ou ocupacional não seja realizada com frequência, nos Estados Unidos é uma prática comum, e avanços nas pesquisas na área da Toxicologia colaboram para que tais práticas venham a fazer parte de nosso cotidiano.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALIKOVA, M. Collective poisoning with hallucinogenous herbal tea. *Forensic Science International*. v. 128, p. 50-52, 2002.

BARNES, A.J.; DE MARTINIS, B.S.; GORELICK, D.A.; GOODWIN, R.S.; KOLBRICH, E.A.; HUESTIS, M.A. Disposition of MDMA and Metabolites in Human Sweat Following Controlled MDMA Administration. *Clin. Chem.* v. 55, n. 3, p. 454-462, 2009.

BARNES, A.J.; SMITH, M.L.; KACINKO, S.; SCHWILKE, E.W.; CONE, E.J.; MOOLCHAN, E.T.; HUESTIS, M.A. Excretion of Methamphetamine and Amphetamine in Human Sweat Following Controlled Oral Methamphetamine Administration. *Clin. Chem.* v. 54, n. 1, p. 172-180, 2008.

BJORNSTAD, K.; HULTEN, P.; BECK, O.; HELANDER, A. *Clinical Toxicology*, v. 47, p. 566-572, 2009.

BOUSO, J.C.; RIBA, J. An overview of the literature on the pharmacology and neuropsychiatric long term effects of Ayahuasca. *The Ethnopharmacology of Ayahuasca*, p. 55-63, 2011.

BRASIL. Gabinete de Segurança Institucional. Resolução RDC nº01 de 25 de janeiro de 2010. Dispõe sobre a observância, pelos órgãos da Administração Pública, das decisões do Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas - CONAD sobre normas e procedimentos compatíveis com o uso religioso da Ayahuasca e dos princípios deontológicos que o informam. Disponível em: <www.anvisa.org.br>. Acesso em 12/13/13.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos". Disponível em: <<http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Legislacao/327995.pdf>>. Acesso em 01/09/13.

BRIERLEY, D.I.; DAVIDSON, C. Harmine augments electrically evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens shell. *Journal of Psychopharmacology*, v. 27, n. 1, p. 98-108, 2013.

BRUSH, D. E.; BIRD, S. B.; BOYER, E. W. Monoamine Oxidase Inhibitor Poisoning Resulting from Internet Misinformation on Illicit Substances. *Journal of Clinical Toxicology*, v. 42, n. 2, p. 191-195, 2004.

CALLAWAY, J.C.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, G.S.; RAYMON, L.P.; POLAND, R.E.; ANDRADE, E.N.; ANDRADE, E.O.; MASH, D.C. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in health humans. *Journal Ethno-Pharmacology*, v. 65, p. 243-256, 1999.

CALLAWAY, J.C.; RAYMON, L.P.; HEARN, W.L.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, G.S.; MASH, D.C. Journal of Analytical Toxicology, v. 20, 1996.

CAPLAN, Y. H.; GOLDBERGER, B. A. Alternative specimens for workplace drug testing, Journal of Analytical Toxicology, v. 25, n. 5, 2001.

CONCHEIRO, M.; SHAKLEYA, D.M.; HUESTIS, M.A. Simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine and nicotine metabolites in sweat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, v. 400, p. 69-78, 2011.

COSTA, M.C.M.; FIGUEIREDO, M.C.; CAZENAVE S.O.S. Ayahuasca: Uma abordagem toxicológica do Uso Ritualístico. Revista de Psiquiatria Clínica, v. 32, p. 310-318, 2005.

DE MARTINS, B.S. Sweat as na Alternative Matrix for Amphetamines and Methylenedioxy Derivates Analysis. Current Pharmaceutical Analysis, v. 4, n. 4, p. 274-278, 2008.

DE MARTINIS, B.S.; BARNES, A.J.; SCHEIDWEILER, K.B.; HUESTIS, M.A. 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, v. 852, p. 450-458, 2007.

DOS SANTOS, R.G. The Pharmacology of Ayahuasca: A review. Brasília Med, v. 47, n. 2, p. 188-195, 2010.

DOS SANTOS, R.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; STRASSMAN, R.J.; MOTTA, V.; CRUZ, A.P.M. Effects of Ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. J Ethno-Pharmacology, v. 112, p. 507-513, 2007.

FRISON, G.; FAVRETTO, D.; ZANCANARO, F.; FAZZIN, G.; FERRARA, S.D. A case of β -carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. Forensic Sci. Int. v. 179, p. 37-43, 2008.

GABLE, R.S. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. Addiction, v. 102, p. 24-34, 2006.

GAMBELUNHE, C.; ARONI, K.; ROSSI, R.; MORETTI, L.; BACCI, M. Identification of N, N-dimethyltryptamine and β -carbolines in psychotropic beverage. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 1056-1059, 2008.

GAUJAC, A.; DEMPSTER, N.; NAVICKIENE, S.; BRANDT, S.D.; DE ANDRADE, J.B. Determination of N,N-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry. Talanta, v. 106, p. 394-398, 2013.

GAUJAC, A.; AQUINO, A.; NAVICKIENE, S.; DE ANDRADE, J.B. Determination of N,N-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC-MS. *Journal of Chromatography B*, v.881-882, p. 107-110, 2012.

GROB, C.S.; MCKENNA, D.J.; CALLAWAY, J.C.; BRITO, G.S.; NEVES, E.S.; OBERLAENDER, G.; SAIDE, O.L.; LABIGALINI, E.; TACLA, C.; MIRANDA, C.T.; STRASSMAN, R.J.; BOONE, K.B. Human Psychopharmacology of Hoasca, A Plant Hallucinogen Used in Ritual Context in Brazil. *J Nervous & Mental Disease*, v. 184, n. 2, p. 86-94, 1996.

HUESTIS, M.A.; OYLER, J.M.; CONE, E.J.; WSTADIK, A.T., SCHOENDORFER, D.; JOSEPH, R.E. Sweat testing for cocaine, codeine and metabolites by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, v. 733, p. 247-264, 1999.

KACINKO, S.L.; BARNES, A.J.; SCHWILKE, E.W.; CONE, E.J.; MOOLCHAN, E.T.; HUESTIS, M.A. Disposition of Cocaine and Its Metabolites in Human Sweat after Controlled Cocaine Administration. *Clinical Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 2085-2094, 2005.

KIKURA-HANAJIRI, R.; HAYASHI, M.; SAISHO, K.; GODA, Y. Simultaneous determination of nineteen hallucinogenic tryptamines/ β -calbolines and phenethylamines using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 825, p. 29-37, 2005.

KINTZ, P.; SAMYN, N. Determination of “Ecstasy” components in alternative biological specimens. *Journal of Chromatography*, v. 733, p. 137-143, 1999.

KINTZ, P.; BRENNEISEN, R.; BUNDELI, P.; MANGIN, P. Sweat testing for heroin and metabolites in a heroin maintenance program. *Clin. Chem.*, v. 43, n. 5, p. 736-739, 1997.

KOSTER, R.A.; ALFFENAAR, J.C.; GREJDANUS, B.; VANDERNAGEL, J.E.L.; UGES, D.R.A. Application of Sweat Patch Screening for 16 Drugs and Metabolites Using a Fast and Highly Selective LC-MS/MS Method. *Therapeutic and Drug Monitoring*, v. 36, n. 1, p. 35-45, 2014.

MAHMOUDIAN, M.; JALILPOUR, H.; SALEHIAN, P. Toxicity of Peganum harmala: Review and a Case Report. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. v. 1, n. 1, p. 1-4, 2002.

MCILHENNY, E.H.; RIBA, J.; BARBANOJ, M.J.; STRASSMAN, R.; BARKER, S. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. *Biomedical Chromatography*, v. 26, p. 301-313, 2011.

MCILHENNY, E.H.; RIBA, J.; BARBANOJ, M.J.; STRASSMAN, R.; BARKER, S. Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites

of the Amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine. *Biomedical Chromatography*, v. 25, p. 970-984, 2010.

MCKENNA, D.J. Clinical investigations of the therapeutic potential of Ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacol Ther*, v. 102, p. 111-129, 2004.

MCKENNA, D.J.; TOWERS, G.H.N.; ABBOTT, F. Monoamine Oxidase Inhibitors in South American Hallucinogenic Plants: Tryptamine and β -Carboline Constituents of Ayahuasca. *J Ethnopharmacology*, v. 10, p. 195-223, 1984.

MOURA, S.; CARVALHO, F.G.; OLIVEIRA, C.D.R.; PINTO, E. qNMR: An applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. *Phytochemistry Letters*, v. 3, p. 79-83, 2010.

OLIVEIRA, C.D.R.; MOREIRA, C.Q.; MARQUES DE SÁ, L.R.; SPINOSA, H.S.; YONAMINE, M. Maternal and Development Toxicity of Ayahuasca in Wistar Rats. *Birth Defects Research (Part B)*, v. 89, p. 207-212, 2010.

RIGA, M.S.; SORIA, G.; TUDELA, R.; ARTIGAS, F.; CELADA, P. the natural hallucinogen 5-MeO-DMT, componente of Ayahuasca, disrupts cortical function in rats: reversal by antipsychotic drugs. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, p. 1-14, 2014.

OSÓRIO, F.L.; MACEDO, L.R.H.; SOUZA, J.P.M.; PINTO, J.P.; QUEVEDO, J.; CRIPPA, J.A.S.; HALLAK, J.E.C. The therapeutic potential of harmine and Ayahuasca in depression: Evidence from exploratory animal and human studies. *J Ethnopharmacol of Ayahuasca*, p. 75-85, 2011.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *Forensic Science Int.*, v. 165, p. 216-224, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. Outros mediadores periféricos: 5-hidroxitriptamina e purinas. In: RANG & DALE *Farmacologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Cap. 12, p. 189-200.

RIBA, J.; RODRIGUEZ-FORNELLS, A.; URBANO, G.; MORTE, A.; ANTONIJOAN, R.; MONTERO, M.; CALLAWAY, J.C.; BARBANOJ, M.B. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. *J Psychopharmacol*, v. 154, p. 85-95, 2001.

RIBA, J.; VALLE, M.; URBANO, G.; YRITIA, M.; MORTE, A.; BARBANOJ, M.J. Human Pharmacology of Ayahuasca; Subjective and Cardiovascular Effects, Monoamine Metabolite Excretion and Pharmacokinetics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306, n. 1, p. 73-83, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. *Quimica Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROUEN, D.; DOLAN, K.; KIMBER, J. A review of drug detection testing and an examination of urine, hair, saliva and sweat. *National Drug and Alcohol Research*

Centre. University of New South Wales, Sydney, 2001. Disponível em: <<http://ndarc.med.unsw.edu.au/sites/default/files/ndarc/resources/TR.120.PDF>>. Acesso em: 17 de novembro de 2013.

SAITO, T.; WTSADIK, A.; SCHEIDWEILER, K.B.; FORTNER, N.; TAKEICHI, S.; HUESTIS, M.A. Validated Gas Chromatographic-Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometric Method for Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Sweat Patches. *Clinical Chemistry*. v. 50, n. 11, p. 2083-2090, 2004.

SALUM PIRES, A.P.; OLIVEIRA, C.D.R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 31, n. 1, p. 15-23, 2010.

SALUM PIRES, A.P.; OLIVEIRA, C. D. R.; MOURA, S.; DORR, F. A.; SILVA, W. A. E.; YONAMINE, M. Gas Chromatographic Analysis of Dimethyltryptamine and β -Carboline Alkaloids in Ayahuasca, an Amazonian Psychoactive Plant Beverage. *Phytochemical Analysis*, v.20, p. 149-153, 2009.

SAMOYLENKO, V.; RAHMAN, M.; TEKWANI, B.; TRIPATHI, L. M.; WANG, Y.; KHAN, I. A.; MILLER, L. S. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the actives relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *Journal of ethnopharmacology*, v. 127, p. 357-367, 2010.

SAMYN, N.; DE BOECK, G.; WOOD, M.; LAMERS, C.T.J.; DE WAARD, DICK.; BROOKHUIS, K.A.; VERSTRAETE, A.G.; RIEDEL, W.J. Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. *Forensic Sci. Int.*, v. 128, p. 90-97, 2002.

SCHWILKE, E.W.; BARNES, A.J.; KACINKO, S.L.; CONE, E.J.; MOOLCHAN, E.T.; HUESTIS, M.A. Opioid Disposition in Human Sweat after Controlled Oral Codeine Administration. *Clin. Chem.* v. 52, n. 8, p. 1539-1545, 2006.

SKLEROV, J.; LEVINE, B.; MOORE, K. A.; KING, T.; FOWLER, D. A fatal Intoxication Following the Ingestion of 5-Methoxy-N, N-Dimethyltryptamine in Ayahuasca Preparation. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 29, 2005.

SPIEHLER, V.; FAY, J.; FOGERSON, R.; SCHOENDORFER, D.; NIEDBALA, R.S. Enzyme immunoassay validation for qualitative detection of cocaine in sweat. *Clin. Chem.* v. 42, n. 1, p. 34-38, 1996.

THOMAS, G.; LUCAS, P.; CAPLER, N.R.; TUPPER, K.W.; MARTIN, G. Ayahuasca-Assisted Therapy for Addiction: Results from a Preliminary Observational Study in Canada. *Current Drug Abuse Reviews*, v.6, p. 30-42, 2013.

VEJA. Alucinação assassina. *Revista Veja.com*, edição 2157, 24 de março de 2010. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/240310/alucinacao-assassina-p-066.shtml>>. Acesso em: 27 outubro de 2013.

YRITIA, M.; RIBA, J.; ORTUÑO, J.; RAMIREZ, A.; CASTILHO, A.; ALFARO, Y.; TORRE, R.; BARBANOJ, M.J. Determination of N, N-dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. *Journal of Chromatography B*, v. 779, p. 271-281, 2002.

Considerações Finais

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ayahuasca, mundialmente conhecida como bebida amazônica está sendo cada vez mais utilizada, tanto para fins terapêuticos, como para recreação, em países da Europa e EUA, sendo adquirida facilmente pela internet, no entanto, ainda que se encontre relatos na literatura, assim como na Internet, do uso da Ayahuasca no tratamento das mais variadas patologias, como: dependência química, parkinsonismo e até mesmo na cura do câncer, a segurança e eficácia da bebida não estão totalmente esclarecidos.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 120/2011
kms

Ribeirão Preto, 16 de dezembro de 2011.

À
PÓS-GRADUANDA LIDIANE SILVA TAVARES
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 98ª Sessão Ordinária, realizada em 14/12/2011, o projeto de pesquisa intitulado "INVESTIGAÇÃO DE ALCALÓIDES β -CARBOLINAS, TRIPTAMINA PRESENTES NA AYAHUASCA (SANTO DAIME) E SEUS METABÓLITOS, EM AMOSTRAS DE SUOR, UTILIZANDO A EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MODIFICADA (PONTEIRAS DE EXTRAÇÃO DPX®) E A CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE NITROGÊNIO-FÓSFORO (GC-NPD)", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 250.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE *deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador*".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Atenciosamente,

PROF.ª DR.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: “Investigação de alcalóides β -carbolinas, Triptaminas presentes na Ayahuasca (Santo Daime) e seus metabólitos, em amostras de suor, utilizando a extração em fase sólida modificada (ponteiras de extração DPX®) e a Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de nitrogênio-fósforo (GC-NPD)”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, CRQ N° 04.100.360 - tels (16) 3602-4424, (16) 3602-3359, martinis@fmrp.usp.br

Lidiane Silva Tavares, tel (16) 3602-3359, lstavare@fcfrp.usp.br

PROMOTORES DA PESQUISA

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis.

Antes de aceitar a participar deste estudo é importante que você leia e entenda as explicações sobre o procedimento proposto. Você é **livre** para não querer participar ou **desistir** da pesquisa a qualquer momento que desejar.

Caso mude de idéia, você não será prejudicado. Você tem direito a perguntar o que quiser durante a pesquisa. Você não pagará nada e também não receberá nenhum dinheiro ou benefício adicional.

MOTIVO DA PESQUISA

O objetivo dessa pesquisa é desenvolver um método de análise para identificação e quantificação dos compostos da Ayahuasca em suor.

O chá é utilizado por uma grande variedade de indivíduos, e fatores fisiopatológicos individuais podem interferir nas ações farmacológicas da Ayahuasca. Há na literatura relato de intoxicação devido ao consumo da ayahuasca, sendo necessários maiores estudos para obter informações sobre os efeitos clínicos e dessa forma diagnosticar corretamente casos de intoxicação pelo uso do chá.

Desta maneira, a pesquisa fornecerá base para posteriores aplicações em pesquisas clínicas, e obtenção de maiores conhecimentos toxicológicos e farmacológicos sobre a Ayahuasca.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Se você concordar em participar da pesquisa, será fixado na sua pele na região lombar (costas) adesivos para coleta de suor, antes da ingestão da ayahuasca. Antes da aplicação do adesivo, a sua pele (local onde será colocado o adesivo) será limpa com álcool isopropílico, para remover contaminação externa e melhorar a adesão do adesivo. Serão colocados 2 adesivos por voluntário que serão removidos após 48h da ingestão do chá.

RISCOS E/OU DESCONFORTOS

A coleta de suor não trará nenhum desconforto ou risco para você, o único desconforto possível, será uma possível irritação ou alergia local (no local onde o adesivo foi colocado), porém sem causar danos graves ou estéticos. Não há relatos de nenhum tipo de dano nocivo devido ao uso do adesivo para coleta de suor.

BENEFÍCIOS

Os voluntários não irão obter benefícios com a participação nesta pesquisa, mas a sua participação na pesquisa poderá contribuir para o desenvolvimento de um novo método de determinação dos componentes da Ayahuasca.

CONFIDENCIALIDADE

Os seus dados da sua participação nesta pesquisa são confidenciais. Você não será identificado em nenhum trabalho que possa resultar dessa pesquisa.

PROBLEMAS OU PERGUNTAS

Se você tiver alguma pergunta ou qualquer dúvida sobre essa pesquisa, entre em contato com **Lidiane Silva Tavares** ou **Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis** pelos telefones: (16) 3602-3359 ou (16) 3602-4424. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP, tel (16) 3602-4681.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido e tiver entendido a Informação e concordar voluntariamente em participar desse estudo, por favor, assine abaixo:

Nome do voluntário Assinatura do voluntário Data

Nome da testemunha Assinatura da testemunha Data

Eu expliquei o propósito desse estudo ao voluntário. Estou certo de que ele entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do pesquisador:

Assinatura: _____

Data: _____