UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e
N,N-dimetiltryptamina (DMT) como substratos de peroxidases:
uma possível rota de metabolização

Melissa Medrano Gomes

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo
2008

Melissa Medrano Gomes

Dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e *N,N*-dimetiltriptamina
(DMT) como substratos de peroxidases: uma possível rota de
metabolização

Comissão Julgadora da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ana Campa
Orientadora / Presidente

Profa. Dra. Regina Vicenzi Oliveira
1º. examinador

Prof. Dr. Josef Willhen Baaden
2º. examinador

São Paulo, 25 de fevereiro de 2008.

À minha amiga e orientadora Profa. Dra. Ana Campa, que sempre apostou em mim e nunca duvidou de minha vitória. Obrigada pela oportunidade que me ofereceu de ter participado de seu respeitado grupo, onde não só cresci como profissional, mas também como pessoa. Levarei sempre comigo todos esses momentos maravilhosos que pudemos compartilhar. Por fim, obrigada pela confiança, respeito e amizade.

*“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará a seu tamanho original”.*

Albert Einstein

Quero oferecer esse mérito conquistado à minha querida avó Manoela e à memória dos meus queridos avôs Caetano e Ardevan, que sempre quiseram que meus estudos estivessem em primeiro lugar e nunca negaram ajuda para que isso fosse possível. Graças ao incentivo de minha avó, consegui realizar um sonho que pensava estar fora de minha realidade. Assim, quero agradecê-la pelo incentivo persistente, pelo carinho e amor me oferecidos. Tenho certeza também de que, onde quer que meus avôs estejam eles estarão igualmente orgulhosos de mim...

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com freqüência, poderíamos ganhar pelo simples medo de arriscar.”

William Sheikspeare

Ao meu querido companheiro Felipe Augusto Dörr, que se tornou em tão pouco tempo, uma das pessoas mais especiais da minha vida. Foi quem me forneceu todo suporte técnico-profissional para que este trabalho fosse bem sucedido, assim como todo apoio emocional necessário durante esse período. Serei infinitamente grata a você!

*“Não espere realizar seus sonhos
se você não estiver disposto a ajudar
os outros a realizar os deles.”*

Kaughee Vill

Agradecimentos

A **Deus** pela grande oportunidade me oferecida e a toda **minha família** que compartilhou comigo os momentos de alegrias e dificuldades.

Às minhas queridas amigas **Paula Kujbida, Grasiela Magnani e Silene Migliorini** pelo carinho e amizade sempre me oferecidos.

Aos meus colegas de trabalho **Silvana Sandri, Sabrina Okada, Andressa Franco, Alziana Pedrosa, Siddartha Sacadura e Sidney Moura**, por toda ajuda técnica, convívio e apoio moral.

Aos professores doutores **Maurício Yonamine e Ernani Pinto Júnior** pelo incentivo quando precisei e pela amizade que se formou.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (**FCF/USP**) e a todos os **funcionários** que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela concessão de bolsa e suporte financeiro, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**).

Índice

1. LISTA DE ABREVIATURAS	1
2. RESUMO	3
3. ABSTRACT	4
4. INTRODUÇÃO	5
5. REVISÃO DA LITERATURA	9
5.1 COMPOSTOS INDÓLICOS COM ATIVIDADE ALUCINÓGENA	9
5.1.1 DIETILAMIDA DO ÁCIDO LISÉRGICO (LSD)	11
5.1.2 <i>N,N</i> -DIMETILTRIPTAMINA (DMT)	14
5.2 NEUTRÓFILOS, CÉLULAS MONONUCLEARES E BURST OXIDATIVO	18
5.3 PEROXIDASES	20
5.3.1 MIELOPEROXIDASE	20
5.3.2 PEROXIDASE DE RÂBANO	22
5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	24
5.4.1 DETECTORES DE ABSORBÂNCIA	25
5.4.2 DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA	26
5.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	27
5.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC/MS)	28
5.7 QUIMILUMINESCÊNCIA	29
6. OBJETIVOS	31
7. MATERIAL E MÉTODOS	33
7.1 MATERIAL	33
7.1.1 REAGENTES	33
7.1.2 EQUIPAMENTOS	33
7.1.3 LEUCÓCITOS E URINA	34
7.2 MÉTODOS	34
7.2.1 PREPARO DE SOLUÇÕES	34
7.2.2 ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS	35
7.2.3 REAÇÃO DE LSD COM HRP E H ₂ O ₂	35
7.2.4 REAÇÃO DE LSD COM LEUCÓCITOS ATIVADOS	36
7.2.5 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE LSD POR HPLC COM DETECTORES PDA E FLUORESCÊNCIA, E POR LC/MS	36
7.2.6 REAÇÃO DE LSD COM DE NEUTRÓFILOS ATIVADOS E ADIÇÃO DE INIBIDORES DE ERO	37
7.2.7 ANÁLISE DE URINA DE USUÁRIO DE LSD	37
7.2.8 QUIMILUMINESCÊNCIA DA REAÇÃO DE LSD COM LEUCÓCITOS ATIVADOS E COM HRP E H ₂ O ₂	38
7.2.9 REAÇÃO DE LSD COM H ₂ O ₂ 29% E ANÁLISE POR LC/MS	38

7.2.10 EXTRAÇÃO DE DMT A PARTIR DO CHÁ DE SANTO DAIME (AYAHUASCA)	39
7.2.11 SÍNTESE DE DMT A PARTIR DE INDOL	39
7.2.12 REAÇÃO DE DMT COM HRP E H ₂ O ₂	40
7.2.13 REAÇÃO DE DMT COM NEUTRÓFILOS ATIVADOS	40
7.2.14 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE DMT POR HPLC COM DETECTORES PDA E FLUORESCÊNCIA, E POR LC/MS.....	41
7.2.15 REAÇÃO DE DMT COM NEUTRÓFILOS ATIVADOS E ADIÇÃO DE INIBIDORES DE ERO	41
8. RESULTADOS	43
8.1 LSD	43
8.1.1. REAÇÃO DE LSD COM HRP E H ₂ O ₂	43
8.1.2 REAÇÃO DE LSD COM NEUTRÓFILOS ATIVADOS.....	54
8.1.3 ANÁLISE DE URINA DE USUÁRIO DE LSD	58
8.1.4. QUIMILUMINESCÊNCIA DA REAÇÃO DE LSD COM LEUCÓCITOS ATIVADOS E COM HRP/H ₂ O ₂	59
8.1.5 REAÇÃO DE LSD COM H ₂ O ₂ 29%	62
8.2 DMT	63
8.2.1 EXTRAÇÃO DE DMT A PARTIR DA AYAHUASCA (CHÁ DE SANTO DAIME)	63
8.2.2 OBTENÇÃO DE DMT A PARTIR DE SUA SÍNTESE	64
8.2.3 REAÇÃO DE DMT COM HRP E H ₂ O ₂	65
8.2.4 REAÇÃO DE DMT COM NEUTRÓFILOS ATIVADOS	72
9. DISCUSSÃO	75
9.1 LSD	75
9.1 DMT	80
10. CONCLUSÕES	85
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
12. ANEXOS.....	95
12.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	95
12.3 FICHA DO ALUNO	98
12.3 CURRÍCULO LATTES.....	101

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AFMK: *N*-acetil-*N*-formil-5-metoxiquinuramina

AIA: ácido 3-indolacético

AMK: *N*-acetil-5-metoxiquinuramina

AOMBK: *N,N*-dietil-7-amino-4-metil-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahidrobenzo[*f*]quinolina-2-carboxamida

CONAD: Conselho Nacional Anti Drogas

Da: Dalton (unidade de massa atômica)

DC: corrente contínua

DMFK: *N,N*-dimetil-*N*-formilquinuramina

DMK: *N,N*-dimetilquinuramina

DMSO: dimetilsulfóxido

DMT: *N,N*-dimetiltriptamina

DPI: difeniliodônio

ERO: espécies reativas de oxigênio

ESI: ionização por *electrospray*

FOMBK: *N,N*-dietil-7-formamido-4-metil-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahidrobenzo[*f*]quinolina-2-carboxamida

HCIO: ácido hipocloroso

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HRP: *horseradish peroxidase*

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

LC/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LC/MS/MS: LC/MS em série

LSD: dietilamida do ácido lisérgico

MAO: monoamina oxidase

MPO: mieloperoxidase

MS: espectrometria de massas

***m/z*:** relação massa/carga

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

***nor*-LSD**: *N*-demetil-LSD

O₂^{-•}: ânion superóxido

O-H-LSD: 2-oxo-3-hidroxi-LSD

ONU: Organização das Nações Unidas

PBMC: células mononucleares periféricas sangüíneas

PBS: tampão fosfato salina

DAD: detector de arranjo de diodos

PMN: neutrófilos

PMA: acetato de forbol miristato

RF: rádio frequência

RMN: ressonância magnética nuclear

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TA: aminas traço

TFA: ácido trifluoracético

TR: tempo de retenção

UV/Vis: ultravioleta/visível

ZO: zimosan opsonizado

2. RESUMO

Após um intervalo de duas décadas, ressurgiu um novo interesse em estudos sobre alucinógenos que visam a compreensão de como estes compostos interagem com o sistema nervoso central (SNC). Sabendo-se que enzimas do tipo peroxidases estão presentes em células do tipo leucócitos, neurônios e microglia, e que, são capazes de oxidar compostos indólicos, esta, portanto, poderia representar uma rota ativa de metabolização de alucinógenos no SNC, ainda não conhecida. Nesta perspectiva, este trabalho contribui com a descrição da metabolização da dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e da *N,N*-dimetiltryptamina (DMT) por peroxidase de rábano (HRP) e mieloperoxidase (MPO) proveniente de neutrófilos ativados. A formação de produtos de reação foi acompanhada por HPLC com detectores de arranjo de diodos (DAD) e fluorescência, e a identificação por espectrometria de massas (MS). Ambas as peroxidases foram capazes de metabolizar LSD a compostos que coincidem com produtos de sua metabolização *in vivo*, como 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD) e *nor*-LSD, por enzimas hepáticas do complexo P450. Entretanto, um terceiro produto formado não havia sido descrito anteriormente. Apresenta como característica principal a abertura do anel indólico e foi nomeado pelo nosso grupo como *N,N*-dietil-7-formamido-4-metil-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahidrobenczo[*f*]quinolina-2-carboxamida (FOMBK). De uma maneira semelhante, HRP e MPO também metabolizaram DMT a um produto hidroxilado (OH-DMT), que possivelmente apresenta considerável ação alucinógena, e a um segundo produto nomeado *N,N*-dimetil-*N*-formil-quinuramina (DMFK). Visto que peroxidases estão presentes em diferentes tipos celulares, é razoável supor que a formação dos produtos descritos neste estudo possa ocorrer *in vivo*, numa possível via alternativa de metabolização de LSD e DMT ainda não descrita em humanos.

3. ABSTRACT

After a gap of two decades a new interest in hallucinogen studies that aim the comprehension of how these compounds interact with the central nervous system (CNS) rose again. It is known that peroxidases enzymes are present in cells such as leukocytes, neurons and microglia and that they are capable of oxidizing indolic compounds. Then it could represent an active metabolization pathway for hallucinogens in the CNS, not known yet. In this perspective, this study contributed with the description of the metabolization of lysergic acid diethylamide (LSD) and *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) by horseradish peroxidase (HRP) and myeloperoxidase (MPO) from activated neutrophils. The formation of the reaction products was attended by HPLC with diode array and fluorescence detectors, and the identification by mass spectrometry (MS). Both peroxidases were capable of metabolizing LSD to compounds that coincide with products from its *in vivo* metabolization, as 2-oxo-3-hydroxy-LSD (O-H-LSD) and *nor*-LSD by the liver enzymes from P450 complex. However, a third compound had not been described before. It has the opened indolic ring as main characteristic and was named by our group as *N,N*-diethyl-7-formamido-4-methyl-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahydrobenzo[*f*]quinoline-2-carboxamide (FOMBK). In a similar way, HRP and MPO also metabolized DMT to a hydroxylated product (OH-DMT) that possibly shows a considerable hallucinogen action and to a second product named as *N,N*-dimethyl-*N*-formyl-kynuramine (DMFK). Since peroxidases are present in different cell types, it is reasonable to assume that the formation of the products described in this study may occur *in vivo* as well, in a possible alternative metabolic pathway for LSD and DMT that has not been described in humans yet.

4. INTRODUÇÃO

Os alucinógenos constituem uma das classes de agentes farmacologicamente ativos mais antigos que se conhece (Schuster & Kuhar, 1996). Após 1943, ano em que se descobriu a ação alucinógena da dietilamida do ácido lisérgico (LSD) (Hofmann, 1980), muitos estudos sobre esta e demais substâncias alucinógenas começaram a ser feitos. Além da descrição da metabolização hepática, prevaleceram estudos clínicos sobre o potencial terapêutico dessas substâncias, rendendo centenas de artigos publicados entre 1950 e meados dos anos 70.

Após este período, houve uma queda acentuada no número de publicações, uma vez que, além de não ter sido possível encontrar atividades terapêuticas satisfatórias para estas substâncias, em 1972, seu uso foi proibido pela ONU em todo o mundo, inclusive para fins médicos. Isto porque durante os anos 60, milhões de jovens vivenciavam o movimento *hippie*, onde, ao mesmo tempo em que faziam uso recreacional destas substâncias com o intuito de buscar novas experiências, contestavam as autoridades.

Entretanto, a partir dos anos 90, surge um novo crescimento no número de publicações sobre alucinógenos que se deu graças aos resultados provenientes do avanço da tecnologia, onde modernos equipamentos de cromatografia e espectrometria foram desenvolvidos, tornando-se poderosas ferramentas analíticas, favorecendo assim, os estudos na área da Toxicologia Forense. Além disso, na era da neurociência, a utilização de modernas técnicas bioquímicas e de genômica propiciam uma nova seqüência de estudos que visam a compreensão de como os alucinógenos interagem com o cérebro, que vias de sinalização são ativadas, que genes são expressos e qual o impacto desses processos sobre a percepção, memória, atenção, aprendizado e doenças afetivas e cognitivas.

Nessa perspectiva, este trabalho contribui com a descrição da metabolização dos alucinógenos LSD e *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) por enzimas do tipo peroxidases, que são encontradas em diferentes tipos celulares (inclusive em neurônios e microglia) e que, portanto, poderiam representar uma rota ativa de metabolização no sistema nervoso central (SNC).

Inicialmente, percebemos que LSD e DMT apresentam uma similaridade estrutural com compostos de amplo e variado espectro de atividades biológicas, como

o aminoácido triptofano, o neurotransmissor serotonina e o hormônio melatonina (**Fig. 1**), bastante abundantes *in vivo* (Ximenes *et al.*, 2001 a).

Figura 1: Estrutura química dos alucinógenos DMT e LSD em comparação aos compostos triptofano, serotonina e melatonina, evidenciando o anel indólico em comum.

Estes compostos são oxidados por diferentes peroxidases, incluindo mieloperoxidase (MPO) presente em células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos, por uma via dependente de ânion superóxido (Ximenes *et al.*, 2005). Estas reações de oxidação geram compostos denominados genericamente de quinureninas, que apresentam como característica principal a abertura do anel indólico (**Fig. 2**) (Silva *et al.*, 2000).

A lista de atividades biológicas dos compostos da classe de análogos de quinurenina tem se ampliado bastante nos últimos tempos. A utilização desses compostos na terapêutica e como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos tem sido considerado (Klivenyi *et al.*, 2004; Stone & Darlington, 2002). A exemplo disso, a quinurenina, composto proveniente da oxidação de triptofano (**Fig.2**), tem atividade reportada em linfócitos (Fallarino *et al.*, 2003), SNC e periférico (Nemeth *et al.*, 2005).

Nosso grupo de pesquisa mostrou que AFMK, análogo de quinurenina produzido a partir da oxidação de melatonina (**Fig.2**), inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos, e está presente em altas concentrações em líquido cefalorraquidiano de indivíduos com meningite viral (Silva *et al.*, 2005). Dessa forma, é

possível que no processo inflamatório, caracterizado pela elevada mobilização e migração de leucócitos, a metabolização de melatonina por células do foco inflamatório seja responsável pela formação de produtos com expressiva atividade imunomodulatória.

Figura 2: Reações de oxidação de triptofano e melatonina por peroxidases com a formação de seus respectivos produtos de abertura do anel indólico. (AFMK: *N*-acetil-*N*-formil-5-metoxiquinuramina, AMK: *N*-acetil-5-metoxiquinuramina).

De qualquer forma, é proposto que a oxidação de compostos indólicos por MPO seja uma rota alternativa especialmente ativa na inflamação e na vigência de algumas doenças, que levem à geração de compostos biologicamente ativos. Entretanto, a possibilidade de que essas reações também ocorram fora do processo inflamatório ganhou novo amparo a partir da identificação de MPO em células neuronais, especialmente em pacientes portadores de Alzheimer (Green *et al.*, 2004) e esclerose múltipla (Nagra *et al.*, 1997).

Sendo assim, se considerarmos que análogos de quinurenic acid podem ser formados por diferentes tipos celulares via reações catalisadas por MPO, amplia-se bastante a possibilidade de que novos compostos deste tipo sejam formados *in vivo*. Evidentemente, a formação desses compostos dependerá da concentração de um dado composto indólico, da presença de MPO e da eficiência da reação.

Para tanto, dando continuidade aos trabalhos do nosso grupo de pesquisa sobre metabolismo de compostos indólicos, houve o interesse em identificar novos

substratos indólicos de peroxidases. Uma classe especialmente interessante para esse estudo foram os compostos indólicos com atividade alucinógena, como o LSD e a DMT, onde ambos apresentam ação no SNC, mas suas vias de metabolização são pouco elucidadas.

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1 Compostos indólicos com atividade alucinógena

Os alucinógenos, também chamados de drogas psicodélicas, apresentam uma rica e fascinante história folclórica e constituem uma das classes de agentes farmacologicamente ativos mais antigos que se conhece (Schuster & Kuhar, 1996). Muitos compostos alucinógenos ocorrem na natureza, outros são sinteticamente produzidos em laboratórios, muitos dos quais clandestinos. Os que ocorrem naturalmente têm sido usados há milhares de anos, principalmente pelos efeitos sobre a percepção sensorial. Até antes dos anos 60, estes compostos eram estritamente usados em rituais religiosos e muitas pessoas mal sabiam de sua existência; para outras, apresentavam propriedades mágicas e místicas (Julien, 1998).

Estruturalmente, os alucinógenos clássicos são divididos em duas categorias: (a) a que possui um núcleo indolamina; (b) e a que possui uma porção fenilamina. O grupo das indolaminas (**Fig. 3**) pode ser dividido em três subgrupos (Schuster & Kuhar, 1996):

- 1) triptaminas simples *N*-substituídas, como DMT, psilocina e bufotenina;
- 2) β -carbolinas, como alcalóides relacionados à harmalina;
- 3) ergolinas, como LSD.

Farmacologicamente, os alucinógenos são classificados como um grupo da classe das drogas psicotrópicas, isto é, que tem ação no SNC, que afetam o humor e o comportamento (Rang *et al.*, 1997). São capazes de alterar o sentido da percepção da realidade e dos processos cognitivos, causando alucinações visuais e auditivas (Nichols, 2004).

Pouco tempo depois da descoberta da serotonina (5-HT) (**Fig. 3**) em 1948, e da confirmação de que 5-HT e LSD apresentavam em comum o núcleo indolamina, foi postulado que os alucinógenos deveriam agir via um mecanismo serotoninérgico. Os receptores 5-HT (serotoninérgicos) são encontrados na musculatura lisa e principalmente na membrana celular de neurônios. A 5-HT é extensivamente sintetizada a partir de triptofano (cerca de 90%) no trato gastrointestinal, sendo estocada principalmente em plaquetas (Aghajanian & Marek, 1999).

Figura 3: Estrutura química dos alucinógenos clássicos do grupo das indolaminas e do neurotransmissor serotonina.

As funções associadas com as vias serotoninérgicas incluem várias respostas comportamentais, o controle do humor, da emoção, do sono e da vigília, das vias sensitivas, da temperatura corporal, do comportamento da alimentação e do vômito (Rang *et al.*, 1997). Os neurônios com receptores serotoninérgicos estão concentrados nos núcleos da rafe da linha média na ponte e no bulbo, projetando-se difusamente para o córtex, sistema límbico, hipotálamo e medula espinhal (Berne *et al.*, 2000). Os principais receptores serotoninérgicos são: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇, e compartilham um alto grau de homologia (Squire *et al.*, 2003).

Não se sabe ainda qual o real mecanismo de ação dos alucinógenos, mas acredita-se que se comportam como agonistas de receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, sendo que para o segundo, são agonistas parciais (Nichols, 2004; Aghajanian & Marek, 1999; Glennon *et al.*, 1984). Entretanto, estudos recentes vêm desenvolvendo técnicas avançadas de genômica e proteômica com a finalidade de caracterizar os mecanismos moleculares de sinalização de receptores 5-HT acoplados à proteína G (Weinstein, 2006).

5.1.1 Dietilamida do ácido lisérgico (LSD)

O doutor Albert Hofmann, químico da indústria farmacêutica suíça Sandoz desde 1929, estudou e manipulou alcalóides do fungo *Claviceps purpurea*, mais conhecido como ergot (Hofmann, 1980), que infesta grãos como centeio e trigo em regiões do continente europeu e América do Norte (Julien, 1998). Um grande número de compostos é preparado a partir de alcalóides do ergot como ergotamina, ergometrina, entre outros, sendo compostos utilizados terapeuticamente em obstetrícia, ginecologia e endocrinologia, como fármacos no tratamento de enxaquecas e no controle de hemorragias pós-parto (Rang *et al.*, 1997).

Como parte de um programa de pesquisa com intuito de ampliar o espectro de ação destes compostos (Julien, 1998), Hofmann decidiu sintetizar e testar uma nova série de derivados de um dos alcalóides do ergot: o ácido lisérgico (**Fig. 4**). Em 1938, foi produzida a vigésima quinta alteração na molécula, nomeada dietilamida do ácido lisérgico, abreviada como LSD-25 (do alemão *Lyserg-säure-diäthylamid*) para uso do laboratório (**Fig. 4**). A síntese desta substância foi planejada com a intenção de se obter um estimulante respiratório (analéptico) e da circulação sangüínea, entretanto, estudos farmacológicos do composto com animais pareceram ser pouco promissores, sendo posto à parte. Nos cinco anos seguintes, nada mais se falou sobre LSD-25 (Hofmann, 1980).

Figura 4: Estrutura química do ácido lisérgico e do composto semi-sintético LSD-25.

Os estudos de Hofmann com derivados de alcalóides do ergot não estavam trazendo resultados satisfatórios e ele não havia esquecido o relativo desinteresse de farmacologistas e médicos sobre o composto LSD-25. Então, um sentimento peculiar

de que o composto pudesse apresentar outras propriedades além daquelas estabelecidas nas primeiras investigações, o induziram a produzir LSD-25 novamente. Assim, em 1943, Hofmann repetiu a síntese, mas, no último passo da reação, durante o processo de purificação e cristalização na forma de tartarato, começou a sentir sensações estranhas e bizarras. Interrompeu o trabalho e descreveu minuciosamente os sintomas: alucinações visuais, fadiga e falta de concentração (Hofmann, 1980).

Devido à toxicidade conhecida das substâncias do ergot, Hofmann sempre manteve hábitos meticulosos no laboratório. Possivelmente, uma gota da solução de LSD-25 caiu sobre sua mão durante a cristalização, e um traço da substância foi absorvida pela pele. A partir de então, pensou que se LSD-25 foi, de fato, a causa das sensações estranhas que experimentou, muito provavelmente tratava-se de uma substância de extraordinária potência (Hofmann, 1980).

Para tirar a dúvida, decidiu ingerir uma quantidade muito pequena do composto. Após experimentar os mesmos sintomas, provou realmente que a substância que havia sintetizado apresentava evidentes características alucinógenas (Hofmann, 1980). Por fim, Hofmann ajudou a descobrir uma nova área da psicofarmacologia, tornando-se uma autoridade em química e psicologia de substâncias alucinógenas (Drummer *et al.*, 2001).

Incapaz de encontrar um uso terapêutico para o composto LSD-25, a empresa Sandoz o tornou disponível para pesquisadores e psicoterapeutas (Drummer *et al.*, 2001). Os efeitos do LSD em humanos propiciavam um modelo de psicose, como a esquizofrenia, que instigava os pesquisadores. Esse modelo poderia fornecer informações importantes sobre processos fisiológicos e bioquímicos de doenças mentais e, conseqüentemente, descobertas de possíveis tratamentos. Alguns terapeutas utilizaram LSD como adjuvante na psicoterapia, mas não provou ser um tratamento efetivo. O trabalho com LSD em voluntários humanos nos anos 60 acabou por introduzir o composto em várias universidades, aumentando sua popularidade (Julien, 1998).

Contudo, desde àquela época, LSD tem sido amplamente usado principalmente por adolescentes de diversas partes do mundo. Sua popularidade é parcialmente devida à grande disponibilidade e seu preço relativamente baixo (Laing, 2003). Doses comuns variam de 25 a 300 µg, sendo suficientes para promover os efeitos alucinógenos (Julien, 1998). A droga é utilizada na forma de *blotters* (pedaços muito

pequenos de papel), soluções alcoólica ou aquosa, comprimidos e até mesmo em cápsulas gelatinosas (Drummer *et al.*, 2001).

Usualmente, LSD é administrado por via oral e é fácil e rapidamente absorvido. Cerca de uma hora após sua ingestão, é totalmente absorvido atingindo o pico da concentração plasmática em 3 horas. É bem distribuído pelo organismo, atingindo facilmente o SNC e placenta. Apresenta tempo de meia-vida de aproximadamente 3,6 horas e seus efeitos podem ter duração entre 6 a 12 horas, dependendo da dose ingerida (Julien, 1998).

Pouco se sabe sobre a farmacocinética de LSD. Sabe-se que é extensivamente metabolizado no fígado pelas enzimas do complexo P450, responsáveis pela catálise das reações de oxidação, hidroxilação, demetilação e conjugação (Canezin *et al.*, 2001). Seus principais metabólitos, 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD) e *N*-demetil-LSD (*nor*-LSD) (**Fig. 5**), são excretados na urina em uma porcentagem muito maior que a própria droga – apenas 1% de LSD é eliminado na forma inalterada na urina (Klette *et al.*, 2000). Devido ao fato de serem muito polares, esses metabólitos, ao passarem pelos túbulos coletores nos néfrons, não são reabsorvidos, sendo rapidamente eliminados na urina. Esta elevada excreção pode explicar o fato de não serem encontrados no plasma em concentrações significativas (Canezin *et al.*, 2001).

Figura 5: Estrutura química de LSD e seus principais metabólitos, 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD) e *N*-demetil-LSD (*nor*-LSD).

LSD é considerado como droga de abuso devido ao seu potente efeito alucinógeno, que leva à perda da percepção da realidade. Os efeitos adversos incluem os chamados *flashbacks* e *bad trips*, experiências alucinógenas repetidas e distorção dos sentidos, como medo e paranóia, que ocorrem alguns dias após o uso da droga

(Rang *et al.*, 1997). Entretanto, não causa dependências psicológica e química, ausentando o usuário da síndrome de abstinência (Nichols, 2004).

Por ser usado em baixas concentrações, a identificação e quantificação de LSD e seus metabólitos em fluidos biológicos sempre foi um desafio para os laboratórios forense e de toxicologia clínica. A cromatografia gasosa tem mostrado alta sensibilidade para análises de amostras contendo LSD, apesar de sua termolabilidade e da necessidade de derivatização prévia (Hoja *et al.*, 1997). Nos últimos anos, o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) vem substituindo a cromatografia gasosa, bem como a própria cromatografia líquida acoplada à fluorescência (Hoja *et al.*, 1997). A técnica de LC/MS e LC/MS em série (LC/MS/MS) mostra alta sensibilidade e especificidade na detecção de quantidades muito baixas de LSD e de seus metabólitos em urina.

5.1.2 *N,N*-dimetiltriptamina (DMT)

A *N,N*-dimetiltriptamina (DMT), estruturalmente muito semelhante à 5-HT (**Fig. 3**), é uma substância natural da família das triptaminas, presente em uma gama de organismos como fungos, vegetais, anfíbios e até mesmo em alguns poríferos (Jacob & Presti, 2005). Entretanto, em 1965, foi reportada como constituinte normal de sangue e urina de humanos juntamente com a triptamina e a bufotenina (5-OH-*N,N*-dimetiltriptamina) (**Fig. 3**) (Franzen & Gross, 1965).

No entanto, a DMT é provavelmente mais conhecida por sua presença nas folhas de *Psycotria viridis*, popularmente conhecida como chacrona, utilizadas em combinação com o caule de *Banisteriopsis caapi*, vulgo cipó mariri, para a preparação do chá de Santo Daime, também conhecido como *ayahuasca*, que na linguagem quéchua significa chá espiritual (Jacob & Presti, 2005). A bebida cor de terra e gosto amargo tem ação alucinógena e é consumida em cultos religiosos genuinamente brasileiros como a União do Vegetal, o Santo Daime e a Barquinha (Costa *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, estes grupos religiosos têm se espalhado por toda Europa e Estados Unidos, chamando a atenção de pesquisadores internacionais quanto aos efeitos do uso da *ayahuasca*. Calcula-se que, em 1997, apenas na América do Sul, o número de pessoas que faziam uso regular chegaria a 15 mil (Costa *et al.*, 2005). No

Brasil, seu uso no contexto religioso foi oficialmente reconhecido e protegido por lei (CONFEN, 1992), entretanto, não existem muitos estudos sobre seus efeitos. Segundo o relatório final do Grupo Multidisciplinar de Trabalho, de novembro de 2006, foi recomendada ao Conselho Nacional Anti-Drogas (CONAD) a promoção de estudos bioquímicos mais detalhados sobre o uso e efeitos da *ayahuasca* (da Silveira Filho *et al.*, 2006).

A seita do Santo Daime, fundada na década de 20 pelo maranhense Raimundo Irineu Serra, é um tipo de culto eclético que mistura o catolicismo romano, o espiritismo e o candomblé. Sua principal característica é o canto, onde todos os ensinamentos são ministrados por hinos. Durante as cerimônias, todos os participantes ingerem cerca de 200 mL de *ayahuasca*, suficientes para produzir os efeitos alucinógenos. Além disso, a bebida pode provocar irritações gastrintestinais causando vômito e diarreia, vistos como uma desintoxicação do organismo em que, a partir de então, o indivíduo estará apto a receber o Espírito Santo (Costa *et al.*, 2005).

Entretanto, a DMT não tem ação alucinógena quando administrada isoladamente por via oral, pois sofre rápida metabolização pela enzima monoamino oxidase (MAO) tipo A encontrada no trato gastrintestinal (Julien, 1998). Mas, curiosamente, o caule do cipó *B. caapi* possui em sua composição inibidores da MAO em concentrações que variam de 0,05% a 1,95%. Estes inibidores constituem as β -carbolinas, tais como harmina, harmalina e tetra-hidro-harmalina (**Fig. 6**). Dessa forma, as β -carbolinas presentes na *ayahuasca* inibem a MAO, protegendo a DMT de sua metabolização, evidenciando assim seu efeito alucinógeno. Análises quantitativas revelam que 200 mL de *ayahuasca* possuem aproximadamente 30 mg de harmina, 10 mg de tetra-hidro-harmalina e 25 mg de DMT (McKenna *et al.*, 1998).

Figura 6: Estrutura química das β -carbolinas inibidoras da MAO-A, encontradas em caule de *Banisteriopsis caapi*.

A DMT é um composto interessante por si só, não apenas por induzir efeitos alucinógenos na mente humana, mas também por sua síntese endógena, que começou a ser significativamente estudada nos anos 70 (Barker *et al.*, 1981), embora sua função exata nos organismos ainda não esteja totalmente elucidada (Jacob & Presti, 2005). Sabe-se que é formada a partir do aminoácido triptofano mediante duas reações distintas. Primeiramente ocorre uma reação de descarboxilação do aminoácido catalisada pela enzima aminoácido aromático descarboxilase, formando triptamina. Em seguida, a triptamina é monometilada graças à enzima indoletilamina-*N*-metiltransferase, que transfere um grupamento metil proveniente de *S*-adenosil-metionina. Essa reação ocorre novamente, onde outro grupamento metil é introduzido à *N*-metiltriptamina, gerando a DMT (**Fig. 7**) (Jacob & Presti, 2005).

Figura 7: Biossíntese de DMT a partir de triptofano. (AADC) aminoácido aromático descarboxilase; (INMT) indoletilamina-*N*-metiltransferase; (SAM) *S*-adenosil-metionina; (SAH) *S*-adenosil-homocisteína.

Existem poucos estudos sobre a metabolização de DMT em humanos. De uma dose administrada por via intramuscular, apenas 0,07% são excretados na urina na forma inalterada (Kaplan *et al.*, 1974); 25% são metabolizados a ácido 3-indolacético (AIA) (**Fig. 8**) (Szara, 1956). Esse perfil de biotransformação sugere a existência de outros possíveis metabólitos ainda não identificados (Hryhorczuk *et al.*, 1986).

Figura 8: Metabolização da DMT pela enzima MAO-A e formação do ácido 3-indolacético como principal metabólito.

Um estudo feito sobre metabolização *in vitro* de DMT com eritrócitos isolados mostrou a formação de um novo composto identificado por espectrometria de massas como sendo *N,N*-dimetilquinuramina (DMK) (Hryhorczuk *et al.*, 1986). Este composto foi formado via uma reação de oxidação, onde ocorreu a abertura do anel indólico da molécula de DMT. Entretanto, nada foi concluído a respeito deste novo composto, isto é, não se sabe ainda se DMK é formado *in vivo* ou se apresenta alguma atividade biológica (Hryhorczuk *et al.*, 1986). Atualmente, sabe-se apenas que a reação de oxidação provavelmente ocorreu graças à atividade pseudoperoxidásica da hemoglobina presente nos eritrócitos (Kawano *et al.*, 2002).

Em 2001, foi descoberta em cérebro e sistema periférico de vertebrados a presença de receptores para aminas traço (TA), como triptamina e tiramina. Assim como os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, os receptores TA também são acoplados à proteína G e estão envolvidos com centros emotivos do corpo, mostrando possíveis conexões com muitas condições psiquiátricas (Borowsky *et al.*, 2001). Alguns estudos reportaram uma maior ativação dos receptores TA por alucinógenos em relação aos receptores serotoninérgicos (Jacob & Presti, 2005).

Logo após a descoberta de DMT endógeno em humanos, alguns pesquisadores começaram a analisar correlações entre o aumento dos níveis de DMT em urina de humanos e a esquizofrenia (Jacob & Presti, 2005; Tanimukai, 1970). Entretanto, foi descoberto pouco depois, que nem todos os pacientes com esquizofrenia excretavam altas quantidades de DMT. Assim, concluiu-se que DMT não apresentava uma função causal na esquizofrenia, mas poderia ser um fator intermediário, exacerbando certas características da psicose (Jacob & Presti, 2005).

A hipótese da ligação de DMT com receptores TA gera uma nova interpretação da sua presença em urina de esquizofrênicos. Alguns pesquisadores sugerem que o aumento da produção de DMT seja uma resposta homeostática para suprimir a atividade psicótica. Consequentemente, DMT em baixas concentrações pode agir como ansiolítico endógeno, enquanto que em altas, tais como aquelas associadas à atividade alucinógena, produzem mudanças extremas na consciência (Jacob & Presti, 2005).

Analiticamente, a DMT pode ser detectada em plasma e urina de usuários por cromatografia gasosa e líquida, e por LC/MS, que mostra alta sensibilidade e

especificidade na detecção de quantidades muito baixas de DMT e de seu metabólito AIA em fluídos biológicos (Forsström *et al.*, 2001).

5.2 Neutrófilos, monócitos e o *burst* oxidativo

Os neutrófilos, também chamados de polimorfonucleares (PMN) por apresentarem núcleo segmentado, representam cerca de 50 a 70% da população das células brancas (leucócitos) do sangue. Constituem a primeira linha de defesa contra antígenos e agentes infecciosos, particularmente em consequência da infecção bacteriana e fúngica, que penetram as barreiras físicas do corpo. Durante a fase aguda da inflamação, os neutrófilos deixam a circulação e migram para o local da inflamação em um processo chamado de quimiotaxia (Goldsby *et al.*, 2000).

Apresentam em seu citoplasma grânulos primários e secundários. Os primários, também chamados de azurófilos, são mais densos e contêm enzimas digestivas, peroxidase (principalmente mieloperoxidase), lisozima e outras enzimas hidrolíticas. Já os grânulos secundários estão em menor quantidade, contendo collagenase, lactoferrina e lisozima (Segal, 2005). Assim, após aderência aos microrganismos invasores, os neutrófilos são capazes de fagocitá-los, englobando-os para o interior do citoplasma originando o fagossomo, onde as enzimas digestivas terão ação sobre o material fagocitado (Haptom *et al.*, 1998).

Já as células mononucleares (PBMC) são compostas por aproximadamente 30% de monócitos e 70% de linfócitos, e constituem a segunda maior população de leucócitos. Também participam dos processos inflamatórios, mas apenas os monócitos são considerados fagócitos, assim como neutrófilos (Babior *et al.*, 2002). Quando os monócitos circulantes migram para os tecidos, são chamados de macrófagos e apresentam alta capacidade fagocítica (Goldsby *et al.*, 2000).

Durante o processo inflamatório, citocinas interagem com receptores na superfície dos fagócitos, interferindo em sua atividade funcional e na evolução da resposta inflamatória. A membrana celular dos fagócitos tem receptores para alguns anticorpos e componentes do complemento, que também podem se ligar aos antígenos. Caso o antígeno contenha em sua membrana o anticorpo ou componente do complemento apropriado, ligar-se-á mais rapidamente à membrana dos fagócitos, resultando em imediata fagocitose. Assim, anticorpo e complemento funcionam como

opsoninas, moléculas que se ligam tanto ao antígeno quanto aos fagócitos, estimulando a fagocitose. O processo pelo qual antígenos particulados são mais susceptíveis à fagocitose é chamado de opsonização (Goldsby *et al.*, 2000).

A eficiência microbicida dos fagócitos depende de dois eventos confluentes: da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante o processo metabólico conhecido como *burst* oxidativo (mecanismo dependente de oxigênio), e da liberação e ação das enzimas contidas nos grânulos citoplasmáticos (mecanismo não dependente de oxigênio) (Goldsby *et al.*, 2000). O processo de *burst* oxidativo resulta na ativação do sistema NADPH oxidase formado no interior dos fagócitos, que catalisa a redução do oxigênio molecular a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uma ERO extremamente tóxica para microrganismos fagocitados.

O sistema NADPH oxidase é um complexo enzimático formado por proteínas encontradas no citoplasma ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p60^{phox}$) e na membrana dos fagócitos ($p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$). As proteínas de membrana em conjunto constituem a chamada flavohemoproteína heterodimérica conhecida por citocromo b_{588} . Duas outras proteínas de baixo peso molecular ligadas ao nucleotídeo guanina também estão envolvidas neste sistema: Rac2, localizada no citoplasma, e Rap1A, localizada na membrana (Babior *et al.*, 2002).

Quando o fagócito é ativado, a proteína C quinase é responsável pela fosforilação do componente $p47^{phox}$, resultando no acoplamento de todos os outros componentes à membrana do fagócito, tornando assim, o sistema cataliticamente ativo (**Fig. 9**) (Segal, 2005). Dessa forma, há formação de ânion superóxido por meio da transferência de um elétron para o oxigênio molecular pela ação da coenzima NADPH.

Por sua vez, o ânion superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea ou por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável pela adição de um elétron e de dois prótons (H^+) ao ânion superóxido, formando H_2O_2 e oxigênio molecular. A presença de H_2O_2 no fagossomo em altas concentrações é de fundamental importância para a formação de HClO por ação da MPO, conferindo um alto poder microbicida aos fagócitos (Babior, 1984).

Figura 9: Organização dos componentes do sistema NADPH oxidase no interior de fagócitos após ativação, e formação de H_2O_2 a partir de ânion superóxido.

5.3 Peroxidases

Peroxidases são um grupo de enzimas que catalisam reações de oxidação, via transferência de um elétron, de uma gama de substratos orgânicos, estando presentes em diversas espécies animais, vegetais, fungos e bactérias (Jantschko *et al.*, 2002). Apresentam uma grande variedade de isoenzimas, exibindo assim, baixa especificidade (Dunford, 1999).

São denominadas hemoproteínas por apresentarem um grupo prostético heme em sua estrutura, que contém um íon Fe^{3+} ligado a quatro anéis pirrólicos. Participam de vários processos fisiológicos e apresentam um largo espectro de atividade, que envolve diversas reações como de hidroxilação (Jantschko *et al.*, 2002) e *N*-demetilação (Guengerich & MacDonald, 1996), comumente realizadas pela hemoglobina, mioglobina e pelas enzimas do complexo P450 encontradas em hepatócitos. Normalmente, as peroxidases requerem H_2O_2 comoceptor de elétrons (Haptom *et al.*, 1998).

5.3.1 Mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) está presente no citoplasma de fagócitos e tem importante papel na atividade microbicida destas células. Representa 5% do peso

seco de neutrófilos, sendo o maior constituinte dos grânulos azurófilos (Haptom *et al.*, 1998). Apresenta quatro cadeias polipeptídicas (estrutura tetrâmera) constituída de duas subunidades - alfa e beta (**Fig. 10A**). Apresenta o grupo prostético heme m (**Fig. 10B**), derivado da ferriprotoporfirina IX ligado covalentemente à sua porção protéica (Furtmüller *et al.*, 2006).

Figura 10: (A) Estrutura tridimensional da MPO, mostrando as subunidades alfa (azul) e beta (vermelho); (B) Estrutura química do grupo prostético heme m, encontrado em MPO.

Embora MPO esteja presente em monócitos circulantes e em altas concentrações em neutrófilos, não é detectada em microglia (macrófagos específicos do SNC) de tecido cerebral normal (Reynolds *et al.*, 1999). Entretanto, a presença de MPO tem sido observada em microglia de portadores de doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla (Nagra *et al.*, 1997) e doença de Alzheimer (Green *et al.*, 2004), sugerindo que a enzima tenha um importante papel na execução da resposta inflamatória iniciada pela microglia (Reynolds *et al.*, 1999).

O mecanismo de reação da MPO envolve a utilização de H_2O_2 para catalisar a oxidação de uma série de compostos orgânicos. A princípio, MPO se encontra em sua forma nativa ou férrica (Fe^{3+}) que, ao reagir com H_2O_2 proveniente do sistema NADPH oxidase, forma o intermediário redox denominado composto I ($\text{Fe}^{5+}.\text{O}$), que nada mais é que a própria MPO na forma cataliticamente ativa (Furtmüller *et al.*, 2006; Hansson *et al.*, 2006). Por sua vez, o composto I é capaz de reagir com o ânion cloreto e gerar HClO (**Fig. 11**), conferindo importante ação microbicida aos neutrófilos (Haptom *et al.*, 1998).

O composto I também pode reagir com diversos compostos orgânicos (RH) e formar o composto II ($\text{Fe}^{4+}.\text{O}$) e um radical $\text{R}\cdot$. Da mesma forma, o composto II também pode reagir com outra molécula do composto orgânico ou com ânion

superóxido, e gerar $R\cdot$ ou oxigênio molecular (O_2), e a enzima na sua forma nativa, fechando um ciclo conhecido como ciclo peroxidásico clássico (**Fig. 11**) (Hansson *et al.*, 2006). Existe também a possibilidade da formação de um composto III ($Fe^{2+}\cdot O_2$) por uma reação reversível da MPO na forma nativa com ânion superóxido. Existe uma atividade catalítica reportada para o composto III, mas é menos eficiente que os compostos I e II (**Fig. 11**) (Furtmüller *et al.*, 2006; Haptom *et al.*, 1998).

Figura 11: Ciclo peroxidásico clássico: [MPO (Fe³⁺)] MPO na forma férrica ou nativa; ($R\cdot$) radical indoil.

Já o radical $R\cdot$ formado pode reagir com ânion superóxido ou O_2 e formar um intermediário dioxetânico (**Fig. 11**). Na possibilidade deste composto orgânico (RH) ser um composto indólico, este intermediário dioxetânico gera um produto de abertura de anel, a exemplo do que acontece com melatonina, visto anteriormente (**Fig. 1**).

MPO catalisa a oxidação de diversos compostos indólicos biologicamente importantes como o triptofano e a melatonina (Jantschko *et al.*, 2002). Entretanto, triptofano é um bom substrato de composto I, mas reage lentamente com o composto II (Kettle & Candaes, 2000). Por outro lado, quando melatonina reage com o composto I, forma-se um radical que, na presença de oxigênio molecular ou ânion superóxido, forma um intermediário dioxetânico que se cliva produzindo a abertura do anel indólico (Silva *et al.*, 2000). Essa reação gera um produto do tipo quinurenina num estado eletronicamente excitado denominado de *N*-acetil-*N*-formil-5-metoxiquinuramina

(AFMK), composto que mostrou diversas atividades biológicas especialmente imunomodulatórias (Silva *et al.*, 2005). Para este substrato, o ciclo peroxidásico é mantido à custa da reação do ânion superóxido com o composto II e conseqüente regeneração de MPO na forma férrica (Ximenes *et al.*, 2005).

5.3.2 Peroxidase de rábano

Peroxidase de rábano (HRP), comumente conhecida como *horseradish peroxidase*, esta presente em raiz de rábano da espécie *Amoracia rusticana*, e tem como papel a produção de hormônio de crescimento de plantas, o ácido indolacético. É uma glicoproteína que contém o grupamento prostético ferriprotoporfirina IX (heme b) (**Fig. 12**) ligado não covalentemente à porção protéica da enzima (Babior, 1984).

Figura 12: Estrutura química do grupo prostético heme b encontrado em HRP.

Analogamente à MPO, HRP também atua sobre seus substratos por meio do ciclo peroxidásico clássico (**Fig. 13**) (Jantschko *et al.*, 2002). O primeiro passo envolve a oxidação da enzima na forma nativa ou férrica (Fe^{3+}) por H_2O_2 ou de um hidroperóxido orgânico, resultando na formação do composto I, um instável intermediário redox que representa HRP na forma cataliticamente ativa. Aqui também existe a possibilidade da formação de um composto III ($\text{Fe}^{2+} \cdot \text{O}_2$) por uma reação reversível da HRP na forma nativa com ânion superóxido (Furtmüller *et al.*, 2006; Haptom *et al.*, 1998).

A HRP catalisa a oxidação de diversos compostos indólicos biologicamente importantes a produtos análogos de quinureninas (Ximenes *et al.*, 2001 b). Essa reação ocorre com a formação do radical indoil ($\text{R}^{\bullet}$) que pode reagir com ânion superóxido ou O_2 e formar um intermediário dioxetânico (**Fig. 13**). Na possibilidade

deste composto orgânico (RH) ser um composto indólico, este intermediário dioxetânico gera um produto de abertura de anel, a exemplo do que acontece com triptofano, visto anteriormente (**Fig. 1**).

Figura 13: Ciclo peroxidásico clássico: [HRP (Fe³⁺)] HRP na forma férrica ou nativa; (R·) radical indoil.

Nosso grupo de pesquisa mostrou também que a oxidação de uma série de derivados indólicos catalisada por HRP é altamente quimiluminescente, quando comparada ao luminol (Ximenes *et al.*, 2001 a), isto é, durante a reação, há formação de produtos eletronicamente excitados capazes de emitir luz. Sendo assim, este tipo de reação de oxidação pode ser analisado pela técnica de quimiluminescência.

5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A técnica de cromatografia é um método físico-químico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases: uma fase estacionária, que pode ser um líquido, um sólido ou até mesmo um gel, e uma fase móvel que pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico. A fase móvel percola pela fase estacionária em uma direção definida (Weston & Brown, 1997).

Cromatografia líquida (LC) é uma técnica analítica usada para separar uma mistura em solução em seus componentes individuais onde a fase móvel é um líquido. Já o termo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é usado para descrever LC

onde a fase móvel é um líquido que passa sob alta pressão no interior da fase estacionária para assegurar um fluxo constante e assim, garantir uma separação mais eficiente (Ardrey, 2003).

O sistema cromatográfico consiste de cinco componentes principais: injetor, bombas, fase móvel, fase estacionária e detector. Embora o sistema seja padronizado, existe uma considerável diversidade de modos cromatográficos utilizados para promover a separação de compostos com melhor eficiência. Os modos estão relacionados à polaridade dos analitos em relação a ambas as fases. Dentre os diferentes modos estão a cromatografia de fase normal e a de fase reversa (Weston & Brown, 1997).

A identificação dos analitos a serem separados é baseada na comparação de suas propriedades de retenção com materiais de referência (padrões) determinados sob condições experimentais idênticas. As características de retenção de um analito, especificamente do tempo de retenção, são determinadas pela sua interação relativa entre a fase estacionária e a fase móvel (Weston & Brown, 1997).

A fase estacionária, geralmente de sílica, está empacotada em uma coluna capaz de resistir às altas pressões necessárias. Com relação à fase móvel, sua escolha dependerá do modo cromatográfico e da fase estacionária que serão utilizados. Uma separação que envolve uma composição constante da fase móvel é denominada eluição isocrática, enquanto que naquela onde a composição da fase móvel é constantemente modificada é denominada de eluição gradiente (Weston & Brown, 1997).

O detector é responsável por converter uma mudança no efluente da coluna em um sinal elétrico, que é gravado em um sistema de dados. Deve apresentar versatilidade, alta sensibilidade e alta linearidade à resposta. Existem diferentes tipos de detectores, dentre estes o detector de absorbância e o de fluorescência (Weston & Brown, 1997).

5.4.1 Detectores de absorbância

Os detectores de absorbância respondem somente a compostos que absorvem radiação no comprimento de onda gerado pela fonte de luz (Weston & Brown, 1997). Detectores que medem absorbância apenas na região entre 190 e 350 nm são

chamados de detectores de absorvência ultravioleta (UV), enquanto que aqueles que medem na região entre 350 e 700 nm são chamados de detectores visíveis (Vis). Entretanto existem aqueles capazes de medir entre as regiões 190 e 700 nm, sendo denominados de detectores UV/Vis (Kaplan *et al.*, 2002). Já os detectores de arranjo de diodos (DAD) são detectores UV/Vis capazes de monitorar mais de um comprimento de onda durante uma única análise. Todos estes utilizam uma lâmpada de deutério como fonte de luz UV, e uma lâmpada de tungstênio como fonte de luz visível (Weston & Brown, 1997).

A grande maioria dos compostos absorve radiação na região UV graças a características eletrônicas específicas que são capazes de absorver a radiação. Geralmente são compostos que apresentam uma ou mais duplas ligações, assim como compostos com elétrons não pareados. O nome dado ao grupo responsável pela absorvência eletrônica é cromóforo e, os compostos que apresentam esses grupos são chamados de cromofóricos (Weston & Brown, 1997).

A função do detector é monitorar a luz que passa pelo eluente. Assim, a diferença entre a intensidade de luz do eluente puro (branco) e do eluente contendo o composto de interesse (amostra) resulta em um sinal elétrico que é mandado do detector para o sistema de dados. A concentração do soluto e a intensidade de luz transmitida através da cubeta estão relacionadas de acordo com a lei de Lambert-Beer (Weston & Brown, 1997).

Tal lei diz que a concentração de um analito é diretamente proporcional à quantidade de radiação absorvida, ou indiretamente proporcional ao logaritmo da radiação transmitida. Para tanto, a absorvência também é diretamente proporcional à distância percorrida pela radiação através da cubeta. Desta forma, segue a seguinte relação matemática: $A = \epsilon \times c \times l$, onde A é a absorvência; ϵ é o coeficiente de extinção molar; c é a concentração do analito de interesse; e l a distância percorrida pela luz em centímetros. O coeficiente de extinção molar é uma constante relacionada à natureza química do soluto e sua unidade é recíproca às unidades de c e l . Esta equação consiste a base da análise quantitativa da espectrofotometria de absorção (Kaplan *et al.*, 2002).

5.4.2 Detectores de fluorescência

Fluorescência é um tipo específico de luminescência onde compostos que apresentam tal característica são capazes de absorver radiação na forma de luz em determinado comprimento de onda (excitação) e instantaneamente, reemitem esta radiação em um comprimento de onda maior (emissão) (Weston & Brown, 1997).

A característica de fluorescência é esperada em compostos aromáticos ou em compostos que contenham múltiplas duplas ligações conjugadas com alto grau de estabilidade de ressonância. Grupos doadores de elétrons presentes no anel, tais como -NH₂, -OH, -F, -OCH₃ e -N(CH₃)₂, tendem a intensificar a fluorescência. Devido ao fato de a detecção por fluorescência ser uma técnica óptica, está, comumente à detecção por absorbância, sujeita à lei de Lambert-Beer (Weston & Brown, 1997).

A fase móvel apresenta um papel importante na fluorescência, pois se não for escolhida com cautela, pode eliminar a característica fluorescente do composto a ser analisado. A maioria dos solventes que não contém halogênios, usados em HPLC, pode ser usada. A polaridade do solvente e o pH da fase móvel também podem influenciar no processo de fluorescência, caso alterem a carga do cromóforo (Weston & Brown, 1997).

5.5 Espectrometria de massas

Espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica usada para identificar e quantificar compostos através da relação massa/carga (m/z) de seus íons. Uma das vantagens desta técnica é que, além de fornecer o peso molecular do analito, pode promover também informações estruturais da molécula investigada. Esta técnica apresenta altíssima sensibilidade podendo fornecer dados qualitativos a partir de quantidades muito baixas (10⁻⁹ g) do analito, bem como dados quantitativos com alta precisão e exatidão (Ardrey, 2003).

Os componentes básicos de um espectrômetro de massas incluem um sistema de alto vácuo, fonte de ionização, analisador de massas, detector e sistema de controle de dados. O alto vácuo possibilita uma transmissão mais eficiente dos íons pelo sistema, pois caso funcionasse à pressão atmosférica, o caminho que os íons deveriam percorrer seria muito maior, possibilitando choques com o ar e assim,

desviando sua trajetória. Além disso, poderiam ocorrer possíveis fragmentações não desejáveis dos íons ao longo do percurso (Weston & Brown, 1997).

A fonte de ionização por *electrospray* (ESI) é um dos métodos de ionização que atua de forma branda capaz de gerar três tipos de íons por três processos essencialmente distintos, que ocorrem no interior do capilar. Podem ocorrer reações do tipo redox (oxidação/redução), que produzem íons moleculares ($M^{+\bullet}$ ou $M^{-\bullet}$); reações ácido/base (protonação/desprotonação), que resultam na formação de moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou desprotonadas ($[M-H]^-$); e, coordenação com cátions (geralmente os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), que leva à formação de moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$) ou anionizadas ($[M+Cl]^-$ entre outras) (Crotti *et al.*, 2006).

Em relação aos processos eletroquímicos envolvidos, a fonte de ESI pode ser considerada como uma célula eletrolítica à corrente controlada. O potencial elétrico aplicado no capilar metálico (em kV) promove a migração de cargas para a interface capilar/solução, formando uma dupla camada elétrica. Este processo resulta na formação de gotas com superfícies carregadas. A evaporação do solvente, devido à ação do gás nebulizador e secante (N_2), diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas em suas superfícies. A tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor até ocorrer o fenômeno de “explosão coulômbica” das mesmas, que resulta na formação de gotas menores, com posterior liberação dos íons. Forma-se, assim, um *spray* de partículas carregadas, ou seja, uma corrente eletrolítica (Crotti *et al.*, 2006).

O *ion trap* é um analisador de massas de baixa resolução e alta sensibilidade, que tem como princípio o confinamento de todos os íons gerados pela fonte em um tipo de armadilha composta por três eletrodos. Uma combinação de voltagens de corrente contínua (DC) e rádio frequência (RF) é aplicada aos eletrodos, gerando um campo elétrico capaz de confinar os íons com determinado potencial energético no centro do analisador (Bramer, 1997).

O espectro de massas é adquirido pela variação gradual e contínua das voltagens DC e RF, com o intuito de desestabilizar os íons. À medida que os íons são desestabilizados, são ejetados do analisador e atingem o detector. Após todos os íons terem sido expulsos do analisador, um novo conjunto de íons é admitido para seu interior, para que um novo espectro de massas seja adquirido (Bramer, 1997).

Os espectrômetros de massas de baixa resolução permitem diferenciar compostos cujas massas diferem em pelo menos uma unidade de massa (um Dalton), sendo incapazes de diferenciar compostos isóbaros, ou seja, de mesma massa. Já os de alta resolução permitem diferenciar compostos cujas massas apresentam diferenças muito pequenas, permitindo a determinação da composição atômica da substância. A capacidade de alta resolução de um espectrômetro de massas confere confiabilidade ao resultado onde a composição atômica a ser determinada seja importante (Ardrey, 2003).

5.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC/MS)

Em diversas análises, o(s) componente(s) de interesse são encontrados como parte de uma mistura complexa, e a função da técnica cromatográfica é separar os componentes da mistura para permitir sua identificação ou determinar sua quantidade. De uma perspectiva qualitativa, a principal limitação da cromatografia no isolamento de compostos é sua incapacidade de promover uma identificação inequívoca dos componentes de uma mistura, mesmo que sejam completamente separados uns dos outros (Ardrey, 2003).

O poder da espectrometria de massas está no fato de os espectros de massas de diversos compostos serem suficientemente específicos para permitir sua identificação com alto grau de confiabilidade, se não com completa certeza. Entretanto, se um analito de interesse faz parte de uma mistura, o espectro de massas obtido conterá íons de todos os compostos presentes e, caso o analito de interesse seja o componente minoritário da mistura, a identificação com qualquer grau de certeza tornar-se-á muito mais difícil, quando não impossível (Ardrey, 2003).

A combinação da capacidade de separação da cromatografia, que permite a introdução de compostos isolados no espectrômetro de massas, com a capacidade de identificação da espectrometria de massas é claramente vantajosa. Embora muitos compostos apresentem características de retenção similares ou algumas vezes idênticas, exibem espectros de massas completamente diferentes, podendo assim ser diferenciados. Além disso, a especificidade da espectrometria de massas permite a quantificação do analito, o que apenas com a cromatografia não seria possível. Dessa

maneira, a combinação de HPLC com a espectrometria de massas exibe precisa identificação e quantificação de compostos que não são inteiramente resolvidos cromatograficamente (Ardrey, 2003).

5.7 Quimiluminescência

Reação de quimiluminescência é qualquer reação química na qual um dos produtos da reação é luz. Este processo promove a formação de estados eletronicamente excitados de átomos ou moléculas que, quando retornam ao estado fundamental, emitem radiação na forma de luz (Kaplan *et al.*, 2002). Para que a reação ocorra, o estado eletronicamente excitado deve ser capaz de perder energia na forma de um fóton ou de transferir a energia para uma molécula capaz de emitir luz (Hasting & Wilson, 1976).

É um método analítico quantitativo bastante seletivo e sensível, onde a sensibilidade é limitada somente à habilidade do fotodetector em contar os fótons produzidos durante a reação (Weston & Brown, 1997). A grande maioria das reações quimiluminescentes, e todas as reações bioluminescentes, são direta ou indiretamente oxidações que envolvem oxigênio ou alguns de seus derivados, como H_2O_2 , ânion superóxido ou radical hidroxila ($OH\bullet$) (Hasting & Wilson, 1976).

6. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são: verificar a possibilidade de os alucinógenos indólicos LSD e DMT, serem substratos de peroxidases (HRP e MPO) e, assim, investigar rotas alternativas de sua metabolização. Para tal, seguem as principais etapas:

- 1- Obter DMT a partir do chá de Santo Daime (*ayahuasca*) e/ou a partir de sua síntese;
- 2- Verificar a ocorrência da reação de LSD e de DMT com o sistema HRP/H₂O₂, bem como com MPO presente em neutrófilos humanos ativados;
- 3- Otimizar e padronizar as condições de reação e de análise;
- 4- Identificar e caracterizar os produtos formados.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Material

7.1.1 Reagentes

Soluções padrão de LSD (1 mg/mL), O-H-LSD (100 µg/mL) e bufotenina (1 mg/mL) em acetonitrila foram obtidas da Radian International (Austin, TX, USA). HRP tipo VI, dextran, Histopaque®-1077, 5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona (luminol), SOD, catalase, difeniliodônio (DPI), indol e triptamina foram provenientes da Sigma-Aldrich. D-glicose-anidra, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, NaCl, H_2O_2 29% foram obtidos da Synth, e azida sódica, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 , acetato de amônio, formiato de amônio, amoníaco 25%, metanol e acetonitrila grau HPLC, KOH, NaOH, ácido trifluor acético (TFA), ácido fórmico e *n*-hexano foram obtidos da Merck. O chá de Santo Daime (*ayahuasca*) foi proveniente de uma seita do Santo Daime em Sorocaba, SP.

7.1.2 Equipamentos

Balanças analítica e semi-analítica Shimadzu, banho seco (Thermomixer Compact) Eppendorf, banho-maria Fanem (modelo 100), centrífugas Eppendorf (modelo 5804 R refrigerada e MiniSpin), pré-coluna e colunas de cromatografia de fase reversa Luna C18(2), Synergi Polar-RP e Fusion-RP (250 x 4.60 mm, 5 µm) Phenomenex, espectrofotômetro UV/Vis UV-1601-C Shimadzu, filtro Milli-Q Synthesis Millipore, HPLC (SLC-10A VP) com detectores DAD (SPD-M 10A VP) e fluorescência (RF 10A XL) Shimadzu, LC/MS (HPLC SIL-20AC Prominence Shimadzu e espectrômetro de massas Esquire-HCT Bruker com ionização por *electrospray* e analisador do tipo *ion trap*), luminômetro LB 96V MicroLumat Plus (EG&G Berthold Microplate), mesa agitadora para tubos Tecnal (TE-143), Micro TOF LC Bruker, microscópio óptico (modelo 81186) Nikon, pH-metro Quimis (modelo SC09), rotaevaporador Tecnal.

7.1.3 Leucócitos e urina

Neutrófilos e PBMC foram isolados de sangue humano de voluntários sadios do laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. A amostra de urina foi proveniente da Clínica Vila Serena de São Paulo, especializada em dependentes químicos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com permissão para as coletas sob protocolo número 356, em anexo.

7.2 Métodos

7.2.1 Preparo de soluções

Foram preparadas soluções estoque de acetato de forbol miristato (PMA - 100 µg/mL) e DPI (2 mM) por solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções de SOD (1 mg/mL) e catalase (1 mg/mL) foram preparadas em solução salina 0,9%. As soluções estoque de luminol (1 mM) e azida sódica foram obtidas por solubilização em água deionizada. Foram preparadas soluções estoque de 5 mM de H₂O₂ 29% e 10 µM de HRP tipo VI, ambas preparadas com água deionizada e protegida da luz. Tampão acetato (10 mM) foi preparado com acetato de amônio e água ultra pura (quando necessário, era ajustado o pH a 8 com amoníaco 25%). Tampão fosfato salino (PBS) 10 mM e PBS 10 mM glicosado (adição de d-glicose-anidra, CaCl₂ e MgCl₂) foram preparados com água ultra pura em pH 7.4 (preparados apenas no momento do uso). A opsonização do zimosan foi realizada misturando-se 3,0 mL de uma mistura de soro humano fresco com 1,0 mL de zimosan (10 mg/mL). A mistura foi incubada por 1 hora sob agitação bem lenta a 37° C. Após este procedimento, centrifugou-se a mistura a 1800 g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado três vezes com tampão PBS. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 1,0 mL de tampão PBS e as partículas foram contadas em câmara de Neubauer. Solução estoque de zimosan (10 mg/mL) foi preparada por dissolução em tampão PBS. Após sonicação e centrifugação, a solução foi estocada a -20° C.

7.2.2 Isolamento de leucócitos

Neutrófilos (PMN) foram obtidos a partir de sangue periférico de doadores voluntários e isolados segundo o método de Boyum (1968). Foram coletados 10 mL de sangue em heparina (10 UI/mL de sangue), e adicionou-se 25 mL de tampão PBS. Após leve homogeneização, transferiu-se cuidadosamente o material sobre 10 mL de Histopaque®-1077, e o material foi centrifugado a 2300 *g* (25° C) por 20 minutos. O sobrenadante composto por plasma e Histopaque® foi descartado e a camada rica em células mononucleares foi reservada. Ao *pellet* foram adicionados 20 mL de solução de dextran 4%. O tubo foi mantido em banho de gelo por 30 minutos a 45° para sedimentação dos eritrócitos. O sobrenadante rico em PMN foi recuperado e lavado com tampão PBS. Após outra centrifugação a 2300 *g* (25° C) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi submetido a tratamento hipotônico com 10 mL de água destilada gelada para promover a lise dos eritrócitos contaminantes. A solução foi agitada por 1 minuto e restabeleceu-se a isotonicidade das células com a adição de 5 mL de solução NaCl 2,7% gelada. Mais uma vez, a solução foi lavada com tampão PBS e, pela última vez, centrifugou-se a 2300 *g* (25° C) por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. As células isoladas foram ressuspensas em 1 mL de tampão PBS glicosado e contadas em câmara de Neubauer. Com relação às células mononucleares (PBMC), a camada reservada foi lavada com tampão PBS e centrifugada por três vezes a 1500 *g*, 1300 *g* e 1200 *g*, respectivamente, a 25° C por 10 minutos. O sobrenadante final foi descartado e as células isoladas foram ressuspensas em 1 mL de tampão PBS glicosado. A contagem foi feita em câmara de Neubauer.

7.2.3 Reação de LSD com HRP e H₂O₂

Em tampão PBS, 0,15 mM de LSD foram adicionados a 1 μ M de HRP e 0,5 mM de H₂O₂ com volume final de 300 μ L. A reação foi incubada por uma hora em banho seco (37° C) sob agitação (850 rpm) constante e protegida da luz. Alíquotas da reação foram retiradas nos tempos zero, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e o mesmo volume de acetonitrila gelada foi adicionado para interromper a reação e precipitar proteínas,

seguido de banho de gelo por 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas a 9600 *g* por 5 minutos e os sobrenadantes injetados em HPLC.

7.2.4 Reação de LSD com neutrófilos ativados

Pelo fato de o padrão comercial de LSD estar em acetonitrila, foi necessário evaporar o solvente sob N₂ à temperatura ambiente para evitar a morte celular. Após secagem total do solvente, LSD foi ressuscitado em mesmo volume de água ultra pura, mantendo sua concentração inicial. Neutrófilos foram isolados de sangue humano periférico total e 2,0 x 10⁶ células foram ativadas com 50 ng/mL de PMA. Em tampão PBS glicosado, foram adicionados às células ativadas, 0,15 mM de LSD com volume final de 300 µL. A reação foi incubada por uma hora em banho seco (37° C) sob agitação branda (350 rpm) e constante, protegida da luz. Alíquotas da reação foram retiradas nos tempos zero, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e o mesmo volume de acetonitrila gelada foi adicionado para interromper a reação e precipitar as proteínas, seguido de banho de gelo por 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas a 9600 *g* por 5 minutos e os sobrenadantes injetados em HPLC.

7.2.5 Detecção dos produtos da reação de LSD por HPLC com detectores DAD e fluorescência, e por LC/MS

Os sobrenadantes das reações de LSD com o sistema HRP/H₂O₂ e com neutrófilos ativados por PMA, e seus respectivos controles foram injetados primeiramente em HPLC com detectores DAD e fluorescência. Os produtos da reação foram separados pela coluna Synergi Fusion-RP, no modo isocrático (acetato de amônio 0,01M pH 8/ acetonitrila 60:40) em fluxo de 1,0 mL/min. As análises foram monitoradas por DAD (λ = 254 nm e 310 nm) e por fluorescência (λ_{exc} = 330 nm e λ_{em} = 420 nm). Paralelamente, foram feitas análises por LC/MS do tipo *ion trap*, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*. As condições de análise em LC foram as mesmas descritas previamente, onde do fluxo de 1,0 mL/min, apenas 0,2 mL/min foram destinados ao espectrômetro de massas. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo (ESI+) com a voltagem do capilar ajustada para - 3500 V. Nitrogênio ultra-puro foi utilizado como gás nebulizador (35 psi) e secante (5,0 L/min a 300° C).

7.2.6 Reação de LSD com de neutrófilos ativados e adição de inibidores de ERO

Para este experimento foram utilizados SOD (10 µg/ensaio), catalase (10 µg/ensaio), azida sódica (1 mM) e DPI (20 µM) como inibidores de ERO. Neutrófilos foram isolados de sangue humano periférico total e $2,0 \times 10^6$ células em tampão PBS glicosado foram utilizadas para cada inibidor, separadamente. Em seguida, foram adicionados 50 ng/mL de PMA previamente preparado e 0,15 mM de LSD, nesta ordem. O volume final de cada tubo foi de 300 µL e as reações foram incubadas em banho seco (37° C) sob agitação branda (350 rpm) e constante, protegidas da luz. Foi feito também um controle positivo. Após 15 minutos, uma alíquota de cada reação foi retirada e o mesmo volume de acetonitrila gelada foi adicionado para interromper a reação e precipitar as proteínas, seguido de banho de gelo por 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas a 9600 g por 5 minutos e os sobrenadantes injetados em LC/MS sob as mesmas condições previamente descritas.

7.2.7 Análise de urina de usuário de LSD

Uma amostra de urina de usuário de LSD proveniente da Clínica Vila Serena foi analisada segundo o método de Canezin *et al.* (2001), com algumas modificações, como descrito abaixo:

amostra	branco	eficiência da extração	recuperação
10 mL de urina + 5 mL de tampão + 6 mL de éter ↓ extração ↓ evaporação	10 mL de urina + 5 mL de tampão + 6 mL de éter ↓ extração ↓ evaporação	10 mL de urina + 5 mL de tampão + 150 µL de reação + 6 mL de éter ↓ extração ↓ evaporação	10 mL de urina + 5 mL de tampão + 6 mL de éter ↓ extração + 150 µL de reação ↓ evaporação

Foi utilizado tampão acetato de amônio (1 M; pH 9), ajustado com amoníaco 25%. A reação adicionada à recuperação foi feita com 0,15 mM de LSD, 1 μ M de HRP e 0,5 mM de H₂O₂, com volume final de 600 μ L. A reação procedeu-se por 20 minutos em banho seco (37°C) sob agitação constante (850 rpm). As análises foram feitas em duplicatas e após a evaporação do solvente orgânico, foram ressuspendidas em 100 μ L de água e acetonitrila (1:1). Injetou-se 50 μ L em LC/MS sob as mesmas condições previamente descritas.

7.2.8 Quimiluminescência da reação de LSD com leucócitos ativados e com HRP e H₂O₂

Foram utilizadas para este experimento, microplacas brancas opacas de 96 poços, com capacidade máxima para 300 μ L/poço. Após o isolamento de PMN e de PBMC, $2,0 \times 10^6$ células foram ora ativadas com 50 ng/mL de PMA, ora com $1,0 \times 10^7$ partículas/ensaio de zimosan opsonizado (ZO), previamente preparados. Em tampão PBS glicosado, 0,15 mM de LSD foram adicionados às células ativadas. Já na reação com HRP, 1 μ M da enzima foi adicionada a 0,15 mM de LSD e 0,5 mM de H₂O₂. Todas as reações foram feitas em duplicata com volume final de 300 μ L. Sob as mesmas condições de análise, foram feitos os controles de ambas as reações. Para se testar a viabilidade de neutrófilos e PBMC ativados e de HRP, utilizou-se 10 μ M de luminol como substrato em tampão PBS glicosado. O luminômetro foi programado para mensurar a intensidade de luz por 1 hora a 37° C.

7.2.9 Reação de LSD com H₂O₂ 29% e análise por LC/MS

A uma solução de H₂O₂ 29% foi adicionado 1 mM de LSD com volume final de 100 μ L. A mistura permaneceu sob agitação durante 2 horas à temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, 5 μ L da solução foram injetados em LC/MS, onde os produtos da reação foram separados pela coluna Synergi Fusion-RP no modo isocrático (acetato de amônio 0,01M pH 8/acetonitrila 60:40) em fluxo de 1,0 mL/min. Utilizou-se um divisor de fluxo de modo a destinar 0,2 mL/min para a fonte de ESI, a qual foi operada no modo positivo sob as mesmas condições previamente descritas.

7.2.10 Extração e purificação de DMT a partir do chá de Santo Daime (*ayahuasca*)

A extração de DMT a partir do chá de Santo Daime foi realizada segundo o método de Yritia *et al.* (2002), com algumas modificações. A fim de se realizar uma extração líquido-líquido, foram adicionados ao chá, solução saturada de NaCl, solução de KOH 5N e *n*-hexano. A mistura permaneceu sob agitação leve (60 rpm) em posição horizontal por 20 minutos. Após centrifugação a 1800 *g* por 10 minutos, a fase orgânica foi separada e o solvente foi evaporado sob N₂ à temperatura ambiente. O material foi ressuspendido em metanol, filtrado e injetado em HPLC com detector DAD. A DMT foi separada das demais substâncias também extraídas do chá em coluna Luna C18(2) com acetonitrila (solvente A) e tampão fosfato 0,1 M pH 7.4 (solvente B), em fluxo de 1 mL/min no seguinte gradiente de eluição: de zero a 2 minutos 95% de solvente B; de 2 a 15 minutos diminuição do solvente B para 80%; de 15 a 25 minutos diminuição do solvente B para 0%. Colheu-se o pico de DMT em tempo de retenção de 8.9 minutos, em 288 nm e evaporou-se o volume da fase móvel em rotaevaporador. Após pesagem do produto final, fez uma solução 0,1 mM em metanol/ácido acético (1:1), que permaneceu estocada sob refrigeração e protegida da luz.

7.2.11 Síntese de DMT a partir de indol

A síntese de DMT (**Fig. 14**) foi realizada seguindo-se o método descrito por Brand *et al.* (2005), o qual é baseado na rota sintética de Speeter e Anthony (1954). Esta rota parte de 5,44 mmol de indol, o qual foi dissolvido em 150 mL de éter anidro e agitado em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, 16,3 mmol de cloreto de oxalila foram adicionados lentamente, mantendo-se a agitação por mais 30 minutos. O produto formado foi filtrado e lavado três vezes com 50 mL de éter anidro gelado e secado sob vácuo por 3 horas à temperatura ambiente. E seguida, 5 mmol deste produto foram dissolvidos em 100 mL de THF anidro, e então, 15 mmol de dimetilamina foram adicionados lentamente a esta solução, agitando-se em banho de gelo por 4 horas. O solvente foi evaporado e o resíduo cromatografado em coluna de sílica (diclorometano-metanol; 9:1). O produto purificado (1,5 mmol) foi posteriormente dissolvido em 40 mL de THF anidro e adicionado a 100 mL de uma suspensão de hidreto de lítio e alumínio (15 mmol) em THF, sob atmosfera inerte e em banho de

gelo. Esta mistura foi aquecida à temperatura de refluxo por 15 horas e em seguida, resfriada em banho de gelo. O excesso de hidreto foi destruído adicionando-se lentamente 5 mL de água, seguidos de 5 mL de NaOH 20% e mais 5 mL de água. Os sais inorgânicos precipitados foram filtrados e lavados 3 vezes com 30 mL de THF. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo oleoso resultante dissolvido em 75 mL de diclorometano, lavado 3 vezes com água e uma vez com solução saturada de NaCl. À fase orgânica foi adicionado MgSO_4 anidro, e em seguida, esta foi filtrada e evaporada à pressão reduzida para fornecer a DMT.

Figura 14: Reação de síntese da DMT, segundo o método descrito por Brandt *et al.*, 2005.

A purificação foi realizada por HPLC em coluna Luna C18(2) utilizando-se água + 0,1% de TFA (solvente A) e acetonitrila + 0,1% de TFA (solvente B) como fase móvel, em fluxo de 1 mL/min no seguinte gradiente de eluição: de zero a 10 minutos 20% de solvente B; de 12 a 13 minutos aumento do solvente B para 80%; e de 14 a 18 minutos diminuição do solvente B para 20%. Coletou-se o pico de DMT em tempo de retenção de 8.19 minutos, em 288 nm e evaporou-se o volume da fase móvel em rotaevaporador. Após pesagem do produto final, fez uma solução estoque de 2 mM em metanol/água/ácido acético (80:20:0,1), que permaneceu estocada sob refrigeração e protegida da luz.

7.2.12 Reação de DMT com HRP e H_2O_2

Em tampão PBS, 0,1 mM de DMT foi adicionado a 1 μM de HRP e 0,5 mM de H_2O_2 com volume final de 300 μL . A reação foi incubada por uma hora em banho seco (37°C) sob agitação (850 rpm) constante, protegida da luz. Sob as mesmas condições de análise, foram feitos os controles da reação. Alíquotas da reação foram retiradas nos tempos zero, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e o mesmo volume de acetonitrila gelada foi adicionado para interromper a reação e precipitar proteínas, seguido de

banho de gelo por 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas a 9600 *g* por 5 minutos e os sobrenadantes injetados em HPLC.

7.2.13 Reação de DMT com neutrófilos ativados

Foi utilizada DMT proveniente de sua síntese como padrão. O solvente foi evaporado sob N₂ à temperatura ambiente para evitar a morte celular. Após secagem total do solvente, a DMT foi ressuspensa em mesmo volume de água ultra pura, mantendo sua concentração inicial. Neutrófilos foram isolados de sangue humano periférico total e 2,0 x 10⁶ células foram ativadas com 50 ng/mL de PMA, previamente preparado. Em tampão PBS glicosado, foram adicionados às células ativadas, 0,1 mM de DMT com volume final de 300 µL. A reação foi incubada por uma hora em banho seco (37° C) sob agitação branda (350 rpm) e constante, protegida da luz. Alíquotas da reação foram retiradas nos tempos zero, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e o mesmo volume de acetonitrila gelada foi adicionado para interromper a reação e precipitar proteínas, seguido de banho de gelo por 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas a 9600 *g* por 5 minutos e os sobrenadantes injetados em HPLC.

7.2.14 Detecção dos produtos da reação de DMT por HPLC com detectores DAD e fluorescência, e por LC/MS

Os sobrenadantes das reações de DMT com o sistema HRP/H₂O₂, com neutrófilos ativados, e seus respectivos controles foram injetados primeiramente em HPLC com detectores DAD e fluorescência. Os produtos da reação foram separados pela coluna Synergi Polar-RP utilizando-se acetato de amônio 10 mM com 0,01% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel, em fluxo de 1 mL/min no seguinte gradiente de eluição: de zero a 6 minutos 20% de solvente B; de 6 a 10 minutos aumento do solvente B para 80%; e de 10 a 14 minutos mantém o solvente B a 80%; e de 14 a 15 minutos diminuição do solvente B para 20%. As análises foram monitoradas por DAD (λ = 288 nm) e por fluorescência (λ_{exc} = 232 nm e λ_{em} = 351 nm). Paralelamente, foram feitas análises por LC/MS do tipo *ion trap*, equipado com uma fonte de ESI. As condições de análise em LC foram as mesmas descritas previamente, onde do fluxo de 1,0 mL/min, apenas 0,2 mL/min foram

destinados ao espectrômetro de massas. A fonte de *electrospray* foi operada no modo positivo (ESI+) com a voltagem do capilar ajustada para - 3500 V. Nitrogênio ultra-puro foi utilizado como gás nebulizador (35 psi) e secante (5,0 L/min a 300° C).

7.2.15 Reação de DMT com neutrófilos ativados e adição de inibidores de ERO

Para este experimento foram utilizados SOD (10 µg/ensaio), catalase (10 µg/ensaio), azida sódica (1 mM) e DPI (20 µM) como inibidores de ERO. Neutrófilos foram isolados de sangue humano periférico total e $2,0 \times 10^6$ células em tampão PBS glicosado foram utilizadas para cada inibidor, separadamente. Em seguida, foram adicionados 50 ng/mL de PMA previamente preparado e 0,1 mM de DMT, nesta ordem. O volume final de cada tubo foi de 300 µL e as reações foram incubadas em banho seco (37° C) sob agitação branda (350 rpm) e constante, protegidas da luz. Foi feito também um controle positivo. Após 15 minutos, uma alíquota de cada reação foi retirada e o mesmo volume de acetonitrila gelada foi adicionado para interromper a reação e precipitar as proteínas, seguido de banho de gelo por 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas a 9600 g por 5 minutos e os sobrenadantes injetados em LC/MS sob as mesmas condições previamente descritas.

8. RESULTADOS

8.1 LSD

8.1.1 Reação de LSD com HRP e H₂O₂

A HRP comercial foi utilizada como um modelo de peroxidase para avaliarmos a princípio, se a enzima reagiria com LSD. Antes de dar início aos experimentos, foi necessário, primeiramente, padronizar as condições de análise de LSD por HPLC e LC/MS. Para isso, foram feitas diversas tentativas, variando-se a concentração do substrato, coluna, fase móvel e tempo de corrida, até chegar à condição mais adequada, descrita no item procedimentos.

Inicialmente, as concentrações de LSD, HRP e H₂O₂ se basearam no ciclo peroxidásico clássico onde, para cada molécula de HRP utilizada, é consumida uma molécula de substrato e meia de H₂O₂. Entretanto, as concentrações utilizadas nos experimentos foram 1 µM de HRP, 0,5 mM de H₂O₂ e 0,15 mM de LSD, pois testes prévios mostraram que a utilização de LSD na concentração de 1 mM foi adequada.

A Figura 15 apresenta os cromatogramas de HPLC obtidos pelos detectores DAD e fluorescência de alíquotas do tempo zero (Painéis **A** e **B**), 15 minutos (Painéis **C** e **D**) e uma hora de reação (Painéis **E** e **F**). Foi possível verificar a presença de novos picos cromatográficos, indicando a formação de produtos de reação. Sob as mesmas condições, nem HRP, nem H₂O₂ (controles) foram capazes de reagir com LSD isoladamente (resultados não mostrados).

Figura 15: Cromatogramas (HPLC) de 25 μ L da reação de LSD (0,15 mM) com o sistema HRP (1 μ M) e H_2O_2 (0,5 mM) nos tempos zero (A e B), 15 minutos (C e D) e uma hora (E e F). Os cromatogramas da esquerda mostram detecção por DAD ($\lambda = 254$ nm) e os da direita por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm). A reação foi incubada sob agitação constante a 37° C em tampão PBS pH 7.4. Condições de análise: coluna Synergi Fusion-RP, fluxo 1 mL/min em tampão acetato de amônio (0,01 M; pH 8.0) / acetonitrila (60:40) no modo isocrático.

Em seguida, na tentativa de identificar os produtos formados, foi feita uma análise por LC/MS. A Figura 16 mostra o cromatograma reconstituído dos principais íons (compostos) encontrados (m/z 356, m/z 328, m/z 334, m/z 336 e m/z 310) após uma hora de reação, onde o íon de m/z 324 correspondeu ao LSD. O cromatograma revela a presença de dois picos cromatográficos correspondentes a produtos com m/z 356, com tempos de retenção de 4,3 e 7,3 minutos, sugerindo a presença de compostos isóbaros, isto é, distintos, porém com a mesma relação massa/carga (m/z).

Figura 16: Cromatograma (LC/MS) reconstituído dos íons de m/z 356, m/z 328, m/z 334, m/z 336, m/z 324 e m/z 310 (ESI+) após 1 hora de reação. Condições de reação e analítica: as mesmas da Figura 15.

Análises de fragmentação destes compostos foram posteriormente realizadas. No espectro de fragmentação do íon de m/z 324 ($[M+H]^+$) (**Fig. 17**), característico de LSD quando ionizado por *electrospray* no modo positivo (ESI+), pôde-se observar a presença de fragmentos com m/z 281, m/z 251, m/z 223 e m/z 197, que representaram perdas neutras características deste composto, já descritas na literatura (Borowsky et al., 2001).

Figura 17: Espectro de fragmentação (MS²) do íon de m/z 324 (ESI+), correspondente ao composto LSD, eluído em 13,9 minutos.

A Figura 18 ilustra o espectro de fragmentação (MS²) do primeiro composto de m/z 356, eluído em 4,3 minutos. Pôde-se verificar a presença de um fragmento de m/z 338, com 18 Da de diferença em relação ao precursor (m/z 356), sugerindo a perda neutra de uma molécula de água. Experimentos subsequentes (MS³) revelaram que este mesmo íon (m/z 338) sofre as perdas neutras características de LSD (dietilamina e dietilformamida), gerando os íons de m/z 265 e m/z 237, respectivamente (dados não mostrados).

Figura 18: Espectro de fragmentação (MS²) do íon de m/z 356 (ESI+), eluído em 4,3 minutos.

Comparando estes resultados com os da literatura, verificou-se que o íon de m/z 356 representou o composto 2-oxo-3-hidroxi-LSD (O-H-LSD) (Canezin *et al.*, 2001), o principal metabólito de LSD *in vivo*. Por fim, sua identidade foi confirmada com uma análise de fragmentação do padrão comercial do composto O-H-LSD (**Fig. 19**).

Figura 19: Espectro de fragmentação (MS^2) do padrão comercial de O-H-LSD em acetonitrila/água (50:50) + 0,1% de ácido fórmico, ionizado por *electrospray* no modo positivo (ESI+).

Em seguida, procedeu-se à fragmentação (MS^2) do segundo íon de m/z 356 com tempo de retenção de 7,3 minutos (**Fig. 20**). Diferentemente de O-H-LSD, esse composto apresentou uma perda neutra de 28 Da, sugerindo a eliminação de monóxido de carbono (CO), gerando o íon de m/z 328.

Experimentos de MS^3 revelaram que o íon de m/z 328 também sofreu perdas neutras de dietilamina e dietilformamida, gerando os íons de m/z 227 e m/z 255, respectivamente (**Fig. 21**). Esses resultados sugerem fortemente que o composto eluído em 7,3 minutos seja um produto de abertura do anel indólico da molécula de LSD, o qual denominamos como *N,N*-dietil-7-formamido-4-metil-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahidrobenczo[*f*]quinolina-2-carboxamida (FOMBK), bem como o íon de m/z 328 como *N,N*-dietil-7-amino-4-metil-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahidrobenczo[*f*]quinolina-2-carboxamida (AOMBK), que representou sua forma deformilada.

Figura 20: Espectro de fragmentação (MS²) do íon de m/z 356 (TR = 5,9 minutos) (ESI+).

Figura 21: Espectro de fragmentação (MS³) do íon de m/z 356>328 (ESI+).

A presença de um pico cromatográfico correspondente a um íon de m/z 328 também foi investigada. Análises de MS² revelaram que sua fragmentação foi idêntica à fragmentação de AOMBK (dados não mostrados). Dessa forma, sugere-se que este pico seja decorrente da deformilação espontânea de FOMBK no meio analítico ou no próprio meio de reação.

Com relação ao íon de m/z 310, experimentos de fragmentação (MS²) (**Fig. 22**) mostraram as mesmas perdas neutras características de LSD e de O-H-LSD. A comparação destes resultados com dados da literatura revelou que o composto em questão era o *N*-demetil-LSD (*nor*-LSD), o segundo principal metabólito do LSD *in vivo* (Canezin *et al.*, 2001).

Figura 22: Espectro de fragmentação (MS^2) do íon de m/z 310 (ESI+).

Em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani do Instituto de Química da USP, fizemos a análise dos compostos FOMBK e AOMBK, em um espectrômetro de massas de alta resolução (Micro TOF). O composto FOMBK foi isolado por HPLC (Fig. 15 C) e fez-se uma infusão direta no espectrômetro de massas.

Figura 23: Espectro de massas (Micro TOF) do composto FOMBK (ESI+), proveniente da reação LSD/HRP/ H_2O_2 em condições de reação iguais à Figura 15.

Figura 24: Espectro de massas (Micro TOF) do composto AOMBK (ESI+), proveniente da reação LSD/HRP/ H_2O_2 em condições de reação iguais à Figura 15.

Os espectros de massas provenientes desta análise (**Fig. 23 e 24**) mostram a presença de íons de m/z 356,1973 e m/z 328,2028, correspondentes a FOMBK e AOMBK, respectivamente. Para que a identificação estrutural fosse confirmada, foi necessário calcular o erro (ppm) do equipamento mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{valor encontrado} - \text{valor de referência}}{\text{valor de referência}} \times 10^6$$

O valor de referência para o composto FOMBK é 356,1969 $[(M+H)^+]$, e para AOMBK 328,2020 $[(M+H)^+]$. Após os cálculos dos erros, valores abaixo de 2 ppm foram obtidos para ambos os compostos, confirmando a composição molecular das estruturas propostas.

O espectro de absorção do composto FOMBK foi determinado (355 nm), como mostrado na Figura 25 em comparação aos compostos O-H-LSD (254 nm) e LSD (310 nm), os quais já apresentavam absorbâncias conhecidas (Clark's, 2003).

Figura 25: Espectros UV/Vis dos compostos O-H-LSD (TR: 4,59 min), FOMBK (TR: 7,40 min) e LSD (TR: 14,23 min), provenientes da reação de LSD (0,15 mM) com o sistema HRP (1 μ M) e H_2O_2 (0,5 mM), analisados por HPLC com detector DAD. As condições de análises são as mesmas da Figura 15.

Os gráficos da Figura 26 representam as cinéticas do consumo de LSD pelo sistema HRP/H₂O₂ e a de formação dos principais produtos, durante uma hora de reação. É possível notar que após 15 minutos de reação a formação do produto FOMBK começa a decair, à medida que a formação do produto AOMBK começa a aumentar. Isto mostra que AOMBK seja formado pela deformilação de FOMBK.

Figura 26: Cinéticas do consumo de LSD decorrente da reação com sistema HRP (1 μ M) e H₂O₂ (0,5 mM), e da formação de seus principais metabólitos (FOMBK, AOMBK, *nor*-LSD e O-H-LSD). A análise foi feita por LC/MS, e as condições de reação e analíticas são as mesmas da Figura 15.

Outro parâmetro estudado foi o efeito da concentração de H_2O_2 no sistema LSD/HRP/ H_2O_2 . Duas reações idênticas foram processadas, mudando-se apenas as concentrações de H_2O_2 (0,1 mM e 0,5 mM). A Figura 27 apresenta cromatogramas de HPLC obtidos por detector DAD de alíquotas do tempo zero (Painéis **A** e **B**) e após 15 minutos de reação (Painéis **C** e **D**). É possível verificar a presença de novos picos cromatográficos, indicando a formação de produtos de reação. Sob as mesmas condições, HRP ou H_2O_2 (controles) não foram capazes de reagir com LSD (resultados não mostrados).

Figura 27: Cromatogramas (HPLC) de 25 μL da reação LSD/HRP/ H_2O_2 nos tempos zero (A e B) e após 15 minutos de reação (C e D). A coluna da esquerda representa H_2O_2 0,1 mM e a da direita H_2O_2 0,5 mM. As condições de reação e de análise são as mesmas da Figura 15.

O efeito do pH na reação de LSD com o sistema HRP/H₂O₂ também foi estudado. Os valores de pH testados foram: pH 5,0, 7,4 e 8,0. Embora o consumo de LSD durante a reação tenha ocorrido em todos os pHs analisados (**Fig. 28**), a enzima HRP apresentou melhor eficiência em pH 7.4 (**Fig. 29**).

Figura 28: Efeito do pH sobre o consumo de LSD durante a reação com HRP/H₂O₂. Tampão PBS utilizado em diferentes pHs: 5.0, 7.4 e 8.0. As condições de reação e de análise são as mesmas da Figura 15.

Figura 29: Efeito do pH sobre a formação dos produtos FOMBK, O-H-LSD e *nor*-LSD gerados durante a reação de LSD/HRP/H₂O₂. Tampão PBS utilizado em diferentes pHs: 5,0, 7,4 e 8,0. As condições de reação e de análise são as mesmas da Figura 15.

8.1.2 Reação de LSD com neutrófilos ativados

Analogamente à reação de LSD com o sistema HRP/H₂O₂, foi avaliado se MPO proveniente de neutrófilos ativados com PMA também seria capaz promover a formação dos mesmos produtos, em uma reação semelhante. A Figura 30 apresenta os cromatogramas de HPLC obtidos pelos detectores DAD e fluorescência de alíquotas do tempo zero (Painéis **A** e **B**) e após 45 minutos (Painéis **C** e **D**) de reação de LSD com neutrófilos ativados. Foi possível verificar a presença de novos picos cromatográficos, indicando a formação de produtos de reação. Sob as mesmas condições, neutrófilos inertes ou PMA (controles) não foram capazes de reagir com LSD (resultados não mostrados).

Figura 30: Cromatogramas (HPLC) de 25 μ L da reação de LSD (0,15 mM) com neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/ensaio) ativados por PMA (50 ng/ensaio) nos tempos zero (A e B) e 45 minutos (C e D). Os cromatogramas da esquerda mostram detecção por DAD ($\lambda = 254$ nm) e os da direita por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm). A reação foi incubada sob agitação constante a 37° C em tampão PBS pH 7.4. Condições de análise: coluna Luna C18(2), fluxo de 1 mL/min em tampão acetato de amônio 0,01 M pH 8 / acetonitrila (60:40) no modo isocrático.

Em seguida, na tentativa de identificar os produtos formados, o meio de reação foi analisado por LC/MS. A Figura 31 mostra o cromatograma reconstituído dos principais íons (compostos) encontrados após uma hora de reação (m/z 356, m/z 336, m/z 334, m/z 310 e m/z 328). O íon de m/z 324, correspondente ao LSD intacto, estava presente em grande quantidade e não será mostrado para evitar disparidade nas escalas.

O cromatograma revela a presença de dois picos cromatográficos correspondentes a produtos com m/z 356, com tempos de retenção de 3,2 e 5,9 minutos, sugerindo a presença de compostos isóbaros, isto é, distintos, porém com a mesma relação m/z . Novamente foram feitas fragmentações (MS^2) de todos os íons encontrados (resultados não mostrados), comprovando-se que se tratavam dos mesmos compostos formados pelo sistema LSD/HRP/ H_2O_2 , sendo estes: FOMBK, AOMBK, O-H-LSD e *nor*-LSD.

Figura 31: Cromatograma (LC/MS) reconstituído dos íons de m/z 356, m/z 336, m/z 334, m/z 310 e m/z 328 (ESI+) após 1 hora de reação. As condições de reação e analíticas são as mesmas descritas na Figura 15.

Os gráficos da Figura 32 apresentam as cinéticas do consumo de LSD por neutrófilos ativados por PMA e a de formação dos principais produtos, durante uma hora de reação. De uma maneira semelhante à reação de LSD com o sistema HRP/H₂O₂, é possível notar que após 15 minutos de reação a formação do produto FOMBK começa a decair à medida que a formação do produto AOMBK começa a aumentar. Isto, mais uma vez, mostra que AOMBK seja formado pela deformilação de FOMBK.

Figura 31: Cinéticas do consumo de LSD e a de formação de seus principais metabólitos (FOMBK, AOMBK, *nor*-LSD e O-H-LSD) decorrentes de sua metabolização promovida por neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/ensaio) ativados com PMA (50 ng/ensaio). As condições de reação e analíticas são as mesmas da Figura 30.

Outro parâmetro estudado foi a avaliação do efeito de inibidores de ERO na formação dos compostos FOMBK, O-H-LSD e *nor*-LSD, pela reação de LSD com neutrófilos ativados por PMA (**Fig. 33**). Nota-se que as enzimas catalase e SOD, bem como azida sódica e DPI, inibem consideravelmente a formação dos compostos FOMBK e O-H-LSD. Por outro lado, não têm efeito, ou então têm um efeito mais modesto sobre a inibição da formação de *nor*-LSD. A catalase atua sobre o H₂O₂ formando água e oxigênio e a azida sódica é um inibidor clássico de MPO. Já a SOD é responsável por transformar o ânion superóxido em H₂O₂, e o DPI por inibir o sistema NADPH oxidase.

Figura 33: Formação de FOMBK, O-H-LSD e *nor*-LSD pela reação de LSD (0,15 mM) com neutrófilos (2,0 x 10⁶ células/ensaio) ativados por PMA (50 ng/ensaio) e adição de catalase (10 µg/ensaio), azida sódica (1 mM), SOD (10 µg/ensaio) e DPI (20 µM/ensaio). Dados provenientes de análise por LC/MS. Condições de análises: as mesmas da Figura 29.

8.1.3 Quimiluminescência da reação de LSD com neutrófilos e PBMC ativados, e com o sistema HRP/H₂O₂

Foi analisada a quimiluminescência da reação de LSD com neutrófilos e monócitos, bem como com o sistema HRP/H₂O₂. Primeiramente, foi testada a capacidade de MPO proveniente de neutrófilos (**Fig. 35 A**) e PBMC (**Fig. 35 B**) ativados com PMA e zimosan opsonizado, em oxidar luminol.

Figura 35: Cinética de emissão de luz da reação de luminol (1mM) com **(A)** neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/ensaio) e **(B)** PBMC ($1,0 \times 10^6$ células/ensaio) estimulados com PMA (16 ng/ensaio) e zimosan opsonizados ($1,0 \times 10^7$ partículas/ensaio), separadamente, incubados em tampão PBS glicosado pH 7.4 a 37°C.

Após verificar a viabilidade da enzima MPO proveniente dos leucócitos ativados, foi estudada a cinética de emissão de luz da reação de LSD com neutrófilos estimulados com PMA (**Fig. 36 A**) e com zimosan opsonizado (**Fig. 36 B**), separadamente.

Figura 36: Cinética de emissão de luz da reação de LSD (0,15 mM) com neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/ensaio) estimulados com **(A)** PMA (16 ng/ensaio) e **(B)** com zimosan opsonizado ($1,0 \times 10^7$ partículas/ensaio), incubados em tampão PBS glicosado pH 7.4 a 37° C.

Igualmente, foi estudada a cinética de emissão de luz da reação de LSD com PBMC estimulados com PMA (**Fig. 37 A**) e zimosan opsonizado (**Fig. 37 B**), separadamente.

Figura 37: Cinética de emissão de luz da reação de LSD (0,15 mM) com PBMC ($1,0 \times 10^6$ células/ensaio) estimulados com **(A)** PMA (16 ng/ensaio) e **(B)** com zimosan opsonizado ($1,0 \times 10^7$ partículas/ensaio), incubados em tampão PBS glicosado pH 7.4 a 37° C.

Sob as mesmas condições de análise foi estudada a cinética de emissão de luz da reação de LSD com o sistema HRP/H₂O₂ (**Fig. 38**).

Figura 38: Cinética de emissão de luz da reação de LSD (0,15 mM) com o sistema HRP (1 μ M) e H₂O₂ (0,5 mM), incubados em tampão PBS pH 7.4 a 37° C.

Foi avaliado o efeito de inibidores de ERO na quimiluminescência da reação de LSD com neutrófilos ativados por PMA (**Fig. 39**). Observamos que a cinética de emissão de luz foi marcadamente diminuída pela adição dos inibidores azida, SOD e DPI, mas, no entanto, não é consideravelmente afetada pela adição de catalase.

Figura 39: Cinética da emissão de luz da reação de LSD (0,15 mM) com neutrófilos ($1,0 \times 10^6$ células/ensaio) ativados com PMA (16 ng/mL) na presença de catalase (10 μ g/ensaio), azida sódica (1 mM), SOD (10 μ g/ensaio) e DPI (20 μ M). Condições de reação: tampão PBS glicosado pH 7,4, 37° C e volume final de 300 μ L.

8.1.4 Análise de urina de usuário de LSD

Com o intuito de avaliarmos a presença do composto FOMBK na urina de um usuário de LSD, uma amostra proveniente da clínica de dependentes químicos Vila Serena foi analisada por LC/MS. A amostra foi colhida pelo usuário 22 horas após a ingestão de um *blotter* de LSD.

Os resultados obtidos revelaram a presença dos compostos O-H-LSD e *nor*-LSD, os principais metabólitos descritos, bem como o próprio LSD em sua forma inalterada. Entretanto, como pode ser visto na Figura 34 (B), não foi possível detectar a presença do composto FOMBK na amostra analisada.

Figura 34: Cromatogramas (LC/MS) reconstituídos dos íons correspondentes aos compostos **(A)** O-H-LSD, FOMBK, LSD e *nor*-LSD (ESI+) de urina (branco) adicionada de 150 μ L de uma alíquota de 15 minutos da reação de LSD (0,15 mM) com o sistema HRP (1 μ M) e H₂O₂ (0,5 mM) após; **(B)** O-H-LSD, LSD e *nor*-LSD (ESI+) de urina de usuário de LSD.

8.1.5 Reação de LSD com H_2O_2 29%

Da mesma forma que nosso grupo de pesquisa sintetizou AFMK a partir da reação de melatonina e H_2O_2 29% (Ximenes *et al.*, 2005), foi verificado se o mesmo ocorreria com o padrão comercial de LSD com o intuito de produzir FOMBK. Após 2 horas de reação, os produtos da reação foram analisados por LC/MS. A Figura 40 mostra o cromatograma reconstituído dos principais íons (compostos) encontrados após duas horas de reação (m/z 356, m/z 374 e m/z 340). O íon de m/z 324, correspondente ao LSD intacto, estava presente em grande quantidade e não será mostrado para evitar disparidade nas escalas.

Análises de fragmentação destes compostos foram posteriormente realizadas (resultados não mostrados). Concluímos mediante estes resultados que o íon de m/z 356 correspondeu ao composto FOMBK, embora a reação não tenha sido muito eficiente. Já os íons de m/z 340 e m/z 374 representam sucessivas inserções de grupamentos hidroxila (-OH) na molécula de LSD.

Figura 40: Cromatograma (LC/MS) reconstituído dos íons de m/z 356, m/z 374 e m/z 340 (ESI+) após 2 horas de reação. LSD (3 mM) e H_2O_2 29% foram incubados sob agitação constante. As condições de análise são as mesmas descritas na Figura 15.

8.2 DMT

8.2.1 Extração de DMT a partir da ayahuasca (chá de Santo Daime)

Primeiramente, a DMT foi extraída da *ayahuasca* segundo o método de Yritia *et al.* (2002), o qual descreve sua extração em plasma humano. Na tentativa de reproduzir esta metodologia, o plasma foi substituído por *ayahuasca* e as condições de análise foram adaptadas aos materiais e equipamentos que possuímos em nosso laboratório (todas as reações foram realizadas no Laboratório de Análise Toxicológica em colaboração com o Prof. Dr. Maurício Yonamine do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).

A DMT foi separada dos outros alcalóides e flavonóides encontrados na bebida por HPLC com detector DAD (**Fig. 41 A**). Após a padronização da metodologia, colheu-se o pico de DMT no tempo de retenção de 8,9 minutos. O espectro de absorção UV/Vis da DMT (Clark's, 2003) está mostrado na Figura 41 B. Entretanto, esta extração requer muito tempo, consumo de solventes, e, além disso, fornece uma quantidade relativamente baixa de DMT. Desta forma, optamos por tentar realizar sua síntese.

Figura 41: (A) Cromatograma (HPLC) de 200 μ L de material obtido pela extração da *ayahuasca*. Condições da extração: solvente *n*-hexano, N_2 como gás secante, ressuspensão em metanol. Condições analíticas: coluna Luna C18(2), fluxo de 1 mL/min em tampão acetato fosfato 0,1 M pH 7.4 / acetonitrila em gradiente de eluição, detector DAD ($\lambda = 288$ nm); (B) Espectro de absorção UV/Vis ($\lambda = 288$ nm) de DMT isolado por HPLC (TR= 8,9 minutos).

8.2.2 Obtenção de DMT a partir de sua síntese

As tentativas iniciais para a síntese de DMT basearam-se em variações do método clássico de Eschweiler-Clark para metilação de aminas (Kapnang *et al.*, 1977; Guimanini *et al.*, 1976; Sondengam *et al.*, 1973; Pine & Sanchez, 1971; Borch & Hassi, 1972). Partindo-se de triptamina, tentou-se a dimetilação através da reação com formaldeído e diferentes agentes redutores. Após diversos testes e em função dos baixos rendimentos obtidos, optou-se pela rota sintética de Speeter e Anthony (1954), utilizando-se indol como material de partida. Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Síntese de Moléculas Bioativas em colaboração com o Prof. Dr. Hélio Alexandre Stefani do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Após a reação de síntese, a DMT foi isolada por HPLC (**Fig. 42**) de acordo com a metodologia padronizada e descrita no item procedimentos.

Figura 42: Cromatograma (HPLC) de 20 μ L de material obtido pela síntese de DMT a partir de indol. Condições analíticas: coluna Luna C 18(2), fluxo de 1 ml/min em acetonitrila + 0,1% de TFA / água + 0,1% de TFA (50:50), em gradiente de eluição, λ = 288 nm.

Em seguida, na tentativa de confirmar o produto isolado, o material ressuspendido foi analisado por MS (**Fig. 43**). Pôde-se verificar a presença de um fragmento de m/z 144, com 45 Da de diferença em relação ao precursor (m/z 189), sugerindo a perda de uma molécula de dimetilamina (C_2H_7N). Também foi observado um fragmento de m/z 58, característico da molécula de DMT [40].

Figura 43: Espectro de fragmentação (MS^2) do íon de m/z 189 (ESI+). Pico isolado por HPLC de DMT em acetonitrila / água (50:50).

8.2.3 Reação de DMT com HRP e H_2O_2

A HRP comercial foi utilizada como um modelo de peroxidase para avaliarmos a princípio, se a enzima reagiria com DMT. Antes de dar início aos experimentos, foi necessário primeiramente padronizar as condições de análise de DMT por HPLC e LC/MS. Para isso, foram feitas diversas tentativas, variando-se a concentração do substrato, coluna, fase móvel e tempo de corrida, até chegar à condição mais adequada, descrita no item procedimentos. Para este experimento foi utilizada DMT proveniente da síntese do indol, previamente isolada e purificada.

Inicialmente, as concentrações de DMT, HRP e H_2O_2 se basearam no ciclo peroxidásico clássico onde, para cada molécula de HRP utilizada, é consumida uma molécula de substrato e meia de H_2O_2 . Entretanto, as reais concentrações utilizadas nos experimentos foram 1 μM de HRP, 0,5 mM de H_2O_2 e 0,1 mM de DMT, pois testes prévios mostraram que a utilização de DMT na concentração de 1 mM foi inadequada.

A Figura 44 apresenta os cromatogramas de HPLC obtidos pelos detectores DAD e fluorescência de alíquotas do tempo zero (Painéis **A** e **B**) e 15 minutos (Painéis **C** e **D**). Foi possível verificar a presença de novos picos cromatográficos, indicando a formação de produtos de reação. Sob as mesmas condições, nem HRP, nem H_2O_2 (controles) foram capazes de reagir com DMT isoladamente (resultados não mostrados).

Figura 44: Cromatogramas (HPLC) de 25 μ L da reação DMT (0,1 mM) com o sistema HRP (1 μ M) e H_2O_2 (0,5 mM) nos tempos zero (A e B) e 15 minutos (C e D). Os cromatogramas da esquerda mostram detecção por DAD ($\lambda = 288$ nm) e os da direita por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 232$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 351$ nm). A reação foi incubada sob agitação constante a 37° C em tampão PBS pH 7.4. Condições de análise: coluna Polar-RP, fluxo de 1 mL/min em tampão acetato de amônio 0,01 M / acetonitrila, em gradiente de eluição.

Em seguida, na tentativa de identificar os produtos formados, foi feita uma análise por LC/MS. A Figura 45 mostra o cromatograma reconstituído dos principais íons (compostos) encontrados (m/z 205, m/z 221 e m/z 193) após uma hora de reação, onde o íon de m/z 189 correspondeu à DMT.

Figura 45: Cromatograma (LC/MS) reconstituído dos íons encontrados no tempo 1 hora da reação de DMT com HRP/H₂O₂ mostrando os íons segundo a sequência de eluição. Condições de reação e analíticas são as mesmas da Figura 44.

Análises de fragmentação destes compostos foram posteriormente realizadas. A Figura 46 ilustra o espectro de fragmentação (MS²) do íon de m/z 205, eluído em 7,5 minutos. Pode-se verificar a presença de um fragmento de m/z 160, com 45 Da de diferença em relação ao precursor (m/z 205), sugerindo a perda de uma molécula de dimetilamina (C₂H₇N).

Foi observado também um segundo fragmento de m/z 132 onde a diferença de 28 Da em relação ao íon de m/z 160 sugere a perda neutra sequencial de uma molécula de etileno (C₂H₄). Este resultado foi confirmado através de experimentos de MS³, onde o íon de m/z 160 quando submetido à fragmentação gerou o íon de m/z 132 (dados não mostrados).

Figura 46: Espectro de fragmentação (MS²) do íon de m/z 205 (ESI+).

Comparando esses resultados com os da literatura, verificou-se que o íon de m/z 205 apresentou o mesmo perfil de fragmentação dos alucinógenos já conhecidos bufotenina (5-OH-DMT) (**Fig. 47 A e B**) e psilocina (4-OH-DMT) [40]. Entretanto, por esta técnica, não foi possível determinar o real posicionamento do grupo hidroxila no anel aromático do íon de m/z 205, sendo nomeado por hora como OH-DMT.

Figura 47 A: Espectro de fragmentação (MS^2) do padrão comercial de bufotenina (5-OH-DMT) em acetonitrila/água (50:50) + 0,1% de ácido fórmico, ionizado por *electrospray* no modo positivo (ESI+).

Figura 47 B: Espectro de fragmentação (MS^3) do padrão comercial de bufotenina (5-OH-DMT) em acetonitrila/água (50:50) + 0,1% de ácido fórmico, ionizado por *electrospray* no modo positivo (ESI+).

Em seguida, procedeu-se à fragmentação (MS^2) do íon de m/z 221 com tempo de retenção de 10,0 minutos (**Fig. 48**). Igualmente à OH-DMT, esse composto sofreu perdas neutras de dimetilamina (C_2H_7N) e dimetiletilamina ($C_4H_{11}N$), gerando os íons de m/z 176 e m/z 148, respectivamente. Além disso, apresentou uma perda neutra de 28 Da, sugerindo a eliminação de monóxido de carbono (CO), gerando o íon de m/z 193. Esses resultados sugerem fortemente que este o composto seja um produto de abertura do anel indólico da molécula de DMT, o qual denominamos como *N,N*-dimetil-*N*-formil-quinuramina (DMFK).

Figura 48: Espectro de fragmentação (MS^2) do íon de m/z 221 (ESI+).

Por fim, a fragmentação (MS^2) do íon de m/z 193, também encontrado no meio de reação, gerou as mesmas perdas neutras encontradas nos compostos DMT, OH-DMT e DMFK. Esses resultados sugerem que este composto seja a forma deformilada do composto DMFK, denominado *N,N*-dimetil-quinuramina (DMK).

Figura 49: Espectro de fragmentação (MS^2) do íon de m/z 193 (ESI+).

Novamente, em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani do Instituto de Química da USP, fizemos a análise dos compostos OH-DMT (m/z 205) e DMFK (m/z 221), no espectrômetro de massas de alta resolução (Micro TOF). Os compostos foram isolados por HPLC (**Fig. 44 C**) e fez-se uma infusão direta isoladamente no espectrômetro de massas.

Figura 50: Espectro de massas (Micro TOF) do composto OH-DMT (ESI+), proveniente da reação DMT/HRP/H₂O₂ em condições de reação iguais à Figura 44.

Figura 51: Espectro de massas (Micro TOF) do composto DMFK (ESI+), proveniente da reação DMT/HRP/H₂O₂ em condições de reação iguais à Figura 44.

Os espectros de massas provenientes das análises (**Fig. 50 e 51**) mostram a presença de íons de m/z 205,1332 e m/z 221,1280, correspondentes a OH-DMT e DMFK, respectivamente. Para que a identificação estrutural fosse confirmada, foi necessário calcular o erro (ppm) do equipamento mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{valor encontrado} - \text{valor de referência}}{\text{valor de referência}} \times 10^6$$

O valor de referência para o OH-DMT é 205,1335 [(M+H)⁺], e 221,1285 [(M+H)⁺] para DMFK. Após os cálculos dos erros, valores abaixo de 2 ppm foram obtidos para ambos os compostos, confirmando a composição molecular das estruturas propostas.

Uma última etapa foi a tentativa de análise do composto OH-DMT por ressonância magnética nuclear (RMN), uma vez que por MS não foi possível determinar a real posição do grupamento hidroxila em seu anel aromático. Mas devido a quantidades insuficientes do composto, estes resultados não foram conclusivos, sendo necessários mais estudos para confirmar sua identidade.

Os gráficos da Figura 52 apresentam as cinéticas do consumo de DMT pelo sistema HRP/H₂O₂ e a de formação dos principais produtos, durante uma hora de reação. É possível notar que após 45 minutos de reação a formação do produto DMFK começa a decair, à medida que a formação do produto DMK começa a aumentar. Isto mostra que DMK é formado pela deformilação de DMFK.

Figura 52: Cinéticas do consumo de DMT decorrente da reação com sistema HRP (1 μ M) e H₂O₂ (0,5 mM), e a de formação de seus principais metabólitos (OH-DMT, DMFK, DMK). A análise foi feita por LC/MS, e as condições de reação e analíticas são as mesmas da Figura 44.

8.2.4 Reação de DMT com neutrófilos ativados

Analogamente à reação de DMT com o sistema HRP/H₂O₂, foi avaliado se MPO proveniente de neutrófilos ativados com PMA também seria capaz promover a formação dos mesmos produtos, em uma reação semelhante. Para este experimento foi utilizada DMT proveniente da síntese do indol, previamente isolada e purificada.

Embora tenha sido feita a análise desta reação por HPLC com detectores DAD e fluorescência, está mostrado aqui somente o cromatograma reconstituído dos principais íons (compostos) encontrados em análise por LC/MS. Isto porque não foi possível observar a formação dos produtos da reação por DAD e fluorescência, devido ao baixo rendimento da reação.

De qualquer forma, foi possível verificar por LC/MS (**Fig. 53**) a formação de produtos (m/z 205, m/z 221 e m/z 193) após uma hora de reação. Sob as mesmas condições, neutrófilos inertes ou PMA (controles) não foram capazes de reagir com DMT isoladamente (resultados não mostrados). O íon de m/z 189, correspondente à DMT intacta, estava presente em grande quantidade e não será mostrado para evitar disparidade nas escalas.

Figura 53: Cromatograma (LC/MS) reconstituído dos íons de m/z 205, m/z 221 e m/z 193 (ESI+) após 1 hora de reação. As condições de reação e analíticas são as mesmas descritas na Figura 44.

Novamente foram feitas fragmentações (MS²) de todos os íons encontrados (resultados não mostrados), comprovando-se que se tratavam dos mesmos compostos formados pelo sistema DMT/HRP/H₂O₂, sendo estes: OH-DMT, DMFK e DMK.

Os gráficos da Figura 54 apresentam as cinéticas do consumo de DMT por neutrófilos ativados por PMA, e a de formação dos principais produtos, durante uma hora de reação. De uma maneira semelhante à reação com o sistema HRP/H₂O₂, é possível notar que após 45 minutos de reação a formação do produto DMFK começa a decair, à medida que a formação do produto DMK começa a aumentar. Isto, mais uma vez, mostra que DMK seja formado pela deformilação de DMFK.

Figura 54: Cinéticas do consumo de DMT e de formação de seus principais metabólitos (OH-DMT, DMFK e DMK) decorrentes de sua metabolização promovida por neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/ensaio) ativados com PMA (50 ng/ensaio). As condições de reação e analíticas são as mesmas da Figura 44.

Outro parâmetro estudado foi a avaliação do efeito de inibidores de ERO na formação dos compostos OH-DMT e DMFK, pela reação de DMT com neutrófilos ativados por PMA (**Fig. 55**). Nota-se que as enzimas catalase e SOD, bem como azida sódica e DPI, inibem consideravelmente a formação dos compostos OH-DMT e DMFK.

Figura 55: Formação de OH-DMT e DMFK pela reação de DMT (0,1 mM) com neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/ensaio) ativados por PMA (50 ng/ensaio) e adição de catalase (10 µg/ensaio), azida sódica (1 mM), SOD (10 µg/ensaio) e DPI (20 µM/ensaio). Dados provenientes de análise por LC/MS. Condições de análises: as mesmas da Figura 44.

9. DISCUSSÃO

9.1 LSD

Tanto neutrófilos ativados com PMA, quanto o sistema HRP/H₂O₂, foram capazes de metabolizar LSD via reação catalisada por MPO e HRP, respectivamente, onde os produtos formados foram identificados por MS. Um dos produtos, proveniente de uma reação de oxidação, foi identificado como sendo um produto de abertura do anel indólico da molécula de LSD. Este produto não havia sido relatado anteriormente e foi por nós nomeado de *N,N*-dietil-7-formamido-4-metil-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahidrobenzo[*f*]quinolina-2-carboxamida (FOMBK) (**Fig. 56**). Sua forma deformilada, também encontrada no meio de reação, foi denominada de *N,N*-dietil-7-amino-4-metil-6-oxo-2,3,4,4a,5,6-hexahidrobenzo[*f*]quinolina-2-carboxamida (AOMBK) (**Fig. 56**). Ambos os compostos foram analisados por um espectrômetro de massas de alta resolução, confirmando com alto grau de precisão a composição molecular das estruturas propostas.

Figura 56: Estrutura química de FOMBK e AOMBK, em comparação ao LSD.

Dois outros produtos identificados da reação de metabolização de LSD catalisada por peroxidases, curiosamente coincidem com os produtos já descritos de seu metabolismo *in vivo*, provenientes da ação das enzimas do complexo P450 encontradas em hepatócitos. Os compostos O-H-LSD e *nor*-LSD (**Fig. 5**) são decorrentes de reações de hidroxilação e *N*-demetilação, respectivamente (Canezin *et. al*, 2001). Várias hemoproteínas possuem múltiplas atividades, como por exemplo, hemoglobina, mioglobina e citocromo P 450, que mostram atividade peroxidásica em

algumas condições específicas de reação (Kawano *et al.*, 2002; Dunford, 1999; Guengerich & MacDonald, 1996). O mesmo vale para a atividade de hidroxilação encontrada em peroxidases (Kettle & Winterbourn, 1994). Neste estudo fica claro a atividade de hidroxilação e *N*-demetilação tanto de MPO como de HRP.

Ainda decorrentes da reação de LSD com peroxidases, observamos a presença de outros dois íons de *m/z* 334 e *m/z* 336, em análise por MS. Embora algumas análises tivessem sido feitas na tentativa de identificá-los, como por exemplo, fragmentação dos íons e análise no modo negativo (ESI-), ainda não foi possível chegar a conclusões satisfatórias. Graças aos fragmentos gerados, concluímos apenas que estes produtos possivelmente não foram provenientes de reação de oxidação da molécula de LSD.

Os produtos gerados da metabolização de LSD por MPO proveniente de neutrófilos ativados ou então, por HRP na presença de H₂O₂, são semelhantes e guardam algumas similaridades com a oxidação de outros compostos indólicos descrita anteriormente. Sabemos que, quando ativados com PMA ou outro estímulo, neutrófilos geram uma grande quantidade de ERO que podem ser usadas para a oxidação de compostos de diferentes classes catalizada por MPO (Silva *et al.*, 2004). Alguns destes compostos eram indólicos e, nestes casos, observou-se, em algum grau, a formação de produtos que são caracterizados pela abertura do anel indólico (Silva *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004). Nesta classe de compostos estão o triptofano, melatonina e serotonina.

A eficiência de formação do produto de abertura do anel indólico é bastante diferente para estes compostos. No caso de triptofano, a reação é pouco eficiente e a constante de reação está abaixo daquela descrita para melatonina, que ao contrário de triptofano é bastante eficiente, com uma constante de velocidade com composto I de aproximadamente 10⁶ e com composto II, aproximadamente 10² (Ximenes *et al.*, 2005). Ambos os compostos, melatonina e triptofano, são substratos de MPO composto I (forma originada da reação entre a enzima nativa com H₂O₂), mas não de MPO composto II (Kettle & Candaeis, 2000; Allegra *et al.*, 2001). Assim, para que a reação prossiga há a necessidade da presença de ânion superóxido.

Para LSD, imaginamos que ocorra o ciclo peroxidásico (**Fig. 57**), similar ao que ocorre com triptofano e melatonina. Neste caso, LSD reagiria com o composto I formando o radical LSD• que, pela reação com oxigênio molecular ou ânion

superóxido, formaria um intermediário do tipo dioxetânico que poderia gerar os produtos O-H-LSD e FOMBK, após diferentes clivagens (**Fig. 58**). Em seguida, FOMBK sofreria deformilação e geraria AOMBK.

Figura 57: Mecanismo proposto da via de metabolização de LSD por peroxidases como MPO e HRP, envolvendo os compostos I e II do ciclo peroxidásico.

Figura 58: Proposta de mecanismo de formação dos produtos O-H-LSD, FOMBK e AOMBK decorrentes da metabolização de LSD por peroxidases (MPO e HRP), mediante um intermediário dioxetânico.

De acordo com este ciclo proposto, os inibidores DPI e azida, respectivamente do sistema NADPH oxidase e MPO, inibem intensamente a formação dos produtos FOMBK e O-H-LSD (**Fig. 33**). Do mesmo modo, como esperado, a adição de seqüestradores de H_2O_2 e ânion superóxido, respectivamente catalase e SOD, afetam a formação destes produtos.

Consideramos, em analogia com o ciclo descrito para melatonina, que LSD também não deve ser um bom substrato para o composto II. O fato de a degradação de LSD ser dependente de H_2O_2 em concentrações superiores (0,5 mM) ao do próprio LSD (0,15 mM) indicam, ainda que preliminarmente, o envolvimento de ânion superóxido na manutenção do ciclo peroxidásico.

Existe ainda uma outra possibilidade para a formação de um produto hidroxilado (OH-LSD), que seria através de um ciclo envolvendo composto III (**Fig. 59**) (reação da forma nativa com ânion superóxido), a exemplo da hidroxilação de salicilato catalisada por MPO (Kettle & Winterbourn, 1994). Em seguida, por meio de uma reação de oxidação, este produto hidroxilado formaria o composto O-H-LSD. Entretanto, também de forma análoga ao que foi descrito para melatonina, esta rota não deve ser suficientemente eficiente (Ximenes *et al.*, 2005).

Figura 59: Proposta da via de metabolização de LSD por peroxidases como MPO e HRP, envolvendo o composto III.

Inicialmente, consideramos que *nor*-LSD poderia ser formado via demetilação de um produto hidroxilado como descrito para outros substratos (Guengerich & MacDonald, 1996). Entretanto este composto parece ser formado numa reação, ou seqüências de reações totalmente diferentes das propostas para O-H-LSD e FOMBK. Para *nor*-LSD não se observou a inibição por azida, catalase ou SOD e houve apenas uma inibição parcial com DPI. No momento, não temos indicação de quais sejam as

possíveis rotas de formação de *nor*-LSD. Apesar da ausência de inibição pela azida, o fato de não haver formação significativa de *nor*-LSD pela incubação de LSD isoladamente com H_2O_2 ou então com peroxidase, indica dependência de espécies reativas de oxigênio e possivelmente complexos de ferro.

Embora não usamos padrão-interno em nossos experimentos, foi feita uma estimativa em porcentagem da eficiência das peroxidases em metabolizar LSD. De 0,15 mM de LSD que foram adicionados aos neutrófilos ou ao sistema HRP/ H_2O_2 , 28% e 92% foram consumidos, respectivamente. A eficiência de formação do produto FOMBK parece ser alta para ambas as enzimas. Nota-se que, o aumento da quantidade do produto AOMBK foi inversamente proporcional à quantidade de FOMBK formado. Isso mostra que FOMBK origina rapidamente sua forma deformilada.

O efeito do pH em reações catalisadas por peroxidase foi recentemente descrito para melatonina (Ximenes *et al.*, 2007). Neste estudo, o pH mostrou grande influência sobre o sistema HRP/ H_2O_2 e parece ter afetado a distribuição na formação dos produtos FOMBK, O-H-LSD e *nor*-LSD. Houve um maior rendimento de todos os produtos em pH 7.4.

A reação de LSD com H_2O_2 29% mostrou baixo rendimento na formação do composto FOMBK, entretanto, alguns compostos hidroxilados também foram caracterizados por LC/MS, não sendo ainda possível relatar as posições do grupo hidroxila.

Nosso grupo de pesquisa descreveu recentemente que HRP e MPO catalisam a oxidação de compostos indólicos na presença de H_2O_2 , formando produtos de abertura do anel indólico em uma reação que consome oxigênio e emite quimiluminescência (Silva *et al.*, 2001). Da mesma forma, foi analisada a quimiluminescência da reação de LSD com como com leucócitos ativados, bem como com o sistema HRP/ H_2O_2 .

Observamos que a emissão de luz durante as reações de LSD com leucócitos ativados e com o sistema HRP/ H_2O_2 durou alguns minutos e foi absolutamente dependente da adição de todos os reagentes. Para ambos os estímulos testados, PMA e zimosan opsonizado, tanto neutrófilos quanto PBMC foram bons modelos celulares para degradar LSD, embora a quimiluminescência dependa do número de células presente. Observou-se também que neutrófilos ativados com PMA foram capazes de gerar uma maior intensidade luz quando comparado aos outros ensaios. A

quimiluminescência proveniente da reação de LSD com leucócitos ativados ou com HRP/H₂O₂ deve ser originada da formação de um produto em um estado eletronicamente excitado. O padrão de inibição da quimiluminescência pela adição de catalase, azida, SOD e DPI foi equivalente ao padrão de inibição da formação tanto de O-H-LSD quanto de FOMBK (**Fig. 33** e **Fig. 39**). Muito possivelmente FOMBK seja formado no estado eletronicamente excitado e seja responsável pela quimiluminescência.

A ação de peroxidases na formação de compostos de abertura do anel indólico já é conhecida para compostos como a melatonina e triptofano (Silva *et al.*, 2000; Ximenes *et al.*, 2001 b; Allegra *et al.*, 2001), porém é inédita tratando-se de LSD. Visto que peroxidases estão presentes em diferentes tipos celulares, e que durante o processo inflamatório, neutrófilos são ativados por citocinas e outros fatores pró-inflamatórios, resultando em um aumento da produção de ERO, é razoável supor que a formação de FOMBK possa ocorrer *in vivo*, especialmente em condições que levem à ativação dessas células. Embora o composto FOMBK não foi detectado em urina de usuário de LSD, nós sugerimos que a metabolização de LSD por peroxidases pode estar ativa no SNC, uma vez que neurônios e microglia são capazes de expressar MPO.

9.2 DMT

Diferentemente de LSD, não foi possível adquirir um padrão comercial do composto DMT. Conseguimos por meio de sua síntese, utilizando indol como material de partida, quantidade suficiente para a realização deste estudo, embora a extração do chá de Santo Daime (*ayahuasca*) também tenha sido bem sucedida.

De uma maneira semelhante à reação com LSD, neutrófilos ativados com PMA foram capazes de metabolizar DMT, via reação catalisada por MPO, bem como pelo sistema HRP/H₂O₂, onde os produtos formados foram caracterizados e identificados por MS. Um dos produtos, decorrente de uma reação de oxidação, foi identificado como sendo um produto de abertura do anel indólico da molécula de DMT, sendo nomeado como *N,N*-dimetil-*N*-formilquinuramina (DMFK) (**Fig. 60**). Sua forma deformilada nomeada de *N,N*-dimetil-quinuramina (DMK) (**Fig. 60**), também foi encontrada no meio de reação. O composto DMFK foi analisado por um espectrômetro

de massas de alta resolução, confirmando com alto grau de precisão a composição molecular da estrutura proposta.

Um outro produto identificado da reação de metabolização de DMT catalisada por peroxidases, apresenta a mesma relação m/z e o mesmo perfil de fragmentação dos alucinógenos já conhecidos bufotenina (5-OH-DMT) e psilocina (4-OH-DMT) (Julien, 1998). Embora este composto também tenha sido analisado por um espectrômetro de massas de alta resolução, confirmou-se apenas sua composição molecular proposta. Foi necessária uma análise por RMN para determinar a real posição do grupamento hidroxila no anel aromático do composto. Entretanto, os resultados não foram conclusivos por quantidade insuficiente de material. Mas de qualquer forma, o nomeamos de OH-DMT (**Fig. 60**).

Figura 60: Estrutura química de OH-DMT, DMFK e DMK, em comparação a DMT.

Não há muitos relatos sobre a metabolização de DMT *in vivo*. Sabe-se apenas que 25% do total de DMT administrado é convertido em AIA, sendo considerado seu principal metabólito (Szara, 1956). Assim, é possível que reações de DMT com peroxidases ou então, com enzimas que expressem atividade peroxidásica, pudessem gerar tais compostos hidroxilados.

Imaginamos que para a metabolização de DMT ocorra o ciclo peroxidásico (**Fig. 61**), similar ao que ocorre com triptofano, melatonina e LSD. Neste caso, DMT reagiria com o composto I formando o radical DMT[•] que, pela reação com oxigênio molecular ou ânion superóxido, formaria um intermediário do tipo dioxetânico que poderia gerar o composto DMFK, após diferentes clivagens (**Fig. 62**). Em seguida, DMFK sofreria deformilação e geraria DMK.

Figura 61: Proposta de via de metabolização de DMT por peroxidases como MPO e HRP, envolvendo os compostos I e II.

Figura 62: Proposta de mecanismo de formação dos produtos OH-DMT, DMFK e DMK decorrentes da metabolização de DMT por peroxidases (MPO e HRP), mediante um intermediário dioxetânico.

Caso DMT fosse substrato de composto II, haveria a manutenção do ciclo peroxidásico, juntamente com ânion superóxido. O fato de a metabolização de DMT ser dependente de H_2O_2 em concentrações superiores (0,5 mM) à própria DMT (0,1 mM) indica, ainda que preliminarmente, o envolvimento de ânion superóxido na manutenção do ciclo peroxidásico.

Existe ainda a possibilidade da formação de OH-DMT por meio de um ciclo envolvendo composto III (**Fig. 63**) (reação da forma nativa com ânion superóxido), a exemplo da hidroxilação de salicilato catalisada por MPO (Kettle & Winterbourn, 1994).

Figura 63: Proposta da via de metabolização de DMT por peroxidases como MPO e HRP, envolvendo o composto III.

Tanto a formação de DMFK quanto a de OH-DMT foi fortemente inibida por DPI e azida, inibidores do sistema NADPH oxidase e da MPO, respectivamente. A inibição de DMFK por catalase está de acordo com as propostas do ciclo mostradas nas Figuras 61 e 63, pois enquanto a formação de DMFK depender do ciclo peroxidásico clássico, e, portanto, de H_2O_2 , a formação do OH-DMT será menos afetada pelo sequestro de H_2O_2 .

Por fim, é importante salientar que a DMT, ao contrário do LSD, é um composto endógeno encontrado no SNC e que sua função ainda não está elucidada. Supõe-se que sua síntese aconteça na glândula pineal, assim como o hormônio melatonina (Callaway, 1993), e que sua função esteja relacionada com a aparição dos sonhos durante o sono graças a seus efeitos alucinógenos (Callaway, 1988). Assim, esta possível rota descrita nesta dissertação pode significar uma rota metabólica normalmente ativa para a DMT, ainda não descrita em humanos.

10. CONCLUSÕES

1. Os alucinógenos indólicos LSD e DMT foram metabolizados *in vitro* pelo sistema HRP/H₂O₂, e por MPO presente em neutrófilos ativados;
2. A metabolização de LSD por peroxidases mostrou a formação de três produtos principais: um produto de abertura do anel indólico, que nomeamos de 6-oxo-7-formamido-*N*-metil-hidrobenzoquinolina-2-dietil-formamida (FOMBK), e O-H-LSD e *nor*-LSD que coincidem com produtos formados por sua metabolização *in vivo* por ação das enzimas do complexo P450 presentes em hepatócitos;
3. Embora não foi possível encontrar o composto FOMBK em urina de usuário de LSD, é sugerido que a metabolização de LSD por peroxidases possa estar ativa no SNC, uma vez que MPO é expressa por neurônios e microglia;
4. A síntese de DMT a partir de indol, segundo a reação de Speeter e Anthony, foi bem sucedida, e sua extração a partir da *ayahuasca* foi adequadamente realizada, nas mesmas condições de extração descritas para sua extração em plasma;
5. A metabolização de DMT por peroxidases mostrou a formação de dois produtos principais: um produto de abertura do anel indólico, que nomeamos de *N,N*-dimetil-*N*-formilquinuramina (DMFK) e um produto hidroxilado (OH-DMT) que apresenta a mesma relação *m/z* que os alucinógenos bufotenina e psilocina.
6. Esta possível rota metabólica descrita neste trabalho pode significar uma via alternativa de metabolização de LSD e DMT ainda não descrita em humanos;
7. Devido ao fato de DMT ser uma substância endógena, esta possível rota descrita pode ser uma rota normalmente ativa de sua metabolização.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANIAN, G. K. AND MAREK, G. J. (1999). Serotonin and hallucinogens. **Neuropsychopharmacology** 21 (2S): 16S-23S.

ALLEGRA, M., FURTMÜLLER, P. G., REGELSBERGER, G., TURCO-LIVERI, M. L., TESORIERE, L., PERETTI, M., LIVREA, M. A. and OBINGER, C. (2001). Mechanism of reaction of melatonin with human myeloperoxidase. **Biochem Biophys Res Commun** 282: 380-6.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction**. Wiley, Chichester, England, 2003.

BABIOR, B. M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest** 73: 599-601.

BABIOR, B. M., LAMBETH, J. D. and NAUSEEF, W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. **Arch Biochem Biophys** 397 (2): 342-4.

BARKER, S. A., MONTI, J. A. and CHRISTIAN, S. T. (1981). *N,N*-dimethyltryptamine: an endogenous hallucinogen. **Int Rev Neurobiol** 22: 83-110.

BERNE, R. M., LEVY, M. N., KOEPPEN, B. M. and STANTON, B. A. **Fisiologia**. Terceira edição, Guanabara Koogan, 2000.

BORCH, R. F. and HASSID, A. I. (1972). A new method for the methylation of amines. **J Organic Chem** 37 (10): 1673-4.

BOROWSKY, B., ADHAM, N., JONES, K. A., RADDATZ, R., ARTYMYSHYN, R., OGOZALEK, K. L., DURKIN, M. M., LAKHLANI, P. P., BONINI, J. A., PATHIRANA, S., BOYLE, N., PU, X., KOURANOVA, E., LICHTBLAU, H., OCHOA, F. Y., BRANCHEK, T. A. and GERALD, C. (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 8966-71.

BOYUM, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand J Clin Lab Invest Suppl** 21: 77-89.

BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Widener University, Chester, 1997.

BRAND, S. D., FREEMAN, S., FLEET, I. A., MCGAGH P. and ALDER, J. F. (2005). Analytical chemistry of synthetic routes to psychoactive tryptamines Part II. Characterisation of the Speeter and Anthony synthetic route to N,N-dialkylated tryptamines using GC-EI-ITMS, ESI-TQ-MS-MS and NMR. **Analyst** 130: 330-44.

CALLAWAY, J. C. (1988). A proposed mechanism for the visions of dream sleep. **Med Hypotheses** 26:119-24.

CALLAWAY, J. C. (1993). Tryptamines, beta-carbolines and you. **The Newsletter of the Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies (MAPS)** volume 4, number 2.

CANEZIN, J., CAILLEUX, A., TURCANT, A., LE BOUIL, A., HARRY, P. and ALLAIN, P. (2001). Determination of LSD and its metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B** 765: 15-27.

CLARK'S . Isolation and identification of drugs. (2003). The Pharmaceutical Press. Third edition.

CONFEN – Conselho Federal de entorpecentes. Resolução número 6 de 04 de fevereiro de 1986. **Diário Oficial da União**, 24 de agosto de 1992.

COSTA, M. C. M., FIGUEIREDO, M. C. e CAZENAVE, S. O. S. (2005). Ayahuasca: uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. **Rev Psiquiatr Clín** 32 (6): 310-8.

CROTTI, A. E. M., VESSICCHI, R., LOPES, J. L. C. and LOPES, N.P. (2006). Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quím Nova** 29 (2): 287-92.

DA SILVEIRA FILHO, D. X. (23/11/2006). **Relatório Final – Grupo Multidisciplinar do Trabalho – GMT – Ayahuasca**. <http://daime.net/arquivos/textos/conad/Relatorio-AYAHUASCA.pdf>

DRUMMER, O., ODELL, M. and DRUMMER, O. H. **The forensic Pharmacology of drugs of abuse**. Arnold Press, 2001.

DUNFORD, H. B. **Hemeperoxidases**. Wiley-VCH, New York, 1999.

FALLARINO, F., GROHMANN, U., VACCA, C., ORABONA, C., SPRECA, A., FIORETTI, M. C. and PUC CETTI, P. (2003). T cell apoptosis by kynurenines. **Adv Exp Med Biol** 527: 183-90.

FORSSTRÖM, T., TUOMINEN, J. and KÄRKKÄINEN, J. (2001). Determination of potentially hallucinogenic N-dimethylated indoleamines in human urine by HPLC/ESI-MS-MS. **Scand J Clin Lab Invest** 61: 547-56.

FRANZEN, F. and GROSS, H. (1965). Tryptamine, *N,N*-dimethyltryptamine, *N,N*-dimethyl-5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine in human blood and urine. **Nature** 206: 1052.

FURTMÜLLER, P. G., ZEDERBAUER, M., JANTSCHKO, W., HELM, J., BOGNER, M., JAKOPITSCH, C. and OBINGER, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Arch Biochem Biophys** 445: 199-213.

GIUMANINI, A. G., CHIAVARI, G. and SCARPONI, F. L. (1976). *N*-Permethylation of polyamines for gas chromatographic and mass spectrometric analyses. **Analytical Chem** 48 (3): 484-9.

GLENNON, R. A., TITELER, M. and MCKENNEY, J. D. (1984). Evidence for the involvement of 5-HT₂ receptors in the mechanisms of action of hallucinogenic agents. **Life Sci** 35: 2505-11.

GOLDSBY, R. A., KINDT, T. J. and OSBORN, B. A. Cells and organs of the immune system. **Immunology**. Fourth edition, New Your, Kubi, 2000.

GREEN, P. S., MENDEZ, A. J., JACOB, J. S., CROWLEY, J. R., GROWDON, W., HYMAN, B. T., and HEINECKE, J. W. (2004). Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. **J Neurochem** 90: 724-33.

GUENGERICH, F. P., YUN, C. and MACDONALD, T. L. (1996). Evidence for a 1-electron oxidation mechanism in *N*-dealkylation of *N,N*-dialkylanilines by cytochrome P450 2B1. **J Biol Chem** 271 (44): 27321-9.

HANSSON, M., OLSSON, I. and NAUSEEF, W. M. (2006). Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Arch Biochem Biophys** 445: 214-24.

HAPTOM, M. B., KETTLE, A. J. and WINTERBOURN, C. C. (1998). Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood** 92 (9): 3007-17.

HASTING, J. W. and WILSON, T. (1976). Bioluminescence and chemiluminescence. **Photochem Photobiol** 23: 461-73.

HOFMANN, A. **LSD – My problem child**. McGraw-Hill, 1980.

HOJA, H., MARQUET, P., VERNEUIL, B., LOTFI, H., DUPUY, J. and LACHÂTRE, G. (1997). Determination of LSD and *N*-demethyl-LSD in urine by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **J Chromatogr B** 692: 329-35.

HRYHORCZUK, L. M., RAINEY, JR., J. M., FROHMAN, C. E. AND NOVAK, E. A. (1986). A new metabolic pathway for *N,N*-dimethyltryptamine. **Biol Psychiatry** 21: 84-93.

JACOB, M. S. and PRESTI, D. E. (2005). Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Med Hypotheses** 64: 930-37.

JANTSCHKO, W., FURTMÜLLER, P. G., ALLEGRA, M., LIVREA, M. A., JAKOPITSCH, C., REGELSBERGER, G. and OBINGER, C. (2002). Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. **Arch Biochem Biophys** 398: 12-22.

JULIEN, R. M. **A Primer of Drug Action**. Eighth edition, Freeman, 1998.

KAPLAN, J., MANDEL, L. R., STILLMAN, R., WALKER, R. W., VANDENHEUVEL, W. J. A., GILLIN, J. C. and WYATT, R. J. (1974). Blood and urine levels of *N,N*-dimethyltryptamine following administration of psychoactive dosages to human subjects. **Psychopharmacologia** 38 (3): 239-45.

KAPLAN, L. A., PESCE, A. and KAZMIERCZAK, S. **Clinical Chemistry: theory, analysis, correlation**. Fourth edition, Mosby, 2002.

KAPNANG, H., CHARLES, G., SONDENGAM, B. L. and HEMO, J. H. (1977). Bis (alcoxymethyl) amines: preparation et reduction; *N*-dimethylation selective d'amines primaires. **Tetrahedron Letters** 39: 3469-72.

KAWANO, T., PINONTOAN, R., HOSOYA, H. and MUTO, S. (2002). Monoamine-dependent production of reactive oxygen species catalyzed by pseudoperoxidase activity of human hemoglobin. **Biosci Biotechnol Biochem** 66(6): 1224-32.

KETTLE, A. J. and CANDAEIS, L. P. (2000). Oxidation of tryptophan by redox intermediates of myeloperoxidase and inhibition of hypochlorous acid production. **Redox Rep** 5: 179-84.

KETTLE, A. J. and WINTERBOURN, C. C. (1994). Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. **J Biol Chem** 269: 17146-51.

KLETTE, K. L., ANDERSON, C. J., POCH, G. K., NIMROD, A. C. and ELSOHL, M. A. (2000). Metabolism of lysergic acid diethylamide (LSD) to 2-oxo-3-hydroxy-LSD (O-H-LSD) in human liver microsomes and cryopreserved human hepatocytes. **J Anal Toxicol** 24 (7): 550-6.

KLIVENYI, P., TOLDI, J. and VECSEI, L. (2004). Kynurenines in neurodegenerative disorders: therapeutic consideration. **Adv Exp Med Biol** 541:169-83.

LAING, R. R. **Hallucinogens - a forensic drug handbook**. First edition, Academic Press, San Diego, CA, 2003.

MCKENNA, D.J.; CALLAWAY, J.C. and GROB, CS. (1998). The scientific investigation of *ayahuasca*: a review of past and current research. **The Heffer Review of Psychedelic Research**, Volume 1.

MEUNIER, G. and MEUNIER, B. (1985). Peroxidase-catalysed O-demethylation reactions. **J Biol Chem** 260: 10576-82.

NAGRA, R. M., BECHER, B., TOURTELLOTT, W. W., ANTEL, J. P., GOLD, D., PALADINO, T., SMITH, R. A., NELSON, J. R. and REYNOLDS, W.F. (1997). Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 78: 97-107.

NEMETH, H., TOLDI J. and VECSEI, L. (2005). Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems. **Curr Neurovasc Res** 2(3): 248-60.

NICHOLS, D.E. (2004). Hallucinogens. **Pharmacol Ther** 101: 131-81.

PINE, S. H. and SANCHEZ, B. L. (1971). The formic acid-formaldehyde methylation of amines. **J Organic Chem** 36 (6): 829-32.

RANG, H. P., DALE, M. M. and RITER, J. M. **Farmacologia**. Terceira edição, Guanabara Koogan, 1997.

REYNOLDS, W. F., RHEES, J., MACIEJEWSKI, D., PALADINO, T., SIEBURG, H., MAKI, R. A. and MASLIAH, E. (1999). Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. **Exp Neurol** 155: 31-41.

SCHUSTER, C. R. and KUCHAR, M. J. **Pharmacological Aspects of Drug Dependence**. First edition, Springer, 1996.

SEGAL, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. **Ann Rev Immunol** 23: 197-223.

SILVA, S. O., RODRIGUES, M. R., CARVALHO, S. R., CATALANI, L. H., CAMPA, A. and XIMENES, V.F. (2004). Oxidation of melatonin and its catabolites, *N*1-acetyl-*N*2-formyl-5-methoxykynuramine and *N*1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. **J Pineal Res** 37(3): 171-5.

SILVA, S. O., XIMENES, V. F., CATALANI, L. H., and CAMPA, A. (2000). Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun** 279: 657-62.

SILVA, S. O., XIMENES, V. F., LIVRAMENTO, J. A., CATALANI, L. H. and CAMPA, A. (2005). High concentrations of the melatonin metabolite, *N*-acetyl-*N*-formyl-5-

methoxykynurenine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. **J Pineal Res** 247 (B): 1-5.

SONDENGAM, B. L., HEMO, J. H. and CHARLES, G. (1973). Su rne nouvelle method de methylation des amines primaires et secondaires. **Tetrahedron Letters** 3: 261-3.

SPEETER, M. E. and ANTHONY, W. C. (1954). The action of oxalyl chloride on indoles: a new approach to tryptamines. **J Americ Chem Soc** 76 (23): 6208-10.

SQUIRE, R. L., BLOOM, F. E., MCCONNELL, S. R., ROBERTS, J. L., SPITZER, N. C. and ZIGMOND, M. J. **Fundamental Neuroscience**. Second edition, Academic Press, San Diego, CA, 2003.

STONE, T.W. and DARLINGTON, L.G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov** 1: 609-20.

SZARA, S. (1956). Dimethyltryptamine: its metabolism in man; the relation to its psychotic effect to the serotonin metabolism. **Experientia** 12: 441-2.

TANIMUKAI, H., GINTHER, R., SPAIDE, J., BUENO, J. R. and HIMWICH, H. E. (1970). Detection of psychotomimetic N,N-dimethylated indoleamines in the urine of four schizophrenic patients. **Br J Psychiat** 117: 421-30.

WEINSTEIN, H. (2006). Hallucinogen actions on 5-HT receptors reveal distinct mechanisms of action and signaling by G-protein-coupled receptors. **The AAPS Journal** 7 (4) article 85.

WESTON, A. and BROWN, P. R. **HPLC and CE: principles and practice**. Academic Press, San Diego, 1997.

XIMENES, V. F., CATALANI, L. H. and CAMPA, A. (2001 a). Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. **Biochem Biophys Res Commun** 287: 130-4.

XIMENES, V. F., CATALANI, L. H. and CAMPA, A. (2001 b). The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. **Arch Biochem Biophys** 387 (2): 173-9.

XIMENES, V. F., FERNANDES, J. R., BUENO, V. B., CATALANI, L. H, DE OLIVEIRA, G. H. and MACHADO, R. G. P. (2007). The effect of pH on horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of melatonin: production of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine versus radical-mediated degradation. **J Pineal Res** 42: 291-6.

XIMENES, V. F., SILVA, S. O., RODRIGUES, M. R., CATALANI, L. H., MAGHZAL, G. J., KETTLE, A. J. and CAMPA, A. (2005). Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. **J Biol Chem** 280 (46): 38160-9.

YRITIA, M., RIBA, J., ORTUÑO, J., RAMIREZ, A., CASTILLO, A., ALFARO, Y., DE LA TORRE, R. and BARBANOJ, M. J. (2002). Determination of *N,N*-dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 779: 271-81.