UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - *Ecstasy*), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA - *Eve*) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência: aspecto forense

José Luiz da Costa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

São Paulo
2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - *Ecstasy*), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA - *Eve*) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência: aspecto forense

José Luiz da Costa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

São Paulo
2004

José Luiz da Costa

Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - *Ecstasy*), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA - *Eve*) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência: aspecto forense

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin
orientadora/presidente

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
1º. examinador

Profa. Dra. Silvia de Oliveira Santos Cazenave
2º. examinador

São Paulo, 18 de junho de 2004.

*Em dezembro de 2002, ouvi de minha orientadora a
frase que passou a nortear este trabalho e minha vida:*

“Tudo dará certo no final.

Se ainda não deu certo, é porque ainda não chegou o final.”

Amigos

Tenho amigos que não sabem o quanto são meus amigos. Não percebem o amor que lhes devoto e a absoluta necessidade que tenho deles.

A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor, eis que permite que o objeto dela se divida em outros afetos, enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que não admite a rivalidade.

E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências...

A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida.

Mas, porque não os procuro com assiduidade, não posso lhes dizer o quanto gosto deles. Eles não iriam acreditar. Muitos deles estão lendo esta crônica e não sabem que estão incluídos na sagrada relação de meus amigos.

Mas é delicioso que eu saiba e sinta que os adoro, embora não declare e não os procure. E às vezes, quando os procuro, noto que eles não tem noção de como me são necessários, de como são indispensáveis ao meu equilíbrio vital, porque eles fazem parte do mundo que eu, tremulamente, construí e se tornaram alicerces do meu encanto pela vida.

Se um deles morrer, eu ficarei torto para um lado. Se todos eles morrerem, eu desabo!

Por isso é que, sem que eles saibam, eu rezo pela vida deles. E me envergonho, porque essa minha prece é, em síntese, dirigida ao meu bem estar. Ela é, talvez, fruto do meu egoísmo.

Por vezes, mergulho em pensamentos sobre alguns deles. Quando viajo e fico diante de lugares maravilhosos, cai-me alguma lágrima por não estarem junto de mim, compartilhando daquele prazer...

Se alguma coisa me consome e me envelhece é que a roda furiosa da vida não me permite ter sempre ao meu lado, morando comigo, andando comigo, falando comigo, vivendo comigo, todos os meus amigos, e, principalmente os que só desconfiam ou talvez nunca vão saber que são meus amigos!

A gente não faz amigos, reconhece-os.

Vinicius de Moraes (1913-1980)

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Teresa e Nelson, e aos meus irmãos
Thiago e Nathália, que sempre me fortaleceram com amor e carinho.
Nunca tiveram que saber o que era MDMA ou para que servia um
HPLC para apoiarem, incentivarem e rezarem para que este
trabalho se realizasse. Agradeço a vocês pela educação e
ensinamentos transmitidos ao longo da minha vida.*

*À Fernanda Cortez Colósimo, única pessoa no mundo
que realmente sabe o que esta dissertação de mestrado significa para
mim.*

A Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin.

Não apenas pelos ensinamentos e orientação neste trabalho, mas principalmente pela amizade, carinho, paciência e confiança que sempre depositou em mim. Espero ter sido um orientado à sua altura.

Será sempre um espelho, a pessoa e o profissional que quero ser quando “crescer”.

Agradecimentos

Terei sempre que agradecer em primeiro lugar a Professora Doutora Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, minha eterna orientadora, por ter guiado os primeiros passos de minha vida como analista/toxicologista. Terá sempre minha eterna gratidão e devoção.

Ao meu irmão Thiago Luiz da Costa, por ter ficado todo este tempo sem computador só para que um pudesse terminar esta dissertação. Mano, muitíssimo obrigado.

A toda “família” do Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística de São Paulo: Alessandra (minha “irmã” mais velha), Cristiane, Fátima, Milton Sadaue, Nilza, Valéria Furlan e Valéria Reis, pelo apoio e por todas as vezes que vocês se desdobraram para cobrir minhas ausências no laboratório. Agradeço de forma ainda mais especial e carinhosa a minha chefe, Dra. Lucilena Martins Kaye, sempre conivente com minhas ausências e pronta para ajudar quando precisei.

A Profu. Dra. Maria de Fátima Menezes Pedrozo e a Profu. Dra. Pierina Sueli Benato pelos importantes apontamentos e sugestões cedidos durante o exame de qualificação.

Ao Dr. José Jarjura Jorge Júnior, Diretor do Instituto Médico-Legal de São Paulo, por permitir a coleta das amostras junto ao Núcleo de Toxicologia Forense. Do mesmo modo,

agradeço aos Peritos Criminais Dra. Vera Eliza Reinhardt, Dr. Erasmo Soares de Silva e Dra. Clarice Caladoi, por elaborarem para a coleta do material.

As funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) Dalva, Luzia, Roseli, Helena e Karla (SBTOX) pelo imprescindível apoio técnico, pelo sempre delicioso café e pelas conversas descontraídas.

Aos meus eternos amigos da época de Alfenas, Elisângela, Fernanda, Flávio, Gilson, Ingrid, Nader, Ricardo, Reniel, Tatiane, Tiago (Bixão) e Waldir, pelos inesquecíveis momentos de risos e festas que passamos juntos, lembranças que sempre me dão forças para seguir em frente. Mesmo longe dos olhos, estarão sempre perto do meu coração.

Aos meus novos bons companheiros, Cássia, Emerson (Cambe), Fausto (Frodo), Igo (Naja), José Antônio (Pernambuco), José Roberto (Zero), Luiz Fernando (Nando) e Márcio (Astrinho), por terem me acolhido para esta turma animada.

A minhas amigas Danielle e Renata, pelas discussões e sugestões que enriqueceram este trabalho.

A Erica, presença importante nesta reta final, por todas as sugestões, comentários e pelas várias vezes que leu e releu esta dissertação.

A todos que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho, Muito obrigado

Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
2. GENERALIDADES	03
2.1. Histórico	03
2.2. Padrões de consumo	04
2.3. Vias de síntese e propriedades físico-químicas	13
3. TOXICOCINÉTICA	16
3.1. Vias de administração e concentrações plasmáticas de pico	16
3.2. Distribuição e eliminação	17
3.3. Toxicocinética enantio-dependente	22
4. TOXICODINÂMICA	25
4.1. Mecanismos de ação das metilenodioxianfetaminas sobre o Sistema Nervoso Central	25
4.2. Sinais e sintomas da intoxicação	28
4.2.1. Hepatotoxicidade	35
4.2.2. Nefrotoxicidade	38
4.2.3. Neurotoxicidade	42
5. ASPECTOS ANALÍTICOS	45
5.1. Matrizes biológicas utilizadas	49
5.2. Técnicas de extração	48
5.3. Técnicas de separação e identificação	54
6. Objetivo e Plano de Trabalho	57
7. MATERIAIS E MÉTODOS	58
7.1. Material	58
7.1.1. Equipamentos, vidrarias e acessórios	58
7.1.2. Solventes e reagentes	59
7.1.3. Condições cromatográficas	60
7.1.3.1. Fase móvel	60
7.1.3.2. Sistema de detecção	60
7.1.4. Soluções-padrão	61

7.1.5. Amostras de sangue total	62
7.1.5.1. Amostras de sangue total referência negativa	62
7.1.5.2. Amostras de sangue total selecionada para análise	62
7.1.6. Amostras de urina	62
7.1.6.1. Amostras de urina referência negativa	62
7.1.6.2. Amostras de urina selecionada para análise	63
7.1.7. Tratamento estatístico	63
7.2. Métodos	63
7.2.1. Procedimentos de extração	63
7.2.1.1. Técnica proposta para extração de MDMA, MDEA e MDA em sangue total	63
7.2.1.2. Técnica proposta pra extração de MDMA, MDEA e MDA em urina	64
7.2.2. Condições cromatográficas	67
7.2.2.1. Fator de retenção (k)	67
7.2.2.2. Fator de separação (α)	67
7.2.2.3. Resolução (R_s)	68
7.2.3. Otimização do procedimento de extração	68
7.2.3.1. Avaliação do efeito <i>salting out</i>	68
7.2.3.2. Avaliação da precipitação proteica sobre o rendimento da extração	69
7.2.4. Validação dos métodos propostos	70
7.2.4.1. Especificidade e seletividade	70
7.2.4.2. Preparação das curvas analíticas	70
7.2.4.3. Parâmetros de confiança analítica	72
7.2.4.4. Estudo de estabilidade	74
7.3. Aplicação da metodologia proposta às amostras de sangue total e urina selecionadas para este estudo	76
8. RESULTADOS	77
8.1. Condições cromatográficas	77
8.2. Otimização do procedimento de extração	81
8.2.1. Avaliação do efeito <i>salting out</i>	81
8.2.2. Avaliação da precipitação protéica sobre o rendimento da	81

extração	
8.3. Preparação das curvas analíticas	83
8.3.1. Curvas analíticas para sangue total	83
8.3.2. Curvas analíticas para urina	85
8.4. Parâmetros de segurança analítica	88
8.5. Pesquisa de possíveis fármacos interferentes	91
8.6. Aplicação da metodologia proposta às amostras de sangue total e urina selecionadas para este trabalho	94
9. DISCUSSÃO	95
10. CONCLUSÕES	108
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Uso concomitante do *Ecstasy* com outras drogas de abuso por usuários da cidade de São Paulo (n=52), entrevistados entre os meses de junho e agosto de 1999. 04

Tabela 2 – Métodos analíticos utilizados nas análises de derivados anfetamínicos. 43

Tabela 3 - Tempo de retenção, retenção relativa, fator de retenção e simetria dos picos cromatográficos obtidos para os analitos e padrão interno. 72

Tabela 4 - Parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a eficiência na separação dos analitos nas condições cromatográficas propostas. 72

Tabela 5 - Efeito da adição de cloreto de sódio sobre o processo de extração de MDMA, MDEA e MDA em urina, avaliado através de suas respectivas áreas relativas. 76

Tabela 6 - Médias das áreas absolutas e relativas obtidas após análise de amostras de sangue total enriquecidas (concentração de 50 ng/mL) que sofreram processo de precipitação ou diluição antes do procedimento de extração. 76

Tabela 7 - Áreas relativas obtidas para a elaboração das curvas analíticas dos analitos em sangue total e respectivos coeficientes de variação (%CV). 77

Tabela 8 - Áreas relativas obtidas para a elaboração das curvas analíticas dos analitos em urina e respectivos coeficientes de variação (%CV). 80

Tabela 9 - Coeficientes de variação das concentrações sangüíneas e urinárias de MDMA, MDEA e MDA obtidos nos ensaios de precisão intra e inter-ensaio. 83

Tabela 10 – Exatidão e recuperação dos métodos propostos para análise de MDMA, MDEA e MDA em amostras de sangue total e urina, avaliados em diferentes concentrações. 84

Lista de Figuras

- Figura 1. Estrutura química das metilenodioxianfetaminas de maior interesse forense. 03
- Figura 2. Alterações no consumo de metilenodioxianfetaminas (MDMA, MDEA, MDA) no mundo, 2001 (ou último ano disponível). 06
- Figura 3. Quantidade apreendida e tendências do tráfico mundial de metilenodioxianfetaminas (MDMA, MDEA, MDA) no biênio 2001-2002. 09
- Figura 4. Possíveis vias de síntese do MDMA e seus análogos a partir do safrol e isosafrol. 11
- Figura 5. Posição do carbono quiral (asterisco em vermelho) presente nas metilenodioxianfetaminas de maior interesse forense. 12
- Figura 6. Biotransformação das metilenodioxianfetaminas. 18
- Figura 7. Estrutura química de catecolaminas endógenas, da anfetamina e seus alguns de seus derivados. 23
- Figura 8. Fluxograma do procedimento de extração da MDMA, MDEA e MDA em sangue total. 60
- Figura 9. Fluxograma do procedimento de extração da MDMA, MDEA e MDA em urina. 61
- Figura 10. Cromatograma de amostra de sangue total referência negativa. 73
- Figura 11. Cromatograma de amostra de sangue total referência negativa enriquecida com MDMA, MDEA e MDA na concentração de 50 ng/mL e padrão interno (MBDB 100 ng/mL). 73

Figura 12. Cromatograma de amostra de urina referência negativa enriquecida com padrão interno MBDB na concentração de 500ng/mL. 74

Figura 13. Cromatograma de amostra de urina referência negativa enriquecida com MDMA, MDEA, MDA e MBDB na concentração de 500 ng/mL. 74

Figura 14. Efeito da adição de cloreto de sódio (NaCl) sobre o processo de extração do MDMA, MDEA e MDA em sangue total. 75

Figura 15. Representação da curva analítica para a determinação de MDMA nas concentrações sanguíneas de 5 a 200 ng/mL. 78

Figura 16. Representação da curva analítica para a determinação de MDEA nas concentrações sanguíneas de 5 a 200 ng/mL. 78

Figura 17. Representação da curva analítica para a determinação de MDA nas concentrações sanguíneas de 5 a 200 ng/mL. 79

Figura 18. Representação da curva analítica para a determinação de MDMA nas concentrações urinárias de 50 a 2000 ng/mL. 80

Figura 19. Representação da curva analítica para a determinação de MDEA nas concentrações urinárias de 50 a 2000 ng/mL. 81

Figura 20. Representação da curva analítica para a determinação de MDA nas concentrações urinárias de 50 a 2000 ng/mL. 81

Figura 21. Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento. 86

Figura 22. Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após armazenamento sob refrigeração (10°C). 87

Figura 23. Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após 88 armazenamento a temperatura ambiente (estabilidade de bancada).

Lista de Siglas

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT: 5-hidroxitriptamina ou serotonina

AN: anfetamina

CG: cromatografia gasosa

CG/DIC: cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama

CG/DNP: cromatografia gasosa com detecção termiônica específica (detector seletivo de nitrogênio e fósforo)

CG/EM: cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

Cmáx: concentração plasmática máxima

CV: coeficiente de variação

CYP2D6: citocromo P-450 isoforma 2 D 6

EC: eletroforese capilar

EC/DAD: eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos

EC/DF: eletroforese capilar com detecção por fluorescência

EC/EM: eletroforese capilar acoplada a espectrômetro de massas

ELL: extração líquido-líquido

FPIA: imunofluorescência polarizada

HHA: 3,4-dihidroxianfetamina

HHMA: 3,4-dihidroximetanfetamina

HMA: 4-hidroxi-3-metoxianfetamina

HMMA: 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina

HPLC: do inglês, high performance liquid chromatography - cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC/DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

HPLC/DF: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência

HPLC/EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

LSD: dietilamina do ácido lisérgico

MA: metanfetamina

MBDB: N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butamina

MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina

MDEA: 3,4-metilenodioxietilanfetamina

MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina

MDPA: 3,4-metilenodioxipropilanfetamina

NTF-IML/SP: Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo

PMA: para-metoxianfetamina

SPE: do inglês, solid phase extraction - extração em fase sólida

SPME: do inglês, solid-phase microextraction - microextração em fase sólida

$t_{1/2}$: meia-vida eliminação

TCA: ácido tricloroacético

RESUMO

Resumo

COSTA, J. L. Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - *Ecstasy*), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA - *Eve*) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) em fluidos biológicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: aspecto forense. São Paulo, 2004. 121p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

Em todo o mundo é crescente o uso drogas de abuso sintéticas conhecidas com *designer drugs*. Os principais representantes desta classe são o *Ecstasy* ou 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e o *Eve* ou 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), substâncias com efeitos estimulantes e alucinógenos. No Brasil é crescente sua divulgação pela mídia e o uso recreacional tem sido constatado em vários pacientes que buscam tratamento nas clínicas para dependentes. O presente trabalho constitui validação de metodologia analítica para o diagnóstico laboratorial do uso de MDMA, MDEA e seu produto de biotransformação, o 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), em sangue total e urina, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os métodos desenvolvidos mostraram boa linearidade, precisão, exatidão, rendimento e capacidade de detectar os analitos mesmos quando presentes em baixas concentrações, o que permite sua aplicação na verificação da intoxicação aguda quanto no uso recreacional destas drogas de abuso.

Abstract

COSTA, J. L. Determination of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA - *Ecstasy*), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA - *Eve*) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in biological fluids by high-performance liquid chromatography: forensic aspect. São Paulo, 2004. 121p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

There is a worldwide increase in the use of the synthetic drugs of abuse known as designer drugs. The main representatives of this class are *Ecstasy* or 3,4-methylenodioxymethamphetamine (MDMA) and *Eve* or 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), substances with stimulant and hallucinogenic effects. In Brazil media coverage of them is on the increase and their recreational use is in evidence by the growing numbers of patients who seek treatment at drug treatment centers. This paper validates the analytical methodology for the laboratory diagnosis of the use of MDMA, MDEA and their product of biotransformation, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), in whole blood and urine by high performance liquid chromatography with fluorescence. The developed methods showed good linearity, precision, accuracy, yield and capacity to detect analytes even when present in low concentrations, which enables its application in cases high intoxication as well as in cases of the recreational use of these drugs of abuse.

1. INTRODUÇÃO

O tráfico internacional de *Ecstasy* aumentou geometricamente durante a década de 1990. Tagliaro et al., (2000) relataram que o *Ecstasy* está em terceiro lugar na lista das substâncias ilícitas mais utilizadas da Itália, o mesmo ocorrendo em outros países da Europa e nos Estados Unidos. Peculiaridades desta classe de drogas de abuso como a facilidade de uso quanto à via de introdução (via de regra, oral) e sua discreta forma de apresentação (pequenos comprimidos), acabam por facilitar o tráfico e a difusão destas drogas entre os usuários. Isto porque enquanto outras substâncias ilegais geralmente exigem local reservado e acessórios para seu uso, o *Ecstasy* não exige nenhuma preparação e pode ser consumido com muita discrição em qualquer lugar (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998). Além disso, as quantidades relacionadas ao uso individual tornam mínimo o risco de ser identificado e apreendido pela polícia.

No Brasil, é crescente sua divulgação pela mídia e o uso recreacional tem sido identificado em vários pacientes que buscam tratamento para farmacodependência nas clínicas de São Paulo (SILVA; YONAMINE; REINHARDT, 1998). Segundo informações fornecidas pelo Núcleo de Exames em Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo, durante o ano 2001 foram apreendidos 1061 comprimidos de *Ecstasy* pela Polícia Civil do Estado de São Paulo; no ano seguinte este número foi de 5677. Segundo a Organização das Nações Unidas, o aumento no número de apreensões de determinada classe de drogas de abuso é indicativo do aumento no consumo desta substância. Mesmo com o aumento no número de apreensões e a notada presença das metilenodioxianfetaminas como fármacos de abuso no Brasil, até o momento não existem informações precisas sobre o consumo destas substâncias.

Face ao exposto, é de extrema importância a padronização de metodologia analítica que possibilite a identificação e quantificação de metilenodioxianfetaminas em fluidos biológicos, ferramenta imprescindível para futuros delineamentos epidemiológicos sobre o consumo de *Ecstasy* em nosso país.

2. GENERALIDADES

2.1. Histórico

As chamadas *designer drugs* estão entre as drogas de abuso mais consumidas no ocidente. Seus efeitos psicotrópicos específicos, e dos quais emanam sua utilização como drogas de abuso, são descritos como capacidade aumentada da comunicabilidade, empatia e auto-conhecimento, o que distingue esta classe de compostos das substâncias estimulantes e alucinógenas típicas. Nesta categoria de classificação encontram-se a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, *Ecstasy*), a 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA, *Eve*) e a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), substâncias cuja estrutura química é ilustrada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química das metilenodioxianfetaminas de maior interesse forense. (VARESIO; VEUTHEY, 1995; SPITZER et al., 2001; MEYER et al., 2002; BUECHLER et al., 2003).

Da mesma forma que a anfetamina e outros derivados anfetamínicos, a MDMA, MDEA e a MDA são substâncias sintéticas que não existem na natureza. A MDA foi sintetizada em 1910 e patenteada em 1956 como fármaco supressor da tosse, e em 1961 como moderador de apetite, mas nunca chegou a ser comercializado para nenhum destes fins. A

MDMA foi sintetizada em 1914 pelo laboratório alemão Merck, com intuito de ser um novo moderador de apetite (BEITIA et al., 2000; KALANT, 2001).

Nas décadas de 1960 e 1970 a MDMA foi utilizada como parte do movimento *New Age* para estimulação e elevação de experiências sensoriais. Entre o final da década de 1970 e início da década de 1980, foi sugerido o uso da MDMA como adjuvante na psicoterapia por provocar um estado controlado de alteração da consciência, auxiliando na diminuição das barreiras psicológicas e no estabelecimento de um vínculo entre o terapeuta e o paciente, facilitando a comunicação entre eles (ALMEIDA; SILVA, 2003). Em julho de 1985, o *U. S. Drug Enforcement Administration (DEA)* classificou a MDMA como substância *Schedule I*, que significa a sua presença na lista de substâncias controladas consideradas de alto potencial de abuso, sem benefício terapêutico/médico e cujo uso apresenta riscos mesmo sob supervisão médica, tornando seu uso ilegal no território norte-americano. Contribuíram também para a decisão do DEA o crescente número de artigos científicos que atribuíam ao seu análogo, MDA, significativa ação neurotóxica (RICAURTE et al., 1985). Em 11 de fevereiro de 1986 a Organização Mundial da Saúde e a “Comissão de drogas entorpecentes” da Organização das Nações Unidas seguiram a decisão do *DEA*, classificando internacionalmente a MDMA como substância pertencente a *Schedule I*.

2.2. Padrões de consumo

O *Ecstasy* é comercializado principalmente na forma de comprimidos, que possuem grande variedade de cores, formas e tamanhos, estampados com vários tipos de figuras e logotipos. Pode também ser vendido na forma de cápsulas ou em pó. Dentre os nomes mais populares desta droga de abuso, os mais utilizados são Bala, A, E, XTC e ADAM. À

semelhança de outras drogas vendidas no mercado ilícito, a dosagem e pureza destes comprimidos podem variar muito (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998; GREEN et al., 2003). Vários artigos encontrados na literatura (SILVA; YONAMINE; REINHARDT, 1998; SHERLOCK et al., 1999; BAGGOTT et al., 2000; COLE et al., 2002; GIMENO; BESACIER; CHAUDRON-THOZET, 2003) referem quais seriam os constituintes presentes nos comprimidos comercializados no mercado ilícito como sendo *Ecstasy*, e observaram a presença, além da MDMA, de MDEA, MDA, PMA (para-metoxianfetamina), efedrina, cafeína, dextrometorfano, cetamina, dentre outras substâncias. A dosagem típica para uso recreacional é aquela geralmente presente em um comprimido que pode ser de 50 a 150 mg, com variações na concentração que podem chegar a 70% ou mais (LARANJEIRA et al., 1996; KALANT, 2001). Mesmo sendo proscrito em várias partes do mundo desde a segunda metade da década de 1980, a MDMA e seus análogos tornaram-se drogas de abuso cada vez mais comuns principalmente entre jovens que freqüentam festas de música eletrônica, conhecidas como *raves parties*. Estas festas geralmente acontecem em grandes discotecas e são uma mistura de música eletrônica, vídeos e luzes controladas por computadores, onde os participantes dançam por horas sem parar (LARANJEIRA et al., 1996; FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002; GREEN et al., 2003). Neste contexto, a MDMA contribui para adiar a fadiga e permitir que o usuário dance durante horas. Para este propósito, o consumo usual é de 1 ou 2 comprimidos (entre 100 e 300 mg de MDMA) durante a festa, mas existem relatos da utilização de quantidades tão grandes quanto 10 comprimidos e combinação com outras drogas, normalmente levando a quadros de intoxicação grave. A quantidade ingerida costuma ser maior entre indivíduos que fazem uso freqüente deste tipo de droga (KALANT, 2001).

Estima-se que cerca de 0,2% da população global com idade acima de 15 anos consuma *Ecstasy*. Aproximadamente 40% do consumo mundial deste tipo de droga de abuso ocorre na Europa, seguido pela América do Norte onde cresce seu consumo, o mesmo

ocorrendo no Leste Europeu e países em desenvolvimento das Américas, África do Sul e sudeste asiático (UNODC, 2003).

No Brasil, conforme pode ser observado na Figura 2, informações sobre o consumo deste tipo de droga de abuso ainda são escassas como também o são as informações oficiais sobre a quantidade de comprimidos apreendidos no país. Recentemente, Almeida e Silva (2003) entrevistaram 192 indivíduos que haviam feito uso recente ou freqüente de *Ecstasy* na cidade de São Paulo. Observaram que a idade média dos usuários entrevistados era de 24 anos, e que a população era composta principalmente por indivíduos solteiros, com nível de escolaridade superior e pertencentes à classe econômica média. Segundo estes autores, 78,8% dos usuários fazem uso da droga em festas *raves*, na presença de outras pessoas e normalmente adquirem a droga de amigos ou pessoas conhecidas. Um dado alarmante exposto por estes autores é que 93,3% dos indivíduos entrevistados fazem uso concomitante de outras drogas psicoativas, principalmente maconha, tabaco e LSD (dietilamina do ácido lisérgico), conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Uso concomitante de *Ecstasy* com outras drogas de abuso por usuários da cidade de São Paulo (n=52), entrevistados entre os meses de junho e agosto de 1999.

Drogas de abuso associadas ao consumo de <i>Ecstasy</i>*	n	%
Maconha	43	82,7
Tabaco	32	61,5
LSD	16	30,8
Etanol	14	26,9
Cocaína ou <i>Crack</i>	9	17,3
Anfetamina	3	5,8
Outras drogas (opiídeos, inalantes)	3	5,8
Não faz uso concomitante de outra droga	4	7,7

*Respostas não excludentes. (Fonte: ALMEIDA; SILVA, 2003)

Embora a produção de MDMA ocorra nos Estados Unidos, a maior parte da droga consumida naquele país ainda é importada da Europa Ocidental. Estima-se que a Holanda, Bélgica e Luxemburgo sejam responsáveis pela produção de 80% da MDMA consumida no mundo (NIDA, 2001). Gimeno, Besacier e Chaudron-Thozet (2003), relataram que de acordo com a Europol (*European Police Office*), durante o ano 2000 foram apreendidos 17,4 milhões de comprimidos de *Ecstasy* nos países membros da União Européia, o que corresponde a um aumento de 50% quando comparado com o número de apreensões que aconteceram durante o ano de 1999. Estes mesmo autores comentam ainda que este aumento apresenta-se de forma mais pronunciada em países como a Áustria (420%), Finlândia (394%), Grécia (1803%),

Irlanda (163%), Itália (86%), Holanda (50%), Espanha (64%) e Suíça (152%) (GIMENO; BESACIER; CHAUDRON-THOZET, 2003). A quantidade de comprimidos de *Ecstasy* apreendidos pela polícia de Taiwan aumentou de 700 para 44650 gramas nos últimos quatro anos (SUE; LEE; HUANG, 2002).

Figura 2. Alterações no consumo de metilenodioxianfetaminas (MDMA, MDEA, MDA) no mundo, 2001 (ou último ano disponível).

(Fonte: Global Illicit Drug Trends 2003 - Office on Drugs and Crime, United Nations, 2003) .

No Brasil, a MDMA, MDEA e MDA são classificadas como substâncias entorpecente (Lista F2) pela Portaria nº. 344 do Ministério da Saúde de 12 de maio de 1998. Segundo informações fornecidas pelo Núcleo de Exames de Entorpecentes do Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo, somente neste Estado, entre os meses de março e dezembro de 2001, foram realizadas nove apreensões totalizando 1601 comprimidos de *Ecstasy*; já entre os meses de janeiro e outubro de 2002 foram realizadas 13 apreensões, totalizando 5677 comprimidos, o que representa um aumento de 355%.

O número de atendimentos relacionados ao uso de MDMA em salas de emergência dos EUA, que no ano de 1994 foi de 250, aumentou para 2850 no ano de 1999 (FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002). Entre 1974 e 2000, 160 mortes atribuídas à MDMA foram relatadas na literatura científica internacional, número que certamente subestima o real número de mortes causadas pela auto-administração de MDMA (NIDA, 2001).

Alguns pesquisadores questionam se a MDMA é realmente o agente de *causa mortis* de todos estes óbitos, uma vez que a droga de rua conhecida como *Ecstasy* nem sempre contém apenas MDMA. Estudos realizados na Europa e Estados Unidos demonstraram que o *Ecstasy* geralmente contém outras substâncias ativas além da MDMA. Entre fevereiro de 1999 e março de 2000, a organização anônima conhecida como *DanceSafe* analisou 107 comprimidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi observado que 63% dos comprimidos continham MDMA, enquanto que 29% continham outras substâncias ativas além da MDMA. O fármaco mais identificado foi o dextrometorfano, princípio ativo de xarope antitussígeno, em concentração média de 136 mg, dose 4,5 a 9 vezes maior que a dose terapêutica. Em concentrações de 300 a 480 mg, o dextrometorfano pode causar taquicardia e outros efeitos adversos que incluem depressão e psicose semelhante à causada pela fenciclidina. Além disso, o dextrometorfano (assim como a MDMA) inibe a

enzima CYP2D6, o que indica que a administração concomitante dos dois fármacos pode produzir efeitos adversos inesperados. Outros fármacos identificados durante as análises dos comprimidos incluem cafeína, efedrina, pseudoefedrina e ácido acetilsalicílico (NIDA, 2001).

Cole et al. (2002) analisaram 136 amostras de comprimidos de *Ecstasy* apreendidos no Reino Unido durante o ano de 2001 e observaram que a quantidade de MDMA presente nestes comprimidos possui grande variação (entre 20 e 109 mg de MDMA por comprimido).

Os países da Europa Ocidental são os principais fornecedores de *Ecstasy* para o restante do mundo, como pode ser observado na Figura 3. Segundo relatório da ONU, três quartos dos países que realizaram apreensões de comprimidos de *Ecstasy* dentro de seu território relataram que a droga era proveniente da Holanda. A Bélgica é o segundo maior fornecedor de metilenodioxianfetaminas para o mundo, seguida pela Alemanha, Reino Unido, Espanha e Estados Unidos da América. China, Indonésia, Tailândia, África do Sul e Colômbia, são outros países mencionados como fonte deste tipo de droga de abuso (UNODC, 2003).

Figura 3. Quantidade apreendida e tendências do tráfico mundial de metilenodioxianfetaminas (MDMA, MDEA, MDA) no biênio 2001-2002. (Fonte: Global Illicit Drug Trends 2003 - Office on Drugs and Crime, United Nations, 2003).

2.3. Vias de síntese e propriedades físico-químicas

Na literatura científica internacional (RENTON; COWIE; OON, 1993; BAUDOT et al., 1998), encontram-se descrições de várias vias de síntese da MDMA conforme pode ser observado na Figura 4. Todas apresentam em comum o fato de que o composto inicial possui o anel metilenodioxí. A primeira síntese e descrição da MDMA ocorreu na Alemanha em 24 de dezembro de 1912, realizada pelo laboratório Merck® sendo patenteado em 16 de maio de 1914. Neste processo (via III da Figura 4), a MDMA foi sintetizada em duas etapas a partir do safrol. A MDMA também pode ser sintetizada a partir da MDA por reação com etil cloroformato seguida por redução (SHULGIN, 1986). Existem ainda dois processos de síntese através da aminação redutiva da piperonil acetona (vias I e II da Figura 4), substância disponível comercialmente.

As vias I e II parecem ser as mais comumente utilizadas em laboratórios que sintetizam este fármaco clandestinamente, pois as reações envolvidas nestes processos podem ser facilmente adaptadas para a preparação dos análogos da MDMA (RENTON; COWIE; OON, 1993; BAUDOT et al., 1998).

As reações descritas na patente do laboratório Merck® envolvem a formação do 3,4-metilenodioxifenil-2-bromopropano (MDPBP) a partir do safrol seguido por reação com metilamina e amônia para a formação de MDMA e MDA, respectivamente (RENTON; COWIE; OON, 1993; BAUDOT et al., 1998).

A MDMA é uma amina secundária, podendo ser encontrada na forma de base livre (líquido de aspecto oleoso, insolúvel em água e solúvel na maioria dos solventes orgânicos) ou como sal de ácidos (sólido branco, hidrossolúvel) (SHULGIN, 1986).

Figura 4. Possíveis vias de síntese da MDMA e seus análogos a partir do safrol e isosafrol.

A base livre possui ponto de ebulição de 155°C a 20 mm/Hg. A forma salina de cloridrato pode ocorrer em um grande número de formas cristalinas hidratadas, o que torna

arriscada a identificação e estimativa da pureza desta substância através de suas propriedades físicas e cristalinas. A forma anidra apresenta ponte de fusão em torno de 148°C (SHULGIN, 1986).

A MDMA é um composto quiral, sendo encontrado nos comprimidos de *Ecstasy* vendidos no mercado ilícito exclusivamente na forma de racemato (BAGGOTT; JEROME, 2001). Sua síntese clandestina é baseada em métodos aquirais, resultando invariavelmente em misturas racêmicas dos produtos finais (MOORE et al., 1996). A estrutura destes compostos é mostrada na Figura 5.

Figura 5. Posição do carbono quiral (asterisco em vermelho) presente nas metilenodioxianfetaminas de maior interesse forense (VARESIO; VEUTHEY, 1995; SPITZER et al., 2001; MEYER et al., 2002; BUECHLER et al., 2003).

Esta substância é estruturalmente semelhante à anfetamina e a algumas fenilalquilaminas de atividades alucinógenas como a mescalina. Contudo, a atividade farmacológica desta substância parece não se restringir apenas à simples atividade estimulante ou alucinógena, sendo classificado por Nichols (1986) como representante de uma nova categoria de fármacos, os entactógenos, classe que abrigaria aquelas substâncias que provocam alteração controlada de consciência, com harmonia sensual e emocional (NICHOLS, 1986; ORTUÑO et al., 1999; KALANT, 2001).

3. TOXICOCINÉTICA

3.1. Vias de administração e concentrações plasmáticas de pico

À semelhança de outras anfetaminas, a MDMA e seus análogos são aminas e podem ocorrer como base livre ou na forma de sal de vários ácidos. De um modo geral, as bases livres são voláteis e podem ser utilizadas na forma inalada. Contudo, o radical metilenodioxí leva a um aumento no ponto de ebulição da base livre, o que impossibilita sua utilização por inalação de vapor. Os sais de ácidos são hidrossolúveis e por esta razão podem ser administrados por via intravenosa, oral ou por inalação do pó (procedimento semelhante ao uso do cloridrato de cocaína) (KALANT, 2001).

A via pela qual ocorre a auto-administração do *Ecstasy* é quase que exclusivamente a oral, na forma de comprimidos ou cápsulas com concentrações que variam entre 50 e 150 mg da substância ativa, ou em pó, misturado a sucos de fruta (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998). Existem raros relatos sobre a administração da droga por outras vias, como a intravenosa e a intranasal (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998; KALANT, 2001).

A MDMA é prontamente absorvida no trato intestinal e atinge pico de concentração plasmática aproximadamente duas horas após a administração. Doses de 50 mg, 75 mg e 125 mg administradas a voluntários sadios produziram concentrações plasmáticas máximas de 106 ng/mL, 131 ng/mL e 236 ng/mL, respectivamente. Estas concentrações são consideravelmente baixas, posto que a substância passa rapidamente para os tecidos e liga-se a seus constituintes (KALANT, 2001). Na literatura consultada não foram encontradas informações relevantes sobre a ligação da MDMA e seus análogos a proteínas plasmáticas em humanos. Bagott e Jerome (2001) relatam que a fração de MDMA ligada a proteínas

plasmáticas em experimentos com cães é de aproximadamente 0,4 (razão entre a concentração do fármaco nos eritrócitos e sua concentração livre no plasma) (GARRETT; SEYDA; MARROUM, 1991) e possui relação independente da concentração numa ampla faixa de concentrações.

3.2. Distribuição e eliminação

A MDMA não possui comportamento farmacocinético linear e dose-dependente (DE LA TORRE; FARRÉ et al., 2000). Sua biotransformação é fundamentalmente hepática, sendo que a principal via é oxidativa e envolve desmetilação, levando a catecóis reativos que são posteriormente convertidos por metilação, conjugação com ácido glicurônico ou com radical sulfato antes de ser eliminado (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998; KRETH et al., 2000; BAGGOTT; JEROME, 2001), conforme pode ser observado na Figura 6. A cadeia alifática lateral é degradada por N-desalquilação, levando inicialmente à correspondente amina primária (KRETH et al., 2000).

De um modo geral, estas substâncias são biotransformadas principalmente no fígado, por ação de enzimas do citocromo P-450, em particular pela CYP2D6 (ORTUÑO et al., 1999; KRETH et al., 2000; KALANT, 2001; SEGURA et al., 2001). Outras enzimas estão envolvidas nestes processos de degradação, sendo que algumas delas parecem sofrer saturação em concentrações baixas do fármaco (KALANT, 2001).

Em estudos com voluntários foi observado que a taxa de eliminação do fármaco da circulação diminui com o aumento da dose. Estudos *in vitro* sugerem que produtos de

biotransformação da MDMA ligam e inativam a enzima CYP2D6, além de saturar rapidamente enzimas de alta afinidade envolvidas nesta biotransformação.

Figura 6. Biotransformação das metilenodioxianfetaminas (ORTUÑO et al., 1999; DE LA TORRE; FARRÉ et al., 2000; KALANT, 2001; GREEN et al., 2003).

Como resultado desta ligação enzimática, doses maiores de MDMA podem inativar/saturar mais enzimas, diminuindo a quantidade disponível para biotransformar o fármaco, resultando em farmacocinética não-linear. Conseqüentemente, quando a dose é aumentada, ocorre um aumento desproporcional das concentrações sanguíneas e cerebrais da MDMA. Por esta razão, um pequeno aumento na dose oral de MDMA pode produzir dramática elevação nos níveis plasmáticos do fármaco circulante, o que pode explicar alguns dos efeitos tóxicos observados na superdosagem, como por exemplo quando usuários ingerem outro comprimido antes da depuração da primeira dose (KALANT, 2001; NIDA, 2001).

A biotransformação destas substâncias envolve reações de N-desmetilação da cadeia alifática lateral, onde a MDEA é convertida em MDMA e esta pode ser convertida em MDA. A MDMA sofre O-desalquilação originando a 3,4-dihidroximetanfetamina (HHMA) e a 3,4-dihidroxianfetamina (HHA), O-metilação originando a 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) e a 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA) (KRETH et al., 2000; BAGGOTT; JEROME, 2001). A formação de HMMA e HMA a partir da HHMA e da HHA, respectivamente, ainda não foi completamente estudada, mas possivelmente ocorra pela ação da catecol-o-metil transferase.

Os metabólitos dihidroxilados possuem meia-vida plasmática curta, sendo de difícil detecção (BAGGOTT; JEROME, 2001). Os principais produtos de biotransformação da MDMA encontrados na urina são a MDA, HMMA e HMA (aproximadamente 90% dos derivados hidroxilados são encontrados na urina na forma conjugada com o ácido glicurônico, o que explica a necessária etapa prévia de hidrólise para a realização de análises destas substâncias) (ORTUÑO et al., 1999). A MDA é o principal produto de biotransfomação livre (não conjugado) encontrado no plasma e urina, mas sua concentração só representa uma

pequena porcentagem da concentração de MDMA (10% da concentração plasmática de MDMA) (ORTUÑO et al., 1999; GREEN et al., 2003).

Variações genéticas determinam diferenças na atividade da enzima CYP2D6, o que pode ter efeito sobre a toxicidade da MDMA. A atividade desta enzima é geneticamente determinada e mais de 10% da população caucasiana apresenta deficiência para esta enzima. Desta forma, indivíduos podem apresentar-se com metabolismo rápido ou lento para compostos biotransformados pela CYP2D6, possuindo susceptibilidade diferente à droga, o que explica a “ampla” faixa de concentração relacionada à intoxicação aguda e aos efeitos neurotóxicos das metilenodioxianfetaminas (ORTUÑO et al., 1999; BAGGOTT; JEROME, 2001; SEGURA et al., 2001).

De la Torre et al., (2000), em experimento onde enfocaram administração de dose única de MDMA a usuários recreacionais de *Ecstasy*, verificaram que os níveis plasmáticos da MDMA e MDA observados indicavam um comportamento cinético não-proporcional à dose administrada, verificando que sua biotransformação apresentava comportamento dose-dependente, sendo reduzido em 50% após a administração de 125 mg de MDMA, indicando falha no *clerance* hepático da substância. Neste experimento, análises de amostras de plasma demonstraram que a HMMA é o principal produto de biotransformação encontrado após a administração de 50, 75 e 100 mg de MDMA, enquanto que o fármaco inalterado é o principal produto encontrado no plasma após a administração de doses maiores (125 mg ou 150 mg) da substância. Esta informação demonstra que com o aumento da dose de MDMA, o aumento na concentração plasmática não segue a mesma proporção, o que pode ser indicativo de não-linearidade da farmacocinética desta substância. Uma possível explicação para estes achados é que as vias de biotransformação da MDMA tornam-se saturadas em doses maiores; outra explicação seria uma possível interação entre os produtos de biotransformação e as

enzimas envolvidas neste processo: a manutenção de grupos metoxi nas posições 3 e 4 das metilenodioxianfetaminas, promove aumento na afinidade destas moléculas pela enzima CYP2D6, quando comparado com os respectivos produtos O-desmetilados (GREEN et al., 2003).

Em modelos animais, a administração de MDMA é seguida por efeitos neurodegenerativos no sistema serotoninérgico central. O produto resultante da O-desmetilação, a 3,4-dihidroximetanfetamina (HHMA), foi encontrado no cérebro de ratos e postulado como sendo responsável por esta neurotoxicidade causada pelo *Ecstasy*, devido à formação de adutos com a glutathione e outros compostos endógenos que contenham radicais tióis (ORTUÑO et al., 1999). Em humanos, a presença da HHMA só foi demonstrada em estudos *in vitro*, aparecendo como principal produto da biotransformação da MDMA. As concentrações plasmáticas e urinárias da HHMA são proporcionais à quantidade de MDMA presentes nestas matrizes. Este produto possui alta reatividade e instabilidade devido à sua estrutura química, sendo encontrado apenas na forma conjugada em materiais biológicos (ORTUÑO et al., 1999).

Devido à baixa taxa de ligação a proteínas (aproximadamente 20%) e ao baixo peso molecular da MDMA e seus análogos, estes compostos possuem passagem praticamente irrestrita entre o plasma e a saliva (NAVARRO et al., 2001). Estes fármacos distribuem-se amplamente por todos os tecidos, atravessando a barreira hematoencefálica (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998).

A eliminação da MDMA é relativamente lenta, com meia-vida plasmática da ordem de 8 horas. De acordo com o postulado de que o tempo médio para eliminação de 95% de um fármaco do organismo é da ordem de 5 meia-vidas (aproximadamente 40 horas para a MDMA), pode-se justificar por sua cinética de eliminação alguns dos efeitos adversos que

podem ocorrer até dois dias após o uso. Alguns produtos de biotransformação da MDMA possuem atividade farmacológica, em especial a MDA, razão pela qual alguns efeitos do *Ecstasy* podem durar mais do que o tempo de permanência da MDMA no organismo (KALANT, 2001). Ortuño et al. (1999), verificando a eliminação da MDMA e seus principais produtos de biotransformação (MDA, HMMA, HMA), observaram que aproximadamente 50% da MDMA é recuperada nas primeiras 24 horas, independente da dose administrada. Enquanto a recuperação urinária da HMMA é praticamente constante para todas as doses estudadas, a recuperação da MDMA aumenta de maneira não-proporcional a dose administrada, outro indicativo da não-linearidade da farmacocinética desta substância (GREEN et al., 2003). Como para todas as aminas, o pH urinário influi decisivamente para a excreção urinária, sendo que a acidificação da urina aumenta sua eliminação (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998).

2.3. Toxicocinética enantio-dependente

Estereoisômeros são isômeros que diferem apenas pelo modo como seus átomos estão dispostos no espaço. Nesta categoria de isomerismo, encontra-se uma forma especial, que ocorre quando um átomo individual, na maioria das vezes carbono, possui quatro substituintes distintos. Neste caso, ocorrem duas espécies denominadas enantiômeros, cujas estruturas diferem apenas por serem imagens especulares não sobreponíveis. Esses enantiômeros recebem denominações distintas R ou S de acordo com sua configuração e (+) ou (-) devido à propriedade de promover a rotação de plano de luz polarizada para a direita ou esquerda, respectivamente (ROMERO, 1998).

Como ocorre com vários outros fármacos, as metilenodioxianfetaminas estudadas neste trabalho ocorrem na forma de dois isômeros ópticos R(-) e S(+). Durante sua produção clandestina e quando comercializadas como drogas de rua, estas substâncias são vendidas como mistura destas duas formas isoméricas (NIDA, 2001).

Fallon et al. (1999) administraram 40 mg de mistura racêmica de MDMA a oito voluntários não-usuários e mediram as concentrações sanguíneas e urinárias do esteroisômeros S(+)-MDMA, R(-)-MDMA, S(+)-MDA, R(-)-MDA em intervalos de tempo regulares e observaram que a concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) dos dois enantiômeros da MDMA foi atingida 4 horas após a administração, mas o valor da $C_{\text{máx}}$ do enantiômero R(-)-MDMA foi significativamente maior que a do S(+)-MDMA e a área sob a curva (AUC) das concentrações plasmáticas foi de duas a quatro vezes maior para o enantiômero-R do que para o enantiômero-S após a administração de 40 mg para voluntários. Além disso, a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do S(+)-MDMA foi significativamente menor que a do R(-)-MDMA.

Outro estudo relata que após a administração de 1,5 mg/kg, a concentração plasmática da forma S(+) retorna para aproximadamente zero após 24 horas, enquanto que a forma R(-) apresenta valores quantificáveis até 36 horas após a administração. Análises quantitativas revelaram um acúmulo aproximadamente três vezes maior da forma R(-) na circulação comparado com a forma S(+), e que a forma R(-) é eliminada do plasma cerca de 35% mais lentamente que a forma S(+). Estes resultados sugerem que a forma R(-) pode sofrer acúmulo com administrações sucessivas (NIDA, 2001).

Não existe diferença no clearance renal dos dois enantiômeros de MDMA, indicando que o clearance não-renal (metabólico) é o processo estereoespecífico (GREEN et al., 2003). Moore et al. (1996) observaram níveis maiores do enantiômero-R da MDMA em amostras de

sangue, fígado, humor vítreo e bile de indivíduos que morreram logo após a ingestão de *Ecstasy*.

A recuperação urinária média dos enantiômeros de MDMA e MDA durante as primeiras 24 horas após a administração foi de 21,4% para o R(-)-MDMA, 9,3% para o S(+)-MDMA, 1,0% para o R(-)-MDA e 1,4% para o S(+)-MDA, mostrando substancial disposição enantioseletiva da MDMA em humanos, com o enantiômero S(+) apresentando maior atividade farmacológica com menor meia-vida, menor concentração plasmática e maior clearance metabólico (GREEN et al., 2003).

4. TOXICODINÂMICA

4.1. Mecanismos de ação das metilenodioxianfetaminas sobre o Sistema Nervoso Central

A MDMA possui estrutura química similar as catecolaminas endógenas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), conforme pode ser observado na Figura 7, e atua no cérebro aumentando a atividade de pelo menos três neurotransmissores: serotonina, dopamina e noradrenalina. Como outras anfetaminas, a MDMA aumenta a liberação destes neurotransmissores nas fendas sinápticas, aumentando a atividade cerebral. Possui maior atuação sobre a serotonina, principal neurotransmissor responsável pela regulação do humor, sono, dor, emoções, apetite e comportamentos. Pela liberação de grande quantidade de serotonina, inibição da sua recaptação, e também por interferir em sua síntese, a MDMA leva ao comprometimento da depleção deste neurotransmissor e, como resultado é preciso considerável espaço de tempo para a restauração nos estoques necessários para realização de importantes funções fisiológicas e psicológicas (KALANT, 2001; FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002; TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002). Desta forma, o uso crônico desta substância leva à depleção de serotonina, podendo causar danos as vezes irreversíveis aos neurônios responsáveis pela liberação deste neurotransmissor.

De modo similar, mas em menor extensão, este aumento na liberação e inibição da recaptação ocorre com a dopamina, sendo atribuído a este neurotransmissor um importante papel na mediação dos efeitos psicoestimulantes da MDMA (GREEN et al., 2003). Há também uma ação importante da droga sobre os receptores adrenérgicos α_2 , que parece mediar a ação simpática provocada por este fármaco. À luz dos conhecimentos atuais, está

claro que o aumento na liberação de serotonina (e possivelmente de dopamina) seja os principal mecanismo de ação da MDMA (KALANT, 2001).

Figura 7. Estrutura química de catecolaminas endógenas, da anfetamina e alguns de seus derivados.

A serotonina é sintetizada a partir do triptofano, um aminoácido essencial, sendo que os neurônios serotoninérgicos possuem todas as proteínas necessárias para sintetizar este neurotransmissor a partir do L-triptofano. Sua principal via de metabolismo está relacionada com a enzima monoamino oxidase (MAO) originando aldeído, que será convertido em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) pela ação da enzima aldeído desidrogenase. Muitas funções cerebrais são mediadas pela serotonina, como sono, cognição, percepção sensorial, atividade motora, regulação da temperatura corpórea, apetite, comportamento sexual e secreção hormonal. Todos os subtipos de receptores são expressos no cérebro, muitas vezes em áreas

sobrepostas. Ainda que os padrões de expressão em neurônios não tenham sido completamente esclarecidos, é provável que muitos subtipos de receptores com ações similares ou até mesmo antagônicas sejam expressas em um mesmo neurônio, o que resulta em enorme diversidade de ações. A serotonina recém-formada é rapidamente armazenada em vesículas sinápticas onde fica protegida da ação da monoamino oxidase. Quando liberada na fenda sináptica, a serotonina liga-se a receptores localizados nos neurônios pós-sinápticos, causando alterações nas propriedades elétricas deste neurônio. A serotonina liberada para a fenda sináptica durante o impulso nervoso e que não se liga aos receptores, é recaptada no neurônio pré-sináptico por um carreador sódio-dependente, conhecido como transportador de serotonina. A recaptação pré-sináptica é um mecanismo altamente eficiente para eliminar a ação da serotonina liberada pelo impulso nervoso. A monoamino oxidase localizada nos neurônios pós-sinápticos e na fenda sináptica rapidamente inativa o neurotransmissor que escapa da recaptação (BUSH; MAYER, 2003). Quando a MDMA se liga ao transportador de serotonina, mais neurotransmissor é liberado na fenda sináptica por dois mecanismos: primeiro porque a MDMA impede que o transportador de serotonina retire-a da fenda sináptica, pois bloqueia este transportador e segundo porque a MDMA pode fazer com que o transportador de serotonina atue de modo reverso, transportando-a do interior do neurônio pré-sináptico para a fenda sináptica. Assim, como mais serotonina está presente na fenda, mais receptores são ativados, sendo este o principal mecanismo de ação da MDMA sobre a fisiologia cerebral.

A MDMA e seus análogos são geralmente produzidos como mistura racêmica, mas os estereoisômeros diferem em vários aspectos importantes. O isômero S(+)-MDMA é mais potente que o R(-)-MDMA na produção dos efeitos subjetivos característicos do *Ecstasy*. Alguns estudos sugerem que o isômero R(-) está mais relacionado com os efeitos semelhantes aos da mescalina e ao LSD (dietilamina do ácido lisérgico), e que, portanto estariam

relacionados aos efeitos alucinógenos reportados, enquanto que o isômero S(+) estaria mais relacionado com os efeitos semelhantes à anfetamina. Os enantiômeros diferem também quanto a intensidade dos efeitos provocados, sendo que o isômero S(+) apresenta maior potência que o isômeros R(-). Neste aspecto a MDMA difere de outras anfetaminas alucinógenas, como a 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina (DOM), as quais invariavelmente são mais ativas na forma levorotatória – R(-) (GOWING et al., 2001).

De acordo com a *American Psychiatric Association* (1995), o *Ecstasy* causa dependência por satisfazer 4 critérios de diagnóstico: é utilizado mesmo com conhecimento dos seus efeitos adversos, é consumido em doses maiores que as planejadas, induz tolerância e causa “ressaca” caracterizada por cansaço, insônia e depressão. A caracterização da tolerância apresenta certas dificuldades, uma vez que pode ocorrer em maior grau para os efeitos colaterais indesejáveis, limitando assim, o consumo de doses elevadas e frequentes.

4.2. Sinais e sintomas da intoxicação

Mesmo tendo reputação de droga segura, os efeitos agudos causados pelo uso do *Ecstasy* (hipertermia, complicações cardiovasculares, falência renal e hepática) podem levar à morte (KRETH et al., 2000).

Os efeitos buscados pelos usuários de *Ecstasy* incluem aumento do humor, elevação de empatia e sensação de proximidade, alterações visuais, sensoriais e emocionais, aumento da energia física, extroversão e autoconfiança. Dentre os principais efeitos adversos destacam-se o bruxismo, contratura da mandíbula, diminuição do apetite, cefaléia, alterações locomotoras e sudorese (FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002).

Os efeitos causados pelas metilenodioxianfetaminas variam de acordo com a dose, frequência e duração do uso. De modo geral, os efeitos desejados por muitos usuários são aqueles produzidos por baixas doses usadas esporadicamente. A MDMA produz significativo aumento na vivacidade, paciência e sensação de energia, despertar sexual e adiamento da fadiga e do sono. Os efeitos fisiológicos observados são descritos como um aumento da euforia, bem-estar, percepção sensorial aguçada, melhora na sociabilidade, extroversão, aumento na sensação de intimidade e proximidade com outras pessoas, maior tolerância à opinião e sentimentos alheios (LARANJEIRA et al., 1996). Estes últimos efeitos levam a afirmar que a MDMA representa uma classe distinta entre as drogas de abuso designadas como “entactógenos”, ou seja, que poderiam ser utilizadas com adjuvante em sessões de psicoterapia (SHULGIN, 1986; KALANT, 2001; TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002).

Como outras anfetaminas, a MDMA também possui efeitos adversos demonstrados em muitas funções físicas, mesmo quando utilizada em doses moderadas com finalidade recreacional. Como a ação básica das anfetaminas envolve o aumento do despertar e da vigília, usualmente ocorre também aumento da tensão muscular, manifestada por contratura da mandíbula, bruxismo e movimentos constantes das pernas. O aumento da atividade muscular, somado à ação direta do fármaco no sistema termorregulador do cérebro, leva a um aumento na temperatura corpórea. Rigidez e dor nos membros inferiores e na região inferior das costas são queixas frequentes durante os primeiros 2-3 dias após o uso de MDMA. Dor de cabeça, náuseas, diminuição do apetite, visão turva, boca seca e insônia são outros sintomas físicos relatados após a experiência do uso de *Ecstasy*. Os efeitos psicológicos indesejados resultantes da intoxicação aguda por MDMA representam uma resposta exagerada dos efeitos desejados e buscados pelo usuário. Como exemplo o aumento da vigília, se em excesso, é convertido em hiperatividade, confusão e insônia. Outras queixas relacionadas ao uso de MDMA incluem alucinação leve, despersonalização, ansiedade, agitação, comportamentos

bizarros e repetitivos. Ocasionalmente estes sintomas podem levar a ataques de pânico, delírio ou até episódios curtos de psicose (pouco freqüentes) (FERIGOLO; MEDEIROS; BARROS, 1998; WEINMANN; BOHNERT, 1998; BAGGOTT; JEROME, 2001; KALANT, 2001).

Porquanto a MDMA seja considerado droga segura pelos usuários, este conceito é falso, pois além de causar alterações da percepção que comprometem a habilidade, por exemplo, em dirigir, existem relatos de intoxicações agudas envolvendo estas substâncias, etanol e outras drogas de abuso (WEINMANN; BOHNERT, 1998; TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002). O quadro clínico mais freqüentemente associado à intoxicação aguda por *Ecstasy* é caracterizado por lesão hepática grave (podendo ocorrer necrose do tecido hepático), hipertermia associada ou não à rabdomiólise, coagulação intravascular disseminada e falência renal. Outras complicações freqüentemente relatadas incluem hiponatremia, estupor catatônico, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnóide ou isquemia cerebral. Concentrações sanguíneas de MDMA superiores a 1000 µg/mL são potencialmente fatais enquanto que concentrações inferiores a 0,6 µg/mL são capazes de levar a quadros de intoxicação aguda (DE LETTER et al., 2004). As intoxicações por MDMA ou MDEA não podem ser diferenciadas clinicamente, mas apenas através de análises toxicológicas em amostras de urina ou sangue (WEINMANN; BOHNERT, 1998).

Ao contrário do grande número de relatos de intoxicação aguda por MDMA, poucas são as informações sobre casos de mortes relacionadas ao uso de MDEA (WEINMANN; BOHNERT, 1998), talvez porque o consumo deste tipo de substância seja inferior ao consumo de MDMA.

Vários relatos sobre a toxicidade da MDMA são associados à hiponatremia e danos hepáticos que podem progredir até falência fulminante do fígado. Problemas cardiovasculares relatados incluem arritmias cardíacas e hipertensão, mas as freqüências destes sinais não são

conhecidos. Interação com outras drogas ou adulterantes presentes nos comprimidos podem interferir no metabolismo e nos efeitos tóxicos da MDMA. Finalmente, a farmacocinética não-linear aumenta a possibilidade de que pequenos aumentos na dose de MDMA administrada, venha a resultar num aumento desproporcional das concentrações sanguíneas posto que, como citado anteriormente, a eliminação não é dose-dependente o que aumenta o risco de intoxicações (FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002).

A MDMA apresenta significativos efeitos sobre o sistema cardiovascular, principalmente devido à sua ação sobre a liberação de noradrenalina e por agir como agonista α -2-adrenérgico. Por este mecanismo provoca aumento dose-dependente da frequência cardíaca e pressão sanguínea (DE LA TORRE; FARRÉ et al., 2000). A hipertensão induzida pelo *Ecstasy* pode causar danos a vários órgãos, o que geralmente ocorre quando a pressão diastólica excede 130 mm Hg (BAGGOTT; JEROME, 2001). Esta hipertensão pode estar relacionada com outras patologias induzidas por este tipo de fármaco, como a falência renal aguda, distensão aórtica, infarto do miocárdio e hemorragia cerebral (MANCHANDA; CONNOLLY, 1993; WOODROW; HARNDEN; TURNEY, 1995).

Outra ação da MDMA ocorre sobre a liberação hormonal, onde esta substância leva a um aumento dose-dependente da concentração de cortisol, prolactina e do hormônio adrenocorticotrófico, enquanto que as concentrações de hormônio do crescimento permanecem inalteradas mesmo após a administração de 125 mg de MDMA (MAS et al., 1999). Henry et al. (1998) demonstraram que mesmo em baixas doses (40 mg) a MDMA pode induzir secreção de hormônio antidiurético (vasopressina) em humanos, levando desta forma a alterações como aumento na retenção de fluidos, o que pode contribuir para a instalação do quadro de hiponatremia (BAGGOTT; JEROME, 2001; SUE; LEE; HUANG, 2002).

Algumas mortes associadas ao uso de MDMA envolvem aumento da temperatura corpórea (síndrome hipertérmica), e são devido à atuação desta substância sobre as vias dopaminérgicas e serotoninérgicas que regulam a temperatura corpórea (ELLIS et al., 1996; FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002). Considera-se que este quadro clínico esteja caracterizado sempre que a temperatura corpórea se iguale ou exceda 38°C. Os casos de hipertermia induzida pelo *Ecstasy* são provavelmente o resultado da soma de vários fatores: a ação do fármaco sobre o sistema termoregulador do cérebro e a vasoconstrição periférica induzida por este e que diminui a perda de calor corpóreo. As atividades físicas intensas, reposição inadequada de eletrólitos e líquido e as altas temperaturas muitas vezes encontradas nas festas *raves*, aumentam de modo significativo os riscos de hipertermia (GORDON et al., 1991; ELLIS et al., 1996).

As principais manifestações clínicas da hipertermia são edema cerebral, hipotensão e hipóxia tecidual com enfraquecimento da contratilidade (ELLIS et al., 1996). O tratamento da hipertermia requer atendimento médico imediato, e pode levar a rabdomiólise e lesões renais (FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002). Na presença de distúrbios neurológicos, como delírio, estupor ou convulsões, a hipertermia significa alto risco de morbidade e mortalidade (que acontece dependendo da temperatura máxima atingida, da duração da hipertermia e do estado de saúde e consciência do indivíduo) (WATSON et al., 1993; BAGGOTT; JEROME, 2001). O tratamento da hipertermia induzida pelo *Ecstasy* necessita de acompanhamento médico e envolve medidas de apoio e facilitação do resfriamento corpóreo. A administração de solução salina pode ser usada para corrigir a hipovolemia e muitas vezes é o suficiente para corrigir a taquicardia e hipotensão. A administração de diazepam pode ser necessária a fim de se evitar crises convulsivas (BAGGOTT; JEROME, 2001; MECHAN et al., 2002).

Rabdomiólise é uma síndrome clínica resultante da degeneração muscular e liberação de proteínas musculares para a região extracelular. Em usuários de *Ecstasy*, a degeneração muscular na maioria das vezes ocorre devido à hipertermia prolongada, excesso de esforço físico ou durante as crises convulsivas que podem ser desencadeadas pelos efeitos das metilenodioxianfetaminas sobre o Sistema Nervoso Central (WATSON et al., 1993; BAGGOTT; JEROME, 2001; SUE; LEE; HUANG, 2002). Baggott e Jerome (2001) relatam que 38% dos usuários de *Ecstasy* que apresentam quadro de hipertermia podem apresentar também rabdomiólise. Possíveis fatores de risco para o desenvolvimento desta síndrome muscular são, além da hipertermia, a desnutrição, desidratação, esforço físico excessivo, tabagismo e alcoolismo. Os sintomas da rabdomiólise incluem dor muscular, fraqueza e urina de coloração marrom. O conteúdo das células musculares lesadas pode causar ainda graves riscos à saúde do indivíduo, podendo desencadear falência renal aguda e coagulação intravascular disseminada (WATSON et al., 1993). A rabdomiólise pode ser desenvolvida tardiamente ao uso da droga (TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002).

A coagulação intravascular disseminada é uma patologia relacionada com a formação de fibrina e o consumo de fatores de coagulação e plaquetas no interior dos vasos sanguíneos. Pode ser apresentada nos quadros de intoxicações causadas pelo uso de *Ecstasy* e deve ocorrer devido a uma combinação de fatores como necrose hepática, lesões de células endoteliais e pela termo-inativação de fatores de coagulação, plaquetas e megacariócitos (ELLIS et al., 1996). Com o prejuízo destes fatores, a coagulação fica impossibilitada podendo ocorrer hemorragia generalizada, caracterizada por sangramento nasal e da gengiva, febre, dificuldades em respirar, taquicardia e hipotensão. Segundo Baggott e Jerome (2001), a coagulação intravascular disseminada ocorre em 50% dos usuários de *Ecstasy* que apresentam quadro de hipertermia.

A coagulação intravascular disseminada pode levar ainda a problemas mais graves, como hemorragia e infarto cerebral. O infarto cerebral pode ser devido à isquemia causada pela vasoconstrição que é induzida pela droga ou pela formação de coágulos (possivelmente relacionado com a desidratação e coagulopatia induzida pelo *Ecstasy*) (HUGHES; MCCABE; EVANS, 1993). Já a hemorragia cerebral é comum entre usuários de substâncias psicoestimulantes principalmente devido à hipertensão induzida pelo fármaco (que pode levar a ruptura de vasos sanguíneos do cérebro) (CHASIN, 1990; HUGHES; MCCABE; EVANS, 1993; ROTHWELL; GRANT, 1993).

A hiponatremia é outro efeito adverso associado ao uso de MDMA que não se manifesta durante a utilização de outras anfetaminas (HALL, 1997; SUE; LEE; HUANG, 2002; TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002). Este efeito parece ser raro, ainda pouco estudado, mas pode estar associado à morbidade e mortalidade relacionadas ao fármaco. Sue, Lee e Huang (2002) relatam ter conhecimento de apenas 14 casos deste tipo de efeito por usuários de *Ecstasy*. Este efeito adverso causado pela MDMA pode estar associado com a síndrome da secreção inapropriada de hormônio antidiurético (ADH), uma vez que a MDMA é um agonista serotoninérgico e existem evidências de que a liberação de ADH seja mediada por este neurotransmissor (SUE; LEE; HUANG, 2002; TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002).

Os sintomas iniciais da hiponatremia aguda ocorrem quando os níveis séricos de sódio caem até valores menores que 120 mEq/L (BAGGOTT; JEROME, 2001), e podem incluir náuseas, vômitos e câibras musculares. Posteriormente, pode ocorrer a instalação de quadro de edema cerebral. Neste estado, os efeitos neurológicos são predominantes e incluem cefaléia, letargia, confusão, estupor, crises convulsivas e coma (SUE; LEE; HUANG, 2002; TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002).

Quando a concentração plasmática de sódio começa a diminuir, a pressão osmótica imediatamente provoca entrada de água para o interior das células. No cérebro, vários mecanismos (incluindo a bomba de sódio-potássio ATPase) culminam na diminuição dos solutos intracelulares na tentativa de prevenir o edema celular. Estes mecanismos podem liberar sódio para dentro do espaço subaracnóide, causando difusão de água do cérebro para o líquido cefalorraquidiano. Se este mecanismo for incapaz de compensar a hiponatremia, haverá aumento da pressão intracraniana, edema cerebral, compressão do cérebro e possivelmente morte (SUE; LEE; HUANG, 2002; TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002).

Sue, Lee e Huang (2002) observaram ainda que, mulheres no período pré-menopausa são mais susceptíveis à hiponatremia e a crises de epilepsia após o uso de *Ecstasy*, uma vez que os níveis de estrógeno parecem ter efeito sobre a resposta antidiurética da vasopressina, contribuindo para a eliminação de sódio. O quadro de hiponatremia pode ainda ser agravado pelo consumo excessivo de água que normalmente acompanha o uso de *Ecstasy*.

3.2.1. Hepatotoxicidade

O consumo de *Ecstasy* foi relatado como sendo a segunda causa mais freqüente de hepatotoxicidade na Espanha entre jovens de até 25 anos (ANDREU et al., 1998).

O uso de MDMA pode causar alterações hepáticas graves, manifestadas principalmente por icterícia, hepatomegalia, necrose centrolobular, hepatite, anorexia, náusea, vômito e urina com coloração escura (relacionada ao aumento na quantidade de urobilinogênio presente na urina, causada pela elevada formação e excreção de bilirrubina decorrente da hemólise provocada pela hipertermia e coagulação intravascular disseminada)

(BEITIA et al., 2000; MOTTA, 2000; BAGGOTT; JEROME, 2001). A hepatotoxicidade pode ocorrer após o uso de um único comprimido (ELLIS et al., 1996) ou após meses de uso regular da droga (ANDREU et al., 1998). De um modo geral, a falência hepática aguda pode ocorrer logo após o uso de *Ecstasy*, enquanto que a hepatite pode se desenvolver ao longo de semanas após o uso da droga. A gravidade dos danos hepáticos não parece estar relacionada com a quantidade ou frequência de utilização, o que sugere um tipo de reação idiossincrática (ELLIS et al., 1996; BEITIA et al., 2000).

As lesões hepáticas aparecem com maior frequência entre os usuários que manifestam quadro de hipertermia. Contudo, os danos hepáticos nestes casos são causados em parte devido ao efeito da temperatura corpórea, e parte devido à ação da MDMA e seus produtos de biotransformação sobre o fígado. Estudos *in vitro*, conduzidos em condições experimentais que simulavam a hipertermia com hepatócitos de camundongo, mostraram que a MDMA aumenta a peroxidação lipídica e diminui a viabilidade das células hepáticas (CARVALHO; CARVALHO; BASTOS, 2001).

Os organismos vivos possuem vários sistemas de eliminação de radicais livres. A forma reduzida da glutathione neutraliza muitas formas de radicais livres de forma direta ou em associação com a enzima glutathione peroxidase. Depleção nos níveis de glutathione reduzida, especialmente no fígado, pode causar lesões irreversíveis e morte celular. Esta forma de glutathione desempenha importante função na proteção das células contra espécies reativas de oxigênio, sendo que sua depleção pode agravar a toxicidade induzida por radicais livres. Desta forma, a diminuição na quantidade de glutathione é um marcador precoce de danos causados por radicais livres e constitui evidência observável de morte celular. Beitia et al. (2000) observaram que a administração de única dose de MDMA (20 mg/kg) a ratos Wistar, não causou alterações significativas nos níveis de glutathione. Contudo, no mesmo estudo,

estes autores observaram que a administração repetida deste fármaco produziu quantidade suficiente de radicais livres para causar depleção de glutathione, além de observarem tendência na diminuição da atividade da enzima glutathione peroxidase. Durante o experimento de administração repetida de MDMA, os autores observaram ainda um aumento desproporcional da atividade da enzima AST (aspartato aminotransferase) comparada com a atividade da ALT (alanina aminotransferase). Este efeito é frequentemente classificado como um importante marcador de necrose celular (ELLIS et al., 1996; BEITIA et al., 2000).

3.2.2. Nefrotoxicidade

Nos últimos anos, vários casos de falência renal secundária ao consumo de *Ecstasy* têm sido relatados (BINGHAM et al., 1998; CARVALHO et al., 2002). A falência renal aguda pode ocorrer quando coágulos de fibrina/plaquetas ou de mioglobina, que são liberados das células musculares lesadas, precipitam e bloqueiam os túbulos renais. A desidratação facilita o desenvolvimento deste tipo de problema renal e pode levar ao acúmulo de substâncias, que deveriam ser depuradas e eliminadas no sangue, podendo causar danos secundários a outros tecidos ou órgãos (BAGGOTT; JEROME, 2001; CARVALHO et al., 2002). Segundo Baggott e Jerome (2001), a falência renal aguda ocorre em 24% dos usuários de *Ecstasy* que apresentam quadro de hipertermia. Ocorre também nos casos onde ocorreu rabdomiólise, mas que não houve evidência de hipertermia. Este processo pode culminar em isquemia renal súbita e/ou necrose tubular aguda (CARVALHO et al., 2002).

3.2.3. Neurotoxicidade

Uma característica observada a respeito dos efeitos da MDMA no Sistema Nervoso Central, é que este fármaco induz alterações significantes na liberação e recaptação de serotonina pelos neurônios, e estas alterações podem persistir por longos períodos mesmo após o fármaco já ter sido biotransformado e eliminado. Experimentos com ratos mostram que a MDMA dispara uma rápida liberação de serotonina no cérebro seguida por significativa diminuição nos níveis de serotonina que persistem por pelo menos sete dias após a administração (NIDA, 2001). As reduções mais significativas de serotonina ocorreram no córtex prefrontal, córtex estriado e hipocampo, com menor redução no hipotálamo e nos núcleos da base do cérebro (COLE et al., 2002).

O uso crônico de MDMA pode levar ao desenvolvimento de neurotoxicidade, especialmente dos neurônios serotoninérgicos, como foi observado em estudos *in vitro* com animais de experimentação. Devido a limitações metodológicas e éticas, os efeitos do uso crônico de metilenodioxianfetaminas ainda é restrito a exames por imagem e aplicação de questionários. Em humanos, o uso de MDMA é associado à depressão, debilidade da atuação cognitiva e atuação anormal dos neurônios serotoninérgicos quando analisados por tomografia de emissão de positrons (PET). Estudos realizados no líquido cefalorraquidiano de usuários de MDMA demonstraram uma redução nos níveis de 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético), produto de degradação da serotonina, achado que confirma a neurotoxicidade desta substância (TRAUB; HOFFMAN; NELSON, 2002). O 5-HIAA é excretado na urina e atua como indicador da produção de serotonina no organismo, sendo originada a partir de desaminação oxidativa catalisada pela monoamina-oxidase, seguida por oxidação catalisada pela enzima aldeído desidrogenase, havendo relação direta entre a diminuição dos níveis de serotonina e a concentração de 5-HIAA (RANG; DALE; RITTER, 2001; BUSH; MAYER, 2003).

Uma hipótese para explicar a neurotoxicidade causada pela MDMA no sistema serotoninérgico, é que este fármaco induz tanto estresse oxidativo quanto metabólico nestes neurônios que, como consequência, têm diminuída sua capacidade de produzir serotonina. O suporte para esta hipótese vem de uma variedade de estudos, incluindo aqueles mostrando que a MDMA provoca alterações na atividade de várias enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e que o aumento artificial (induzido em experimentos) dos níveis destas enzimas diminui os efeitos da MDMA sobre os neurônios serotoninérgicos (NIDA, 2001).

Estudos sobre a ação farmacológica da MDMA no Sistema Nervoso Central realizados com animais ou humanos, revelaram que esta substância possui efeito tóxico sobre os neurônios serotoninérgicos, e presume-se que seus análogos possuam mecanismo farmacológico similar (WEINMANN; BOHNERT, 1998). Estudos com ratos e primatas têm demonstrado efeitos neurotóxicos seletivos no sistema serotoninérgico central após a administração de única ou de múltiplas doses de MDMA. Esta toxicidade é secundária à depleção de serotonina e aos danos causados na região terminal dos axônios e implicam em perda dos sítios de recaptção de serotonina. Estudos clínicos sobre a toxicidade crônica da MDMA em humanos são escassos. Existem evidências de que alguns usuários de MDMA apresentam problemas de memória e verifica-se um aumento na incidência de psicopatologias nestes indivíduos (SEGURA et al., 2001).

Em estudos que empregaram animais de experimentação, a injeção direta de MDMA no cérebro não reproduziu os efeitos neurotóxicos observados após a administração periférica. Este fato sugere que uma possível correlação entre produtos de biotransformação da MDMA e o desenvolvimento de neurotoxicidade (SEGURA et al., 2001). É postulado que produtos como a 3,4-dihidroxi metanfetamina (HHMA), principal produto de biotransformação da

MDMA em ratos e preparações microssomais de fígado humano, podem estar relacionados com este tipo de efeito pela formação de adutos com glutathione e outros compostos endógenos que contenham radicais tióis (DE LA TORRE; FARRE et al., 2000; SEGURA et al., 2001).

Em humanos, a presença da HHMA só foi demonstrada em estudos *in vitro*, aparecendo como principal produto da biotransformação da MDMA. Como visto anteriormente (item 3.2. da toxicocinética), essa via de biotransformação é catalisada parcialmente pela enzima CYP2D6 do Citocromo P-450, que é expressa polimorficamente em humanos, sendo que cerca de 10% da população caucasiana possui deficiência desta enzima, possuindo susceptibilidade diferente à intoxicação aguda e aos efeitos neurotóxicos da MDMA (ORTUÑO et al., 1999; BAGGOTT; JEROME, 2001; SEGURA et al., 2001). As concentrações plasmáticas e urinárias da HHMA são equivalentes a quantidades de MDMA presentes nessas matrizes. Este produto possui alta reatividade e instabilidade devido à sua estrutura química, sendo encontrado apenas na forma conjugada nos materiais biológicos (ORTUÑO et al., 1999; SEGURA et al., 2001).

Porquanto as três substâncias enfocadas neste trabalho tenham potencial de provocar neurotoxicidade, a maioria dos artigos a respeito evidenciam a neurotoxicidade serotoninérgica associada ao uso de MDMA em estudo com animais e humanos. Este fato é explicado devido à toxicidade mais elevada deste último em relação aos outros, o que explica conduta ético-científica de autores que, para estudar a cinética destes compostos em voluntários humanos, optam pela administração da MDEA ao invés da MDMA (PARROTT, 2002). Os resultados obtidos em vários estudos realizados com animais sugerem uma redução dose-dependente da atividade serotoninérgica após exposição repetida à MDMA. Atualmente, pouco se sabe sobre a neurotoxicidade em humanos associado ao uso de MDMA. Embora ainda não seja demonstrado o nexo causal, pode-se conjecturar que este tipo de lesão ao sistema

serotonérgico, seria responsável pelos possíveis efeitos neuropsiquiátricos e falhas cognitivas (FREESE; MIOTTO; REBACK, 2002).

A co-administração de inibidores seletivos da recaptação de serotonina parece, além de atenuar os efeitos das metilenodioxianfetaminas, proporcionar também uma ação neuroprotetora (BAPTISTA, 2002).

5. ASPECTOS ANALÍTICOS

Os métodos utilizados na análise de metilenodioxianfetaminas em materiais biológicos podem ser compostos a partir de diferentes procedimentos de extração, separação, identificação e quantificação dos analitos presentes na amostra. A seleção da técnica de extração a ser utilizada, bem como o tipo de equipamento empregado na identificação e quantificação, deve levar em consideração além da finalidade a que se destina a análise e, portanto, da sensibilidade requerida, o tipo de equipamento disponível para a execução dos trabalhos. Em análises forenses, deve-se buscar sempre a elaboração de métodos sensíveis, seletivos e específicos, permitindo ao analista a emissão de resultados inquestionáveis e irrefutáveis, uma vez que tais resultados com frequência são utilizados como parte de processos judiciais, que poderão culminar com a condenação ou absolvição de um réu. Assim, no emprego de métodos cromatográficos em análises quantitativas de xenobióticos é necessário que o procedimento analítico empregado possa garantir com qualidade e confiança adequada o valor do dado gerado durante análises em materiais biológicos (CAUSON, 1997; CHASIN, 2001; SOFT/AAFS, 2002). A Tabela 2 apresenta os principais métodos analíticos citados na literatura científica internacional para determinação de derivados anfetamínicos, como a MDMA e seus análogos.

Tabela 2 – Métodos analíticos utilizados nas análises de derivados anfetamínicos.

material biológico	analito	extração	técnica analítica	referência
cabelo	MDMA, MDEA, MDA, MBDB, AN	SPME	CG/EM	Gentili, Cornetta e Macchia, 2004
saliva	MDMA, MDEA, MBDB, AN, MA	SPME	CG/EM	Fucci, Gionanni e Chiarotti, 2003
urina	MDMA, MDEA, MDA, AN, MA	SPME	CG/FID	Raikos et al., 2003
urina	MDMA, MDEA, MDA, MBDB, AN	EEL	CG/EM	Pellegrini et al., 2002
sangue, urina	MDMA, MDA, HMMA, HMA	SPE	CG/EM e EC/DAD	Pizarro et al., 2002
cabelo	MDMA, MDEA, MDA	SPE	CG/EM	Skender et al., 2002
saliva, plasma	MDMA, MDA, HMMA	SPE	CG/EM	Navarro et al., 2001
urina	MDMA, MDA, AN, MA	SPME	CG/EM	Jurado et al., 2000
plasma, soro	MDMA, MDA, HMMA, HMA	SPE	CG/EM e CG/DNP	de la Torre et al., 2000
plasma	MDMA, MDA, NA	SPE	CG/DNP	Mas et al., 1999
plasma, urina	MDMA, MDA, HMMA, HMA	SPE	CG/DNP	Ortuño et al., 1999
urina	MDMA, MDEA, MDA	SPME	CG/EM	Battu et al., 1998
comprimidos	MDMA, MDEA, MDA	diluição	CG/DNP e CG/EM	Silva, Yonamine, Reinhardt, 1998
soro, urina, cabelo, tecidos	MDEA, MDMA	ELL; SPE	CG/EM	Weinmann & Bohnert, 1998
sangue total	MDMA, MDEA, MDA, AN, MA	ELL	CG/EM	Marquet et al., 1997
cabelo	MDMA, MDEA, MDA	SPE	CG/EM	Rothe et al., 1997
sangue, urina, tecidos	MDMA, MDA, MDEA, AN	SPE	CG/EM e CG/DNP	Tamayo, Tena e Rodríguez, 1997

Continua

urina	MDMA, MDEA, AN, MA	SPME	CG/EM	Centini, Masti e Comparini, 1996
urina, sangue, fígado, bile, humor vítreo	MDMA, MDA	ELL/SPE	CG/EM	Moore et al., 1996
cabelo, unha	MDMA, MDA, anfetamina	ELL	CG/EM	Cirimele; Kintz; Mangin, 1995
plasma, urina	MDMA, MDA, HHMA, HMA, HMMA	SPE	HPLC/DAD e CG/EM	Helmlin et al., 1996
plasma, urina	MDEA, MDA, HME	SPE	HPLC/DF	Buechler et al., 2003
sangue, humor vítreo, urina, tecidos	MDMA, MDA	ELL	HPLC/DF	de Letter et al., 2002
sangue, cérebro	MDMA, MDEA, MDA, HMMA, HME	SPE	HPLC/DF	Meyer et al., 2002
plasma, urina, saliva, suor	MDMA, MDEA, MDA	SPE	HPLC/EM-EM	Samyn et al., 2002
plasma	MDEA, MDA, HME	SPE	HPLC/DF	Brunnenberg e Kovar, 2001
sangue total, soro, urina	MDMA, MDA, MDEA	ELL	HPLC/DF	Clauwaert, Bocxlaer e Leenheer, 2001
soro, sangue total, urina, humor vítreo	MDMA, MDEA, MDA	ELL	HPLC/DF	Clauwaert et al., 2000
microsomas hepático	MDMA, MDA	injeção direta	HPLC/DF	Kreth et al, 2000
soro, urina	MDMA, MDEA, MDA, AN, MA	ELL	HPLC/DAD e HPLC/EM	Bogusz, Kala e Maier, 1997
comprimidos	MDMA, MDEA, MDA	dissolução	HPLC/DAD	Rothe et al., 1997
plasma	MDMA, MDA	ELL	HPLC/DAD	Garrett, Seyda e Marroum, 1991
urina	MDMA, MDA, MBDB	ELL	EC/DF	Chung, Liu e Lin, 2001
urina	MDMA, MDEA, MDA, AN, MA	SPE, ELL	EC/DAD	Varesio e Veuthey, 1995
urina	MDMA, MDEA, MDA, MBDB, AN	ELL	EC/EM	Geiser, Cherkaoui e Veuthey, 2000
urina	MDMA, MDA, HMMA	SPE	EC/DAD	Thormann et al., 1998

5.1. Matrizes biológicas utilizadas

As análises em amostras de sangue ou seus derivados (soro ou plasma) são de especial importância, pois através dos níveis sanguíneos de determinado fármaco quase sempre é possível realizar correlações com os efeitos do fármaco sobre o organismo (CHASIN, 1990). Estes achados, aliados a conhecimentos sobre a farmacocinética da substância, ajudam na inferência sobre o momento de uso, quantidade de substância administrada e possíveis alterações psíquicas causadas pelo fármaco no instante do delito.

Em indivíduos vivos, os efeitos fisiológicos da maioria dos fármacos possuem correlação direta com suas concentrações no sangue e seus derivados (plasma e soro), fato que serve de base para a monitorização terapêutica de fármacos. Quando, entretanto as amostras de sangue são coletadas *post-mortem* são necessárias ressalvas, uma vez que fatores como o local de coleta e outros relacionados à redistribuição (cinética *post mortem*) que eventualmente ocorreram quando cessados os fenômenos vitais, podem modificar os valores encontrados (BLANKE; POKLIS, 1996).

A urina constitui importante material biológico para a análise de MDMA e seus análogos, pois neste material as concentrações dos fármacos inalterados (MDMA e MDEA) e de seus produtos de biotransformação são relativamente altas (RAIKOS et al., 2003). Além disso, a urina é, após o humor vítreo que apresenta aproximadamente 98% de água em sua constituição, a matriz biológica com menor número de interferentes endógenos, pois é constituída principalmente por água e somente apresenta níveis significantes de proteína e lipídios (que poderiam interferir no processo de extração e identificação de fármacos) durante estados patológicos. Contudo, os resultados de análises realizadas em amostras de urina oferecem poucas vantagens com relação aos efeitos fisiológicos provocados por determinado

fármaco identificado nesta matriz. Os resultados obtidos em análises realizadas em urina estabelecem apenas que o fármaco/droga de abuso foi administrado, uma vez que a correlação com os efeitos é baixa devido à grande variedade de fatores que afetam a taxa de excreção de determinado composto e o volume urinário (BLANKE; POKLIS, 1996). Nos casos de morte causada por overdose de MDMA, a concentração urinária pode chegar a 170 µg/mL (MOORE et al., 1996; DE LETTER et al., 2002).

O conteúdo estomacal pode constituir amostra de análise *post-mortem*, uma vez que prevalece no estômago a forma inalterada (CHASIN, 1990) e ionizada (aprisionamento farmacocinético) das metilenodioxianfetaminas, que podem estar presentes tanto na forma de resíduos da droga ingerida quanto pela possível secreção gástrica, posto que é base fraca e passível de ser secretada para o lúmen estomacal, onde se ioniza e permanece até a posterior reabsorção no duodeno (DE LETTER et al., 2002). Humor vítreo, fragmentos de tecido muscular e vísceras como fígado, rins e cérebro também são materiais utilizados nos casos de necropsia (WEINMANN; BOHNERT, 1998; CLAUWAERT et al., 2000; DE LETTER et al., 2002).

A verificação do uso de drogas de abuso por análise de cabelo é uma ferramenta útil para demonstrar ou excluir a suspeita de uso crônico. Como amostra biológica, o cabelo fornece vantagens particulares como facilidade de obtenção, coleta não invasiva, sem violação da privacidade, maior dificuldade para adulteração, janela de detecção ampla (vários meses) e, principalmente, dispensa cuidados especiais durante o transporte e armazenamento, o que favorece a estabilidade dos analitos (KINTZ; SAMYN, 1999; SKENDER et al., 2002; GENTILI; CORNETTA; MACCHIA, 2004). As principais desvantagens do uso de cabelo como matriz biológica para a verificação do uso de drogas de abuso com aspecto forense é a falta de correlação entre a dose e a concentração do fármaco no cabelo, que impede qualquer

inferência sobre alterações do comportamento do indivíduo momentos antes do óbito e/ou prática criminosa (ROTHER et al., 1997) e a possibilidade de contaminações ambientais (KINTZ; SAMYN, 1999). Rothe et al. (1997), após estudo com usuários de *Ecstasy*, concluíram que a ingestão de um comprimido da droga pode levar a concentrações capilares da ordem de 1 ng/mg.

Outra amostra biológica capaz de fornecer evidências retrospectivas do uso drogas de abuso é a unha. Assim como o cabelo, este tecido queratinizado pode armazenar fármacos administrados por meses (CIRIMELE; KINTZ; MANGIN, 1995). Este tipo de matriz possui praticamente as mesmas vantagens e desvantagens atribuídas ao cabelo como amostra biológica para verificação do uso de drogas de abuso, agravado pelo fato de que a quantidade de amostra de unhas disponível geralmente é escassa (CIRIMELE; KINTZ; MANGIN, 1995).

A saliva também se configura como amostra importante na determinação das metilenodioxianfetaminas. A passagem de fármacos da corrente sanguínea para a saliva já havia sido sugerida desde a segunda metade da década de 1960. Mesmo assim, a utilização de saliva como matriz biológica alternativa vem aumentando muito nos últimos anos, principalmente em estudos de farmacocinética, monitorização terapêutica e na verificação do uso de drogas ilícitas, particularmente por agências que monitoram motoristas de caminhão quanto ao uso de substâncias psicoativas (KINTZ; SAMYN, 1999; FUCCI; GIOVANNI; CHIAROTTI, 2003). A saliva possui ainda a vantagem de que sua coleta não é invasiva e provavelmente se constitui como o único fluido biológico pelo qual se podem traçar paralelos com a concentração sanguínea, podendo ser empregada em estudo de farmacocinética e em análises forenses por permitir correlacionar as concentrações obtidas com alterações comportamentais que possam eventualmente ser causadas pelo fármaco. Contudo, esta matriz

possui janela de detecção de apenas algumas horas e a quantidade de amostra disponível freqüentemente é baixa (KINTZ; SAMYN, 1999; NAVARRO et al., 2001).

Somente estão disponíveis para a difusão para a saliva os fármacos que não estiverem livre na circulação sanguínea, ou seja, aqueles que não estiverem ligados a proteínas plasmáticas. Assim, a baixa taxa de ligação a proteínas (aproximadamente 20%) da MDMA e seus análogos somado ao baixo peso molecular destes compostos, confere a estas substâncias passagem praticamente irrestrita entre o plasma e a saliva (NAVARRO et al., 2001). À semelhança do que acontece no conteúdo estomacal, e por serem estas substâncias bases fracas com elevado pKa e sendo o pH da saliva mais ácido do que o pH sanguíneo, o que promove a ionização dos compostos e impede a difusão para o plasma, resultando em acúmulo na saliva. Samyn et al. (2002), durante um estudo controlado onde foram administrados 75 mg de MDMA a voluntários, observaram que as concentrações de MDMA na saliva geralmente são superiores às concentrações plasmáticas, fato também observado por Navarro et al. (2001). Estes autores observaram ainda que as concentrações do fármaco na saliva apresenta grande variabilidade interindividual e atribuem esta variação à viscosidade e volume da amostra, que podem ser diferentes mesmo intra-indivíduo. Navarro et al. (2001) observaram que o pico de eliminação da MDA na saliva ocorre entre 1,5-4 horas após a ingestão de MDMA e sua concentração representa aproximadamente 5% da concentração salivaria do fármaco inalterado. Já os níveis plasmáticos deste produto de biotransformação apresenta concentração máxima entre 5-6 horas após a administração.

A utilização do suor como matriz alternativa ao sangue e seus derivados para verificação do uso de substâncias psicoativas sempre esbarrou nas dificuldades de coleta inerentes a este fluido biológico. Nos últimos anos, este empecilho parece ter sido resolvido pelo desenvolvimento dos *sweat patch*. O suor também possui a vantagem de não representar

coleta invasiva, não constrangedora e permite controle de indivíduos internados em clínica de tratamento e detentos em liberdade condicional (KINTZ; SAMYN, 1999).

A instabilidade dos analitos na matriz biológica e os fenômenos de redistribuição *post mortem* são interferentes importantes em toxicologia forense. Conhecimentos sobre a estabilidade dos analitos no material biológico são de fundamental importância em várias situações nas análises toxicológicas, uma vez que várias situações acabam por inserir intervalos de tempo variáveis entre a coleta do material, seu transporte até o laboratório e o momento da análise. A MDMA e seus análogos apresentam relativa estabilidade quando presentes em materiais biológicos. Clauwaert, Bocxlaer e Leenheer (2001) estudaram a estabilidade da MDMA, MDEA e MDA em matrizes biológicas como sangue total, soro, água (mimetizando a presença dos fármacos no humor vítreo) e urina durante 21 semanas quando armazenados ao abrigo da luz a -20 , 4 e 20°C . Observaram que estas substâncias não sofreram perda significativa quando presentes na água e urina, em todas as condições de temperatura avaliadas. O mesmo resultado foi verificado para amostras de soro durante até 17 semanas e, até 5 semanas quando a matriz biológica era sangue total. Os autores ressaltam que, após estes períodos, as análises ficam inviáveis devido à degradação sofrida pela matriz biológica, levando à formação de inúmeros interferentes que dificultaram a identificação dos analitos de interesse frente aos demais produtos de decomposição presentes (CLAUWAERT; BOCXLAER; LEENHEER, 2001).

5.2. Técnicas de extração

Como citado no item referente à fase toxicocinética, as quantidades de MDMA e/ou MDEA eliminadas nas formas inalteradas, bem como a quantidade de MDA presente na urina

representam boa parte da quantidade administrada do fármaco. Assim, a pesquisa dos fármacos inalterados e do produto de biotransformação que é eliminado na forma não conjugada é de grande importância para a avaliação do uso de *Ecstasy* ou *Eve*, uma vez que a análise destes compostos dispensa etapa de hidrólise.

Para a determinação dos produtos de biotransformação mono e diidroxilados da MDMA, é necessária etapa de hidrólise anterior ao processo de extração, uma vez que estes produtos são eliminados na forma conjugada com ácido glicurônico. Esta hidrólise pode ser realizada pela ação de ácido clorídrico (mais rápida, eficiente e menor custo) ou pela ação enzimática com o uso de β -glicuronidase/sulfatase (HEMLIN et al., 1996). Alguns dos produtos de biotransformação diidroxilados da MDMA, como a HHMA e a HHA, possuem natureza extremamente instável, o que inviabiliza sua quantificação (HEMLIN et al., 1996).

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas geralmente requer etapas de pré-tratamento da amostra, que visam separar os analitos de interesse de demais compostos presentes na amostra e que são incompatíveis com a coluna cromatográfica (proteínas, por exemplo), além de servir como etapa de concentração das substâncias a serem analisadas, freqüentemente presentes em nível de traços (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Com relação aos procedimentos de extração de MDMA e seus análogos, destacam-se três processos: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*).

A extração líquido-líquido ocorre através da partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), sendo que neste tipo de procedimento, a eficiência da extração depende de fatores como a afinidade dos analitos pelo solvente extrator, razão das fases e número de extrações (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). A afinidade dos analitos pela

fase orgânica pode ser aumentada pelo ajuste de pH (que irá prevenir a ionização das substâncias de interesse). As metilenodioxianfetaminas, por serem bases fracas (pK_a maior do que 8,5), são melhor extraídas de fluidos biológicos por solventes orgânicos se o pH da fase aquosa for ajustado a valores em torno de 9,0. Muitos artigos na literatura internacional mencionam a utilização da ELL, principalmente devido à sua simplicidade (CIRIMELE; KINTZ; MANGIN, 1995; MOORE et al., 1996; WEINMANN; BOHNERT, 1998; CLAUWAERT; BOCXLAER; LEENHEER, 2001; DE LETTER et al., 2002).

O uso de colunas de extração em fase sólida como processo alternativo à tradicional ELL aparece com grande frequência em publicações científicas (HEMLIN et al., 1996; MOORE et al., 1996; ROTHE et al., 1997; TAMAYO; TENA; RODRÍGUEZ, 1997; WEINMANN; BOHNERT, 1998; MAS et al., 1999; NAVARRO et al., 2001; SAMYN et al., 2002; SKENDER et al., 2002). Possui a vantagem de evitar a formação de emulsão, de ser mais rápida que os processos tradicionais de extração e de suprimir as passagens de purificação e, conseqüente aumento na porcentagem de recuperação das substâncias analisadas (CHASIN, 1990). A SPE utiliza colunas de sílica quimicamente ligada a diferentes tipos de radicais orgânicos, que são escolhidos de acordo com o tipo de análise pretendida, sendo que os mais utilizados nas análises de metilenodioxianfetaminas são as fases de sílica ligada ao radical octadecil ou a radicais aniônicos.

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica moderna em que os processos de extração e pré-concentração dos analitos ocorrem de modo diferente ao observado na extração líquido-líquido e na extração em fase sólida (PIRES; VALENTE, 2000; SNOW, 2000; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Neste procedimento se emprega uma fibra de sílica fundida, recoberta com um filme delgado de polímero que pode possuir espessura variável (nas análises de metilenodioxianfetaminas o polímero mais utilizado é o

polidimetilsiloxano de 100 µm de espessura), sendo que seu acondicionamento se dá dentro da agulha de uma espécie de microseringa. A extração através desta técnica pode ser conduzida de dois modos diferentes: através do contato direto da fibra com a amostra biológica, em condições controladas de agitação e tempo de contato; ou através da exposição da fibra ao *headspace*, onde a amostra é aquecida e agitada sob condições bem estabelecidas para que os componentes voláteis sejam adsorvidos à fibra. Após a extração, os analitos presentes na fibra são desorvidos pela ação térmica do bloco de injeção do cromatógrafo gasoso ou pelo contato com a fase móvel em interface apropriada para o cromatógrafo líquido. A SPME apresenta vantagens significativas com relação a ELL e SPE, por ser um procedimento analítico mais simples e rápido, fornecer extratos mais limpos e, por consequência, melhores cromatogramas. Evidente proteção ao analista e ao meio ambiente, também são vantagens desta técnica, uma vez que não são utilizados solventes orgânicos na eluição, além da facilidade de automação (BATTU et al., 1998; UGLAND; KROGH; RASMUSSEN, 1999; LORD; PAWLISZYN, 2000; PAWLISZYN; LORD, 2000; THEODORIDIS; KOSTER; JONG, 2000; MESTER; STURGEON; PAWLISZYN, 2001; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; WILSON et al., 2001; KUMAZAWA; LEE; SUZUKI, 2003). Contudo, este procedimento de extração ainda é economicamente inviável para os laboratórios forenses do Brasil.

A associação da SPME com amostragem por *headspace* (onde a fibra não é mergulhada no material biológico, mas sim exposta à fração volátil da amostra presente em frasco fechado e aquecido) é de especial interesse durante as análises de derivados anfetamínicos, uma vez que estes compostos apresentam considerável semi-volatilidade. Esta composição de técnicas, além de fornecer as vantagens inerentes ao *headspace* (cromatogramas com menor número de interferentes) apresenta ainda a vantagem de aumentar a vida média da fibra quando comparada a SPME com imersão da fibra no material biológico.

Battu et al. (1998) descreve um método de triagem para 21 derivados anfetamínicos através da SPME e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Pelas facilidades fornecidas durante o processo de análise, a extração por *headspace*-SPME com análise por cromatografia gasosa representa a maioria dos procedimentos observados na literatura internacional consultada para análise de MDMA e seus derivados (CENTINI; MASTI; COMPARINI, 1996; BATTU et al., 1998; UGLAND; KROGH; RASMUSSEN, 1999; JURADO et al., 2000; LORD; PAWLISZYN, 2000; THEODORIDIS; KOSTER; JONG, 2000; WILSON et al., 2001; FUCCI; GIOVANNI; CHIAROTTI, 2003; KUMAZAWA; LEE; SUZUKI, 2003; RAIKOS et al., 2003; GENTILI; CORNETTA; MACCHIA, 2004).

A utilização de padrão interno, substância que apresenta similaridade estrutural e físico-química aos analitos de interesse, pode minimizar os erros provenientes de perdas que eventualmente ocorram durante o procedimento de extração, e que podem acarretar grande variação na quantificação dos analitos. O uso de isótopos estáveis (substâncias deuteradas) como padrão interno é extremamente difundido e recomendado quando a detecção é conduzida por espectrometria de massas, uma vez que este equipamento faz a distinção dos analitos e do padrão interno baseado na relação massa/carga (m/z) dos íons formados após a fragmentação da molécula (BATTU et al., 1998; SOFT/AAFS, 2002). Quando, entretanto, a detecção está baseada na utilização de métodos óticos (freqüentemente empregados após separação por cromatografia líquida) ou ainda, utiliza-se detectores mais simples em cromatografia gasosa (como os de ionização em chama ou em chama alcalina), é necessário que se busque compostos similares aos analitos. Durante as análises de metilenodioxianfetaminas, as substâncias mais freqüentemente citadas como padrão interno são o 3,4-metilenodioxipropilamfetamina (MDPA) (CLAUWAERT; BOCXLAER;

LEENHEER, 2001), a metanfetamina (MA) (HELMMLIN et al., 1996), N-etilamfetamina e para-metoxiamfetamina (PELLEGRINI et al., 2002).

5.3. Técnicas de separação e identificação

As principais técnicas de identificação das metilenodioxiamfetaminas e seus produtos de biotransformação presentes em material biológico são imunoensaios, cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*) e eletroforese capilar (EC).

Imunoensaios como radioimunoensaio, enzima-imunoensaio e imunoensaio por fluorescência polarizada são técnicas normalmente utilizadas como procedimentos de triagem, sendo que seus achados invariavelmente devem ser confirmados por técnicas mais específicas e sensíveis (CHASIN, 1990; 2001). Entidades internacionais, como o do *National Institute on Drug Abuse* (NIDA) e o *Federal Workplace drug testing* estabelecem como 1000 ng/mL valor de *cut-off* para amfetamina e metanfetamina em amostra de urina, o que resultou na elaboração de *kits* de imunoensaio com elevados limites de detecção (PELLEGRINI et al., 2002). Também por esta razão, a maioria das técnicas de imunoensaios disponíveis comercialmente para derivados amfetamínicos são desenvolvidas para a detecção de amfetamina e/ou metanfetamina.

Estas técnicas apresentam várias limitações como reações cruzadas entre compostos amfetamínicos, o alto valor de *cut-off* que permite detecção apenas do uso recente da droga de abuso; possibilidade de resultados falso positivos com fármacos como efedrina e ranitidina, (BOGUSZ; KALA; MAIER, 1997; BATTU et al., 1998; PELLEGRINI et al., 2002) e

finalmente, estes ensaios apresentam custo considerável o que inviabiliza sua utilização na rotina dos laboratórios forenses do Brasil.

A cromatografia em fase gasosa, utilizando detector seletivo de nitrogênio e fósforo, tem sido utilizada com significativa frequência na determinação de MDMA, seus análogos e produtos de biotransformação em fluidos biológicos, principalmente devido à alta especificidade e sensibilidade deste tipo de detector e a não necessidade da etapa de derivação (TAMAYO; TENA; RODRÍGUEZ, 1997; SILVA; YONAMINE; REINHARDT, 1998; MAS et al., 1999; ORTUÑO et al., 1999; DE LA TORRE; FARRÉ et al., 2000). Quantidades da ordem de 3 a 10 ng/mL em plasma podem ser quantificadas com alta precisão pelo uso deste detector (DE LA TORRE; FARRÉ et al., 2000).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) é a técnica instrumental mais utilizada (CENTINI; MASTI; COMPARINI, 1996; MARQUET et al., 1997; BATTU et al., 1998; ORTUÑO et al., 1999; JURADO et al., 2000; PELLEGRINI et al., 2002; PIZARRO et al., 2002; FUCCI; GIOVANNI; CHIAROTTI, 2003; RAIKOS et al., 2003; GENTILI; CORNETTA; MACCHIA, 2004) na identificação da MDMA e seus análogos presentes em material biológico, oferecendo grande sensibilidade e especificidade. Contudo, neste tipo de sistema analítico faz-se necessária etapa prévia de derivação da MDMA, seus análogos e produtos de biotransformação, com o objetivo de melhorar o comportamento cromatográfico de aminas primárias e secundárias (ORTUÑO et al., 1999; CLAUWAERT et al., 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência é outra técnica frequentemente citada na literatura internacional (GARRETT; SEYDA; MARROUM, 1991; BOGUSZ; KALA; MAIER, 1997; CLAUWAERT et al., 2000; BRUNNENBERG; KOVAR, 2001; MEYER et al., 2002; BUECHLER et al., 2003). A grande vantagem da cromatografia líquida é que esta

técnica dispensa a etapa prévia de derivação, necessária para análise de metilenodioxianfetaminas por CG (CLAUWAERT et al., 2000). A detecção por arranjo de diodos é citada para a análise da MDMA em urina e plasma (ORTUÑO et al., 1999), mas este sistema de detecção possui baixa sensibilidade devido à baixa absorvidade destes compostos (CLAUWAERT et al., 2000). A detecção eletroquímica pode ser utilizada durante análise dos produtos de biotransformação hidroxilados da MDMA (HMMA, HMA, HME) (ORTUÑO et al., 1999; BRUNNENBERG; KOVAR, 2001). O detector de fluorescência é sem dúvida o mais utilizado na detecção de MDMA e seus análogos após separação no HPLC, pois aproveita-se da fluorescência natural destas substâncias fornecendo análises de alta sensibilidade e especificidade, mesmo durante estudos em materiais biológicos complexos como sangue total (CLAUWAERT et al., 2000). A cromatografia líquida de alta eficiência é ferramenta útil durante as análises enantioméricas. Neste caso são utilizadas colunas de fase estacionária quiral ou são adicionados à fase móvel modificadores que permitem a separação dos isômeros da MDMA e seus análogos (BRUNNENBERG; KOVAR, 2001; MEYER et al., 2002; BUECHLER et al., 2003).

Nos últimos anos, a eletroforese capilar (EC) vem ganhando espaço e se consagrando, à semelhança da cromatografia em fase gasosa ou líquida, como técnica de separação de grande utilidade para análises de fármacos em materiais biológicos. Diferentemente das técnicas cromatográficas, na eletroforese a separação dos compostos ocorre sob influência de um campo elétrico. Na EC, as separações são conduzidas em tubos capilares com dimensões de 15 a 100 µm de diâmetro e 30 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor e submetido à ação de um campo elétrico elevado (THORMANN et al., 1998; PIZARRO et al., 2002; LIMA, 2003).

6. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica adequada para determinação de MDMA, MDEA e MDA em amostras de sangue total e urina, com vistas ao estabelecimento do diagnóstico laboratorial do uso de *Ecstasy* e/ou *Eve*.

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

- Ψ Revisão dos métodos analíticos existentes na literatura para identificação e quantificação de MDMA, MDEA e MDA em material biológico;
- Ψ Desenvolvimento e validação de um método para análise destas substâncias em sangue total e urina empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência;
- Ψ Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras provenientes do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo, coletadas durante o mês de março de 2004.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Material

7.1.1. Equipamentos, vidrarias e acessórios

- cromatógrafo líquido de alta eficiência Hewlett Packard® modelo 1100 Series, composto por degaseificador a vácuo (G1322A), bomba binária (G1312A), injetor automático (G1313A), compartimento de coluna com termostato (G1316A), detector de arranjo de diodos – DAD (G1315A) e detector de fluorescência HP1046A. O sistema cromatográfico era acoplado a computador modelo Vectra XM 4-5/150, e controlado através do software ChemStation;
- coluna cromatográfica Spherisorb ODS2 (150 x 4 mm, 5 µm), Hewlett Packard®;
- frascos âmbar com capacidade de 2,0 mL, septos de silicone e tampas de rosca Hewlett Packard®;
- sistema de purificação de água Milli-Q Plus, Millipore®;
- banho de ultra-som Thornton®;
- peagâmetro digital DMPH-2, Digimed®;
- filtros Millex em polietileno com membrana Durapore®, poro de 0,45 µm, 13 mm de diâmetro, não estéril, Millipore®;
- membrana de celulose MFS®, poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro;

- conjunto para filtração a vácuo composto de funil, base e tampa tubulada em vidro borosilicato e garra de alumínio anodizado, Millipore®;
- balões volumétricos de 5, 10 e 25 mL;
- seringas de vidro com capacidade para 5 mL;
- pipetas automáticas Finpipette®, Labsystems com diferentes capacidades volumétricas;
- balança analítica Sartorius® *research* R200D;
- mesa agitadora de tubos TE-143, Tecnal®;
- agitador mecânico tipo vortex Fanem® 251;
- centrífuga T6000D, Sorvall®;
- bloco de aquecimento com sistema de evaporação *Reacti-therm Heatin*, modelo 18870 Pierce®.

7.1.2. Solventes e reagentes

- acetonitrila, grau de pureza adequado à cromatografia líquida, J.T. Baker®;
- metanol Omnisolv, grau de pureza adequado à cromatografia líquida, Merck®;
- dodecil sulfato de sódio, grau de pureza superior a 99%, Pharmacia Biotech®;

- acetato de etila, n-hexano, cloreto de sódio, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram de grau analítico, Sigma[®].

7.1.3. Condições cromatográficas

7.1.3.1. Fase móvel

Eluente A: solução de dodecil sulfato de sódio foi preparada em água purificada no sistema Milli-Q Plus, na concentração de 50 mM (14,40 g de dodecil sulfato de sódio em 1000 ml de água purificada). O pH desta solução foi ajustado a 4,0 em peagâmetro utilizando solução de ácido clorídrico 0,1 M;

Eluente B: acetonitrila.

A fase móvel utilizada nas análises foi composta de mistura isocrática na proporção 60% (v/v) do eluente A e 40% do eluente B. A fase móvel foi filtrada através de filtro Millipore 0,45 µm e degaseificada sob vácuo antes do uso.

7.1.3.2. Sistema de detecção

A detecção dos analitos valeu-se da capacidade intrínseca destas substâncias de emitir fluorescência. Por esta razão foi utilizado detector de fluorescência, com comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) e de emissão (λ_{em}) ajustados em 288 nm e 324 nm, respectivamente. As condições de atenuação do sinal gerado pelo detector foram ajustadas de acordo com a matriz biológica analisada, uma vez que segundo a literatura internacional a concentração urinária dos analitos é superior as encontradas em sangue.

7.1.4. Soluções-padrão

Soluções-padrão de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butanamina (MBDB, padrão interno) na concentração de 1,0 mg/mL em metanol foram obtidas da Cerilliant[®], Round Rock, TX, USA.

Foram preparadas soluções de trabalho de MDMA, MDEA e MDA a partir de diluições das soluções-padrão, obtendo-se concentrações finais de 0,2, 0,4, 1, 2, 4 e 20 µg/mL (para realização das análises em sangue total) e 1,2, 2, 4, 8, 20, 40 e 80 µg/mL (para realização das análises em urina).

A partir da solução-padrão de MBDB foram preparadas soluções de trabalho em metanol, obtendo-se concentração final de 4 µg/mL (padrão interno das análises em sangue total) e 20 µg/mL (padrão interno das análises em urina).

Soluções padrão de cafeína, cetamina, cocaína, dextrometorfano, dietilpropiona, efedrina e femproporex na concentração de 1,0 mg/mL em metanol foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo e foram utilizadas na pesquisa de possíveis interferentes para as análises.

Todas as soluções (padrão e de trabalho) foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração (-20°C).

7.1.5. Amostras de sangue total

7.1.5.1. Amostras de sangue total referência negativa

Sangue total proveniente de clínica médica do Instituto Médico Legal de São Paulo encaminhados ao Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo (NTF/IML/SP) e de cadáveres humanos necropsiados nos postos médico-legais do Estado de São Paulo, sem indicação de uso de MDMA ou seus análogos, conforme notificação expressas nas respectivas requisições de exame toxicológico.

7.1.5.2. Amostras de sangue total selecionadas para análise

Coleção de amostras provenientes de clínica médica do Instituto Médico Legal de São Paulo encaminhados ao Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo (NTF/IML/SP) no período compreendido entre 01 de março e 01 abril de 2004, sem qualquer especificação. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em reunião realizada em 30 de setembro de 2002 e comunicado através do Ofício CEP nº 89/2002.

7.1.6. Amostras de urina

7.1.6.1. Amostras de urina referência negativa

Urina colhida de voluntários não usuários de MDMA ou seus análogos. Durante a seleção destas amostras, não foi feito nenhum questionamento ou restrição quanto ao uso de medicamentos a fim de avaliar a especificidade do método proposto.

7.1.6.2. Amostras de urina selecionadas para análise

Coleção de amostras provenientes de clínica médica do Instituto Médico Legal de São Paulo encaminhados ao Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo (NTF/IML/SP) no período compreendido entre 01 de março e 01 abril de 2004, sem qualquer especificação.

7.1.7. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi feito através dos softwares de computador Microsoft[®] Excel 2000 e Microcal[®] Origin 6.0.

7.2. Métodos

7.2.1. Procedimentos de extração

7.2.1.1. Técnica proposta para extração de MDMA, MDEA e MDA em sangue total

Foram transferidos 2 mL de sangue total enriquecidos com 50 µL de solução metanólica do padrão interno MBDB (concentração final no material biológico igual a 100 ng/mL), para tubos com capacidade para 15 mL. Foram adicionados 2 mL de solução fisiológica (solução aquosa de cloreto de sódio 0,9%, m/v), 2 g de cloreto de sódio e 500 µL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. Após breve homogeneização em vortex (30 segundos), foram adicionados 5 mL da mistura n-hexano/acetato de etila (7/3, v/v). Os tubos foram então agitados durante 15 minutos em mesa agitadora e, em seguida, centrifugados por 15 minutos a 2500 rpm. Da fase orgânica obtida, tomaram-se 4,7 mL que foram transferidos para béqueres afunilados de 5 mL contendo 50 µL de solução metanólica de ácido clorídrico

5 M e evaporados à secura sob fluxo de nitrogênio em temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados com 250 µL de fase móvel, filtrados em membrana Durapore® (0,45 µm de poro) diretamente para frascos âmbar que foram vedados por septo de silicone e tampa de rosca, adequado para o amostrador automático do cromatógrafo. Este procedimento de extração está ilustrado na Figura 8.

7.2.1.2. Técnica proposta para extração de MDMA, MDEA e MDA em urina

Foram transferidos 4 mL de urina, enriquecidos com 100 µL de solução metanólica do padrão interno MBDB (concentração final no material biológico igual a 500 ng/mL) para tubos com capacidade para 15 mL. Foram adicionados 2 g de cloreto de sódio e 500 µL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. Após breve homogeneização em vortex (30 segundos), foram adicionados 5 mL da mistura n-hexano/acetato de etila (7/3, v/v). Os tubos foram então agitados em mesa agitadora durante 10 minutos e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm. Da fase orgânica obtida, tomaram-se 4,7 mL que foram transferidos para béqueres afunilados de 5 mL contendo 50 µL de solução metanólica de ácido clorídrico 5 M e evaporados à secura sob fluxo de nitrogênio em temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados com 250 µL de fase móvel, filtrados em membrana Durapore® (0,45 µm de poro) diretamente para frascos âmbar que foram vedados por septo de silicone e tampa de rosca, adequado para o amostrador automático do cromatógrafo. Este procedimento de extração está ilustrado na Figura 9.

Figura 8. Fluxograma do procedimento para extração de MDMA, MDEA e MDA em sangue total.

Figura 9. Fluxograma do procedimento para extração de MDMA, MDEA e MDA em urina.

7.2.2. Condições cromatográficas

Amostras de sangue total e urina referência negativa foram enriquecidas com quantidades adequadas de soluções de trabalho dos analitos de interesse e submetidas aos procedimentos de extração descritos no item 7.2.1.. Os extratos obtidos nestes processos foram utilizados para a determinação das melhores condições cromatográficas, avaliadas através dos parâmetros fator de retenção (k), simetria do pico obtido, fator de separação (α) e resolução (R_s).

7.2.2.1. Fator de retenção (k)

O fator de retenção foi calculado através da equação descrita abaixo.

$$k = \frac{\text{tempo de retenção da substância} - \text{tempo de retenção do composto não retido}}{\text{tempo de retenção do composto não retido}}$$

O tempo de retenção do composto não retido foi determinado através da injeção, nas condições cromatográficas descritas acima, de 20 μL de metanol (substância que sabidamente não interage com a coluna cromatográfica octadecil). Como o metanol não apresenta sinal no detector de fluorescência, sua detecção foi feita utilizando detector de arranjo de diodos, com monitoramento em 200 nm.

7.2.2.2. Fator de separação (α)

O fator de separação é obtido através da razão entre os fatores de retenção de dois compostos de eluições adjacentes, conforme a equação:

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

Onde: k_1 e k_2 representam o fator de retenção de dois picos avaliados.

7.2.2.3. Resolução (R_s)

A resolução mede a separação (seletividade) e a largura do pico cromatográfico (eficiência da coluna cromatográfica). O numerador consta da diferença na retenção dos compostos enquanto que o denominador reflete a média da largura dos diferentes picos.

$$R_s = \frac{2(dr_2 - dr_1)}{wb_1 + wb_2}$$

Onde: dr_1 e dr_2 representam a distância ou tempo de retenção dos dois picos avaliados;

wb_1 e wb_2 representam a largura dos picos avaliados.

7.2.3. Otimização do procedimento de extração

7.2.3.1. Avaliação do efeito *salting out*

Visando obter melhores rendimentos nos procedimentos de extração, foi avaliada a influência da adição de cloreto de sódio (NaCl) ao material biológico (*salting out*), procedimento que contribui para um maior deslocamento dos analitos da fase aquosa (sangue ou urina) para a fase orgânica (mistura extratora), por diminuir a solubilidade dos analitos fração aquosa.

Para as análises em sangue total, este efeito foi avaliado pela adição de quantidades crescente de NaCl (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 gramas) em amostras referência negativas enriquecidas com os analitos na concentração de 50 ng/mL. Para as análises em urina, foi verificado se havia diferença significativa entre a média das áreas relativas obtidas após a extração sem a adição de NaCl e a média das áreas relativas obtidas quando foram adicionados 2,0 g do sal. Para este estudo foram utilizadas amostras de urina referência negativas enriquecidas na concentração de 500 ng/mL.

7.2.3.2. Avaliação da precipitação proteica sobre o rendimento da extração

Nas análises de sangue total foi avaliado o efeito da precipitação proteica pelo uso de solução aquosa de ácido tricloroacético 20% (m/v) (TCA 20%). Estes estudos foram conduzidos em amostras de sangue total referência negativa enriquecidas, em triplicata, com soluções de trabalho dos analitos de tal forma que a concentração final foi de 50 ng/mL. A 2 mL destas amostras foi adicionado 1 mL da solução de TCA 20%, sendo o tubo então agitado por 30 segundos em vortex e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido neste processo (de aspecto límpido e transparente) foi utilizado no procedimento descrito no item 7.2.1.1..

Estes resultados foram comparados com aqueles obtidos quando as amostras de sangue total foram diluídas com 2 mL de solução fisiológica e extraídas sem a adição de qualquer solução diluente ou precipitante.

7.2.4. Validação dos métodos propostos

7.2.4.1. Especificidade e seletividade

A especificidade é definida como a capacidade do método analítico em detectar os analitos de interesse presentes em uma amostra na presença dos demais componentes inerentes à matriz biológica (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998). Este parâmetro foi avaliado através das análises de *pool* (mistura de volumes iguais de seis amostras referência negativa) de sangue total e urina.

A fim de se avaliar possíveis substâncias que viessem a interferir nas análises, amostras de sangue total e urina referência negativa foram enriquecidas com soluções padrão dos fármacos cafeína, cetamina, cocaína, dextrometorfano, dietilpropiona, efedrina e femproporex, obtendo concentração igual a 100 µg de cada fármaco por mililitro de material biológico. Estas amostras enriquecidas foram então submetidas aos procedimentos analíticos propostos.

Amostras de urina que apresentaram resultado positivo para anfetaminas pela técnica de Imunofluorescência Polarizada (FPIA) foram obtidas no Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/FCF/USP e submetidas ao procedimento descrito no item 7.2.1.2..

7.2.4.2. Preparação das curvas analíticas

As curvas analíticas para os métodos propostos foram feitas através das análises de amostras de sangue total e urina referência negativa às quais foram adicionadas soluções de

trabalho dos analitos de interesse em concentrações crescentes e, a seguir especificadas, respectivamente para sangue total e urina.

Sangue total

Foi preparado um *pool* de amostras referência negativa de sangue total e que, após a separação em alíquotas, cada uma delas foi enriquecida com 50 µL das soluções de trabalho, para a obtenção dos calibradores nas concentrações 5, 10, 25, 50, 100 e 200 ng/mL (n=6 para cada um dos calibradores). As alíquotas foram submetidas aos procedimentos descritos no item 7.2.1.1. A curva analítica foi obtida pela projeção das concentrações de cada um dos analitos (MDMA, MDEA e MDA) no eixo das abscissas e das relações de áreas referentes a cada um deles e padrão interno (MBDB) no eixo das ordenadas, utilizando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a obtenção da equação da reta. A linearidade, definida como a capacidade do método gerar resultados proporcionais da espécie em estudo, foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) da curva (CHASIN et al., 1998).

Urina

Foi preparado um *pool* de amostras referência negativa de urina e que, após a separação em alíquotas, cada uma delas foi enriquecida com 100 µL das soluções de trabalho, para a obtenção dos calibradores nas concentrações 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng/mL (n=6 para cada um dos calibradores). As alíquotas foram submetidas aos procedimentos descritos no item 7.2.1.1. A curva analítica foi obtida pela projeção das concentrações de cada um dos analitos (MDMA, MDEA e MDA) no eixo das abscissas e das relações de áreas referentes a cada um deles e padrão interno (MBDB) no eixo das ordenadas, utilizando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a obtenção da equação da reta. A linearidade, definida como a capacidade do método gerar resultados proporcionais da espécie

em estudo, foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) da curva (CHASIN et al., 1998).

7.2.4.3. Parâmetros de confiança analítica

Para determinação dos parâmetros de confiança analítica ou figuras analíticas de mérito as amostras de referência negativa de sangue total e urina foram enriquecidas com soluções de trabalho diferentes daquelas utilizadas para enriquecimentos das amostras referência negativa utilizadas na preparação das curvas analíticas.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) foi determinado através da análise de amostras de sangue total e urina referência negativa que foram enriquecidas com soluções de trabalho dos analitos em concentrações decrescentes e considerou-se como LD aquele referente à menor concentração na qual foi possível obter picos integrados pelo equipamento, em seis replicatas, nas condições especificadas (CHASIN et al., 1998).

O limite de quantificação (LQ) foi determinado como a menor concentração que pôde ser determinada com precisão e exatidão adequada (coeficiente de variação $\leq 20\%$) (GOLDBERGER; HUESTIS; WILKINS, 1997; CHASIN et al., 1998).

Imprecisão intra-ensaio e inter-ensaio

A precisão de um método bioanalítico é uma medida do erro aleatório e é definida como a concordância de resultados obtidos durante as análises de replicatas de amostras. Este

parâmetro avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (CAUSON, 1997; GOLDBERGER; HUESTIS; WILKINS, 1997; CHASIN et al., 1998). Neste estudo, a precisão intra-ensaio foi determinada através da análise, em um mesmo dia, de seis replicatas de amostras de sangue total e urina enriquecidas e adicionadas de padrão interno. Para determinação da precisão inter-ensaio foram analisadas, em cinco dias diferentes, três replicatas de amostras de sangue total nas concentrações de 5, 50 e 200 ng/mL e urina nas concentrações de 50, 500 e 2000 ng/mL. Em ambos os casos a imprecisão foi calculada através do coeficiente de variação (CV) das áreas relativas (razão entre área absoluta dos analitos e a área absoluta do padrão interno).

Exatidão

A exatidão de um método bioanalítico é a medida do erro sistemático do processo analítico (CAUSON, 1997). Pode ser definido como a proximidade entre a concentração do analito determinado pela metodologia proposta e a real concentração desta substância no material analisado. Neste estudo, a exatidão foi determinada através da análise de três replicatas de amostras referência negativa de sangue total enriquecidas com soluções de trabalho obtendo concentrações de 5, 50 e 200 ng/mL e urina nas concentrações de 50, 500 e 2000 ng/mL. Os valores de área relativa foram convertidos de concentração de analito por mililitro de amostra através das respectivas equações de regressão linear obtidas das curvas analíticas. A concentração obtida foi comparada com a concentração real presente na amostra, obtendo-se a exatidão do método através da equação:

$$\%Inexatidão = \frac{(concentração\ obtida - concentração\ real)}{concentração\ real} \times 100$$

Recuperação

A eficiência dos procedimentos de extração foi avaliada através da recuperação. A recuperação dos analitos das amostras de sangue total foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando amostras referência negativa enriquecidas com quantidades adequadas das soluções de trabalho e padrão interno, foram submetidas ao processo de extração, em relação à concentração obtida quando amostras referência negativas contendo somente padrão interno passaram pelo processo de extração e a adição da solução de trabalho nas mesmas concentrações que a correspondentes às alíquotas extraídas foram adicionadas imediatamente antes da retomada do resíduo. As análises foram realizadas conforme descrito no item 7.2.1. (n=6) (CHASIN et al., 1998).

7.2.4.3. Estudo da estabilidade

Estabilidade dos analitos na matriz biológica

A estabilidade dos analitos foi determinada através do enriquecimento de amostras referência negativa obtendo-se concentração final igual a 50 ng/mL de urina. A estabilidade na matriz biológica foi avaliada de três formas diferentes:

(a) Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Amostras de urina referência negativa foram enriquecidas e analisadas através dos procedimentos descritos no item 7.2.1.2. (estes resultados foram considerados como sendo os

relativos ao tempo zero do experimento), sendo então congeladas e armazenadas em freezer a -20°C . Estas amostras foram descongeladas e alíquotas foram analisadas 4, 30 e 90 dias após seu preparo, sendo o restante novamente congelado, e os resultados comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

(b) Estabilidade após armazenamento sob refrigeração

Amostras de urina referência negativa foram enriquecidas e analisadas através dos procedimentos descritos no item 7.2.1.2. (estes resultados foram considerados como sendo os relativos ao tempo zero do experimento de estabilidade), sendo então armazenadas sob refrigeração (aproximadamente 10°C). Estas amostras foram alíquotadas e analisadas 1, 4 e 7 dias após seu preparo, e os resultados comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

(c) Estabilidade após armazenamento à temperatura ambiente (estabilidade de bancada)

Amostras de urina referência negativa foram enriquecidas e analisadas através dos procedimentos descritos no item 7.2.1.2. (estes resultados foram considerados como sendo os relativos ao tempo zero do experimento de estabilidade), sendo então armazenadas na temperatura ambiente do laboratório. Estas amostras foram alíquotadas e analisadas 1, 4 e 7 dias após seu preparo, e os resultados comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

7.3. Aplicação da metodologia proposta às amostras de sangue total e urina selecionadas para este estudo

As amostras de sangue total e urina descritas nos itens 7.1.5.2. e 7.1.6.2. foram submetidas aos procedimentos descritos em 7.2.1.1. e 7.2.1.2. Os critérios adotados para as amostras que eventualmente fornecessem concentrações fora dos valores pré-estabelecidos para a curva analítica (intervalo dinâmico) seria o de diluir com matriz biológica referência negativa e proceder a re-análise (CAUSON, 1997).

8. RESULTADOS

8.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas para o método foram otimizadas e os parâmetros cromatográficos encontram-se expressos nas Tabelas 3 e 4. Foi utilizada detecção por fluorescência, com comprimento de onda de excitação ajustado em 288 nm e comprimento de onda de emissão ajustado em 324 nm. A Figura 10 apresenta cromatograma referente a extrato proveniente de amostra de sangue total referência negativa e a Figura 11 mostra cromatograma de amostra de sangue total referência negativo enriquecido com os analitos de interesse na concentração de 50 ng/mL e submetida ao procedimento de extração descrito no item 7.2.1.1..

A Figura 12 apresenta cromatograma referente a extrato proveniente de amostra de urina referência negativa e a Figura 13 mostra cromatograma de amostra de urina referência negativa enriquecida com os analitos de interesse na concentração de 500 ng/mL e submetida ao procedimento de extração descrito no item 7.2.1.2..

Tabela 3 - Tempo de retenção, retenção relativa, fator de retenção e simetria dos picos cromatográficos obtidos para os analitos e padrão interno.

Analito	Tempo de retenção (min)	Retenção relativa *	k	Simetria
MDA	8,035	0,631	7,035	0,867
MDMA	9,768	0,767	8,768	0,781
MDEA	11,490	0,903	10,490	0,806
MBDB	12,729	1,000	11,729	0,867

*Tempo de retenção do analito dividido pelo tempo de retenção do padrão interno (MBDB).

Tabela 4 - Parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a eficiência na separação dos analitos nas condições cromatográficas propostas.

Analito	Fator de separação (α)	Resolução (R_s)
MDA/MDMA	1,246	3,022
MDMA/MDEA	1,196	2,423
MDEA/MBDB	1,118	1,548

Figura 10. Cromatograma de amostra de sangue total referência negativa.

Figura 11. Cromatograma de amostra de sangue total referência negativa enriquecida com MDMA, MDEA e MDA na concentração de 50 ng/mL e padrão interno (MBDB-100 ng/mL).

Figura 12. Cromatograma de amostra de urina referência negativa enriquecida com padrão interno MBDB na concentração de 500ng/mL.

Figura 13. Cromatograma de amostra de urina referência negativa enriquecida com MDMA, MDEA, MDA e MBDB na concentração de 500 ng/mL.

8.2. Otimização do procedimento de extração

8.2.1. Avaliação do efeito *salting out*

Foi observado que a adição de 2,0 g de cloreto de sódio melhorou o rendimento dos procedimentos de extração dos analitos em sangue total (Figura 14) fornecendo valores de área relativa 20,7%, 12,3% e 14,1% para o MDMA, MDEA e MDA, respectivamente. A adição de cloreto de sódio também melhorou o rendimento dos procedimentos de extração dos analitos presentes na urina, como pode ser observado na Tabela 5.

Figura 14. Efeito da adição de cloreto de sódio (NaCl) sobre o processo de extração da MDMA, MDEA e MDA em sangue total.

8.2.2. Avaliação da precipitação proteica sobre o rendimento da extração

A Tabela 6 apresenta os valores de área absoluta e relativa obtidos durante os estudos de precipitação proteica empregando solução aquosa de ácido tricloroacético a 20 % (m/v) como agente precipitante.

Tabela 5 - Efeito da adição de cloreto de sódio sobre o processo de extração de MDMA, MDEA e MDA em urina, avaliado através de suas respectivas áreas relativas.

Analito	Média das áreas relativas (500 ng/ml)		
	Sem adição de NaCl	Com adição de NaCl	Aumento no valor da área relativa (%)
MDMA	0,930	1,004	8,0
MDEA	0,876	0,893	1,9
MDA	0,860	1,052	22,3

Tabela 6 - Médias das áreas absolutas e relativas obtidas após análise de amostras de sangue total enriquecidas (concentração de 50 ng/mL) que sofreram processo de precipitação ou diluição antes do procedimento de extração.

Analito	Diluição com solução fisiológica		Precipitação com TCA 20%	
	Área absoluta	Área relativa *	Área absoluta	Área relativa *
MDMA	176,2	0,616	103,0	0,887
MDEA	191,3	0,668	99,9	0,860
MDA	150,3	0,525	62,5	0,536
MBDB	286,5	1,000	116,4	1,000

* Área absoluta do analito dividida pela área absoluta do padrão interno (MBDB).

8.3. Preparação das curvas analíticas

8.3.1. Curvas analíticas para sangue total

As curvas analíticas (Figuras 15, 16, 17) foram obtidas através dos dados apresentados na Tabela 7. A equação de regressão linear foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados e será utilizada na quantificação da MDMA, MDEA e MDA em amostras de sangue total selecionadas para análise.

Tabela 7 - Áreas relativas obtidas para a elaboração das curvas analíticas dos analitos em sangue total e respectivos coeficientes de variação (%CV).

Concentração (ng/ml)	Área relativa dos analitos					
	MDA	CV* (%)	MDMA	CV* (%)	MDEA	CV* (%)
5	0,041	18,98	0,042	10,77	0,038	18,74
10	0,130	6,53	0,156	12,12	0,109	5,22
25	0,335	4,52	0,384	5,55	0,290	5,03
50	0,585	3,41	0,626	6,74	0,499	3,23
100	1,211	3,56	1,312	3,77	1,050	3,38
200	2,246	2,08	2,610	3,00	2,119	0,74

* Coeficiente de variação.

Figura 15. Representação da curva analítica para a determinação de MDMA nas concentrações sanguíneas de 5 a 200 ng/mL.

Figura 16. Representação da curva analítica para a determinação de MDEA nas concentrações sanguíneas de 5 a 200 ng/mL.

Figura 17. Representação da curva analítica para a determinação de MDA nas concentrações sanguíneas de 5 a 200 ng/mL.

8.3.2. Curvas analíticas para urina

As curvas analíticas (Figuras 18, 19 e 20) foram obtidas através dos dados apresentados na Tabela 8. A equação de regressão linear foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados e será utilizada na quantificação da MDMA, MDEA e MDA em amostras de urina selecionadas para análise.

Tabela 8 - Áreas relativas obtidas para a elaboração das curvas analíticas dos analitos em urina e respectivos coeficientes de variação (%CV).

Concentração (ng/mL)	Área relativa dos analitos					
	MDA	CV* (%)	MDMA	CV* (%)	MDEA	CV* (%)
50	0,140	8,96	0,149	16,21	0,124	12,74
100	0,256	8,82	0,248	7,18	0,233	10,26
200	0,475	8,58	0,440	7,32	0,407	5,52
500	1,140	6,30	1,044	5,77	0,937	4,24
1000	2,235	4,43	2,080	5,18	2,006	2,95
2000	3,350	6,08	3,566	4,09	3,638	2,98

* Coeficiente de variação.

Figura 18. Representação da curva analítica para a determinação de MDMA nas concentrações urinárias de 50 a 2000 ng/mL.

Figura 19. Representação da curva analítica para a determinação de MDEA nas concentrações urinárias de 50 a 2000 ng/mL.

Figura 20. Representação da curva analítica para a determinação de MDA nas concentrações urinárias de 50 a 2000 ng/mL.

8.4. Parâmetros de segurança analítica

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção para a técnica de extração proposta para a análise em sangue total foi de 3 ng/mL para os três analitos. Para a análise em urina os valores de limite de detecção foram de 10 ng/mL, 15 ng/mL e 20 ng/mL para a MDA, MDMA e MDEA, respectivamente.

O limite de quantificação da técnica proposta para as análises em sangue total foi de 5 ng/mL para os três analitos, enquanto que para as análises em urina os limites de quantificação foram 15 ng/mL, 20 ng/mL e 30 ng/mL para a MDA, MDMA e MDEA, respectivamente.

Imprecisão intra-ensaio e inter-ensaio

Os coeficientes de variação obtidos nas análises das concentrações sanguíneas e urinárias estão relacionados na Tabela 9.

Exatidão

A exatidão obtida em diferentes concentrações sanguíneas e urinárias está expressa na Tabela 10.

Recuperação

A recuperação dos analitos obtida em diferentes concentrações sanguíneas e urinárias está expressa na Tabela 10.

Tabela 9 - Coeficientes de variação das concentrações sanguíneas e urinárias de MDMA, MDEA e MDA obtidos nos ensaios de precisão intra e inter-ensaio.

	<i>Concentrações sanguíneas</i>			<i>Concentrações urinárias</i>		
	5 ng/mL	50 ng/mL	200 ng/mL	50 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL
<i>Imprecisão intra-ensaio CV* (%)</i>						
MDMA	10,77	6,74	3,00	6,85	2,05	2,84
MDEA	18,74	3,23	0,74	12,03	3,53	2,07
MDA	12,98	3,41	2,08	6,69	2,49	3,74
<i>Imprecisão inter-ensaio CV* (%)</i>						
MDMA	16,55	11,60	8,52	16,21	5,77	4,09
MDEA	15,78	9,75	4,65	12,74	4,24	2,98
MDA	14,45	13,10	7,82	8,96	3,00	6,08

* Coeficiente de variação.

Tabela 10 – Exatidão e recuperação dos métodos propostos para análise de MDMA, MDEA e MDA em amostras de sangue total e urina, avaliados em diferentes concentrações.

	<i>Concentrações sanguíneas</i>			<i>Concentrações urinárias</i>		
	5 ng/mL	50 ng/mL	200 ng/mL	50 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL
<i>Exatidão(ngml)</i>						
MDMA	4,8	52,1	199,0	42,2	425,2	1860,0
MDEA	4,6	47,1	197,2	45,0	545,5	1916,0
MDA	5,0	49,9	199,2	48,5	541,0	2010,0
<i>Recuperação (%)</i>						
MDMA	67,77	72,11	71,35	86,88	87,11	91,14
MDEA	82,13	85,07	77,02	83,91	88,94	87,81
MDA	90,35	76,33	90,67	91,64	90,08	92,86

8.5. Pesquisa de possíveis fármacos interferentes

Após aplicação dos procedimentos analíticos propostos, nenhum dos possíveis fármacos interferentes foi detectado pelo presente método. Mesmo as amostras de urina positivas para anfetaminas pela técnica de Imunofluorescência Polarizada (FPIA) fornecidas pelo Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/FCF/USP e submetidas ao procedimento descrito no item 7.2.1.2., não apresentaram picos interferentes quando analisadas.

Estabilidade dos analitos na matriz biológica

As Figuras 21, 22 e 23 ilustram os resultados obtidos durante o estudo de estabilidade dos analitos em amostras de urina sob diferentes condições de armazenamento.

Figura 21. Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento.

Não houve variação superior a 20 % (coeficiente de variação) entre as áreas relativas dos analitos obtidas durante o estudo de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

Figura 22. Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após armazenamento sob refrigeração (10°C).

Figura 23. Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após armazenamento a temperatura ambiente (estabilidade de bancada).

Quando as amostras de urina foram armazenadas sob refrigeração (10°C) e em condições ambientais não foram observadas variações entre os valores de área relativa dos analitos superior a 20%.

8.6. Aplicação da metodologia proposta às amostras de sangue total e urina selecionadas para este estudo.

Foram analisadas quatorze amostras de sangue total e vinte amostras de urina. Estas amostras representaram, respectivamente 15,4% (n=91) e 46,5% (n=43) do total de amostras de clínica médica que deram entrada no Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico-Legal de São Paulo, durante o período compreendido entre 01 de março e 01 de abril de 2004. Não foi detectada a presença dos analitos pesquisados neste trabalho em nenhuma das amostras analisadas (LD igual a 3 ng/mL para MDMA, MDEA e MDA para análises realizadas em 2 mL de sangue total e LD igual a 10 ng/mL, 15 ng/mL e 20 ng/mL para a MDA, MDMA e MDEA, respectivamente para 4 mL de urina).

9. DISCUSSÃO

Como já foi descrito anteriormente, este trabalho teve por objetivo apresentar metodologia analítica que possibilite aos laboratórios de toxicologia forense, estabelecer um diagnóstico laboratorial inequívoco da utilização de *Ecstasy* e *Eve* através da análise de seus princípios ativos MDMA e MDEA, respectivamente. Para complementar estas análises, optou-se ainda pela quantificação da MDA, produto de biotransformação originado pela desmetilação dos fármacos citados acima e eliminado na urina na forma livre (sem conjugação com radicais hidrofílicos).

A relevância deste trabalho reside no fato de que, conforme mostrado no relatório elaborado pela Organização das Nações Unidas (ONU), ainda não existe no Brasil qualquer informação sobre o consumo de metilenodioxianfetaminas (UNODC, 2003). O aumento no número de apreensões de comprimidos de *Ecstasy* pela Polícia no Estado de São Paulo e no Brasil são indicativos da tendência de aumento na prevalência e incidência do consumo ilícito de *designer drugs* (UNODC, 2003). A correspondente morbidade e até mesmo a mortalidade relacionada a este consumo não pode ser verificada, a menos que o laboratório forense tenha à disposição metodologia apropriada e criteriosamente validada para que o resultado emitido seja inequívoco e conseqüentemente incontestável (CHASIN, 2001).

Assim, para não comprometer a exequibilidade da análise, os critérios utilizados na escolha da metodologia a ser testada, após revisão da literatura científica, procuraram na medida do possível se adequar às condições técnicas, a serem disponibilizadas nos laboratórios de toxicologia forense do país.

As intoxicações por MDMA ou MDEA não podem ser diferenciadas através da sintomatologia clínica, rigorosamente semelhante para os dois fármacos. Esta diferença pode ser estabelecida com relativa facilidade através de análises toxicológicas em amostras de urina ou sangue onde se pesquise a presença dos fármacos inalterados. Se considerarmos que os comprimidos vendidos como *Ecstasy* possuem apenas MDMA em sua composição e os comercializados com *Eve* contenham apenas a MDEA, espera-se que durante a realização dos

exames em material biológico de usuários de *Ecstasy* seja verificada da presença da MDMA e seu produto de desalquilação a MDA. Já durante as análises de usuários de *Eve* é esperada a presença, além da MDEA, dos respectivos produtos de desalquilação MDMA e MDA. O diagnóstico diferencial da substância utilizada só pode ser feito, portanto, através das análises toxicológicas.

A presença de pequenas quantidades de MDA nos casos onde também seja identificada a presença de MDMA e/ou MDEA é interpretada apenas como presença de produto de biotransformação destes fármacos precursores. Tamayo, Tena e Rodríguez (1997) relataram que nenhuma quantidade significativa desta substância *per se* foi identificada nas amostras provenientes de necropsia analisadas pelos autores, o que confirma a idéia de que a MDA praticamente não é utilizada como droga de abuso. Rothe et al., (1997) analisando amostras de cabelo de usuários e comprimidos apreendidos, concluíram também que a MDA encontrado nas amostras biológicas são provenientes exclusivamente da N-desalquilação da MDMA e/ou MDEA, uma vez que a MDA não foi identificada em nenhum dos 124 comprimidos analisados e esteve presente com frequência nas amostras de cabelo analisadas.

A escolha do material biológico utilizado para realização dos exames levou em consideração principalmente as características toxicocinéticas dos agentes investigados e a finalidade do presente trabalho, qual seja, diagnóstico laboratorial da intoxicação com finalidade de auxílio-diagnóstico nos casos de envolvimento médico-legal.

O sangue é a amostra biológica ideal para se proceder a quantificação de substâncias relacionadas a intoxicações exógenas, através do qual é possível estabelecer relação com os efeitos apresentados, realizar inferência sobre o momento do uso, quantidade de substância administrada, possíveis alterações psíquicas causadas pelo fármaco no instante do delito, bem como afirmar se o fármaco está relacionado com a *causa mortis*. A urina por sua vez é a amostra biológica de eleição para identificação do uso de drogas de abuso com finalidade forense, por possuir menor número de interferentes que as amostras de sangue e vísceras. Soma-se a este fato o fenômeno de que praticamente 50% da quantidade ingerida dos fármacos aqui estudados são eliminados na urina na forma inalterada.

Porquanto úteis em toxicologia forense, as matrizes como humor vítreo, fragmentos de tecido muscular e vísceras (fígado, rins, cérebro e conteúdo estomacal) não são referidos

freqüentemente na literatura em relação a determinação das metilenodioxianfetaminas. Este fato tem relação a estes materiais só estarem disponíveis nos casos de necropsia (WEINMANN; BOHNERT, 1998; DE LETTER et al., 2002). Cabe ainda ressaltar que o número de intoxicações fatais causadas por MDMA é relativamente baixo, o que faz desta substância um agente cuja morbidade sobrepõe a mortalidade (DE LETTER et al., 2002). Ademais, as mortes documentadas pelo uso de *Ecstasy* são excepcionalmente raras e são decorrentes principalmente de doenças cardíacas pré-existentes, complicações cardiovasculares e/ou hipertermia. Frequentemente as vítimas de óbito pelo consumo de *Ecstasy* ou *Eve*, apresentam significativas alterações hepáticas, cardíacas e cerebrais (HELMMLIN et al., 1996). Mesmo nos casos onde as metilenodioxianfetaminas não estão relacionadas com óbito por intoxicação aguda, o abuso destas substâncias pode acarretar ainda outros riscos como perda da capacidade de dirigir devido à diminuição da acuidade visual decorrente da midríase provocada por estas substâncias, nervosismo, confusão, diminuição da inibição, o que reforça o interesse forense na verificação do uso deste compostos (ROTHER et al., 1997). À semelhança do etanol, estas substâncias não constituem agente de *causa mortis* embora seu uso seja freqüente como coadjuvante de morbidade e mortalidade nos casos onde ocorrem.

A técnica utilizada, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, está entre as técnicas mais empregadas para a análise de MDMA e compostos análogos. As metilenodioxianfetaminas são compostos naturalmente fluorescentes o que permitiu a utilização de detector sensível e seletivo e conseqüentemente a quantificação de analitos em matriz biológica complexa como sangue total, mesmo quando estes se apresentam em baixas concentrações.

O desenvolvimento da metodologia para separação e identificação das metilenodioxianfetaminas por cromatografia líquida demandou tempo e perseverança, uma vez que esta análise possuía algumas peculiaridades: (a) grande similaridade estrutural existente entre os analitos, diferindo entre si em apenas por um radical metil; (b) as substâncias analisadas são aminas secundárias, estando sujeitas à interação com resíduos silanóis presentes na coluna cromatográfica. Átomos de nitrogênio com características básicas presentes nos fármacos analisados podem ser protonados dependendo de seu pKa e do pH do eluente utilizado. Este fenômeno faz com que estes compostos interajam com grupamentos silanóis residuais do processo de empacotamento das colunas de fase reversa para HPLC,

originando picos assimétricos, separação ineficiente e não reprodutibilidade no tempo de retenção (VERVOORT et al., 2000).

A assimetria do pico cromatográfico pode ser explicada pelo fato de que a cinética de interação por troca iônica que ocorre entre o fármaco de caráter básico e o grupamento silanol pode ser mais lenta que a interação com o radical alquil (octadecil neste trabalho). Desta forma, as moléculas do analito acabarão sendo submetidas a diferentes formas e intensidades de interação com a fase estacionária, sendo eluídas em bandas mais largas e assimétricas.

Sabe-se que, para melhorar a forma dos picos cromatográficos em cromatografia líquida (e conseqüentemente sua resolução e sua reprodutibilidade), deve-se inicialmente variar a composição da fase móvel do seguinte modo:

- ✓ Seleção do pH da fase móvel, de forma que este seja maior do que o pKa dos compostos analisados. Esta alternativa configurou-se inviável para as análises de metilenodioxianfetaminas uma vez que estes fármacos possuem pKa superior a 10 e as colunas utilizadas normalmente em cromatografia líquida, onde o suporte é sílica, não devem ser submetidas a valores de pH superiores a 8 para que não haja degradação da fase estacionária. Outra alternativa seria diminuir o pH da fase móvel até valores inferiores ao pKa dos grupos silanóis, neutralizando estes radicais. Contudo, durante a fase de otimização do método cromatográfico para análises de MDMA e seus derivados, diminuiu-se o pH da fase móvel até 2,5 e não foi observada melhora na resolução e eficiência da separação dos analitos;
- ✓ Aumento da força iônica da fase móvel, numa tentativa de deslocar o equilíbrio da reação para a esquerda, conforme a equação a seguir:

O aumento na concentração salina no tampão fosfato de sódio da fase móvel, alterações que geralmente são suficientes para melhorar a separação de substâncias em cromatografia líquida, não mostraram resultados satisfatórios, pois a separação dos analitos foi insatisfatória;

- ✓ Redução na concentração da amostra para moderar a saturação dos grupamentos ácidos. Esta alternativa também configura-se inviável durante a otimização de métodos para análises forenses, onde os analitos freqüentemente estão presentes em matrizes complexas e em baixas concentrações. A redução da concentração da amostra injetada implicaria diretamente em valores de limite de detecção maiores;
- ✓ Adição à fase móvel de agentes que possam bloquear a interação iônica entre o fármaco básico e o radical silanól ácido. Dentre estes agentes os mais comumente citados na literatura científica são o hexanosulfonato de sódio e o octanosulfonato de sódio, geralmente chamados de reagentes de pareamento iônico. Estes compostos são constituídos por cadeia alifática ligada a radical SO_3^- , capaz de interagir com o grupamento amina do fármaco neutralizando sua carga e permitindo que ocorra apenas interação hidrofóbica entre a cadeia octadecil da coluna e o analito. Neste trabalho, o reagente de pareamento iônico escolhido foi o dodecil sulfato de sódio, composto alifático de doze carbonos que também possui o radical SO_3^- . Esta escolha foi feita pelo fato de que o dodecil sulfato de sódio é um sal economicamente mais viável do que o hexanosulfonato de sódio ou octanosulfonato de sódio. Assim, a utilização de pareamento iônico, onde se utiliza a adição à fase móvel de um composto que apresente radical nucleofílico, capaz de se ligar às aminas protonadas, diminuindo sua interação com os radicais silanóis presentes na coluna cromatográfica, mostrou boa separação e eficiência. Inicialmente testou-se a utilização de dodecil sulfato de sódio 20 mM, mas nesta concentração não houve separação satisfatória entre o pico da MDEA e o pico do padrão interno. Assim, a melhor condição de fase móvel encontrada foi dodecil sulfato de sódio 50 mM (pH=4,0):acetonitrila (60:40).
- ✓ A utilização de gradiente de eluição também foi testada e, apesar de melhorar a separação dos analitos, causou *drift* (elevação causada pela variação na composição da fase móvel) da linha de base e alargamento dos picos de MDA e MDMA.

A técnica de extração proposta neste trabalho mostrou-se simples, rápida, economicamente viável e apresentou bons rendimentos (recuperação maior que 85% para

todos os analitos), podendo perfeitamente ser aplicada por qualquer laboratório forense. As principais desvantagens observadas durante o emprego deste tipo de extração foram a dificuldade de automação do processo, formação de emulsões (principalmente com as amostras de sangue total) o que demandou a inserção de etapa de diluição do material biológico antes da partição com solvente orgânico, grande consumo de tempo e o emprego de solventes orgânicos que apresentam riscos ao meio ambiente e a saúde do analista caso as análises não sejam conduzidas de acordo com boas práticas de conduta e manipulação de substâncias tóxicas, como a utilização de capela de exaustão, luvas, máscara e óculos de proteção.

Como já mencionado anteriormente, a microextração em fase sólida (SPME), apesar de simples, rápida e limpa (pois praticamente não utiliza solventes orgânicos), não foi selecionada para este trabalho, pois seu emprego na rotina dos laboratórios de análise forense do Brasil ainda é economicamente inviável.

A utilização da mistura extratora n-hexano/acetato de etila (7:3) citada inicialmente por CLAUWAERT et al., (2000) forneceu melhores resultados do que quando foi utilizado apenas n-hexano como solvente extrator como proposto por Sadegipour e Veuthey, (1997). A técnica de extração proposta neste trabalho possui ainda a vantagem de utilizar menos solvente orgânico do que os procedimentos citados por autores como (WEINMANN; BOHNERT, 1998; CLAUWAERT et al., 2000; CLAUWAERT; BOCXLAER; LEENHEER, 2001; DE LETTER et al., 2002). Este procedimento de extração apresentou bons resultados (recuperação maior que 70% para análises em sangue total e maior que 84% para análises em urina) e é perfeitamente exeqüível em qualquer laboratório forense que realize análises em matérias biológicas.

Como já havia sido mencionado por outros autores, antes da etapa de concentração do extrato, foi necessária a acidificação da fase orgânica com solução metanólica de ácido clorídrico 5 M para que ocorresse a conversão das formas básicas das metilenodioxianfetaminas para os correspondentes cloridratos, uma vez que esta segunda forma é menos volátil, diminuindo possíveis perdas durante a evaporação do solvente orgânico (MARQUET et al., 1997).

O padrão interno utilizado nas análises, o N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butamina (MBDB), mostrou-se adequado, pois apresenta grande semelhança estrutural e físico-química com os analitos. Mesmo sendo classificado como *designer drug*, o MBDB raramente é encontrado como adulterante dos comprimidos de *Ecstasy* e *Eve* (SHERLOCK et al., 1999; BAGGOTT et al., 2000), e sua presença nunca foi detectada em comprimidos apreendidos no Estado de São Paulo.

A identificação dos analitos eventualmente presentes nas amostras autênticas analisadas seria feita através do tempo de retenção relativa ao padrão interno, uma vez que a retenção relativa é um parâmetro de identificação mais robusto que a avaliação dos tempos de retenção de cada substância isolada. De modo análogo, a quantificação destas substâncias seria realizada através da metodologia validada que utilizou a razão entre as áreas do analito e do padrão interno como variável dependente da concentração dos fármacos presentes no material biológico.

Durante a otimização do procedimento de extração, foi observado que a adição de quantidades crescentes de cloreto de sódio às amostras de sangue total (efeito *salting out*) aumentou de forma proporcional o rendimento do processo de extração dos analitos, fato observado através da avaliação dos valores de áreas relativas. Esta melhora ocorreu até a

quantidade máxima de 2,0 g do sal para a MDMA e 2,5 g para a MDA e MDEA, valores a partir dos quais começa a haver diminuição do rendimento do procedimento.

Durante as análises de urina verificou-se que a adição de dois gramas de cloreto de sódio ao material biológico causou pequeno aumento nos valores de área relativa da MDMA e da MDEA. Contudo, foi observada que esta adição de sal aumentou em 22% os valores das áreas relativas da MDA, obtidas com e sem a adição de cloreto de sódio na urina como observado na Tabela 5.

Esta melhora no rendimento da extração pela adição de cloreto de sódio ocorre porque o sal diminui a solvatação dos analitos presentes no meio aquoso do material biológico, diminuindo sua solubilidade neste meio e facilitando sua partição para o solvente orgânico de características apolares.

Ainda durante a etapa de otimização das condições de preparação das amostras, observou-se que a extração das amostras de sangue total, quando submetidas ao contato direto com o solvente orgânico, ficou comprometida provavelmente pela precipitação das proteínas causada pelo solvente e pela formação de emulsão, que impediu o recolhimento da fração orgânica mesmo quando os tubos foram centrifugados a 3500 rpm durante 20 minutos. Para contornar este problema, duas alternativas foram testadas: precipitação das proteínas presentes no sangue antes de submeter o material a extração ou diluição da matriz biológica com solução fisiológica.

A diluição do sangue com solução de cloreto de sódio 0,9% na proporção 1:1 (v/v) conferiu maior fluidez à matriz biológica, permitindo maior contato desta com o solvente orgânico durante a agitação e facilitando a separação entre as fases orgânica e aquosa após a centrifugação, que pode ser realizada a 2500 rpm durante 15 minutos. Além disso, este

procedimento mostrou melhores resultados do que a precipitação proteica, tendo em vista que a precipitação das proteínas presentes no sangue pelo uso de solução TCA 20% forneceu áreas absolutas, tanto dos analitos como do padrão interno, menores do que as áreas obtidas quando a matriz biológica foi apenas diluída com solução fisiológica na proporção 1:1 (v/v).

Os métodos propostos apresentaram excelente linearidade dentro do intervalo dinâmico da curva analítica, com valores de coeficiente de determinação sempre superiores a 0,99 (exceto para as análises de MDA em urina). Cabe aqui informar que a linearidade do método, neste caso específico, coincide com aquela relativa ao sistema de detecção utilizado neste trabalho. Segundo informações fornecidas pelo representante do equipamento no país, o detector de fluorescência utilizado opera através do uso de célula fotomultiplicadora. Para possibilitar a detecção de baixas concentrações dos analitos (fundamental em análises forense), a atenuação do sinal gerado pelo equipamento foi diminuída de acordo com a faixa de valores esperados para as duas matrizes analisadas neste trabalho, o que levou à saturação da célula fotomultiplicadora em concentrações mais elevadas, fazendo com que a resposta deixasse de ser linear. Apesar do intervalo dinâmico estar entre 5 ng/mL e 200 ng/mL para a análise de sangue total, e entre 50 ng/mL e 2000 ng/mL para urina, concentrações acima de 200 ng/mL para as análises de sangue total e 2000 ng/mL para as análises de urina serão facilmente determinadas adotando-se como critério, durante o processamento das amostras reais, da diluição das mesmas com matriz biológica referência negativa, sempre que a concentração obtida ultrapassar o valor máximo do intervalo dinâmico.

Os valores de limite de detecção e quantificação obtidos neste estudo podem ser considerados satisfatórios quando se leva em consideração a técnica de extração e o sistema de detecção empregados, e encontram-se de acordo com os observados por outros autores (SADEGHIPOUR; VEUTHEY, 1997). Nas análises de urina, os valores de LQ obtidos foram

ainda menores do que os relatados por DE LETTER et al., (2002) e CLAUWAERT et al., (2000, 2001), que obtiveram LQ igual a 100 ng/mL.

Além da possibilidade da utilização deste método para verificação forense do uso de MDMA e seus análogos, os valores de limite de detecção obtidos para urina mostram-se ainda adequados para verificação do uso recreacional de *Ecstasy* e *Eve*, além de serem inferiores aos valores de *cut-off* propostos pelo *National Institute on Drug Abuse* (200 ng/mL) para técnicas de confirmação do uso de MDMA após triagem por técnica menos específica (imunoensaios).

A ordem crescente de limite de quantificação observada entre MDA, MDMA e MDEA também aparece como resultados de outros autores. Esta sequência corresponde à ordem de eluição dos compostos da coluna cromatográfica. Como os três analitos possuem características estruturais e físico-químicas muito semelhantes, uma possível explicação para este fato seria a de que os compostos que são eluídos primeiramente apresentam picos mais delgados do que os subseqüentes e, por conseqüência, apresentam maior altura, o que melhora a detecção e quantificação da substância.

A precisão, avaliada através da imprecisão e calculada como coeficiente de variação apresentou resultados sempre inferiores a 20%, mesmo quando a imprecisão foi analisada durante dias consecutivos (imprecisão interensaio), o que está perfeitamente de acordo para análises forenses (GOLDBERGER; HUESTIS; WILKINS, 1997).

Sempre que disponível, a exatidão de um método analítico deve ser avaliada utilizando amostras cuja concentração dos analitos no material é garantida por instituições normatizadoras ou responsáveis por programas de garantia da qualidade laboratorial (amostras certificadas). Quando este tipo de material não é disponível, é aceitável que a exatidão do método bioanalítico seja avaliada através do enriquecimento de amostras

referência negativa, comparando os valores encontrados com a concentração nominal adicionada (CAUSON, 1997; GOLDBERGER; HUESTIS; WILKINS, 1997; CHASIN et al., 1998). Causon (1997) refere que a exatidão do método analítico deve estar entre $\pm 15\%$ do valor dito como real para todas concentrações avaliadas. Seguindo este preceito, a metodologia desenvolvida neste trabalho apresenta exatidão adequada, uma vez que nenhuma concentração avaliada apresentou inexatidão superior a $\pm 15\%$.

Embora seja o desejado que a recuperação do método analítico seja o mais próximo possível de 100%, a obtenção de valores inferiores não compromete o mérito do método desenvolvido, uma vez que se pode obter boa precisão e exatidão mesmo que a recuperação do método seja moderada. Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que a mistura n-hexano/acetato de etila (7:3, v/v) foi eficiente na extração da MDMA, MDEA e MDA presentes na matriz biológica, fornecendo rendimentos sempre superiores a 67%, mesmo durante a condução das análises em sangue total, matriz biológica mais complexa e difícil de ser manipulada em processos de extração líquido-líquido.

Em toxicologia forense, a especificidade de um método figura dentre os parâmetros mais importantes e deve ser avaliado com rigoroso critério durante a etapa de validação. Isto porque o material biológico disponível para execução dos exames não recebe os mesmos cuidados e critérios utilizados durante a coleta de material para realização de exames clínicos e podem não receber o devido cuidado durante seu armazenamento e transporte, o que pode aumentar ainda mais a quantidade de possíveis interferentes endógenos em virtude da decomposição da matriz biológica. Soma-se a estes problemas o fato de que quando se realiza a verificação do uso de drogas de abuso é preciso sempre considerar os possíveis adulterantes presentes na droga de rua e que estarão sendo administrados concomitantemente ao usuário.

Os fármacos avaliados como possíveis interferentes, cafeína, cetamina, cocaína, dextrometorfano e efedrina foram selecionados por serem frequentemente citados na literatura internacional como adulterantes presentes nos comprimidos de *Ecstasy* (BAUDOT et al., 1998; SHERLOCK et al., 1999; BAGGOTT et al., 2000; COLE et al., 2002). Os derivados anfetamínicos como a dietilpropiona (anfepramona) e o femproporex foram selecionados para estudo devido ao grande consumo destas substâncias como fármacos moderadores de apetite receitados para tratamentos de emagrecimento no Brasil e que são sabidamente abusados em nosso meio. A metodologia proposta neste trabalho apresentou especificidade adequada para aplicação em toxicologia forense, uma vez que nenhum dos possíveis interferentes testados foi detectado. Corroborar ainda para esta afirmação o fato que, mesmo amostras positivas para anfetaminas pela técnica de Imunofluorescência Polarizada, não apresentaram picos cromatográficos com tempo de retenção próximo ao dos analitos.

O estudo de estabilidade é necessário para que se possa afirmar que a concentração do analito determinada na amostra corresponde ao valor presente na matriz biológica na hora da coleta e/ou óbito, sendo de fundamental importância em toxicologia forense, sem o que as inferências não são possíveis. Segundo Causon (1997), pode-se considerar que os analitos são estáveis no material biológico se sua concentração não diferir em mais de 20% do valor determinado no tempo zero do estudo de estabilidade. Este critério pode perfeitamente ser aceito em nosso estudo, pois as variações demonstradas na situação interensaio não excederam este percentual. Durante o estudo de ciclos de congelamento, a variação obtida entre as áreas relativas dos analitos no período estudado não excedeu o valor de 20%. Utilizando-se este critério, pode-se afirmar também que a MDMA, MDEA e a MDA são estáveis em urina por até uma semana se armazenada sob refrigeração (aproximadamente 10°C) e mesmo quando armazenada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, uma vez que também nestes casos a variação não foi superior ao valor estipulado como limite (20%). Este

achado coincide com os resultados obtidos durante dos estudos de Clauwaert, Bocxlaer e Leenheer (2001), que citam que a MDMA possui boa estabilidade em amostras de sangue, soro e urina, onde os pesquisadores não observaram degradação deste fármaco e seus análogos MDA e MDEA durante 13 semanas, quando os materiais foram armazenados em baixas temperaturas (-20°C).

Mesmo com o crescente aumento no consumo de *Ecstasy* no Brasil, é fato que este uso ainda é muito inferior ao consumo de drogas como cocaína e maconha. A não detecção de metilenodioxianfetaminas nas amostras analisadas pode ser atribuída a fatores como pequeno número de amostras, tanto em relação ao percentual no período estudado quanto em relação ao número total de casos que dão entrada ao laboratório anualmente. Outra possibilidade seria as circunstâncias envolvidas nestes casos que são oriundos de exames de corpo de delito (casos da clínica médica) ou mortes a esclarecer. Nos casos de indivíduos vivos poder-se-ia conjecturar que as circunstâncias normalmente associadas ao uso de *Ecstasy* (festas *rave*) não apresentam relação pronunciada com episódios de envolvimento médico-legal (situações de cunho policial). A aplicação de uma metodologia a um contingente maior de casos provenientes da clínica médica e ainda amostras oriundas de cadáveres provenientes do Instituto Médico Legal, deverá ser conduzida no sentido de se possibilitar inferência sobre este indicador populacional de uso.

10. CONCLUSÕES

A metodologia proposta para análise em sangue total e urina:

1. É exeqüível em qualquer laboratório de Toxicologia Forense de médio porte;
2. Apresenta especificidade, limite de detecção e intervalo dinâmico compatíveis com os teores referidos como aqueles encontrados em sangue e urina de indivíduos intoxicados por MDMA, MDEA e MDA;
3. Se presta a constituir metodologia inequívoca e que, portanto, pode constituir método confirmatório e integrar Laudo Toxicológico.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P., SILVA, M. T. A. Ecstasy (MDMA): effects and patterns of use reported by users in São Paulo. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v.25, n.1, p.11-17, 2003.

ANDREU, V., MAS, A., BRUGUERA, M., SALMERON, J. M., MORENO, V., NOGUE, S., RODES, J. Ecstasy: a common cause of severe acute hepatotoxicity. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v.29, p.394-397, 1998.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington: American Psychiatric Press, v.4. ed., p.175-272, 1995.

BAGGOTT, M., HEIFETS, B., JONES, R. T., MENDELSON, J., SFERIOS, E., ZEHNDER, J. Chemical analysis of ecstasy pills. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.284, n.17, Nov 1, p.2190, 2000.

BAGGOTT, M., JEROME, L. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA): a review of the english-language scientific and medical literature. Disponível em: <<http://www.maps.org/mdma/protocol/litreview.html>>. Acesso em: 10 fev. 2004.

BAPTISTA, M. C. **O uso de êxtase (MDMA) na cidade de São Paulo e imediações: um estudo etnográfico**. São Paulo, 2002. 148 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Psicobiologia - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

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

BAUDOT, P., DAYRE, S., LAVAL, R., VIRIOT, M. L., CARRE, M. C. "Ecstasy" (3,4-méthylènedioxyméthamphétamine, MDMA) et dérivés. **Ann. Falsif. Expert. Chim.**, Paris, v.91, n.942, p.81-101, 1998.

BEITIA, G., COBREROS, A., SAINZ, L., CENARRUZABEITIA, E. Ecstasy-induced toxicity in rat liver. **Liver**, Copenhagen, v.20, n.1, Feb, p.8-15, 2000.

BINGHAM, C., BEAMAN, M., NICHOLLS, A. J., ANTHONY, P. P. Necrotizing renal vasculopathy resulting in chronic renal failure after ingestion of methamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine ('ecstasy'). **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v.13, p.2654-2655, 1998.

BLANKE, R. V., POKLIS, A. Analytical/Forensic Toxicology. In: KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J., eds. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5 ed. New York: McGrall-Hill, 1996. p.905-923.

BOGUSZ, M. J., KALA, M., MAIER, R. D. Determination of phenylisothiocyanate derivatives of amphetamine and its analogues in biological fluids by HPLC-APCI-MS or DAD. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.21, n.1, Jan-Feb, p.59-69, 1997.

BRUNNENBERG, M., KOVAR, K. A. Stereospecific analysis of ecstasy-like N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in humans. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.751, n.1, Feb 10, p.9-18, 2001.

BUECHLER, J., SCHWAB, M., MIKUS, G., FISCHER, B., HERMLE, L., MARX, C., GRON, G., SPITZER, M., KOVAR, K. A. Enantioselective quantitation of the ecstasy compound (R)- and (S)-N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its major metabolites in human plasma and urine. **J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, v.793, n.2, Aug 15, p.207-22, 2003.

BUSH, E. S., MAYER, S. E. 5-hydroxytryptamine (serotonin): receptor agonists and antagonists. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G., eds. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10 ed.: McGraw-Hill, 2001. p.269-290.

CARVALHO, M., CARVALHO, F., BASTOS, M. L. Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4- methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v.74, p.789-793, 2001.

CARVALHO, M., HAWKSWORTH, G., MILHAZES, N., BORGES, F., MONKS, T. J., FERNANDES, E., CARVALHO, F., BASTOS, M. L. Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an in vitro study using rat and human renal proximal tubular cells. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v.76, n.10, Oct, p.581-8, 2002.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.689, n.1, Feb 7, p.175-80, 1997.

CENTINI, F., MASTI, A., COMPARINI, I. B. Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by head-space/solid phase micro-extraction (SPME) and GC/MS. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.83, p.161-166, 1996.

CHASIN, A. A. M. **Diagnóstico laboratorial da intoxicação aguda por cocaína: aspecto forense**. São Paulo, 1990. 109 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

CHASIN, A. A. M. Parâmetros de confiança analítica e a irrefutabilidade do Laudo Pericial em Toxicologia Forense. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.14, n.1, p.15-21, 2001.

CHASIN, A. A. M., NASCIMENTO, E. S., RIBEIRO-NETO, L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B., ANDRAUS, M. H., C., S. M., FERNÍCOLA, N. A. G., GORDI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

CIRIMELE, V., KINTZ, P., MANGIN, P. Detection of amphetamines in fingernails: an alternative to hair analysis. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v.70, n.1, p.68-9, 1995.

CLAUWAERT, K. M., BOCXLAER, J. F. V., LEENHEER, A. P. Stability study of the designer drugs "MDA, MDMA and MDEA" in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.124, 2001, p.36-42, 2001.

CLAUWAERT, K. M., VAN BOCXLAER, J. F., DE LETTER, E. A., VAN CALENBERGH, S., LAMBERT, W. E., DE LEENHEER, A. P. Determination of the designer drugs 3, 4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine. **Clin. Chem.**, Washington, v.46, n.12, Dec, p.1968-77, 2000.

COLE, J. C., BAILEY, M., SUMNALL, H. R., WAGSTAFF, G. F., KING, L. A. The content of ecstasy tablets: implications for the study of their long-term effects. **Addiction**, Abingdon, v.97, n.12, Dec, p.1531-6, 2002.

DE LA TORRE, R., FARRÉ, M., ORTUÑO, J., MAS, M., BRENNEISEN, R., ROSET, P. N., SEGURA, J., CAMÍ, J. Non-linear pharmacokinetics of MDMA ("ecstasy") in humans. , 49, 104-109. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v.49, p.104-109, 2000.

DE LA TORRE, R., FARRE, M., ROSET, P. N., HERNANDEZ LOPEZ, C., MAS, M., ORTUNO, J., MENOYO, E., PIZARRO, N., SEGURA, J., CAMI, J. Pharmacology of MDMA in humans. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.914, p.225-37, 2000.

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

DE LETTER, E. A., CLAUWAERT, K. M., LAMBERT, W. E., VAN BOCXLAER, J. F., DE LEENHEER, A. P., PIETTE, M. H. Distribution study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.26, n.2, Mar, p.113-8, 2002.

ELLIS, A. J., WENDON, J. A., PORTMANN, B., WILLIAMS, R. Acute liver damage and ecstasy ingestion. **Gut**, London, v.38, n.3, Mar, p.454-8, 1996.

FERIGOLO, M., MEDEIROS, F. B., BARROS, H. M. T. "Êxtase": revisão farmacológica. **Rev. Saúde Pública**, 32, n.5, 1998.

FREESE, T. E., MIOTTO, K., REBACK, C. J. The effects and consequences of selected club drugs. **J. Subst. Abuse Treat.**, New York, v.23, p.151-156, 2002.

FUCCI, N., GIOVANNI, N., CHIAROTTI, M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.134, p.40-45, 2003.

GARRETT, E. R., SEYDA, K., MARROUM, P. High performance liquid chromatographic assays of the illicit designer drug "Ecstasy", a modified amphetamine, with applications to stability, partitioning and plasma protein binding. **Acta. Pharm. Nord.**, Stockholm, v.3, n.1, p.9-14, 1991.

GENTILI, S., CORNETTA, M., MACCHIA, T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.801, p.289-296, 2004.

GIMENO, P., BESACIER, F., CHAUDRON-THOZET, H. Optimization of extraction parameters for the chemical profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.132, n.3, Apr 8, p.182-94, 2003.

GOLDBERGER, B. A., HUESTIS, M. A., WILKINS, D. G. Commonly practiced quality control and quality assurance procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis in forensic urine drug-testing laboratories. **Forensic Sci. Rev.**, Lausanne, v.9, n.2, p.60-79, 1997.

GORDON, C. J., WATKINSON, W. P., O'CALLAGHAN, J. P., MILLER, D. B. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Phoenix, v.38, p.339-344, 1991.

GOWING, L. R., HEDWARDS, S. M. H., IRVINE, R. J., ALI, R. L. Ecstasy: MDMA and other ring-substituted amphetamines. World Health Organization - Mental Health and Substance Dependence Department. Disponível em: <<http://www.who.int/substance/abuse/publications/psychoactives/en/>>. Acesso em: 03 mai 2004.

GREEN, R., MECHAN, A. O., ELLIOT, J. M., O'SHEA, E., COLADO, I. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). **Pharmacol. Rev.**, Bethesda, v.55, n.3, Set, p.463-508, 2003.

HALL, A. P. Hyponatraemia, water intoxication and "ecstasy". **Intensive Care Med.**, Berlin, v.23, p.1289, 1997.

HELMMLIN, H. J., BRACHER, K., BOURQUIN, D., VONLANTHEN, D., BRENNEISEN, R. Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.20, p.432-439, 1996.

HUGHES, J. C., MCCABE, M., EVANS, R. J. Intracranial haemorrhage associated with ingestion of 'ecstasy'. **Arch. Emerg. Med.**, Oxford, v.10, p.372-374, 1993.

JURADO, C., GIMÉNEZ, M. P., SORIANO, T., MENÉNDEZ, M., REPETTO, M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by CG-MS. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.24, p.11-16, 2000.

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

- KINTZ, P., SAMYN, N. Determination of "Ecstasy" components in alternative biological specimens. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.733, n.1-2, Oct 15, p.137-43, 1999.
- KRETH, K., KOVAR, K. A., SCHWAB, M., ZANGER, U. M. Identification of human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "ecstasy" - related designer drugs. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.59, p.1563-1571, 2000.
- KUMAZAWA, T., LEE, X. P., SUZUKI, O. Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.492, p.49-67, 2003.
- LARANJEIRA, R., DUNN, J., RASSI, R., FERNANDES, M. "Êxtase (3,4-metilenodioximetanfetamina, MDMA): uma droga velha e um problema novo. **Rev. ABP-APAL**, São Paulo, v.18, n.3, p.77-81, 1996.
- LIMA, E. C. **Determinação de opióides em cabelo via eletroforese capilar (CE)**. São Paulo, 2003. 167 p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.
- LORD, H., PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.902, p.17-63, 2000.
- MANCHANDA, S., CONNOLLY, M. J. Cerebral infarction in association with Ecstasy abuse. **Postgrad. Med. J.**, London, v.69, p.874-875, 1993.
- MARQUET, P., LACASSIE, E., BATTU, C., FAUBERT, H., LACHATRE, G. Simultaneous determination of amphetamine and its analogs in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.700, n.1-2, Oct 24, p.77-82, 1997.
- MAS, M., FARRÉ, M., DE LA TORRE, R., ROSET, P. N., ORTUÑO, J., SEGURA, J., CAMÍ, J. Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.290, p.136-145, 1999.

MECHAN, A. O., ESTEBAN, B., O'SHEA, E., ELLIOTT, J. M., COLADO, M. I., GREEN, A. R. The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats. **Br. J. Pharmacol.**, Basingstoke, v.135, n.1, Jan, p.170-80, 2002.

MESTER, Z., STURGEON, R., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. **Spectrochim. Acta, Part B**, Amsterdam, v.56, p.233-260, 2001.

MEYER, A., MAYERHOFER, A., KOVAR, K. A., SCHMIDT, W. J. Enantioselective metabolism of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ('eve') isomers in rat brain and blood. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v.330, n.2, Sep 20, p.193-7, 2002.

MOORE, K. A., MOZAYANI, A., FIERRO, M. F., POKLIS, A. Distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.83, n.2, Dec 2, p.111-9, 1996.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 3.ed. Porto Alegre: Médica Missau, 2000. 388 p.

NAVARRO, M., PICHINI, S., FARRE, M., ORTUNO, J., ROSET, P. N., SEGURA, J., DE LA TORRE, R. Usefulness of saliva for measurement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites: correlation with plasma drug concentrations and effect of salivary pH. **Clin. Chem.**, Washington, v.47, n.10, Oct, p.1788-95, 2001.

NICHOLS, D. E. Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB and classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. **J. Psychoact. Drugs**, San Francisco, v.18, p.305-313, 1986.

NIDA. Ecstasy: What We Know and Don't Know About MDMA - A Scientific Review. US Department of Health and Human Services: National Institute on Drug Abuse. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/PDF/MDMAConf.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2003.

ORTUÑO, J., PIZARRO, N., FARRÉ, M., MAS, M., SEGURA, J., CAMÍ, J., BRENNEISEN, R., DE LA TORRE, R. Quantification of 3,4-methylenedioxymetamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.723, p.221-232, 1999.

PARROTT, A. C. Recreational ecstasy/MDMA, the serotonin syndrome, and serotonergic neurotoxicity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Phoenix, v.71, p.837-844, 2002.

PAWLISZYN, J., LORD, H. Evolution of solid-phase microextraction technology. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.885, p.153-193, 2000.

PELLEGRINI, M., ROSATI, F., PACIFICI, R., ZUCCARO, R., ROMOLO, F. S., LOPEZ, A. Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry. **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, v.769, n.2, Apr 5, p.243-51, 2002.

PIRES, A. L., VALENTE, F. A. Microextração por fase sólida. **Quim. Nova**, São Paulo, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

PIZARRO, N., ORTUNO, J., FARRE, M., HERNANDEZ-LOPEZ, C., PUJADAS, M., LLEBARIA, A., JOGLAR, J., ROSET, P. N., MAS, M., SEGURA, J., CAMI, J., DE LA TORRE, R. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.26, n.3, Apr, p.157-65, 2002.

QUEIROZ, S. C. N., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RAIKOS, N., CHRISTOPOULOU, K., THEODORIDIS, G., TSOUKALI, H., PSAROULIS, D. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.789, p.59-63, 2003.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 692 p.

RENTON, R. J., COWIE, J. S., OON, M. C. H. A study of the precursors, intermediates and reaction by-products in the synthesis of 3,4-methylenedioxymethylamphetamine and its application to forensic drug analysis. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.60, p.189-2002, 1993.

RICAURTE, G., BRYAN, G., STRAUSS, L., SEIDEN, L., SCHUSTER, C. Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. **Science**, Washington, v.229, n.4717, p.986-988, 1985.

ROMERO, J. R. **Fundamentos de estereoquímica dos compostos orgânicos**. Ribeirão Preto: Holos. 1998. 1-21 p.

ROTHER, M., PRAGST, F., SPIEGEL, K., HARRACH, T., FISCHER, K., KUNKEL, J. Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.89, n.1-2, Sep 19, p.111-28, 1997.

ROTHWELL, P. M., GRANT, R. Cerebral venous sinus thrombosis induced by 'ecstasy'. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, London, v.56, p.1035, 1993.

SADEGHIPOUR, F., VEUTHEY, J. L. Sensitive and selective determination of methylenedioxyated amphetamines by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.787, 1997, p.137-143, 1997.

SAMYN, N., DE BOECK, G., WOOD, M., LAMERS, C. T., DE WAARD, D., BROOKHUIS, K. A., VERSTRAETE, A. G., RIEDEL, W. J. Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.128, n.1-2, Aug 14, p.90-7, 2002.

SEGURA, M., ORTUÑO, J., FARRÉ, M., MCLURE, J. A., PUJADAS, M., PIZARRO, N., LLEBARIA, A., JOGLAR, J., ROSET, P. N., SEGURA, J., DE LA TORRE, R. 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. **Chem. Res. Toxicol.**, Columbus, v.14, p.1203-1208, 2001.

SHERLOCK, K., WOLFF, K., HAY, A. W., CONNER, M. Analysis of illicit ecstasy tablets: implications for clinical management in the accident and emergency department. **J. Accid. Emerg. Med.**, Oxford, v.16, n.3, May, p.194-7, 1999.

SHULGIN, A. T. The background and chemistry of MDMA. **J. Psychoact. Drugs**, San Francisco, v.18, n.4, oct-dec, p.291-304, 1986.

SILVA, O. A., YONAMINE, M., REINHARDT, V. E. D. Identificação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e compostos relacionados por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas em comprimidos de ecstasy apreendidos em São Paulo. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.34, n.1, jan/jun, p.33-37, 1998.

SKENDER, L., KARACIC, V., BRCIC, I., BAGARIC, A. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.125, n.2-3, Feb 18, p.120-6, 2002.

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

SOFT/AAFS. Forensic toxicology laboratory guidelines. Society of Forensic Toxicologists, American Academy of Forensic Sciences, Toxicology Section. Disponível em: <<http://www.soft-tox.org/docs/Guidelines.2002.final.pdf>>. Acesso em: 28 de julho de 2003.

SPITZER, M., FRANKE, B., WALTER, H., BUECHLER, J., WUNDERLICH, A. P., SCHWAB, M., KOVAR, K. A., HERMLE, L., GRON, G. Enantio-selective cognitive and brain activation effects of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine in humans. **Neuropharmacology**, New York, v.41, n.2, Aug, p.263-71, 2001.

SUE, Y. M., LEE, Y. L., HUANG, J. J. Acute hyponatremia, seizure, and rhabdomyolysis after ecstasy use. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, Monticello, v.40, n.7, p.931-932, 2002.

TAGLIARO, F., VALENTINI, R., MANETTO, G., CRIVELLENTI, F., CARLI, G., MARIGO, M. Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/ or ecstasy in applicants for driving licences. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.107, p.121-128, 2000.

TAMAYO, C. L., TENA, T., RODRÍGUEZ, A. Amphetamine derivative related deaths. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.85, p.149-157, 1997.

THEODORIDIS, G., KOSTER, E. H. M., JONG, G. J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.745, p.49-82, 2000.

THORMANN, W., AEBI, Y., LANZ, M., CASLAVSKA, J. Capillary electrophoresis in clinical toxicology. **Forensic Sci Int**, 92, p.157-183, 1998.

TRAUB, S. J., HOFFMAN, R. S., NELSON, L. S. The "ecstasy" hangover: hyponatremia due to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. **J. Urban. Health.**, Cary, v.79, n.4, Dec, p.549-55, 2002.

UGLAND, H. G., KROGH, M., RASMUSSEN, K. E. Automated determination of 'Ecstasy' and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatisation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.19, n.3-4, Mar, p.463-75, 1999.

UNODC. Global Illicit Drug Trends 2003. Office on Drug and Crime - United Nations. Disponível em: <http://www.unodc.org/pdf/trends2003_www_E.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2004.

VARESIO, E., VEUTHEY, J. L. Chiral separation of amphetamines by high-performance capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.717, p.219-228, 1995.

VERVOORT, R. J. M., DEBETS, A. J. J., CLAESSENS, H. A., CRAMERS, C. A., JONG, G. J. Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.897, p.1-22, 2000.

WATSON, J. D., FERGUSON, C., HINDS, C. J., SKINNER, R., COAKLEY, J. H. Exertional heat stroke induced by amphetamine analogues. Does dantrolene have a place? **Anaesthesia**, Oxford, v.48, p.1057-1060, 1993.

WEINMANN, W., BOHNERT, M. Lethal monointoxication by overdosage of MDEA. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.91, p.91-101, 1998.

WILSON, J. F., SMITH, B. L., TOSELAND, P. A., WATSON, I. D., WILLIAMS, J., THOMSON, A. H., CAPPS, N. E., SWEENEY, G., SANDLE, L. N. A survey of extraction techniques for drugs of abuse in urine. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v.119, n.1, Jun 1, p.23-7, 2001.

WOODROW, G., HARNDEN, P., TURNEY, J. H. Acute renal failure due to accelerated hypertension following ingestion of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v.10, p.399-400, 1995.