

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
(FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE TOXICOLOGIA

Fabiana Pereira Santos

Desenvolvimento de método baseado em Toxicologia Analítica Verde
para determinação dos componentes ativos da ayahuasca em cabelo

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
(FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE TOXICOLOGIA

Fabiana Pereira Santos

Desenvolvimento de método baseado em Toxicologia Analítica Verde
para determinação dos componentes ativos da ayahuasca em cabelo

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do título de Mestre;
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo; Toxicologia

Orientador: Mauricio Yonamine

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S 237 d Santos, Fabiana Pereira
Desenvolvimento de método baseado em Toxicologia Analítica Verde para determinação dos componentes ativos da ayahuasca em cabelo / Fabiana Pereira Santos. -- São Paulo, 2023 .
87 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Orientador: Yonamine, Mauricio

1 . N,N-dimetiltriptamina. 2. β -carbolinas, 3. Espectrometria de massas. I . T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615 . 9 CDD

Fabiana Pereira Santos

Desenvolvimento de método baseado em toxicologia analítica verde para determinação dos componentes ativos da ayahuasca em cabelo; dissertação para obtenção do título de Mestre; Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; Toxicologia

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Orientador

Ana Paula de Melo Loureiro

1o. Examinador

Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira

2o. Examinador

Álvaro José dos Santos Neto

3o. Examinador

São Paulo, 27 de Setembro de 2023.

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família por todo apoio ao decorrer desse trabalho, em especial a minha mãe, Maria Saboia Pereira Santos e ao meu pai, Nelson Vieira Santos, por garantir que esse sonho se tornasse realidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauricio Yonamine, pela confiança, incentivo e orientação durante esse processo. Além disso, agradeço por todo conhecimento que foi adquirido.

As minhas amigas e maiores incentivadoras, Clarice, Juliana Mirna, Nicássia e Thaísa, por acreditarem no meu potencial e me encorajarem a buscar os meus objetivos e sonhos.

À Farmacêutica Beatriz, por toda atenção e ajuda nesse projeto. Aos colegas de laboratório, alunos e ex-alunos: Carla Sousa, Felipe Mendes, Gabriela Silveira, Gabriela de Paula e Karen Rafaela, por toda ajuda e apoio nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Felipe Rebello por auxiliar e ajudar com as dúvidas referentes à parte estatística deste trabalho. Por fim, agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 18/24770-3 – Auxílio Regular à Pesquisa Regular. Projeto: “Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação dos alcaloides da ayahuasca em diferentes matrizes aplicando estratégias de química analítica verde”.

RESUMO

SANTOS, F. P. Desenvolvimento de método baseado em Toxicologia Analítica Verde para determinação dos componentes ativos da ayahuasca em cabelo. 2023.p.87 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2023.

A ayahuasca é uma bebida alucinógena originária na América do Sul, utilizada por indígenas em rituais xamânicos. É obtida através da fermentação de duas plantas, a folha da *P. viridis*, na qual é obtida a dimetiltriptamina (DMT), substância responsável pelos efeitos alucinógenos e o cipó *B. caapi* que contém β -carbolinas (harmina, harmalina e tetraidro-harmina). As β -carbolinas impedem a degradação da DMT, que é então capaz de exercer atividade agonista em receptores serotoninérgicos. Devido ao seu efeito alucinógeno, identifica-se também o uso abusivo da DMT, administrada de forma isolada pelas vias intravenosa e fumada. Ainda, recentemente, pesquisas são realizadas para avaliar seu potencial terapêutico. Na literatura científica, existem métodos analíticos para detecção desses constituintes em amostras em diferentes matrizes. Contudo, não existem métodos publicados para detecção dos alcaloides da ayahuasca em amostras de cabelo. O cabelo é uma matriz difícil de ser trabalhada com diversas etapas e utilização de solventes tóxicos; assim, o uso de métodos que preservem o meio ambiente tem sido cada vez mais empregados. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método de detecção dos alcaloides da ayahuasca em cabelo utilizando os critérios da Toxicologia Analítica Verde (GAT) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS). A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi utilizado como técnica de preparo de amostra. Essa técnica de extração é mais simples comparada com outras extrações em cabelo e, apesar de utilizar solventes clorados, apenas 200uL foram utilizados, além de ser rápido e com baixo custo, concordando com os princípios da Toxicologia Analítica Verde (GAT).

Palavras-chave: N,N-dimetiltriptamina, β -carbolinas, Toxicologia Analítica Verde, cromatografia líquida, espectrometria de massas

ABSTRACT

SANTOS, F. P. Development of a method based on green analytical chemistry for foreign ayahuasca active components in hair. 2023.p.87 Thesis (Master's) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2023.

Ayahuasca is a hallucinogenic beverage originating in South America, used by indigenous people in shamanic rituals. It is obtained through the fermentation of two plants, the leaf of *P. viridis*, which contains dimethyltryptamine (DMT), a substance responsible for the hallucinogenic effects, and the vine of *B. caapi*, which contains β -carbolines (harmine, harmaline and tetrahydro-harmine). The β -carbolines prevent the degradation of DMT, which is then able to exert agonist activity on serotonergic receptors. Due to its hallucinogenic effect, the abuse of DMT, administered intravenously and smoked, is also identified. Still, recently, researches are carried out to make its therapeutic potential available. In the scientific literature, there are analytical methods for detecting these constituents in different biological matrices. However, there are no published methods for detecting ayahuasca alkaloids in hair samples. Hair is a difficult matrix to work with, with several steps and the use of toxic solvents; so the use of methods that preserve the environment has been increasingly used. Therefore, the aim of the present work was to develop a method for detecting ayahuasca alkaloids in hair using *Green Analytical Toxicology* (GAT) criteria by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS). Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was used as a sample preparation technique. This extraction technique is simple compared to other hair extractions and, despite using chlorinated solvents, only 200uL were used, in addition to being fast and inexpensive, in accordance with the principles of *Green Analytical Toxicology* (GAT).

Keywords: N,N-dimethyltryptamine, β -carbolines, Green Analytical Toxicology, liquid chromatography, mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos alcaloides de <i>P. viridis</i> , o DMT (A) e <i>B. caapi</i> , harmina (B), harmalina (C) e tetrahydroharmina (D) encontrados na ayahuasca.	17
Figura 2: Estruturas químicas do precursor da biossíntese a triptamina, os alcalóides da ayahuasca (DMT, Harmina, Harmalina e THH) e seus produtos de biotransformação (Harmol, Harmalol, Tetrahydroharmol, DMT-NO, NMT, 2-MTHBC e THBC), bem como o metabolito 3-IAA através da metabolização pela MAO-A dos compostos, triptamina, DMT e NMT.	24
Figura 3: Composição da haste capilar, bulbo, papila dérmica, músculo erector, glândula apócrina e glândula sebácea. Isoladamente, a composição interna do fio de cabelo, cutícula, córtex e medula.	30
Figura 4: Classificação dos solventes em categorias de acordo com a periculosidade: recomendado, problemático, perigoso e altamente perigoso.	33
Figura 5: Cromatograma dos íons totais foram projetados após a extração de dados brutos da MassLynx™ Software e plotá-los no Microsoft Excel R 2019 para melhorar a resolução da imagem.	40
Figura 6: Processo de extração dos alcaloides da ayahuasca em cabelo, pela técnica DLLME, conforme descrito no item 3.2.3.	42
Figura 6: continuação.	43
Figura 7: Comparação da extração em barra, da combinação de extrator e dispersor diferentes, hexano e acetato de metila em preto e o THF e clorofórmio em cinza. Podemos observar que as barras em cinza correspondente a HMN, HML e THH houve relevância estatística ($p < 0,05$).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedimentos para a determinação dos compostos da ayahuasca em amostras biológicas.	28
Tabela 2: Parâmetros do espectrômetro de massa para os analitos e padrão interno.	39
Tabela 3: A tabela mostra as concentrações dos controles para ensaios de precisão e exatidão.	47
Tabela 4: Resultados de levantamento bibliográfico de estudos em cabelo. Os solventes e reagentes utilizados nos processos de análise em cabelo (descontaminação, digestão e extração), além da quantidade e equipamento utilizado.	60
Tabela 4: Continuação.	61
Tabela 5: Resultados do limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ) da dimetilriptamina (DMT) em alguns trabalhos já publicados.....	61
Tabela 6: Limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ) e equação da regressão linear e coeficiente de determinação da dimetilriptamina (DMT), tetrahydro-harmina (THH), harmalina (HML) e harmina (HMN) em amostras de cabelo fortificada.	65
Tabela 7: Parâmetros de validação da dimetilriptamina (DMT), tetrahydro-harmina (THH), harmalina (HML) e harmina (HMN) após extração DLLME em amostras de cabelo fortificadas.	65
Tabela 8: Concentrações encontradas dos alcalóides da ayahuasca, N,N-dimetilriptamina (DMT), tetrahydro-harmina (THH), harmalina (HML) e harmina (HMN) em urina, plasma, cabelo e da ayahuasca líquida ou em cápsula liofilizada utilizada nos estudos citados.	70
Tabela 9: Concentração em pg/mg dos alcaloides da ayahuasca em amostras de cabelo autênticas após quantificação por DLLME e LC-MS/MS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2-MTHBC – 2-metil-1,2,3,4-tetra-hidro- β -carbolina
- 5-HT – 5-hidroxitriptamina
- ACN – Acetonitrila
- CA – Controle alto
- CB – Controle baixo
- Cl – Clorofórmio
- CM – Controle médio
- CONAD – Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas
- CV – Coeficiente de variação
- DAT – Receptor de dopamina
- DFCs – Drogas Facilitadores de Crimes
- DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
- DMT – N,N dimetilriptamina
- DMT – N,N dimetilformamida
- DMT-d6 – N,N dimetilriptamina com 6 deutérios
- DMT-NO – DMT-N-óxido
- DoE – Design of experiment
- EM – Efeito matriz
- EP – Eficiência do processo
- ESI – Ionização por electrospray
- GAC – Química Analítica verde
- GAT – Toxicologia Analítica Verde
- GHS – Sistema Global de Harmonização
- GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- GC-NPD – cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo
- HCl- Ácido Clorídrico
- HML – Harmalina
- HMN – Harmina
- HPLC-FLD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
- IAA- Ácido Indolacético

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo

LC-*Ion Trap*-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo *ion trap*

LLE – Extração Líquido Líquido

LoD – Limite de detecção

LoQ – Limite de quantificação

LPME – Microextração em fase líquida

LPs – Lipopolissacarídeo

MAO-A – Monoamino oxidase A

MDA - 3,4-metilenodioxianfetamina

MDMA – Metilenodioximetamfetamina

MeOH – Metanol

MTBE – Éter metil t-butílico

NaOH – Hidróxido de sódio

NMT – N-metiltriptamina

NPS – Novas Substâncias Psicoativas

P450 – Citocromo P450

PAHs – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PI – Padrão interno

RE – Recuperação

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

TEA – Trietanolamina

THBC - 1,2,3, 4-tetrahidro- β -carbolina

THF – Tetra-hidrofurano

THH – Tetraidro-harmina

UDV – União do Vegetal

VA-EO-DLLME – Microextração líquido-líquido assistida por vórtex com óleo essencial.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	Ayahuasca: origem, composição, mecanismo de ação e uso.....	16
1.2	Uso terapêutico.....	18
1.3	Legislação	18
1.4	Uso recreativo e toxicidade	19
1.5	Composição, biotransformação e propriedades físico-químicas	20
1.5.1	Biossíntese e características físico-químicas.....	20
1.5.2	Farmacocinética.....	21
1.5.3	Farmacodinâmica.....	25
1.6	Métodos bioanalíticos para detecção dos alcaloides da ayahuasca .	26
1.7	Análise em cabelo.....	28
1.7.1	Estrutura e composição.....	28
1.7.2	Análise toxicológica em cabelo	30
1.8	Toxicologia Analítica Verde (<i>Green Analytical Toxicology-GAT</i>).....	31
1.9	Microextração Líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	34
2.	OBJETIVOS DO TRABALHO	36
3.	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Materiais	36
3.1.1	Reagentes e outros materiais.....	36
3.1.2	Padrões.....	36
3.1.3	Equipamento e programas	37
3.1.4	Coluna cromatográfica.....	37
3.1.5	Amostras	37
3.1.6	Coleta das amostras e acondicionamento.....	38
3.2	Métodos.....	38
3.2.1	Condições cromatográficas e do espectrometro de massas.....	38
3.2.2	Preparo das amostras de cabelo.....	40
3.2.2.1	Preparo das amostras (descontaminação)	40
3.2.2.2	Processo de digestão da amostra	41
3.2.2.3	Microextração líquido-líquido dispersiva.....	41
3.2.2.4	Otimização do método.....	43
3.2.2.5	Validação do método.....	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	Resultados do processo de descontaminação/lavagem do cabelo ...	51
4.2	Otimização do processo de digestão do cabelo.....	51
4.3	Desenvolvimento do processo de extração.....	53
4.3.1	Estudos preliminares do desenvolvimento da extração.....	53

4.3.2	Desenvolvimento da microextração líquido-líquido dispersiva e otimização	54
4.3.3	Comparação dos métodos desenvolvidos em cabelo e o GAT.....	57
4.4	Resultados da validação do método	61
4.4.1	Limite de detecção e quantificação.....	61
4.4.2	Linearidade	62
4.4.3	Precisão e exatidão.....	62
4.4.4	Efeito matriz, recuperação e eficiência do processo.....	62
4.4.5	<i>Carryover</i> e seletividade.....	64
4.5	Concentração dos alcaloides da ayahuasca em diferentes matrizes biológicas	65
4.6	AMOSTRAS AUTÊNTICAS	71
5.	CONCLUSÃO.....	72
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ayahuasca: origem, composição, mecanismo de ação e uso

Psicodélicos e alucinógenos são definidos como substâncias psicoativas que podem estimular o cérebro às percepções sensoriais, alucinações, ilusões, visões e ainda, podem produzir mudanças de pensamento e de humor (ARAÚJO et al., 2015; BAKER, 2005).

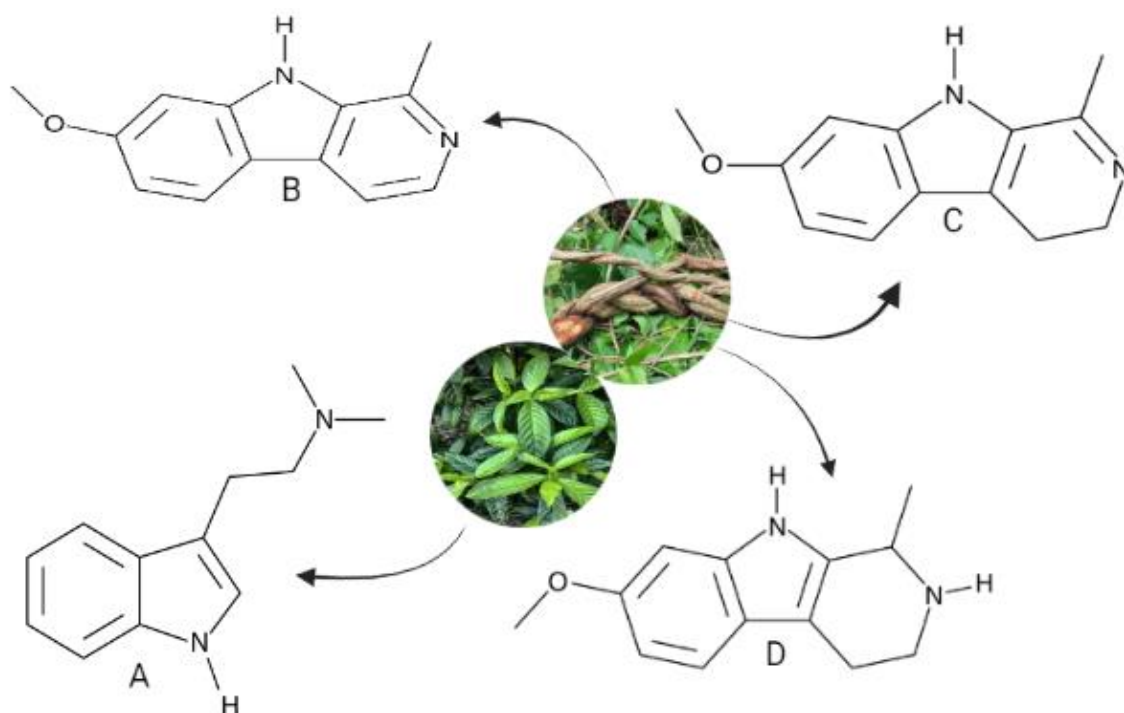
A ayahuasca é uma bebida que possui psicoatividade e foi inicialmente preparada por indígenas na Bacia Amazônica. A ayahuasca é um termo da língua Quéchua, na qual “aya” significa espírito, mundo da morte e “huasca” cipó, videira ou corda, também conhecida como Caapi, Daime, Natem e Yagé. Teve origem na América do Sul, nos países Brasil, Equador, Bolívia e Peru e atualmente se espalhou na Europa e América do Norte (ARAÚJO et al., 2015; CALLAWAY et al., 1999; ESTRELLA-PARRA; ALMANZA-PÉREZ; ALARCÓN-AGUILAR, 2019; FEENEY; LABATE, 2014).

A ayahuasca é uma bebida preparada através da fermentação da casca de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) e das folhas da *Psychotria viridis* (Rubiaceae). A casca e as folhas são lavadas e alternadas em camadas em um recipiente com água, fervidas e concentrada por horas, para a obtenção de um extrato escuro (CALLAWAY et al., 1999).

A ayahuasca contém N,N-dimetiltriptamina (DMT) que é responsável pelos efeitos alucinógenos e β -carbolinas, harmina (HMN), harmalina (HML) e tetraidro-harmina (THH) que possuem efeito inibitório da monoamino-oxidase (MAO) (FEENEY; LABATE, 2013; MCKENNA, 2004).

A DMT não é ativa por via oral devido à degradação pela MAO-A presente no intestino e fígado. A ayahuasca contém inibidores da MAO-A, as β -carbolinas, capazes de prevenir a desaminação oxidativa periférica e diminuir a degradação da DMT, o que permite sua absorção e chegada ao Sistema Nervoso Central (SNC), onde atua como agonista em receptores serotoninérgicos 5HT_{2A}, 5HT_{1A} e 5HT_{2C} (ARAÚJO et al., 2015; CALLAWAY et al., 1999; CAMERON; OLSON, 2018; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; MCKENNA, 2004; RIBA et al., 2001). A ação em receptores 5HT_{2A} é responsável pelos seus efeitos alucinógenos (ARAÚJO et al., 2015; CAMERON; OLSON, 2018).

Figura 1: Estruturas químicas dos alcaloides de *P. viridis*, o DMT (A) e *B. caapi*, harmina (B), harmalina (C) e tetrahydroharmina (D) encontrados na ayahuasca.



Fonte: De autoria própria (2023).

Utilizada historicamente por indígenas em rituais xamânicos e curativos, a ayahuasca foi posteriormente assumida por grupos religiosos no Brasil (CALLAWAY et al., 1999; FEENEY; LABATE, 2013). Os grupos nacionais mais conhecidos que fazem o uso da ayahuasca são a igreja Santo Daime e Barquinha, originárias de Rio Branco (Acre) e União do Vegetal (UDV), formada em Porto Velho (Rondônia) (CALLAWAY et al., 1999; FEENEY; LABATE, 2013; MCKENNA, 2004).

Após administração da bebida, conforme dose e suscetibilidade do indivíduo, podem ocorrer diferentes tipos de alucinações, onde o indivíduo visualiza formas grotescas, animais, cores vivas e brilhantes de imagens, além de incoordenação motora, náuseas e vômito (ESTRELLA-PARRA; ALMANZA-PÉREZ; ALARCÓN-AGUILAR, 2019; MCKENNA, 2004).

Há relatos da presença endógena de DMT em animais, plantas e humanos (BARKER; MCILHENNY; STRASSMAN, 2012). Estudos relatam a presença da DMT em fluidos humanos como no líquido cefalorraquidiano, sangue e urina; no entanto, a

falta de pesquisas envolvendo a DMT endógena não permite a avaliação da sua importância e mecanismos (RODRIGUES; ALMEIDA; VIEIRA-COELHO, 2019).

1.2 Uso terapêutico

Na literatura científica, o uso terapêutico da ayahuasca vem sendo estudado no ambiente celular, animal e humano. Há artigos que mostram a utilização da ayahuasca para tratar depressão e ansiedade (DA SILVA et al., 2022; DA SILVA; DAROS; DE BITENCOURT, 2021; DE OSÓRIO et al., 2015; PALHANO-FONTES et al., 2019); dependência de outras drogas (CRUZ; NAPPO, 2018; OLIVEIRA-LIMA et al., 2015) e o uso da DMT isolada em doenças inflamatórias e autoimunes (CAMERON; OLSON, 2018).

Da Silva e colaboradores (2022) realizaram experimento com modelo de indução a neuroinflamação com administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos Wistar, com intuito de avaliar a resposta da ayahuasca para o tratamento de ansiedade e depressão. Os resultados mostraram uma redução da ansiedade e depressão na administração da concentração de 4mL/kg.

Estudo feito em camundongos Swiss avaliou os efeitos da ayahuasca induzidos em protocolo de sensibilização comportamental com álcool. Foi possível observar que a ayahuasca inibiu o desenvolvimento da sensibilização induzida com álcool nos animais, mostrando que a ayahuasca pode inibir os comportamentos precoces associados a dependência de drogas (OLIVEIRA-LIMA et al., 2015).

Cruz e colaboradores (2018) entrevistaram usuários de *crack* que se recuperaram da dependência pelo consumo da ayahuasca no contexto religioso. Os usuários relataram que a ayahuasca permitiu resolver problemas, traumas e conseqüentemente o consumo de *crack*. Assim, a ayahuasca pode ser uma alternativa ao tratamento de dependências dessa e de outras drogas.

Estudo realizado com cultivo de células dendríticas humanas que foram induzidas ao processo inflamatório, mostraram que a DMT diminui citocinas pró-inflamatórias e aumenta citocinas anti-inflamatória (IL-10), mostrando seu potencial terapêutico em doenças inflamatórias e autoimunes (SZABO et al., 2014).

1.3 Legislação

Em relação a legislação brasileira sobre o uso da ayahuasca, foi definido através do Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas (CONAD), em Resolução do

ano de 2010, a permissão no uso da ayahuasca em rituais religiosos, devido ao seu contexto histórico e cultural. A resolução estabelece regras e normas para o uso da ayahuasca, como, a proibição de práticas de comércio, da propaganda, do uso fora de rituais religiosos, da exploração turística da bebida, do curandeirismo, de ministrar a bebida em pessoas com histórico de transtornos mentais e associação com outras substâncias psicoativas e/ou ilícitas (CONAD, 2010).

1.4 Uso recreativo e toxicidade

A DMT é originalmente conhecida por ser uma composição da bebida amazônica chamada ayahuasca. Recentemente, a DMT também se popularizou pelo abuso de forma isolada pelas vias fumada, inalada e injetada (intramuscular e endovenosa) (CAKIC; POTKONYAK; MARSHALL, 2010; KINTZ; AMELINE; RAUL, 2021; LIU et al., 2021).

Cakic e colaboradores (2010) fizeram um levantamento, através de um questionário, que foi aplicado em indivíduos que fizeram uso da DMT pelo menos uma vez na vida. Cerca de 98,3% relataram o uso da DMT pela via fumada, 30,6% o uso da ayahuasca pela via oral, 5% pela via vaporizada e 2,5% utilizaram pela via injetável. Com este estudo, podemos observar que o uso recreativo da DMT foi preferencialmente pela via fumada.

Conforme descrito acima, a via mais comum para o uso da DMT de forma recreativa é a via fumada, porém, também é possível o uso oral e endovenoso. Oralmente, a utilização de inibidores da MAO tem o intuito de possibilitar a absorção da DMT, como descrito anteriormente; entretanto o uso indiscriminado de inibidores da MAO pode ocasionar a síndrome serotoninérgica, que pode ser fatal ao usuário (CAKIC; POTKONYAK; MARSHALL, 2010).

A *internet* tem oferecido lojas de compras *online*, além de acesso a informações das plantas, detalhes de métodos para sua obtenção, síntese, extração e administração dessas substâncias, possibilitando o uso abusivo da DMT (LANARO et al., 2015). Além disso, ao utilizar a DMT o usuário pode vir a óbito, devido a overdose por administrações repetidas, erro na dosagem e informações errôneas obtidas na *internet* (LIU et al., 2021).

Durante e colaboradores (2020) realizaram um estudo através da aplicação de um questionário em indivíduos, membros da UDV que fazem uso da ayahuasca, com o objetivo de avaliar efeitos adversos e possíveis fatores de risco, como diagnóstico

psiquiátrico e medicamentos. Dos participantes, cinquenta confirmaram ter diagnóstico psiquiátrico e trinta faziam uso de medicamentos controlados (DURANTE et al., 2020). Em outro estudo, foi descrito a intoxicação de um jovem de 25 anos, com esquizofrenia que relatou o uso da ayahuasca e apresentou fortes alucinações. A análise da sua urina demonstrou concentração maior que 2000 ng/mL de DMT (BILHIMER et al., 2018).

A ayahuasca pode ser usada por todos os membros do grupo religioso, incluindo mulheres grávidas e crianças. Oliveira e colaboradores (2010) avaliaram o risco de toxicidade materna no desenvolvimento de ratos Wistar. Foi observado que houve toxicidade materna com diminuição do peso da genitora e consumo de alimento. Houve também lesões externas viscerais e anormalidades esqueléticas nos fetos; no entanto, esses achados foram observados em doses altas (OLIVEIRA et al., 2010).

O CONAD relata que é responsabilidade de mulheres grávidas, o consumo da ayahuasca bem como, a responsabilidade da mãe de crianças que fazem o uso da ayahuasca. Além disso, adverte a não recomendação do uso da ayahuasca em indivíduos que utilizam outras drogas psíquicas ou tem histórico de doença mental (CONAD 2010).

Devido esse contexto, se fazem necessários mais estudos que comprovem a segurança do uso da ayahuasca em adultos, mulheres grávidas e crianças, bem como, em indivíduos que fazem tratamento psiquiátrico. A constatação das diversas formas de exposição aos constituintes da ayahuasca, assim como a DMT endógeno, pode ser realizada através de análises toxicológicas em espécimes biológicos.

1.5 Composição, biotransformação e propriedades físico-químicas

1.5.1 Biossíntese e características físico-químicas

Os alucinógenos clássicos podem ser divididos em dois grupos estruturais: as fenilalquilaminas e as indolaminas. As indolaminas podem ser divididas em dois subgrupos, as triptaminas simples e ergotaminas. As triptaminas simples possuem combinação bicíclica de benzeno e um anel pirrol (anel indol) e uma cadeia lateral de dois carbonos, onde está ligado um grupo amina (ARAÚJO et al., 2015).

A DMT e as β -carbolinas são derivadas do aminoácido triptofano (SIMÃO et al., 2019). O triptofano é descarboxilado, pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase, formando a triptamina que posteriormente, é desmetilada pela enzima

indoletilamina-N-metiltransferase, resultando em S-adenosilmetionina, que é doador de metil para a N-metiltriptamina (NMT) e a DMT. No caso das β -carbolinas, o triptofano e/ou triptamina passam por um processo de condensação das indolaminas com aldeídos ou alfa-cetoácidos (BRITO-DA-COSTA et al., 2020). As moléculas dos alcaloides da ayahuasca estão ilustradas na Figura 2.

A DMT é uma molécula com características lipofílicas, com peso molecular (PM) 188,27 g/mol, apresentando log P de 2,573, ponto de fusão 44,6°C a 46,8°C e pKa de 8,68. A harmina tem PM de 212,25 g/mol, log P de 3,56, ponto de fusão 261°C e um pKa de 7,6. A harmalina tem um PM de 214,3 g/mol e o ponto de fusão 249-250°C e log P 2,1. A THH tem PM de 216,28 g/mol e log P de 1,9 (BRITO-DA-COSTA et al., 2020).

1.5.2 Farmacocinética

A DMT pura administrada por via oral não tem atividade psicotrópica. A base livre da DMT é usualmente fumada ou inalada e os sais de fumarato são utilizados pela via injetada (NICHOLS, 2004). As doses utilizadas pela via nasal são aproximadamente 60 a 100mg. Após o uso, as manifestações alucinógenas são potentes e começam imediatamente em 10 a 15 segundos, com duração inferior a 1 hora (NICHOLS, 2004). Pela via endovenosa, os efeitos alucinógenos foram relatados nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg e permaneceu de 20 a 30 minutos (STRASSMAN, 1994). Pela via intramuscular, as concentrações utilizadas são 0,2 a 1mg/kg com início de 2 a 5 minutos e duração de 30 a 60 minutos (BARKER, 2022; SZÁRA, 2007).

A administração oral de HMN em humanos foi de 20 a 50 mg e seu início de ação começa em 20 a 30 minutos. A concentração máxima de HMN chega em 30 minutos a 1 hora e seus efeitos duram de 6 a 8 horas. Quando administrado de 10 a 20 mg por via intramuscular, o relato dos efeitos ocorre de 5 a 10 minutos. A concentração máxima é atingida em 30 minutos e permanece por 3 a 5 horas (BRITO-DA-COSTA et al., 2020).

Riba e colaboradores (2003) administraram baixas e altas doses da ayahuasca em voluntários. As concentrações baixas administradas foram: 0,6 mg/kg de DMT, 1,0 mg/kg de HMN, 0,07mg/kg de HML e 0,82 mg/kg de THH. As concentrações mais altas foram: 0,85 mg/kg de DMT, 1,4 mg/kg de HMN, 0,09 mg/kg de HML e 1,16 kg/mg de THH. Após administração, a concentração máxima foi atingida em: 1,5 horas para a DMT, 1,5 a 2,0 horas para a HML, 2,5 a 2,75 para o harmalol, 2,5 a 3 horas para a

THH. Já a harmina não foi detectada neste estudo, mas, o harmol atingiu a concentração máxima em 1,5 a 2 horas (RIBA et al., 2003).

Um estudo em ratos observou a relação de distribuição dos alcaloides da ayahuasca em diferentes órgãos. Com a administração intraperitoneal de 5mg/kg da DMT, as seguintes concentrações do alcaloide foram encontradas 5 minutos após administração: plasma 0,4 µg/g, fígado 6,8 µg/g e cérebro 0,9 µg/g. A concentração máxima encontrada no fígado foi de 6,8 µg/g, no intervalo de 5 a 10 minutos e no cérebro de 1,8 µg/g em 15 minutos. Após 30 minutos, a DMT praticamente não foi detectada no cérebro e no plasma (COHEN; VOGEL, 1971).

Em um estudo que administrou o extrato de sementes isoladas de *Peganum harmala* em ratos Wistar por 4 semanas, a concentração de 150kg/mg foram distribuídas nos tecidos, ficando em torno de: fígado 550 ng/g, pulmão 150 ng/g e rim 150 ng/g para HML. Para a HMN, as concentrações nos tecidos foram: fígado 50 ng/g, 35 ng/g baço, 35 ng/g pulmão e 45 ng/g rim. A presença apenas da HML no cérebro demonstrou ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (WANG et al., 2019).

A DMT é metabolizada pela enzima monoaminoxidase A (MAO-A) no intestino, através de um processo de desaminação, formando o metabólito 3-indol-acético (3-IAA). A ausência dos efeitos alucinógenos é devido a esse mecanismo e o 3-IAA fica presente na urina. A administração da DMT via parenteral atinge o SNC e no cérebro também temos a presença da MAO-A que irá degradar a DMT. A ação curta da DMT, pela via injetável e fumada é devido à degradação pela MAO-A no cérebro (BRITO-DA-COSTA et al., 2020).

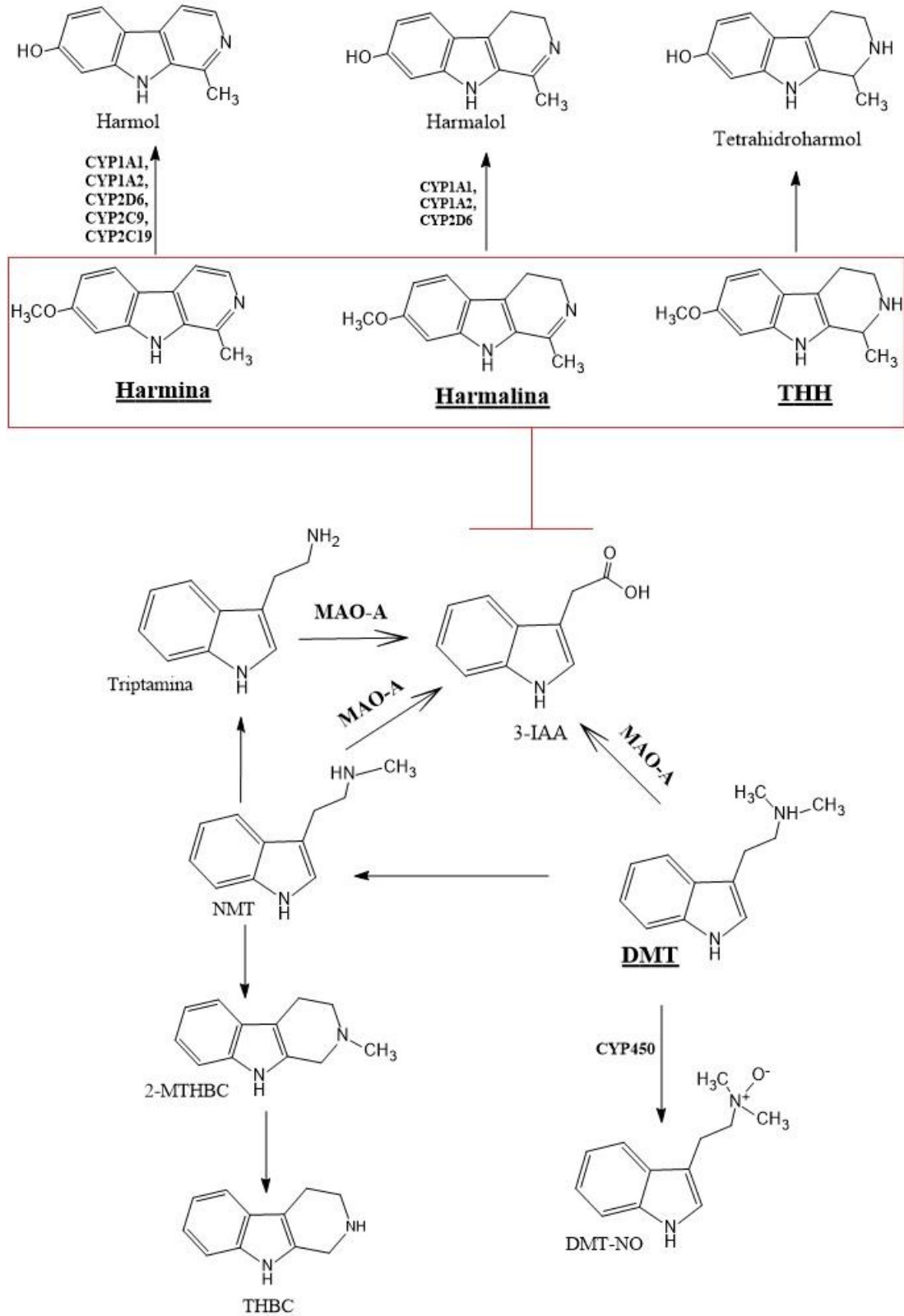
Através da N-oxidação mediada pelo citocromo P450 (CYP450) forma-se o DMT-N-óxido (DMT-NO) e através da N-desmetilação forma-se a N-metiltriptamina (NMT). Além desses produtos de biotransformação, ocorre também a formação de metabólitos em quantidades menores de triptamina e tetra-hidro-β-carbolinas, denominados: 2-metil-1,2,3,4-tetra-hidro-β-carbolina (2-MTHBC) e 1,2,3, 4-tetrahidro-β-carbolina (THBC) (BARKER; MONTI; CHRISTIAN, 1979)

As β-carbolinas (HMN, HML e THH) inibem reversivelmente a MAO. Em decorrência disso, a ingestão oral da ayahuasca reduz a desaminação da DMT fazendo com que a mesma chegue ao SNC. No fígado, a CYP450 também metaboliza as β-carbolinas. Através da CYP1A1, CYP1A2 e CYP2D6, a HML é o-desmetilada em harmalol e a CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 catalisam a HMN

formando o harmol (HAMILL et al., 2018). A THH também pode ser o-desmetilada e formar o tetra-hidroharmol (7-hidroxi-tetrahidroharmina) (RIBA et al., 2012).

A Figura 2 mostra a estrutura química dos alcaloides da ayahuasca e seus produtos de biotransformação conforme citado acima.

Figura 2: Estruturas químicas do precursor da biossíntese a triptamina, os alcaloídes da ayahuasca (DMT, Harmina, Harmalina e THH) e seus produtos de biotransformação (Harmol, Harmalol, Tetrahydroharmol, DMT-NO, NMT, 2-MTHBC e THBC), bem como o metabolito 3-IAA através da metabolização pela MAO-A dos compostos, triptamina, DMT e NMT.



Fonte: Adaptado Brito-da-Costa e colaboradores 2020.

Em um estudo com humanos, foi determinada a concentração dos alcaloides da ayahuasca e produtos de biotransformação em urina, após administração de 0,75 mg/ kg da DMT. No período de coleta de 0 a 8 horas, a concentração dos alcaloides da ayahuasca e de seus produtos de biotransformação foram maiores: DMT 0,6 µg/ml, DMT-NO 11,06 µg/mL, THH 6,27 µg/mL, harmalol 4,04 µg/mL, harmol 3,09 µg/mL, 2MTHBC 0,13 µg/mL. Para os demais analitos, a dosagem no período de 0 a 4 horas foram: HMN 0,16 µg/mL e HML 0,51 µg/mL (MCILHENNY et al., 2010).

No entanto, pela via fumada, cerca de 10% correspondem a DMT e 28% de DMT-NO e 63% do produto formado pela MAO, a 3-IAA (Brito-da-costa 2020). A administração intraperitoneal de 10 mg/kg da DMT em ratos mostrou que 1,1% da DMT foi recuperada em urina, enquanto o DMT-NO e a NMT, apresentaram as taxas de 6,5% e 0,02%, respectivamente. Após administração de 100 µg/kg de fosfato de iproniazida, um inibidor da MAO, os valores de DMT, DMT-NO e NMT aumentaram, apresentando os valores de 2,1%, 20,6% e 0,6%, respectivamente (SITARAM et al., 1987). Essa avaliação demonstrou que a degradação da DMT e de seus produtos é menor quando associado a inibidores da MAO.

1.5.3 Farmacodinâmica

Os alucinógenos clássicos atuam em receptores serotoninérgicos, aumentando os níveis de serotonina no cérebro. O principal receptor envolvido no mecanismo de ação dos alucinógenos clássicos é o 5-HT_{2A} (NICHOLS, 2016). O 5-HT_{2A} é da família da proteína G, que é responsável em ativar várias sinalizações intracelulares, hormônios, neurotransmissores e respostas a sinais da visão, olfato e paladar (NICHOLS, 2004; ZHAO et al., 2016). Estudos mostram a alta distribuição deste receptor no córtex frontal de ratos (POMPEIANO; PALACIOS; MENGOD, 1994), área em que os alucinógenos atuam (GLENNON et al., 2000).

Além desse receptor, a DMT atua no receptor 1 associado à amina traço (TAAR1) (CAKIC; POTKONYAK; MARSHALL, 2010) e do receptor sigma-1 (CAKIC; POTKONYAK; MARSHALL, 2010b; SZABO et al., 2014).

Os principais mecanismos de ação propostos para as β-carbolinas incluem a atividade inibitória da MAO-A, dopamina e afinidade ao receptor 5-HT_{2A} (HAMILL et al., 2018). A HMN, HML e THH também possuem psicoatividade, sua administração isolada resulta em efeitos alucinógenos, devido também a se ligar em receptores 5-HT_{2A} (GLENNON et al., 2000).

A HMN e HML são inibidores reversíveis da MAO-A, enquanto a THH atua como inibidor da recaptura de 5HT, atuando fracamente na enzima MAO-A (BUCKHOLTZ; BOGGAN, 1977). Outros mecanismos da HMN e HML é que provoca o aumento da liberação de dopamina em células do corpo estriado. Além disso, a harmina inibe a recaptura de dopamina pelo transportador de dopamina (DAT), estimulando o efluxo de dopamina (HAMILL et al., 2018).

1.6 Métodos bioanalíticos para detecção dos alcaloides da ayahuasca

Na literatura científica, existem métodos analíticos propostos para detecção dos alcaloides da ayahuasca em amostras de plasma e urina, que são amostras indicativas de uso recente. A Tabela 1 mostra, em detalhes, os métodos analíticos empregados para identificação dos constituintes da ayahuasca em diferentes amostras biológicas, tal qual a forma de preparação e detecção.

Podemos observar na Tabela 1 que os dois trabalhos desenvolvidos em urina utilizam a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS) (MCILHENNY et al., 2010; SILVEIRA et al., 2020). Mcilhenny e colaboradores (2010) realizaram o preparo de amostra com diluição da urina em fase móvel e posterior hidrólise enzimática. Oliviera e colaboradores (2020) aplicaram uma técnica miniaturizada, a microextração em fase líquida (LPME) para análise da DMT, THH, HMN e HML.

Para a análise de plasma, dois autores utilizaram técnicas de detecção diferentes. Os processos de extração do DMT foram semelhantes. Para a análise da DMT, foi realizada extração LLE com 7mL de n-clorobutano e LLE com n-pentano (CALLAWAY et al., 1996; YRITIA et al., 2002). Para os demais analitos houve diferença entre os processos escolhidos. Para Callaway e colaboradores (1996), o método de escolha foi a precipitação de proteína com acetonitrila (ACN) e para Yritia (2002) e colaboradores, foi escolhida a extração em fase sólida (SPE) para extrair THH, HMN e HML. Em ambos os trabalhos, para a detecção da DMT foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de nitrogênio e fósforo (GC-NPD) e para os outros analitos foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD) (CALLAWAY et al., 1996; YRITIA et al., 2002).

Já os demais trabalhos em plasma usaram os seguintes equipamentos: Mcilhenny e colaboradores (2012) utilizaram equipamento de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo *ion trap* utilizando ionização com

electrospray aquecido (LC-HESI-MS/MS); Oliveira e colaboradores (2012) utilizaram o equipamento de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas do tipo *ion trap* (LC-IonTrap-MS/MS) e Silveira e colaboradores (2021) utilizaram o equipamento de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS) para análise dos alcaloides da ayahuasca e produtos de biotransformação. Mcilhenny e colaboradores (2012) realizaram precipitação de proteínas para analisar DMT, HMN, HML, THH e seus produtos de biotransformação. Silveira e colaboradores (2020), desenvolveram um método inovador, a microextração líquido-líquido assistido por vortex com óleo essencial (VA-EO-DLLME) para análise dos alcaloides da ayahuasca.

Atualmente, as técnicas de cromatografia gasosa e líquida acopladas a espectrometria de massas são utilizadas para análise em amostras de cabelo nos laboratórios de análises toxicológicas (KHAJURIA; NAYAK; BADIYE, 2018). É o caso do trabalho desenvolvido para detecção de alcaloides psicoativos em cabelo de múmias do norte do Chile por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), onde foi observada a presença da harmina nas amostras (OGALDE; ARRIAZA; SOTO, 2009).

As demais pesquisas, desenvolveram métodos apenas para detectar a DMT, utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS).

Existem métodos na área forense que desenvolveram métodos para detecção da DMT. Pichini e colaboradores (2014) desenvolveram um método para detecção de alucinógenos em cabelo, presentes em plantas psicodélicas e cogumelos. Boumba e colaboradores (2017) desenvolveram um método *screening* para identificar 132 novas substâncias psicoativas (NPS) em cabelo.

Além destes, dois artigos envolvendo casos legais para detecção da DMT em amostras de cabelo. Um caso envolvendo o indivíduo que alega ter sido exposto passivamente a DMT pela via fumada (KINTZ; AMELINE; RAUL, 2020). E outro caso, envolvendo 28 indivíduos usuários da ayahuasca (LIU et al., 2021). Todos os métodos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Procedimentos para a determinação dos compostos da ayahuasca em amostras biológicas.

Analito	Amostra	Preparação da amostra	Detecção	Referência
DMT, THH, HMN, HML e seus produtos de biotransformação	Urina	Diluição com fase móvel (água, ácido fórmico e ACN) e hidrólise enzimática.	LC-MS/MS	(MCILHENNY et al., 2010)
DMT, THH, HMN, HML	Urina	LPME	LC-MS/MS	(SILVEIRA et al., 2020)
HML, HMN, THH e DMT	Plasma	DMT- LLE com 1-clorobutano; HML, HMN, THH precipitação com ACN	HML, HMN, THH – HPLC-FLD; DMT-GC-NPD	(CALLAWAY et al., 1996)
DMT, HMN, HML, THH, harmalol e harmol	Plasma	DMT-LLE com n-pentano; HMN,HML,THH, Harmalol e Harmol – SPE	DMT - GC-NPD; HMN,HML,THH, Harmolol e Harmol - HPLC – FLD	(YRITIA et al., 2002)
DMT, THH, HMN, HML e seus produtos de biotransformação	Plasma	Precipitação de proteínas com ACN e hidrólise enzimática.	LC-HESI-MS/MS	(MCILHENNY et al., 2011)
DMT, THH, HMN e HML	Plasma	SPE	LC- <i>ionTrap</i> -MS/MS	(OLIVEIRA et al., 2012)
DMT, THH, HMN e HML	Plasma	VA-EO-DLLME	LC-MS/MS	(SILVEIRA et al., 2021)
HMN	Cabelo	SPE	GC-MS	(OGALDE; ARRIAZA; SOTO, 2009)
DMT	Cabelo	Digestão com reagente VMA-T M3 e diluição	LC-MS/MS	(PICHINI et al., 2014)
DMT	Cabelo	Pulverizado com ácido clorídrico em MeOH	LC-MS/MS	(BOUMBA et al., 2017)
DMT	Cabelo	LLE	LC-MS/MS	(KINTZ; AMELINE; RAUL, 2020)
DMT	Cabelo	Pulverização com MeOH	LC-MS/MS	(LIU et al., 2021)

1.7 Análise em cabelo

1.7.1 Estrutura e composição

O processo de extração do cabelo é difícil, principalmente por conta da sua estrutura. Devido a isso, saber a morfologia do cabelo é essencial para compreender

os problemas relacionados ao preparo dessa amostra em análises toxicológicas (FERREIRA; PAULINO; QUINTAS, 2019).

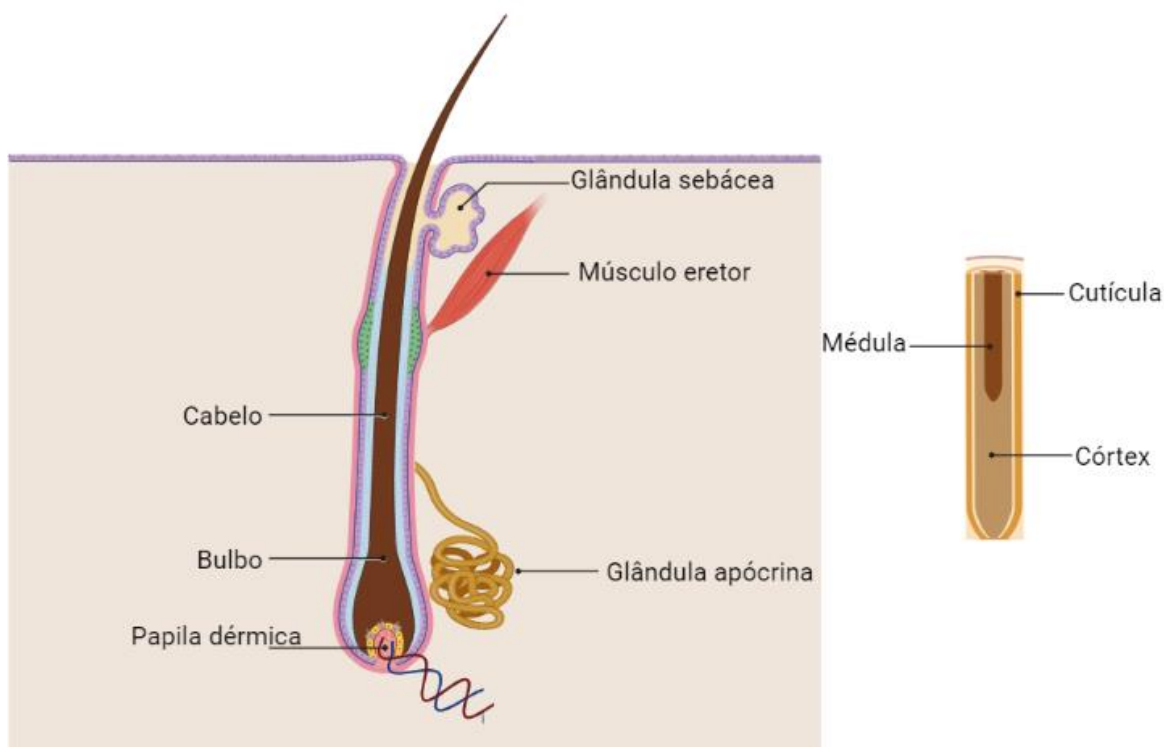
O cabelo é composto por proteínas (65-95%, principalmente queratina), lipídios (1-9%) e pigmentos (0,1 – 5%, melanina) e pequenas quantidades de oligoelementos, polissacarídeos e água (KHAJURIA; NAYAK; BADIYE, 2018; KINTZ, 2019).

O cabelo é formado pela cutícula, córtex e medula. A cutícula é a parte mais externa da haste capilar, o córtex fica na região intermediária entre a cutícula e a medula. Por fim, a medula é a região interna do cabelo. A cutícula é formada por células queratinizadas que ficam sobrepostas ao córtex. O córtex é formado por celular corticais e na parte interna do córtex são localizadas células condensadas que formam a medula (FERREIRA; PAULINO; QUINTAS, 2019; KHAJURIA; NAYAK; BADIYE, 2018).

A queratina é a proteína mais abundante existente no cabelo e é formada por dímeros que juntos formam tetrâmeros de queratina, chamado de protófilamentos, com característica hidrofóbica (FERREIRA; PAULINO; QUINTAS, 2019).

Além da composição da haste capilar, conforme Figura 3, há na parte inferior do cabelo, o bulbo, o folículo piloso e a papila dérmica. No bulbo existem células, que fazem mitose e produzem queratina, responsáveis pelo crescimento do folículo. A papila dérmica possui células mesenquimais, que são indutoras e reguladoras do crescimento capilar e se ligam a corrente sanguínea. (COOPER, 2015; MCELWEE; SINCLAIR, 2008).

Figura 3: Composição da haste capilar, bulbo, papila dérmica, músculo eretor, glândula apócrina e glândula sebácea. Isoladamente, a composição interna do fio de cabelo, cutícula, córtex e medula.



Fonte: De autoria própria (2023).

O cabelo possui três fases de ciclo de crescimento, uma fase de crescimento (anágena), uma fase de transitória (catágena) e uma fase de repouso (telógena). Na fase catágena, ocorre o interrompimento da produção de proteínas e pigmentos, ocorre a destruição da parte inferior do cabelo, e um declínio do folículo na papila dérmica. Na fase telógena, não ocorre o crescimento do cabelo, a papila dérmica fica em repouso e o cabelo fica preso ao folículo piloso. Após a fase de repouso, é iniciado novamente o ciclo de crescimento do cabelo, ou seja, a fase anágena (KHAJURIA; NAYAK; BADIYE, 2018; MCELWEE; SINCLAIR, 2008).

Há duas glândulas ligadas ao cabelo, as glândulas apócrinas e sebáceas, conforme Figura 3. As glândulas apócrinas que estão localizadas nas axilas e região pubiana, e as glândulas sebáceas estão presentes em todo o corpo. Ambas as glândulas secretam no folículo, localizadas próximas a ele (COOPER, 2015).

1.7.2 Análise toxicológica em cabelo

O cabelo tem sido utilizado como amostra em investigação criminal, em mortes relacionada a uso de drogas, na investigação de drogas facilitadoras de crimes (DFCs), no monitoramento de indivíduos em processo de reabilitação de drogas e

monitoramento do uso de drogas no ambiente de trabalho (COOPER, 2015). Como as drogas podem permanecer no cabelo por mais tempo, a análise do cabelo pode complementar os resultados analíticos de amostras convencionais, como o sangue e urina, para confirmar se o indivíduo estava sendo exposto a determinada substância em longo prazo (LIU et al., 2021).

O mecanismo pelo qual as substâncias se ligam ao cabelo ainda é desconhecido, entretanto é considerado que possa ocorrer essa incorporação durante a formação do cabelo no folículo, transferência pelo suor e sebo e também através de transferência de compostos presentes no meio externo (KHAJURIA; NAYAK; BADIYE, 2018; KINTZ, 2018).

Outras características que condizem com a ligação de substâncias no cabelo é a pigmentação. Cabelos pigmentados retêm mais substâncias básicas do que cabelos menos pigmentados; a união da melanina, que possui natureza ácida com a queratina que possui conformação de α -hélice, sendo ambas hidrofóbicas, com outras proteínas contribui para a retenção de substâncias no cabelo (COOPER, 2015; FERREIRA; PAULINO; QUINTAS, 2019).

1.8 Toxicologia Analítica Verde (*Green Analytical Toxicology-GAT*)

A Química Verde, inicialmente, foi mencionada por Anastas em 1990, devido aos processos químicos, reagentes e solventes empregados na área da química que são prejudiciais ao meio ambiente, assim como sua toxicidade, inflamabilidade, potencial corrosivo, volatilidade, que contribuem para a poluição do ar, água e solo (ANASTAS; EGHBALI, 2010). Portanto, o objetivo da Química Verde é diminuir ou eliminar o uso de produtos químicos, subprodutos, solventes e reagentes utilizados em técnicas laboratoriais que são prejudiciais para saúde humana e para o meio ambiente, abrangendo todas as áreas da química inclusive, a química analítica (ANASTAS, 1999).

Anastas e Warner desenvolveram 12 princípios voltados para Química Verde, que englobam a diminuição de formação de resíduos, o aumento da economia de átomos, o desenvolvimento de sínteses menos perigosas e produtos químicos mais seguros, o uso seguro de produtos químicos, o aumento da eficiência energética, o uso de matéria-prima renovável, visar evitar ou diminuir o uso de derivatizantes, o uso de catálise, dar preferência para produtos que se degradem no ambiente e não

formam resíduo, a análise em tempo real para evitar a poluição e a diminuição de acidentes (ANASTAS; EGHBALI, 2010; GHOSH, 2012).

A química analítica utiliza uma gama de substâncias perigosas, em toda sua cadeia de análise, desde a coleta da amostra, preparação, análise e descarte, que geram resíduos prejudiciais ao meio ambiente assim como, o risco da exposição do trabalhador a esses produtos químicos. Desta forma, o termo Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry – GAC*) refere-se ao desenvolvimento de novos procedimentos e estratégias analíticas com a finalidade de diminuir a geração de substâncias tóxicas em geral (ANASTAS, 1999; GAMA et al., 2019).

Galuszka e colaboradores (2013), relatam que apenas 4 princípios dos 12 princípios propostos pela Química Verde se aplicam ao GAC, desta forma, adicionados aos 4 princípios escolhidos, foram propostos mais 8 princípios, especialmente direcionados ao GAC, formando novamente 12 princípios básicos. São eles: a utilização de técnicas analíticas diretas, evitando assim o processo de tratamento de amostra, a minimização de quantidade e o número de amostras, a realização de medições *in situ*, a integração dos processos analíticos, visando diminuir o uso de reagentes e de energia, a utilização de métodos automatizados e miniaturizados, o planejamento para evitar o uso de derivatizantes, diminuir a geração de menos resíduos analíticos e garantir uma gestão adequada dos resíduos; empregar métodos multianalíticos ou multiparâmetros, o uso de energia deve ser minimizado, dar preferência a reagentes de fonte renovável, a substituição ou eliminação de reagentes tóxicos e a garantia da segurança do operador (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

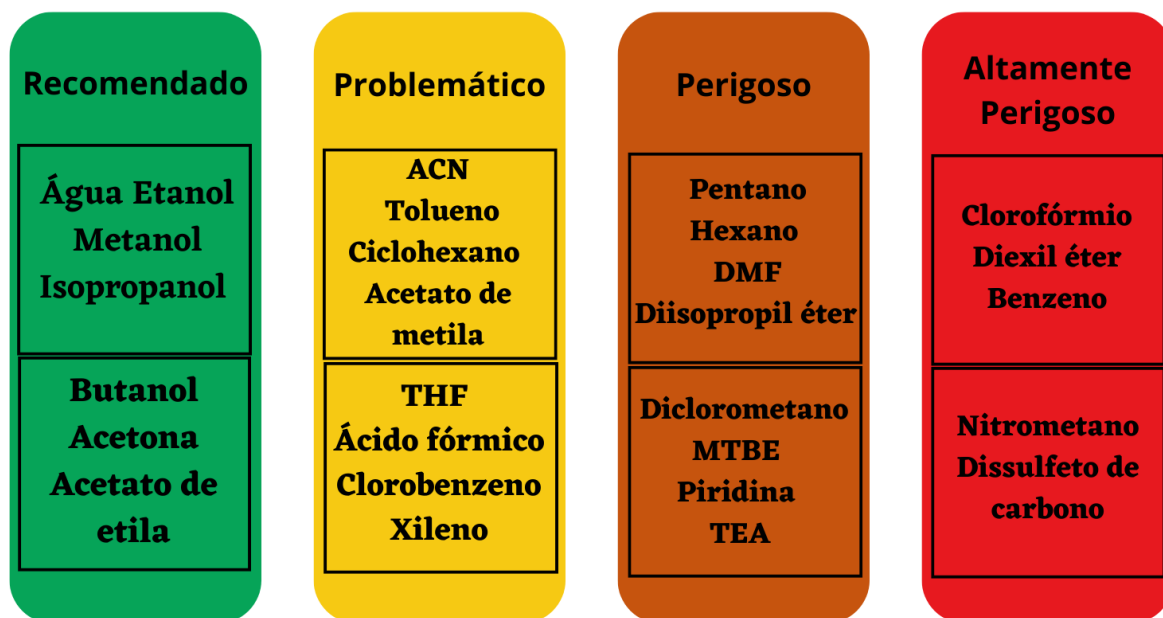
Silveira e colaboradores (2018), publicaram um artigo que cita as principais técnicas de extração verdes empregadas na análise de drogas de abusos em matrizes complexas, como sangue total, leite materno, meconio e cabelo, que mostram o emprego dos princípios do GAC. Uma das técnicas citadas nesse artigo e que foi empregada nesse trabalho, é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), onde é aplicado um solvente de extração e um solvente dispersivo aquoso na amostra, e que será posteriormente discutido no item 1.7.

Recentemente Meirelles e colaboradores (2022), apresentaram um termo (*Green Analytical Toxicology – GAT*), utilizando os princípios do GAC e acrescentando novos termos relacionados à toxicologia, que englobam o preparo de amostras e drogas de abuso nessa área: evitar produtos perigosos através de um *design*

experimental; conduzir testes iniciais empregando produtos químicos menos tóxicos; evitar exposição a produtos químicos perigosos através da condução de testes de segurança; fazer com que as práticas em toxicologia sejam mais sustentáveis e adotar ensaios estratégicos prematuros e preditivos (DE PAULA MEIRELLES et al., 2022).

Os solventes utilizados na área da química geram um grande impacto ambiental e ao trabalhador. Pensando em minimizar esses efeitos, através de consultas embasadas em regulamentações europeias e o Sistema Global Harmonizado (GHS), foi desenvolvido uma metodologia de classificação dos solventes, conforme as normas de segurança, saúde e meio ambiente. Essa classificação foi dividida em 4 categorias, sendo do mais seguro ao menos seguro, e nomeadas como: recomendado, problemático, perigosos e altamente perigosos (PRAT et al., 2015). Na Figura 4 estão listados alguns exemplos dessa classificação:

Figura 4: Classificação dos solventes em categorias de acordo com a periculosidade: recomendado, problemático, perigoso e altamente perigoso.



Fonte: Prat e colaboradores (2015) adaptada por Santos (2023). DMF – N,N dimetilformamida; MTBE – Éter metil t-butílico; TEA – Trietanolamina.

Com base nessa classificação podemos direcionar os estudos para o uso de solventes com menos impacto ao meio ambiente ou a diminuição do consumo de solventes com alta perigosidade.

As técnicas miniaturizadas são outro exemplo de extrações empregados na GAT, que fazem uso de quantidades pequenas de solvente, a microextração em fase líquida (LPME), que possui baixo custo, fácil preparo e utiliza apenas microlitros de solvente orgânico. A extração em fase sólida (SPME), é considerada uma técnica 100% verde pois, não utiliza nenhum solvente no seu processo de extração. E recentemente, a extração desenvolvida por nosso grupo de pesquisa, a microextração líquido-líquido assistido por vórtex baseada em óleo essencial, (VA-EO-DLLME) que também é livre de solventes orgânicos (SILVEIRA et al., 2019; SILVEIRA et al., 2020).

Portanto, com base nos artigos citados sobre as técnicas analíticas em amostras biológicas, principalmente em cabelo, e os estudos citados acima, foi desenvolvido um método utilizando técnicas de preparo de amostras baseadas em toxicologia analítica verde para determinação dos alcaloides da ayahuasca, DMT e as β -carbolinas em cabelo.

1.9 Microextração Líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), foi desenvolvida inicialmente por Rezaee e colaboradores (2006) para extração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Quando a técnica foi desenvolvida, uma seringa foi utilizada para inserir os solventes na amostra, formando assim, uma emulsão turva (REZAAE et al., 2006).

A DLLME é composta por dois solventes, um solvente extrator e um dispersor. O solvente dispersor é miscível na amostra aquosa e no solvente extrator, enquanto o solvente extrator é imiscível na amostra. A formação de gotículas ou emulsão é vista nessa técnica, sendo que essas gotículas emulsionadas ficam na interface entre as fases, permitindo que os analitos da amostra migrem para o solvente extrator (ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; GRZEŚKOWIAK, 2011).

Comparada com outras técnicas de extração como a extração líquido-líquido (LLE) que utiliza grande volume de solvente orgânico, a extração em fase sólida (SPE) que também utiliza solventes orgânicos e tem um custo relativamente alto devido ao uso de cartuchos; a microextração em fase sólida (SPME), onde a fibra utilizada é frágil e tem alto custo, a extração em fase líquida (LPME), que possui baixo custo, utiliza pouca quantidade de solvente, mas é uma técnica pouco prática na sua execução, a DLLME é uma técnica de simples preparação, utiliza pouco volume de

solvente e em algumas versões até dispensa a utilização de solvente orgânico, além de ser rápida e barata.

Na literatura existem métodos para detecção de novas substâncias psicoativas (NPS), estimulantes (anfetamínicos) e benzodiazepínicos em sangue total, plasma, urina e sangue *post-mortem*, utilizando a DLLME como forma de extração (FERNÁNDEZ et al., 2013; MANSOUR; KHAIRY, 2017; MERCIECA et al., 2018; WIELENS BECKER et al., 2020).

Recentemente, Silveira e colaboradores (2020) desenvolveram uma versão da DLLME sem o uso de solvente orgânico, a microextração líquido-líquido assistida por vórtex com a utilização de óleo essencial (VA-EO-DLLME), para quantificação dos alcalóides da ayahuasca em plasma humano.

Na literatura científica não foram identificados métodos de análise de cabelo utilizando a DLLME como técnica de extração, para a identificação e quantificação para dos alcaloides da ayahuasca. Assim, a partir dos solventes extratores e dispersores presentes nesses métodos e nos trabalhos citados de análise de drogas em cabelo, foi desenvolvido a DLLME aplicada nesse estudo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Validar um método de extração através de estratégias de Toxicologia Analítica Verde (GAT) para identificação de compostos ativos da ayahuasca, sendo eles a harmina, harmalina, tetrahydro-harmina e dimetiltryptamina em amostras de cabelo, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS).

O cabelo permite observar a exposição em longo prazo permitindo diferenciar indivíduos que utilizam da ayahuasca dentro do contexto religioso dos indivíduos que utilizam de forma abusiva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e outros materiais

Metanol grau HPLC 99,97% (CH₃OH), acetonitrila grau HPLC 99,9% (CH₃CN), bicarbonato de sódio PA 99,7% à 100,3 (NaHCO₃) e carbonato de sódio PA 99,9% (CNa₂CO₃) todos obtidos pela Merck (Darmstadt, Germany), cloreto de amônio 99,5% (NH₄Cl), obtido pela Merck (Rio de Janeiro, Brasil), formiato de amônio grau MS ≥ 99% (CH₅NO₂), obtido da Sigma Aldrich (Cotia, Brasil), Acetato de metila PA (C₃H₆O₂) 100% obtido da Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany), ácido fórmico PA 98% (CH₂O₂) e tetrahydrofurano (THF) 99% PA (C₄H₈O), ambos obtidos da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil), hidróxido de sódio PA 97% (NaOH), fosfato de sódio bibásico anidro PA 99% (Na₂HPO₄) e ácido clorídrico PA 36,5 à 38% (HCl), todos obtidos da Synth (São Paulo, Brasil), clorofórmio (Cl) 100% PA (CHCl₃), foi obtido da Carlo Erba (Lombardia, Itália), Hexano PA (C₆H₁₄) 99,0%, obtido da LS Chemicals (Ribeirão Preto, Brasil).

Ponteira de eletroforese em gel modelo Round CC 4853 nas dimensões de 0,5mm com capacidade de 1-200 µL obtidos da empresa Costar (Corning, Nova York, USA).

3.1.2 Padrões

Padrões de dimetiltryptamina (pureza 99,4%), harmina, harmalina e tetrahydro-harmina foram adquiridos da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA). Para harmina, harmalina e tetrahydro-harmina a pureza é ≥ 98 %.

O padrão de dimetilriptamina na forma deuterada (DMT-d₆), utilizado como padrão interno, foi sintetizado como descrito por Oliveira e colaboradores (2012).

3.1.3 Equipamento e programas

- O equipamento utilizado neste estudo foi o cromatógrafo líquido de ultra eficiência, modelo Acquity System, acoplado à espectrômetro de massas triplo quadrupolo no modo tandem, modelo Quattro Premier, com ionização por eletrospray (UPLC-ESI-MS/MS), Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EUA). O software utilizado foi o MassLynx™ Software V4.1 (Water Corporation, Milford, MA). Disponível no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP).

- Sistema Milli-Q foi usado processo de água ultra-pura Millipore (Billerica, Massachusetts, EUA).

- Agitador multitubo modelo VX-2500 (VWR, EUA).

- Concentrador de amostra com fluxo de nitrogênio Reacti-Therm III, Thermo Fisher Scientific (Alemanhã);

- Balança analítica Shimadzu Marte modelo AUW-220D (Japão).

- Microcentrifuga Kasvi modelo K14-1215 (São Jose do Pinhais, Paraná).

- Minitab 19.1.1 (EUA).

- MassLynx™ Software V4.1 (Water Corporation, Milford, MA);

- Microsoft Excel R 2019;

- Biorender;

- ChemDraw Pro 12.0.

3.1.4 Coluna cromatográfica

- Coluna C18 (2.1mm x 100mm, 1.7 µm), Waters Corporation (Milford, Massachusetts, EUA).

3.1.5 Amostras

Amostras de cabelo (n = 10) foram coletadas de voluntários que declararam a não utilização das substâncias em estudo. Com estas amostras foram desenvolvidos o método de extração e validação. Para a verificação da negatividade, foi pesada,

extraída e analisada de acordo com o método proposto no item 3 de Material e Métodos.

Para confirmação do método foram coletadas ($n = 6$) amostras de cabelos de indivíduos que realizam uso crônico da ayahuasca em participantes de uma comunidade religiosa ayahuasqueira. A coleta da amostra foi após a ciência e concordância na participação do estudo através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (número do parecer 2.267.476).

3.1.6 Coleta das amostras e acondicionamento

As amostras de cabelo foram coletadas da nuca, na região do vértice posterior, local de menor variação de crescimento. Após calçar as luvas, foi separado uma mecha do vértice posterior da cabeça do voluntário e cortado o mais próximo possível do couro cabeludo.

Em seguida, as amostras foram armazenadas em papel alumínio identificando a parte proximal do couro cabeludo de acordo com seu posicionamento no papel alumínio e acondicionado dentro de envelopes de papel, identificados por números e encaminhadas ao Laboratório de Análises Toxicológicas da USP, onde foram realizadas as análises confirmatórias dos analitos de interesse, com o intuito de comprovar a viabilidade e confiabilidade do método desenvolvido.

3.2 Métodos

3.2.1 Condições cromatográficas e do espectrometro de massas

Para o sistema cromatográfico foi definido a eluição gradiente com 1mM de tampão formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (fase móvel B) a constante de fluxo é 0,3ml/min e a temperatura da coluna à 40°C. O gradiente de eluição usado foi de 0–0.5min, 10% B; 0.5–7min, 40% B; 7.1–8.0min, 80%B; 8.1–9.0min, 10%B; 9.1–12.0min, 10%B. O tempo total da corrida foi de 12.0 min. A volume de injeção foi de 10 μ L. O espectrômetro de massa foi operado no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), considerando três transições para cada analito. As configurações de MS foram estabelecidas da

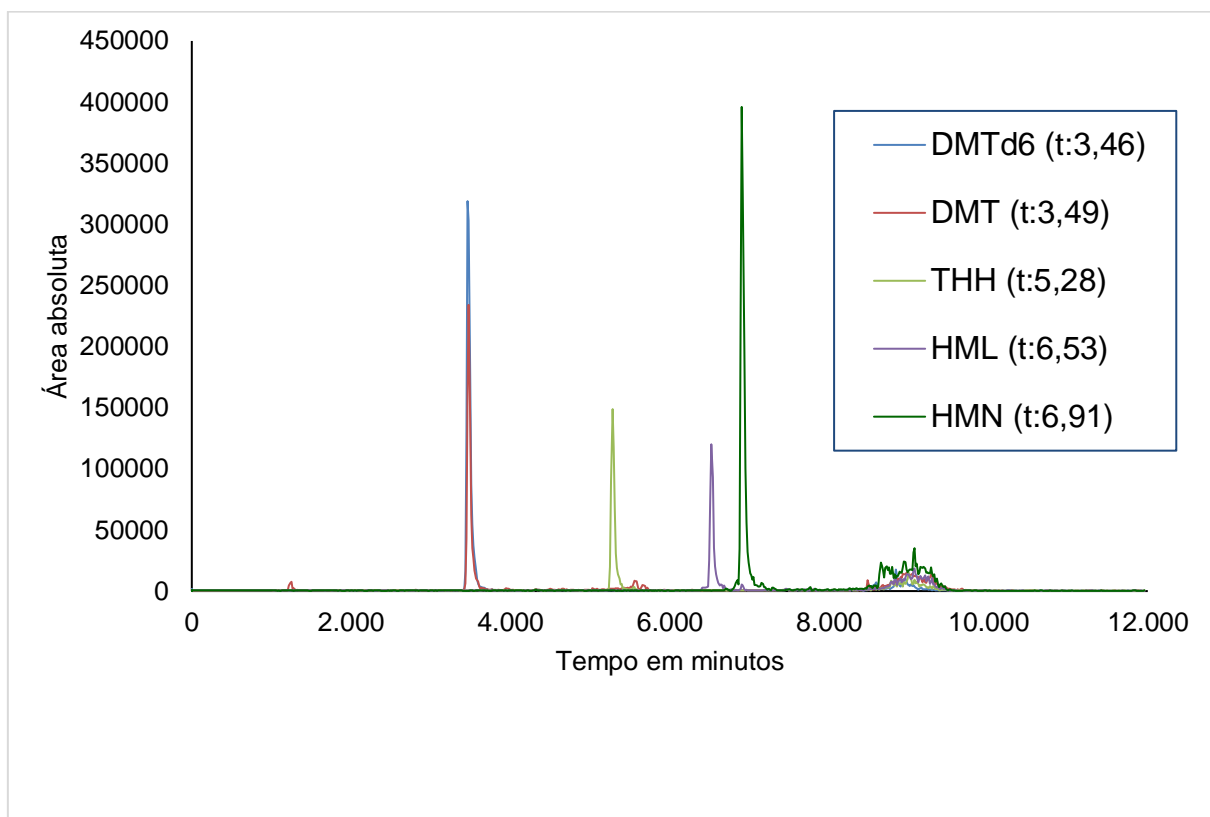
seguinte forma: taxa de fluxo do gás de dessolvatação, 1.000 l/h; taxa de fluxo de gás cone, 50 l/h; temperatura de dessolvatação 450°C; temperatura da fonte, 120°C; tensão capilar, 3.00V. Os tempos de retenção, tensão capilar, energia de colisão e transições massa/carga - m/z usadas para quantificação de cada analito é indicado na Tabela 2. Os cromatogramas foram projetados após a extração de dados brutos da MassLynx™ Software V4.1 (Water Corporation, Milford, MA) e plotá-los no Microsoft Excel R 2019 para melhorar a resolução da imagem, conforme mostra na figura 5.

Tabela 2: Parâmetros do espectrômetro de massa para os analitos e padrão interno.

Analito	Tempo de retenção (min)	Ion precursor, Q1 (m/z)	Ion produto, Q3 (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)
DMT-D6 (IS)	3,46	195,1	63,9	15	14
			114,9	15	36
			143,8	15	22
DMT	3,49	188,9	57,8	20	11
			116,7	20	29
			143,8	20	17
THH	5,28	217,1	172,8	25	29
			187,9	25	17
			200,0	25	13
HML	6,53	215,2	130,4	40	41
			171,7	40	33
			199,9	40	25
HMN	6,91	213,2	143,8	40	39
			169,8	40	30
			198,0	40	23

A Coluna C18 (2.1mm x 100mm, 1.7 µm) da Waters Corporation foi utilizada para desenvolvimento do metodo.

Figura 5: Cromatograma dos íons totais foram projetados após a extração de dados brutos da MassLynx™ Software e plotá-los no Microsoft Excel R 2019 para melhorar a resolução da imagem.



Fonte: De autoria própria (2023).

3.2.2 Preparo das amostras de cabelo

3.2.2.1 Preparo das amostras (descontaminação)

As amostras de cabelo foram descontaminadas com o objetivo de remover contaminação externa, sujeira e gordura da superfície do cabelo, porém sem danificar a integridade ou remover os analitos de interesse do interior do cabelo.

Para isso, a cada 20mg de cabelo, 1mL da solução de lavagem foi adicionado. A lavagem foi padronizada com metanol e agitado com o auxílio de vórtex, sendo esse processo repetido 2 vezes (PANTALEÃO; PARANHOS; YONAMINE, 2012). Para finalizar, a amostra foi seca, na capela, em temperatura ambiente por 24 horas.

Após essa etapa, o cabelo é cortado em tamanhos menores com auxílio de uma tesoura e armazenado em recipiente de vidro. Uma das vantagens em trabalhar com cabelo é que essa matriz possui uma boa estabilidade e não necessita de

procedimentos de armazenamento rigorosos como condicionar as amostras em baixa temperatura, como é o caso da urina, sangue e outras amostras biológicas.

3.2.2.2 Processo de digestão da amostra

Para o estudo, foram utilizados 20mg de cabelo, pois de acordo com o levantamento bibliográfico, a maioria dos autores utilizam essa quantidade de amostra (CHO et al., 2018; DUAN et al., 2021; KINTZ et al., 2005). Além disso, foram realizados testes iniciais e obtivemos um melhor desempenho no processo de extração com essa quantidade de amostra. Em seguida, o cabelo foi digerido com solução de NaOH 1 mol/L, em estufa, com a temperatura de 50°C, por 2h30min.

3.2.2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva

Após a descontaminação das amostras, estas foram separadas em alíquotas de 20mg e transferidas para um *ependorf* de 2mL. Em seguida, foram adicionadas 100pg/mg do padrão interno (PI) e 1mL de NaOH 1mol/L para possibilitar a digestão da fibra capilar e liberação dos analitos da matriz. Os tubos foram fechados e a amostra foi deixada a 50°C por 2h30min. Após este período, foi aguardado o resfriamento da amostra em temperatura ambiente.

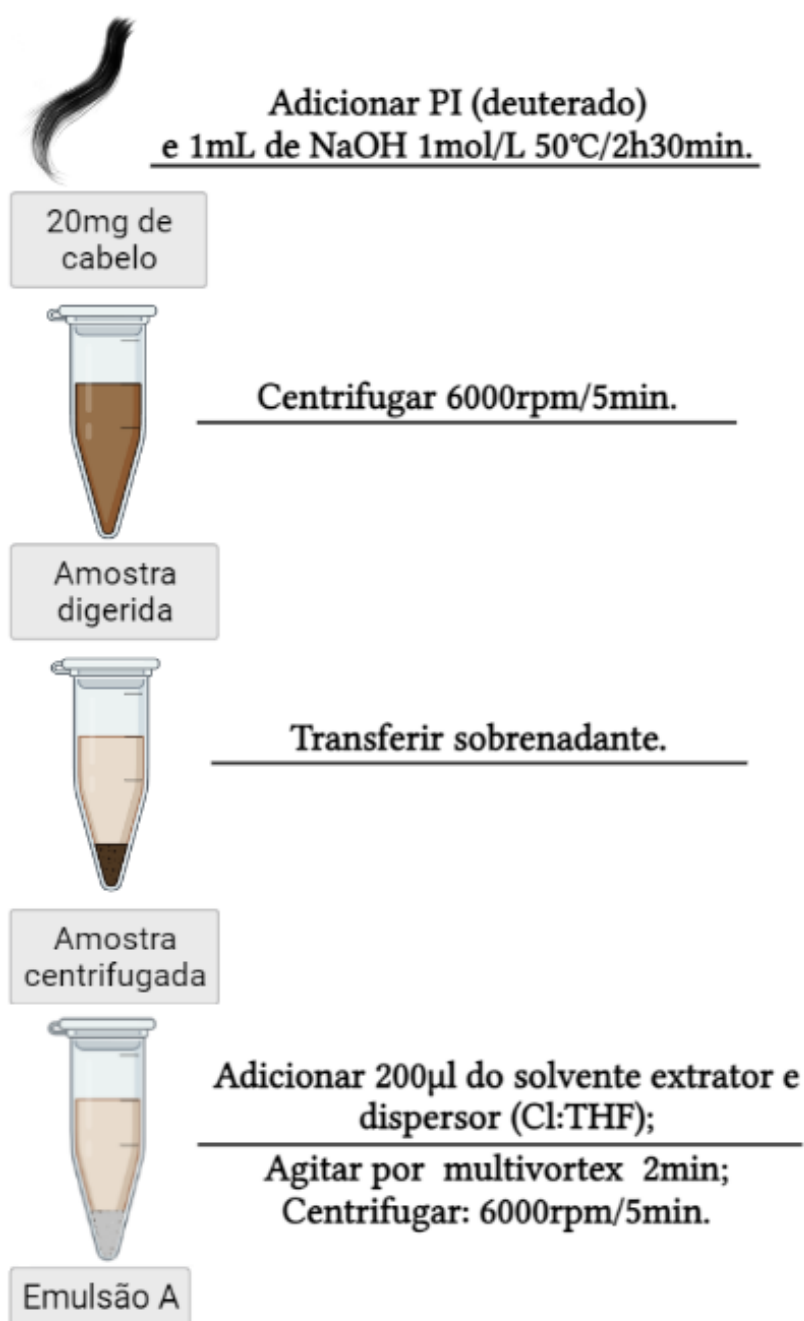
Em seguida, a amostra é centrifugada à 6000 rpm por 5 minutos. As partículas restantes do cabelo vão para o fundo do tubo, retira-se o sobrenadante, e transfere para um novo *ependorf* de 1,5mL. Nesse *ependorf*, com a amostra, é adicionado 200µL de uma solução de clorofórmio (extrator) e THF (dispersor) na proporção 1,5:1 e misturado em multivortex 2.400rpm por 2 minutos. Nesse processo, é formado uma emulsão da amostra, em virtude da mistura da amostra com os solventes extrator e dispersor, chamada emulsão A.

A emulsão A é centrifugada à 6000 rpm por 5 minutos, ocorrendo a separação das fases. A fração inferior do tubo, 170µL é coletado e adicionado em outro *ependorf* de 1,5mL. Nesse *ependorf* foi previamente adicionado 300µL de água ultrapura e 100µL tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH10,8. Esta solução contendo o extrato da emulsão A, água ultrapura e tampão foi agitada por 2 minutos em multivortex 2.400rpm, formando uma nova emulsão, chamada emulsão B.

A emulsão B é centrifugada 6000 rpm por 5 minutos, ocorrendo novamente a separação das fases. Por fim, 120µL da fração inferior é transferida para um novo *ependorf*, seco sob fluxo de nitrogênio e ressuspendido em 200µL com fase móvel A

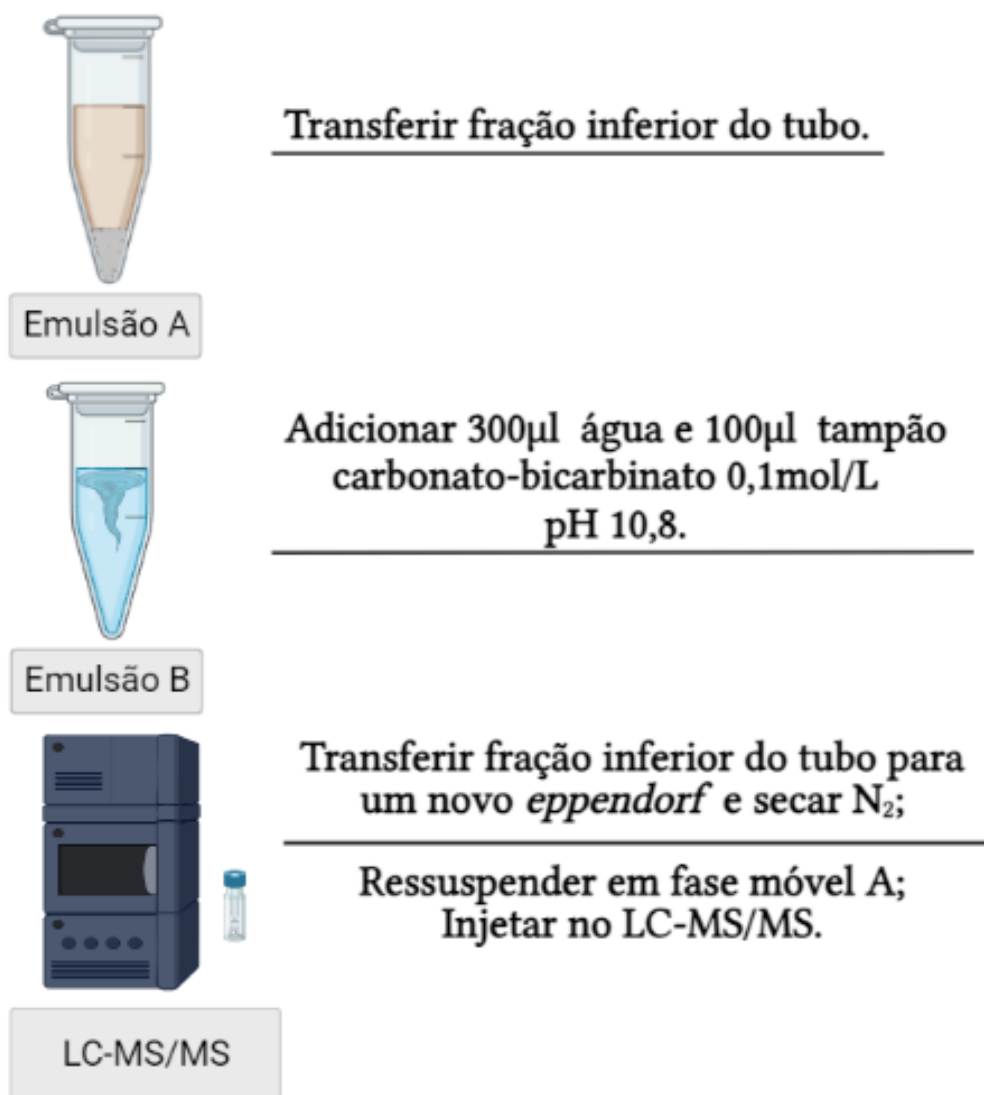
e recolhido para um *vial*, conforme Figura 6. Terminado esse procedimento, 10 μ L do extrato são injetados automaticamente no LC-MS/MS.

Figura 6: Processo de extração dos alcaloides da ayahuasca em cabelo, pela técnica DLLME, conforme descrito no item 3.2.3.



Fonte: De autoria própria (2023).

Figura 6:continuação.



Fonte: De autoria própria (2023).

3.2.2.4 Otimização do método

O experimento foi dividido em duas etapas. Primeiramente, o processo de digestão foi otimizado e os parâmetros avaliados foram: temperatura, volume e diferentes tipos de solventes utilizados no processo. Em um segundo momento, foi otimizada a DLLME, onde os parâmetros estudados foram: tempo de agitação, volume e proporção de solventes dispersor e extrator.

Em algumas dessas etapas foram utilizados o software Minitab® com a criação de um plano experimental, *design of experiment* (DOI) que será descrito no item 4.2.

3.2.2.5 Validação do método

A validação consiste em um conjunto de experimentos que estima de forma confiável a eficácia de um método analítico e principalmente identificar as limitações do método. Além disso, a validação de um método analítico é utilizada não apenas para um novo método, mas, para a modificação de um método já existente, melhorar o desempenho ou atender a outro uso pelo qual não foi originalmente desenvolvido (ANSI/ABS STANDARD, 2019; SWGTOX, 2013).

O método analítico foi validado de acordo com os parâmetros preconizados pelos guias internacionais de validação - *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* (ANSI/ABS STANDARD, 2019), sendo estes: seletividade, limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ), linearidade, precisão intra e inter-ensaio, exatidão e *carryover*.

Para o ensaio efeito matriz, recuperação e eficiência do processo foi utilizado o artigo de Matuszewski e colaboradores, 2003.

3.2.2.5.1 Seletividade

A seletividade é um ensaio realizado com algumas substâncias (fármacos, drogas de abuso e seus produtos de biotransformação) que podem ou não ter características semelhantes com os analitos de interesse. O objetivo é avaliar se essas substâncias interferem no método desenvolvido (IUPAC, 2012).

A seletividade foi avaliada em algumas etapas citadas a seguir:

- Extração de 10 amostras de cabelo branco, ou seja, de indivíduos que não utilizaram a ayahuasca, sem a adição de padrão e padrão interno. Foi avaliada a presença ou ausência de picos interferentes (substâncias endógenas) nos tempos de retenção dos analitos.
- Foram injetados padrões nas concentrações de 10ng/mg (PICHINI et al., 2014b). Foram utilizados os padrões de cafeína, nicotina, anfetamina, metanfetamina, metilenedioximetanfetamina (MDMA), metilenedioxianfetamina (MDA), morfina, codeína, fenobarbital, secobarbital, pentobarbital, paroxetina, fluoxetina, norfluoxetina, sertralina, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, midazolam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam, flunitrazepam, bromazepam, aminoclonazepam, alprazolam, clonazepam, diazepam, cocaína,

cocaetileno, benzoilecgonina, anidroecgonina metil ester (AEME), tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC). Nesse estudo, foi avaliada a presença de picos (substâncias exógenas) nos tempos de retenção dos analitos estudados.

Em uma amostra foi adicionado o padrão à 1000 pg/mg (valor do ponto alto da curva de calibração) dos alcaloides da ayahuasca, realizada a extração e injetada no LC-MS/MS. Esse teste demonstra se os tempos de retenção dos picos cromatográficos dos alcaloides da ayahuasca não coincidem com o tempo de retenção do padrão interno.

Em uma amostra foi adicionado o padrão interno à 100 pg/mg do DMTd₆ extraído e injetado no LC-MS/MS. O pico cromatográfico do DMTd₆ não pode estar presente no mesmo tempo de retenção dos picos dos alcaloides da ayahuasca.

Com exceção da DMT e do DMTd₆, que possuem praticamente o mesmo tempo de retenção. Desta forma, foi avaliado as fragmentações de massa para distinguir a DMT do DMTd₆.

3.2.2.5.2 Limite de detecção (LoD) e quantificação (LoQ)

O LoD é definido como a menor concentração com que o método pode detectar a substância de interesse, sem necessariamente ser quantificado (ARAUJO, 2009a).

Para avaliar o LoD, foi estabelecida uma concentração definida de 3 e 8 pg/mg. Três diferentes amostras de cabelo branco foram selecionadas e realizada apenas a adição do padrão. Esse procedimento foi repetido em três corridas distintas e os critérios de detecção e identificação foram avaliados.

No mesmo experimento descrito acima, também foi avaliado o LoD, através da estimativa usando material de referência. Para essa avaliação foi calculada a relação sinal-ruído por meio de software do instrumento.

O LoQ é a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão (ARAUJO, 2009).

No caso do LoQ, três amostras diferentes foram analisadas ao longo de três corridas para demonstrar que todos os critérios para detecção, identificação, precisão e exatidão foram alcançados (coeficiente de variação - CV% < 20%). O LoD e o LoQ devem apresentar tempo de retenção com variação de, no máximo, variação de $\pm 2\%$ e espectros de massa com massa/carga estabelecidos e proporção entre os íons.

3.2.2.5.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais a concentração do analito presente na amostra (MARK, 2003). A resposta medida e concentração do analito pode ser calculada através da equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde, y é a resposta medida, neste caso a razão entre área do padrão interno e os analitos; x é a concentração; a é a inclinação da curva de calibração; b é a intersecção com eixo y, quando x é igual a 0.

A linearidade foi determinada pela análise de amostras brancas, em sextuplicadas, onde foram adicionados os padrões analíticos de interesse e posteriormente, extraídas. Os padrões foram adicionados nas amostras de cabelo nas concentrações 20,50,200,500,750,1000 pg/mg.

O fenômeno de heterocedasticidade foi avaliado aplicando-se o *F-test*. A partir do resultado da variância da maior concentração da curva em relação a menor concentração, é obtido o $F_{\text{experimental}}$. Com o resultado do $F_{\text{experimental}}$, o mesmo é comparado com o F_{tabelado} , se o $F_{\text{experimental}}$ for maior F_{tabelado} o método é considerado heterocedástico. A curva, sendo heterocedástica, significa que, existe um erro associado as medidas que foram utilizadas para construção da curva de calibração. Esse erro, pode ser corrigido, empregando-se a regressão dos mínimos quadrados ponderados (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCAO, 2002). Os coeficientes de ponderação (w_i) estudados foram $1/X$, $1/X^2$, $1/X^{1/2}$, $1/Y$, $1/Y^2$, $1/Y^{1/2}$. A escolha de W_i foi feita a partir da somatória dos erros relativos (%RE) e o valor do coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,99.

3.2.2.5.4 Carryover

O efeito *carryover* ocorre quando há contaminação de amostras subsequentes às amostras em alta concentração (IUPAC, 2012). O ensaio de *carryover* foi avaliado pela análise de três amostras branco injetadas no LC-MS/MS, imediatamente após a injeção de uma amostra de alta concentração (1000 pg/mg). Os picos e fragmentações dos analitos e padrão interno não devem estar presentes nas amostras branco.

3.2.2.5.5 Precisão e Exatidão

A exatidão de um método é a relação entre quantidade real de analitos presente na matriz e o quão próximo este valor está do valor experimental (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011). Já a precisão, avalia o quão próximo estão as medidas obtidas no método e/ou avalia o erro de um conjunto de medições que neste caso, foram avaliados pelo coeficiente de variação (ARAUJO, 2009; BETZ; BROWN; ROMAN, 2011).

Para isso, os ensaios de precisão e exatidão foram realizados, a partir da análise de amostras de cabelo, em três níveis de controle – baixo (CB), médio (CM) e alto (CA), como na Tabela 3.

Tabela 3: A tabela mostra as concentrações dos controles para ensaios de precisão e exatidão.

Analito	CB pg/mg	CM pg/mg	CA pg/mg
DMT	40	400	800
THH	40	400	800
HML	40	400	800
HMN	40	400	800

A precisão intra-ensaio e inter-ensaio foi avaliada através da análise de três replicatas, por cinco dias diferentes. Os resultados de precisão foram expressos como coeficiente de variação - CV% e calculados através da análise de variância - ANOVA fator único. A seguir estão as fórmulas utilizadas para os cálculos de precisão (intra e inter-ensaio) e CV%:

$$CV\% = \frac{\text{DesvPad}}{\text{Média da AR}} \times 100$$

Precisão intra-ensaio:

$$\text{Precisão intra – ensaio} \left[\frac{\sqrt{MSwg}}{\text{Média para cada concentração}} \right] \times 100$$

Precisão inter-ensaio:

$$\text{Precisão inter – ensaio} \left[\frac{\sqrt{\frac{MSbg + (n - 1) * MSwg}{n}}}{\text{Média para cada concentração}} \right] \times 100$$

MSwg é o quadrado médio do intra-ensaio obtido da tabela ANOVA.

MSbg é o quadrado médio do inter-ensaio obtido da tabela ANOVA.

A exatidão foi determinada a partir da quantificação de três replicadas de cada nível de controle, utilizando a curva de calibração, previamente realizada por cinco dias distintos. Os resultados foram expressos como porcentagem da concentração conhecida, através da fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão (\%)} = \left[\frac{\text{Média das concentrações calculadas} - \text{Concentração nominal}}{\text{Concentração nominal}} \right] \times 100$$

Os critérios de aceitação, tanto para precisão, quanto exatidão, foi de 20% para todos os controles.

3.2.2.5.6 Recuperação, efeito matriz e eficiência do processo.

A recuperação é a quantidade total de uma substância que é quantificada e que foi submetida a um processo químico, nesse caso, ao processo de extração (BIENVENU et al., 2017).

O efeito matriz é definido como todos os componentes presentes na amostra, além do analito (BIENVENU et al., 2017). A eficiência do processo é uma comparação do analito na matriz, após a extração completa, comparado com os analitos após a reconstituição do padrão em fase móvel e injetados no equipamento (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

Para avaliar a recuperação (RE), efeito matriz (ME) e eficiência do processo (EP) foi analisado amostras de cabelo em três níveis de controle, baixo (CB:40pg/mg), médio (CM:400pg/mg) e alto (CA:800pg/mg). Foram utilizadas cinco replicadas para cada concentração, seguindo os métodos propostos por Matuszewski, Constanzer e Chavezeng (2003). Cada replicada de amostra de cabelo foi submetida a um ensaio diferente, separadas em grupos:

Grupo A: padrões puros que foram diluídos em fase móvel.

Grupo B: foram extraídas amostras de cabelo branco e os padrões analíticos foram adicionados após a extração.

Grupo C: os padrões analíticos foram adicionados antes da extração das amostras de cabelo.

Para o cálculo de RE, a área absoluta do grupo C foi comparada com a área absoluta do grupo B (equação 2); para o cálculo do ME, a área absoluta do grupo B

foi comparada com a área absoluta do grupo A (equação 1); e para o cálculo da EP, a área absoluta do grupo C foi comparada com o grupo A (equação 3).

$$1) \quad \mathbf{ME(\%)} = \left(\frac{B}{A}\right) \times 100$$

$$2) \quad \mathbf{RE(\%)} = \left(\frac{C}{B}\right) \times 100$$

$$3) \quad \mathbf{PE(\%)} = \left(\frac{C}{A}\right) \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados do processo de descontaminação/lavagem do cabelo

As amostras de cabelo passam por algumas etapas adicionais de preparo de amostra antes de passar pelo processo de extração. Uma dessas etapas é o processo de lavagem ou descontaminação. Esse processo tem o objetivo eliminar sujidades e contaminantes externos que ficam na superfície do cabelo. Vale ressaltar que no processo de lavagem o solvente de escolha não deve ter a capacidade de retirar os analitos de interesse do interior do cabelo, mas apenas da parte externa; além disso, não existe um método de lavagem padrão ou protocolo em análise de cabelo (FERREIRA; PAULINO; QUINTAS, 2019). O procedimento de descontaminação com metanol foi escolhido com base nos princípios do GAC, por ser um solvente menos prejudicial ao meio ambiente (ANASTAS, 1999).

4.2 Otimização do processo de digestão do cabelo

Após o processo de descontaminação do cabelo, para eliminar contaminação externas ao cabelo, temos a etapa de digestão. Nesse processo, a literatura descreve diferentes solventes e soluções que são utilizados, bem como associado à temperatura e equipamentos de ultrassom ou a um processo adicional, a pulverização (FERREIRA; PAULINO; QUINTAS, 2019).

O processo de digestão do cabelo pode ser feito de três formas: através de uma hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (KHAJURIA; NAYAK; BADIYE, 2018). Foi avaliado o processo de digestão por hidrólise ácida e alcalina. A hidrólise alcalina foi avaliada por meio das soluções: NaOH 0,1mol/L, 0,5mol/L e 1mol/L; cloreto de amônio pH 9,5, tampão fosfato de sódio 0,5M pH 8,4, tampão fosfato de potássio 1mol/L pH 8,4, tampão fosfato de amônio 1mol/L, pH 8,4, e o solvente metanol, grau HPLC. A hidrólise ácida foi verificada através de uma solução contendo acetonitrila, metanol, ambos em grau HPLC, juntamente com formiato de amônio 2mM, ácido clorídrico 0,1mol/L e 1mol/L (CARFORA et al., 2020; CHO et al., 2018; CUTLER et al., 2020; FRENÍ et al., 2020; HOLD et al., 1997; KINTZ, 2018; KINTZ et al., 2005, 2006; MAAS et al., 2017; PANTALEÃO; PARANHOS; YONAMINE, 2012). Além disso, foram investigados diferentes equipamentos para auxiliar no processo de digestão, como a estufa, cuba ultrassônica, banho-maria, agitador multi-vórtex e bloco de aquecedor seco.

Recentemente, um estudo feito para detecção dos analitos da ayahuasca em urina utilizando como método de extração a microextração em fase líquida (LPME) foi utilizado o bloco de aquecimento a 50°C, para a secagem dos analitos em fluxo de nitrogênio, sem que houvesse degradação pela temperatura destes analitos (SILVEIRA et al., 2020).

As amostras de cabelo foram deixadas em diferentes condições: temperatura ambiente (25°C) e alta temperatura, 50°C, e observado por 4, 8, 12 e 24 horas. Baseando-se nesses dados, a hidrólise ácida e alcalina foram avaliadas no processo de digestão do cabelo. Na literatura não é citado se a matriz é completamente digerida no processo de digestão. Assim, um resultado positivo para o nosso estudo de digestão da amostra foi observar a liquefação da fibra do cabelo em solução. Apenas com o uso da solução de NaOH foi observada a digestão completa do cabelo; desta forma, espera-se que os analitos presentes no interior do cabelo sejam totalmente liberados da matriz e permaneçam na solução.

Além disso, métodos desenvolvidos para detecção de anfetamina, metamphetamine, metilenodioximetamphetamine (MDMA) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), femproporex e alprazolam em cabelo utilizaram hidrólise alcalina no processo de digestão (HOLD et al., 1997; PANTALEÃO; PARANHOS; YONAMINE, 2012). A classe de estimulantes e benzodiazepínicos possuem semelhança molecular com os alcaloides da ayahuasca, podendo demonstrar comportamento físico-químico semelhantes entre si, corroborando com os resultados obtidos nesta etapa de digestão sendo, portanto, mais bem indicada para desenvolvimento do método.

Para as soluções, NaOH 0,1mol/L, metanol grau HPLC, cloreto de amônio pH 9,5, tampão fosfato de sódio 0,5mol/L pH 8,4, tampão fosfato de potássio 1mol/L pH 8,4, tampão fosfato de amônio 1mol/L, pH 8,4, a solução contendo acetonitrila, metanol, ambos em grau HPLC, juntamente com formiato de amônio 2mM e ácido clorídrico 0,1mol/L e 1mol/L não ocorreu a digestão do cabelo, mesmo associando equipamentos com aquecimento no período de 24 horas de observação. Já a utilização da solução digestora de NaOH 0,5mol/L e 1mol/L ocorreu a digestão completa do cabelo. A junção do solvente NaOH 0,5mol/L e 1mol/L com os equipamentos mencionados acelerou o processo de digestão. A temperatura de 50°C favoreceu e acelerou o processo de digestão.

Comparando a estufa com os demais equipamentos, são eles, a cuba ultrassônica que funciona por um período 30 minutos, o banho-maria e multi-vortex apresentaram um período maior de digestão comparado com a estufa. O bloco de aquecimento a seco e a estufa apresentaram um tempo de digestão praticamente equivalente, entretanto o bloco de aquecimento a seco comporta apenas 12 espaços para as amostras que ocasiona uma falta de praticidade do processo. Portanto, a estufa foi escolhida por apresentar um maior espaço, suportando um maior número de amostras que podem ser digeridas ao mesmo tempo, além de ser a forma mais rápida de digestão neste estudo. Então, foi definido como solução digestora NaOH 1 mol/L molar e a estufa à 50°C para o processo de digestão.

4.3 Desenvolvimento do processo de extração

4.3.1 Estudos preliminares do desenvolvimento da extração

Na literatura científica não existe um método para detecção dos alcaloides da ayahuasca, DMT juntamente com as β -carbolinas em cabelo, desta forma foi investigado alguns métodos analíticos de extração já comumente usados em outras amostras biológicas e não biológicas como, a ayahuasca, urina e plasma (SILVEIRA et al., 2020; SILVEIRA et al., 2020). Além disso, métodos de extração para anfetaminas e benzodiazepínicos, que possuem semelhança química, com os alcaloides foram testados (FERNÁNDEZ et al., 2014; PIERGIOVANNI et al., 2018; WIELENS BECKER et al., 2020).

Por ser um estudo inédito, alguns métodos de extração preliminares foram avaliados. O cabelo após a digestão gera muito resíduo, assim, o nosso objetivo era encontrar um método para essa amostra que resultasse em um extrato límpido compatível com o LC-MS/MS.

As extrações testadas foram: a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase líquida (LPME). No nosso laboratório foi desenvolvido um método de SPE para os alcaloides da ayahuasca na bebida (PIRES et al., 2009). Com base nisso, tentou-se reproduzir essa técnica para a matriz cabelo, mas mesmo com as diversas etapas de lavagem não foi possível remover todo o resíduo de cabelo do extrato, impedindo sua injeção no LC-MS/MS.

A extração LLE foi testada com diferentes solventes e volumes. Os solventes hexano, solução de hexano e acetato de etila na proporção 99:1, 50:50 e 5:1 e a

associação de hexano e acetato de metila 5:1 foram testados. Porém, assim como na SPE no extrato final foi observado que apresentou resíduos, demonstrando a ineficiência da extração para ser analisada no LC-MS/MS.

O nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma LPME para os alcaloides da ayahuasca em urina (SILVEIRA et al., 2020). A fibra utilizada na extração LPME permitiu a limpeza do extrato e injeção no LC-MS/MS. Essa extração foi testada para a matriz cabelo, porém foi verificado que essa extração quando submetida a uma concentração mais baixa, como as encontradas em cabelo (120pg por mg), a mesma não foi capaz de extrair os analitos da ayahuasca. Portanto, todos os métodos de extração citados foram descartados, por não apresentarem um produto de extração límpido, sendo incompatíveis com o equipamento, ou por não atingirem limites de detecção desejados.

4.3.2 Desenvolvimento da microextração líquido-líquido dispersiva e otimização

Como as extrações LLE, SPE e LPME não apresentaram resultados desejáveis, impossibilitando a continuidade do estudo, outra técnica de extração chamada microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi avaliada. A DLLME é uma extração composta por dois solventes, um solvente extrator, responsável em extrair os analitos da matriz, e um solvente dispersor, responsável por aumentar a superfície de contato do extrator com a amostra, resultando em uma emulsão (ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; GRZEŚKOWIAK, 2011; SILVEIRA et al., 2020).

Foi consultada a literatura científica e selecionados alguns extratores e dispersores mais utilizados. Assim, os extratores diclorometano, hexano, cicloexano, heptano, tolueno, n-octanol e clorofórmio e os dispersores acetonitrila, tetrahidrofurano (THF), 2-propanol, acetona, metanol, etanol e acetato de metila foram testados (MANSOUR; KHAIRY, 2017; PIERGIOVANNI et al., 2018; WIELENS BECKER et al., 2020).

Assim como nos outros métodos de extração, o maior desafio foi desenvolver um método que no final do processo o extrato ficasse límpido e viável para injeção no equipamento. Portanto, a maior parte do tempo foi gasto com esse intuito, assim foram testadas diferentes volumes e proporções dos solventes extratores e dispersores que foram citados acima, sendo elas, proporções: 1:2; 1:5, 1:1,65, 1:2,5 e 1:3; volumes:

200, 250, 280 e 500 μ L. Além disso, foi adicionada mais uma etapa com adição de água e tampão o que permitiu a limpeza do extrato.

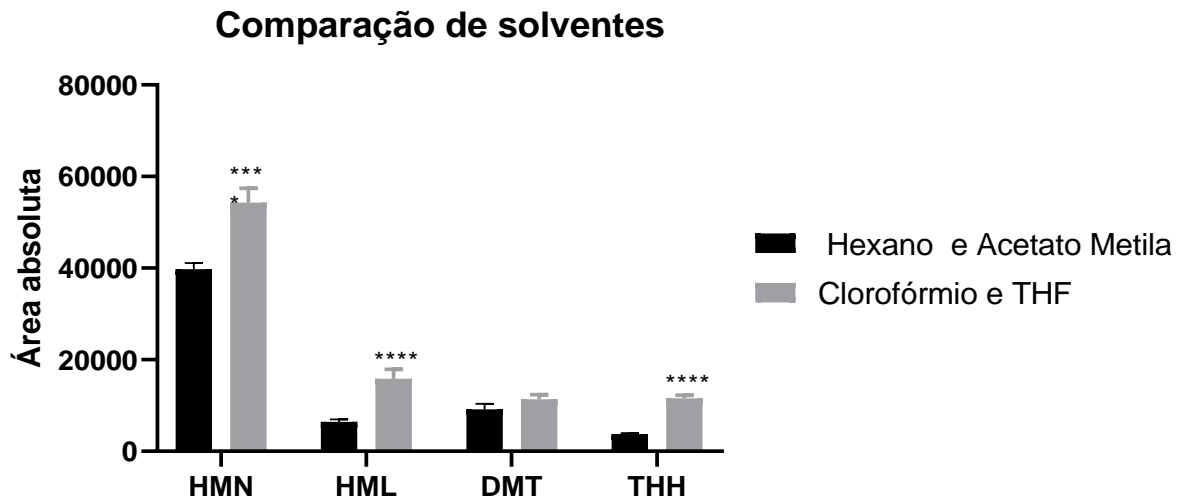
Inicialmente, os testes foram feitos com 50mg de cabelo, mas com esse volume de amostra o extrato final ficava com excesso de resíduo e não era possível injetar no equipamento. Então a massa da amostra foi diminuída para 20mg de cabelo, o que é um volume de amostra mais comum utilizado pelos pesquisadores. Outra melhoria na DLLME foi utilizar um menor volume de dispersor e maior volume de extrator. Na literatura, a DLLME convencional possui um maior volume do dispersor em relação ao extrator, porém quando foi diminuído o volume de dispersor o extrato final ficou límpido. Isso é justificável, porque o cabelo possui em sua composição uma maior parte de substâncias lipofílicas e quando utilizado uma quantidade menor de dispersor, menor será a interação dessas substâncias com a fase extratora, resultando em um extrato mais limpo.

De todos os extratores e dispersores testados apenas o conjunto hexano e acetato de metila, clorofórmio e THF, e diclorometano e THF foram capazes de extrair os alcaloides da ayahuasca, além de apresentar um extrato mais limpo. Assim, foi realizado um experimento na concentração de 150 pg por mg de cabelo, comparando os extratores e dispersores, respectivamente, hexano e acetato de metila, clorofórmio e THF, e diclorometano e THF, na proporção de 2,5:1.

O experimento mostrou que o conjunto hexano e acetato de metila extraíram apenas a DMT e HMN, enquanto os solventes clorofórmio e THF, e diclorometano e THF, extraíram todos os analitos, se sobressaindo a junção do clorofórmio e THF que extraiu uma área absoluta maior. Ao mudar a proporção do hexano e acetato de metila 1,5:1 e 1,65:1 utilizando volume maior, cerca de 500 μ L, foi capaz de extrair todos os alcaloides da ayahuasca.

Desta forma, foi realizado um comparativo entre a solução de clorofórmio: THF na proporção 2,5:1 e de hexano e acetato de metila na proporção 1:1,5.

Figura 7: Comparação da extração em barra, da combinação de extrator e dispersor diferentes, hexano e acetato de metila em preto e o THF e clorofórmio em cinza. Podemos observar que as barras em cinza correspondente a HMN, HML e THH houve relevância estatística ($p < 0,05$).



Fonte: De autoria própria (2023).

Apesar da combinação de solventes clorofórmio e THF ter sido o que melhor extraiu os alcaloides da ayahuasca, como mostra na Figura 7, a combinação de hexano e acetato de metila não ficou tão atrás e pode ser uma alternativa de extração verde, além de ser um método inovador, pois esta combinação de solventes não foi observada na literatura sobre a DLLME em cabelo para extração dos alcaloides da ayahuasca.

Foi realizada a DLLME com solução de hexano e acetato de metila (1:1,5) e clorofórmio e THF (1,5:1) em uma concentração de 3 pg/mg. Para o conjunto hexano e acetato de metila apenas o DMT foi extraído. Já o conjunto de clorofórmio e THF extraiu todos os analitos. Em concentração alta, 500 pg/mg ambos os conjuntos de solução hexano e acetato de metila e clorofórmio e THF extraíram todos os analitos.

Com esses ensaios foi observado que o conjunto de solventes hexano e acetato de metila não se obtinha a extração dos analitos em baixas concentrações (3pg por mg), porém com a solução de clorofórmio e THF era possível extrair baixas concentrações, portanto foi escolhido o segundo conjunto de solventes para seguir adiante com a extração.

O cabelo é uma amostra difícil de ser trabalhada, desta forma não foi possível realizar muitos processos de otimização, isso porque qualquer parâmetro alterado no

processo de extração havia um grande impacto no extrato final, ainda apresentando resíduo na amostra, inviabilizando a injeção no equipamento.

Desta forma, outros parâmetros foram avaliados como tempo de agitação. Na DLLME desenvolvida existem duas etapas de agitação com a mistura de solventes. Por meio da ferramenta estatística Minitab foi realizado um delineamento de experimentos para otimizar esses dois tempos de agitação da DLLME.

Foi definido os tempos de 30 e 120 segundos em triplicata e a área absoluta foi usada para análise estatística. No gráfico de Pareto dos Efeito Padronizado não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os analíticos. Foi plotado o gráfico de desejabilidade ou otimização de resposta, que mostra que obtenho uma melhor resposta com a agitação de 120 segundos nas duas agitações (D:0,5563).

Apesar do estudo estatístico não apresentar uma diferença significativa, ao observar as áreas absolutas obtidas do experimento, foi obtida uma maior homogeneidade nos resultados com o tempo de agitação de 120 segundos nas duas etapas de agitação. Desta forma, foi definido este tempo no processo de extração.

A DLLME em cabelo mostra uma perspectiva inovadora, além de não existir trabalhos na literatura utilizando a DLLME para extrair os alcaloides da ayahuasca em cabelo. São poucos os artigos encontrados sobre o desenvolvimento do processo de extração para os alcaloides da ayahuasca em cabelo, e os publicados focam apenas na extração da DMT. Isso porque é proibida sua comercialização, devido ao seu efeito alucinógeno vem sendo utilizado de forma recreativa. No entanto, sabemos que as β -carbolinas são essenciais para absorção da DMT administrado via oral. Como o cabelo permite observar a exposição em longo prazo seria possível diferenciar indivíduos que utilizam da ayahuasca dentro do contexto religioso, o que é permitido, dos indivíduos que utilizam de forma abusiva.

4.3.3 Comparação dos métodos desenvolvidos em cabelo e o GAT.

O cabelo é considerado uma matriz complexa, com várias etapas de preparo de amostra, utilizando reagentes tóxicos e uma demanda maior no tempo de análise. Neste estudo, minimizamos o uso de solvente tóxicos e utilizamos técnicas consideradas compatíveis com o meio ambiente.

Na Tabela 4 estão apresentadas as etapas de análise de outros estudos em cabelo, mostrando os reagentes, solventes e técnicas de extração utilizadas em cada técnica.

Referente a quantidade de cabelo, três pesquisadores utilizaram 20mg de cabelo, apenas um utilizou 25mg. A composição da fase móvel de todos continham ACN com ácido fórmico, e as amostras foram analisadas por LC-MS/MS (BOUMBA et al., 2017; KINTZ; AMELINE; RAUL, 2021; LIU et al., 2021; PICHINI et al., 2014). Outro autor, utilizou 200mg de cabelo e analisou as amostras por GC-MS(OGALDE; ARRIAZA; SOTO, 2009). Uma das hipóteses desse autor ter utilizado 10x mais quantidade de amostra em sua amostragem pode ser devido a menor sensibilidade obtida pela técnica analítica empregada (GC-MS).

No processo de descontaminação e extração, cada pesquisador realizou um método diferente. Boumba e colaboradores (2017), realizou a lavagem do cabelo 2x com MeOH e 1x com diclorometano. Uma solução de ácido clorídrico em MeOH foi adicionada na amostra, em seguida foi pulverizada e encubada à 40°C por 3 horas.

Em outro estudo, o autor fez a lavagem do cabelo 2x com diclorometano e encubou o cabelo com 1mL de tampão borato, pH 9,5 a 40°C. Em seguida, extraiu os analitos com uma solução de éter, diclorometano, hexano e álcool isoamílico (KINTZ; AMELINE; RAUL, 2020). Já Liu e colaboradores (2021), lavaram o cabelo 3x com acetona, em seguida foi adicionado 1mL de MeOH e o cabelo foi submetido a pulverização.

Ogalde e colaboradores (2009), realizou a digestão do cabelo com 2mL de ácido clorídrico e encubou por 24h à 37°C. Após este período, o cabelo foi neutralizado com NaOH e teve seu pH ajustado com tampão fosfato pH 7. As amostras foram extraídas por SPE com 3mL de cloreto de metila. Pichini e colaboradores (2014), utilizou 5mL de MeOH e 2,5mL de éter dietílico, para a lavagem do cabelo. No processo de digestão do cabelo, foram utilizados 250µL do reagente M3 à 100°C em bloco de aquecimento por 1 hora, após esta etapa, a amostra é diluída em 400µL de água. O reagente M3 é uma solução digestora vendida comercialmente para realizar análise em cabelo.

No processo de descontaminação ou lavagem do cabelo, os autores utilizam MeOH, acetona, éter dietílico e diclorometano. A próxima etapa do cabelo foi a

digestão, os autores encubaram suas amostras com diferentes soluções: ácido clorídrico, MeOH, tampão borato ou reagente M3.

A etapa seguinte é a extração, os pesquisadores utilizaram a LLE com uma solução de éter, diclorometano, hexano e álcool isoamílico (50:30:20:0.5) e a extração SPE. Em outros trabalhos, a etapa de extração não foi realizada e a solução proveniente da digestão ou pulverização foi seca e ressuspensa em solvente compatível com o equipamento.

Os solventes éter dietílico, diclorometano e hexano são considerados perigosos ao meio ambiente e ao analista. Já o MeOH e acetona são considerados solventes mais ambientalmente corretos e recomendados (PRAT et al., 2015). A LLE e SPE utilizam um volume alto de solvente, gerando mais resíduo e causando um aumento no custo da análise (SILVEIRA et al., 2019). Além disso, existem vários tipos de cartucho de SPE, porém, são caros e aumentam o volume de lixo plástico no meio ambiente.

No processo de extração, dois autores utilizaram um equipamento que realiza uma etapa adicional chamada pulverização, que sob alta rotação fragmenta o cabelo em pedaços menores. Este equipamento possui custo muito alto sendo inviável em alguns laboratórios de pesquisa.

Todos os autores utilizaram o LC-MS/MS para analisar suas amostras e apenas um utilizou o GC-MS. Além disso, os autores que utilizaram LC-MS/MS, todos utilizaram na fase móvel, ácido fórmico e ACN. Em relação ao tempo total de corrida, a menor foi 6 minutos e a maior 16 horas e 50 minutos. O fluxo mais alto foi 1,5mL/minuto. Com relação ao tempo de corrida e um fluxo muito alto, acarreta formação de mais resíduo para o meio ambiente (SILVEIRA et al., 2019).

Um dos problemas de utilizar cromatografia líquida é a formação de resíduo para o meio ambiente. Além disso, a utilização da cromatografia de alta performance (UHPLC) permite o uso de colunas com partículas menores, permitindo tempo de separação mais rápido e a utilização de menos solventes. Já o GC-MS é considerado uma técnica mais verde do que a cromatografia líquida (SILVEIRA et al., 2019).

Com relação a fase móvel utilizada em LC-MS/MS, a ACN e o ácido fórmico são considerados problemáticos, conforme a classificação dos solventes em categorias de acordo com a sua periculosidade preconizado pelo GHS (PRAT et al., 2015).

No processo de digestão foi utilizado NaOH que é compatível com o meio ambiente. Além disso, utilizou a DLLME, uma técnica miniaturizada considerada verde (DE PAULA MEIRELLES et al., 2022; SILVEIRA et al., 2019). Descrevendo o método desenvolvido nesse trabalho, o solvente utilizado no processo de descontaminação e na fase móvel foi o metanol que é compatível com o meio ambiente. O ácido fórmico na fase móvel foi utilizado apenas para ajuste do pH, portanto, uma pequena quantidade foi utilizada.

Anastas (1999), diz que nenhuma atividade química é totalmente benéfica ao ser humano e meio ambiente e ainda levanta a diminuição no uso de solventes como uma prática da química verde.

Apesar da técnica desenvolvida utilizar solventes clorados, clorofórmio e THF, considerados perigoso e problemático respectivamente, para o operador e meio ambiente, foi utilizado um pequeno volume deles (PRAT et al., 2015). Apenas um volume total de 200µL foi utilizado em cada amostra. Enquanto a LLE e SPE utilizou respectivamente, 5mL e 3mL por amostra. Portanto, o trabalho desenvolvido está dentro dos conceitos do GAT.

Tabela 4: Resultados de levantamento bibliográfico de estudos em cabelo. Os solventes e reagentes utilizados nos processos de análise em cabelo (descontaminação, digestão e extração), além da quantidade e equipamento utilizado.

Amostra	Qtd	Descontaminação	Digestão/ Extração	Solventes	Autores
Cabelo	20mg	2x com 2 mL MeOH e 1x com 2mL diclorometano	Pulverização e encubação à 40°C por 3 horas	1mL solução ácido clorídrico 0,1M em MeOH	(BOUMBA et al., 2017)
Cabelo	20mg	2x diclorometano	Incubado à 40°C com tampão borato e LLE	1mL de tampão borato, pH 9,5 e 5mL solução de eter, diclorometano, hexano e álcool isoamílico (50:30:20:0.5)	(KINTZ; AMELINE; RAUL, 2021)
Cabelo	20mg	3x com acetona	Pulverização	1mL de MeOH	(LIU et al., 2021)
Cabelo	200mg	-	Digestão com ácido clorídrico por 24h à 37°C e SPE	2mL de ácido clorídrico 0,1M (ajuste do pH NaOH 0,1N e tampão fosfato pH 7) 3mL de cloreto de metila (eluição)	(OGALDE; ARRIAZA; SOTO, 2009)
Cabelo	25mg	5mL de MeOH e 2,5mL de etér dietílico	Digestão com reagente M3 por 100°C em bloco	250uL do reagente M3	(PICHINI et al., 2014)

de aquecimento
por 1h

Qtd – Quantidade

Tabela 4: Continuação.

Amostra	Fase móvel	Equipamento	Autores
Cabelo	50mM de formiato de amônio em ácido formico (fase móvel A) e ACN com 0,1% ácido formico (fase móvel B). Fluxo 1,5 mL/min. Total: 12:40min.	LC/MS/MS	(BOUMBA et al., 2017)
Cabelo	Tampão formiato ajustado ao pH 3 (fase móvel A) e 0,1% ácido formico em ACN. Fluxo 0,4mL/min (fase móvel B). Total: 15min.	LC/MS/MS	(KINTZ; AMELINE; RAUL, 2021)
Cabelo	20mM de acetato de amônio, 6% ACN e 0,1% ácido formico em água (fase A) e ACN (fase B). Total: 6min.	LC/MS/MS	(LIU et al., 2021)
Cabelo	-	GC/MS	(OGALDE; ARRIAZA; SOTO, 2009)
Cabelo	0,3% ácido formico em ACN (solvente A) e 5mM formiato de amônio pH 3 (solvente B). Fluxo 0,40ml/min. Total: 16,50min.	LC/MS/MS	(PICHINI et al., 2014)

4.4 Resultados da validação do método

4.4.1 Limite de detecção e quantificação

Conforme os dados a seguir (Tabela 5) podemos verificar alguns limites de detecção e quantificação para a DMT. Como não existe, na literatura, trabalhos validados em cabelo que contenha a DMT juntamente com as β -carbolinas, apenas a DMT foi utilizada como referência para a determinação dos limites do método.

Tabela 5: Resultados do limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ) da dimetilriptamina (DMT) em alguns trabalhos já publicados.

Analito	LoD pg/mg	LoQ pg/mg	Autores
	0,3	3,0	(LIU et al., 2021)
DMT	10,0	-	(BOUMBA et al., 2017)
	0,1	1,0	(KINTZ; AMELINE; RAUL, 2021)
	10,0	30,0	(PICHINI et al., 2014)

Podemos observar na Tabela 5 que há uma margem de diferença entre os limites para a DMT, que variam de 0,1pg/mg à 10pg/mg do LoD e 1pg/mg à 30pg/mg para o LoQ. Portanto, os resultados apresentados na Tabela 6, o LoD de 8pg/mg e o LoQ de 20pg/mg para a DMT acabam sendo condizentes com sua descrição na literatura.

Para as β -carbolinas não foram encontrados trabalhos publicados com valores de LoD e LoQ, neste caso, os valores foram baseados nos artigos encontrados para a DMT. Os resultados de LoD e LoQ para a DMT e as β -carbolinas estão descritos na tabela 6.

4.4.2 Linearidade

A faixa de concentração foi avaliada no estudo de linearidade, as concentrações foram de 20,50,200,500,750 e 1000 pg/mg. A concentração 20 pg/mg foi também utilizado como LoQ. Como podemos observar na tabela 6, o método foi linear para todos os analitos estudados, ou seja, apresentou um $r^2 \geq 0,99$.

Ao calcular o $F_{\text{experimental}}$ e o F_{tabelado} , observou-se que o $F_{\text{experimental}}$ foi superior ao F_{tabelado} para todos os analitos, portanto, o método em questão é heterocedástico, aplicando-se assim, a equação dos mínimos quadrados ponderados. Conseqüentemente, a regressão linear de mínimos quadrados ponderados resultou nos fatores de ponderação para a DMT e β -carbolinas, $1/Y^2$, $1/X^2$, $1/Y^{1/2}$ e $1/Y^2$, onde apresentou os erros relativos mais baixos. A regressão linear das equações e os coeficientes de determinação estão listados na tabela 6.

4.4.3 Precisão e exatidão

Todos os valores obtidos neste estudo no ensaio de precisão, inter-ensaio e intraensaio atendem aos critérios de aceitação, ou seja, 20% para CB, CM e CA.

Já para o ensaio de exatidão, foi determinada a partir da quantificação de três replicadas de cada nível de controle CB, CM e CA, utilizando a curva de calibração, previamente realizada, por três dias distintos. Os valores obtidos não ultrapassaram o valor aceitável de desvio 20%, mostrando que o método é exato. A tabela 7 mostra os resultados obtidos para a precisão (inter-ensaio e intraensaio) e exatidão.

4.4.4 Efeito matriz, recuperação e eficiência do processo

Os ensaios de EM, RE e EP foram baseados no artigo do Matuszewski e colaboradores (2003) e os resultados estão expressos na Tabela 5. Os valores encontrados para o EM variam de 80,20% (DMT, CB) e 121,85% (HML, CA). Na recuperação foram obtidos os valores de 36,28% (HMN, CB) e 57,91% (DMT, CM). Assim, podemos observar que os resultados obtidos no ensaio EM foram um aumento e supressão da ionização, demonstrando que os resultados de RE podem não estar confiáveis.

O EM é a combinação das substâncias presentes na amostra assim, o sinal do analito e dos componentes da matriz competem entre si no LC-MS/MS, o que pode aumentar ou diminuir a intensidade dos íons do analito e afetar a reprodutibilidade, precisão e exatidão, recuperação do método (IUPAC, 2012; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

Portanto, dependendo de onde a ionização do íon ocorre, por exemplo ionização por *eletrospray* (ESI), essa competição pode diminuir (supressão iônica) ou aumentar (aumento da ionização). Após obtenção dos resultados, valores de 100% indicam que nenhum efeito matriz foi observado. No entanto, valores acima de 100% indicam aumento da ionização e valores abaixo de 100% indica supressão de ionização (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

A recuperação, segundo a IUPAC (2009), é a quantidade total que pode ser recuperada de uma substância que foi submetida a um processo químico. Para avaliar o efeito matriz, deve-se analisar os resultados das amostras com adição do padrão antes e após a extração, considerando assim o efeito matriz na recuperação (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

Apesar de todo levantamento citado acima, o processo de validação não foi afetado pelo aumento ou supressão da ionização e os valores baixos de recuperação indicando que os resultados do método para os LoD e LoQ são aceitáveis.

Além disso, a presença do EM não indica que o método não é válido. Devido a resposta ser a relação do padrão com o padrão interno em todas as amostras assim, a concentração do analito não deve ser afetada (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

Já a eficiência do processo é a combinação do efeito matriz e a recuperação do analito que foram submetidos ao processo de extração (BUHRMAN; PRICE; RUDEWICZ, 1996). A eficiência do processo pode ser calculada multiplicando o valor

do efeito matriz absoluto pela recuperação (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003). A baixa eficiência do processo pode comprometer a precisão e o limite de detecção do método (TAYLOR, 2005).

Os valores obtidos na EP foram de 39,81% (HMN, CB) e 61,14% (THH, CA), porém mesmo com os valores baixos de EP, o método se mostrou preciso e exato assim, pode-se confiar na quantificação realizar nas amostras reais.

4.4.5 Carryover e seletividade

O ensaio de seletividade foi dividido em algumas etapas. Foi realizada a extração de 10 amostras branco de diferentes indivíduos que não consumiram a ayahuasca. Em um segundo momento, foi injetado um *pool* de padrão de drogas de abuso e medicamentos no LC-MS/MS. Neste ensaio, não foram observados picos cromatográficos de substâncias endógenas e exógenas nos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno utilizado no estudo.

Em uma amostra, foi adicionado o padrão do *pool* de analitos da ayahuasca à 1000pg/mg, valor do ponto alto da curva de calibração empregada na validação da linearidade. Em uma segunda amostra, foi adicionado o padrão interno à 100pg/mg. Ambos foram extraídos e injetados no LC-MS/MS. Na amostra que continham os alcaloides da ayahuasca, não foram observados picos cromatográficos nos respectivos tempos de retenção do padrão interno, somente foram observados os picos referentes aos dos alcaloides da ayahuasca presentes no *pool* adicionado. Na amostra que continha apenas o padrão interno, não foram observados picos cromatográficos nos tempos de retenção dos alcaloides da ayahuasca, apenas o pico do padrão interno. Com exceção da DMT e do DMTd₆, que possuem praticamente o mesmo tempo de retenção. Desta forma, foi avaliado as fragmentações de massas para distinguir a DMT do DMTd₆. Além disso, para cada analito foi confirmado a suas respectivas fragmentações de massas. Portanto, o método é seletivo para análise dos analitos da ayahuasca.

Na análise de *carryover*, a injeção de uma amostra contendo uma concentração de 1000 pg/mg, representando o maior ponto da curva de linearidade, e em seguida três amostras branco foram injetadas. Pode-se observar que não foram identificados picos dos analitos nos tempos de retenção das amostras branco, assim, o método não tem arraste para amostras subseqüentes.

Tabela 6: Limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ) e equação da regressão linear e coeficiente de determinação da dimetiltryptamina (DMT), tetrahydro-harmina (THH), harmalina (HML) e harmina (HMN) em amostras de cabelo fortificada.

Analito	LoD (pg/mg)	LoQ (pg/mg)	Fator de Ponderação	Equação de regressão linear	Determinação do coeficiente r^2
DMT	8	20	$1/Y^2$	$y = 0,0120x + 0,0500$	$R^2 = 0,9977$
THH	8	20	$1/X^2$	$y = 0,0030x + 0,0052$	$R^2 = 0,9939$
HML	8	20	$1/Y^{1/2}$	$y = 0,0057x + 0,0266$	$R^2 = 0,9963$
HMN	3	20	$1/Y^2$	$y = 0,0256x + 0,0854$	$R^2 = 0,9983$

Tabela 7: Parâmetros de validação da dimetiltryptamina (DMT), tetrahydro-harmina (THH), harmalina (HML) e harmina (HMN) após extração DLLME em amostras de cabelo fortificadas.

Analito	Concentração (pg/mg)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)	Efeito matriz (%)	Recuperação (%)	Eficiência do processo (%)
		intraensaio	Inter-ensaio				
DMT	40	8,81	10,60	-4,18	86,20	54,94	47,36
	400	3,45	10,44	-8,71	82,07	57,91	47,53
	800	3,18	9,26	-6,40	80,20	50,39	40,41
THH	40	7,22	10,44	-1,18	93,14	48,75	45,41
	400	7,31	18,90	-5,53	101,43	49,92	50,63
	800	6,73	18,70	-8,02	118,98	51,39	61,14
HML	40	9,46	15,32	-5,80	121,85	45,54	55,49
	400	6,41	13,58	-8,00	100,66	51,42	51,76
	800	3,55	7,53	-6,35	84,30	49,84	42,02
HMN	40	10,09	15,83	-3,34	109,70	36,28	39,81
	400	7,26	18,40	-10,51	112,13	48,75	54,67
	800	6,19	16,67	-8,78	92,02	45,51	41,88
DMT-d6	100						

4.5 Concentração dos alcaloides da ayahuasca em diferentes matrizes biológicas

O consumo da ayahuasca e o uso recreativo se tornou mais popular ao longo dos anos. O consumo da ayahuasca vem sendo utilizado para tratamentos no contexto

religioso e na pesquisa científica. Além disso, o uso recreativo da DMT pela via fumada e injetada também está em evidência, isso devido ao fácil acesso em sites *online*, onde é possível comprar diferentes tipos de drogas. Diante desse contexto, não existe muitos estudos que comprovem sua eficácia e segurança, além disso, o consumo ilícito é preocupante. Desta forma, diferentes pesquisadores têm criado métodos para identificar e quantificar esses alcaloides em diferentes matrizes biológicas. A tabela 8 mostra as diferentes concentrações desses métodos em urina, plasma e cabelo.

As matrizes biológicas, plasma e urina permitem indicar exposição recente do uso de drogas. Através da análise do plasma é possível avaliar se o indivíduo está sob efeito de determinada substância. Na matriz urina, é possível avaliar a exposição após algumas horas ou dias e não necessariamente o indivíduo está sob efeito da droga. No entanto, a matriz cabelo indica exposição a longo prazo, é preciso esperar que o cabelo cresça, em média 1 mês para que a substância seja inserida no cabelo.

Callaway e colaboradores (1996), desenvolveram um método para detecção dos analitos da ayahuasca em plasma. A concentração da ayahuasca administrada neste estudo foram: 2 mL/kg e o teor encontrado na bebida foram: 0,24 mg/mL (DMT); 1,07 mg/mL (THH); 0,2 mg/mL (HML) e 1,70 mg/mL (HMN). Já sua concentração dos alcalóides no plasma: 11,5 – 25,5 ng/mL (DMT), 49,2 – 134,5 ng/mL (THH), <1,0 – 9,4 ng/mL (HML) e 36,4 – 222,3 ng/mL (HMN). Neste estudo, a HML está em menor quantidade comparado com os demais alcalóides.

Assim, Mcilhenny e colaboradores (2012) desenvolveram um método para quantificar os alcaloides e produto de biotransformação da ayahuasca em plasma. A ayahuasca passou por um processo de liofilização e foram encapsulados, sendo que a administração foi de 1 mg de DMT por kg e a quantidades dos alcaloides presentes na ayahuasca foram de: 8,33 mg (DMT); 11,36 mg (THH); 0,96 mg (HML) e 14,13 mg (HMN). Foram realizados a coleta das amostras de plasma nos tempos: 1,5, 4,5 e 10 horas, assim a concentração do plasma encontrada na tabela 8, destina-se a maior e menor concentração, e foram: 3,12 – 15,09 ng/mL (DMT), 25,91 – 55,44 ng/mL (THH), 2,23 – 4,53 ng/mL (HML) e 0,54 – 5,18 ng/mL (HMN), destas amostras uma, não apresentou a DMT (MCILHENNY et al., 2012). Em plasma, a THH foi o alcaloide em maior quantidade encontrado após o período de 4,5h (>55ng/mL), seguido por DMT, HML uma pequena quantidade de HMN. Além disso, a THH que possivelmente não é facilmente metabolizada devido seu produto de biotransforma a tetrahydroharmol (0,96

– 2,94 ng/mL) estar em menor concentração mesmo após 10 horas. Já a DMT apesar de ser o segundo em maior concentração, seu produto de biotransformação DMT-NO encontra-se em maior concentração, em 1,5 horas, cerca de 45,18 ng/mL (MCILHENNY et al., 2012).

Mcilhenny e colaboradores (2010) também desenvolveram um método para quantificação dos alcaloides e produto de biotransformação da ayahuasca em urina. Como no trabalho em plasma, pelo mesmo autor, a ayahuasca passou por processo de liofilização e foi encapsulado. Foi administrado 0,75 mg/kg de DMT presente na ayahuasca nos voluntários e as concentrações dos analitos presentes na ayahuasca foram: 4,77 mg (DMT); 9,04 mg (THH); 0,68 mg (HML) e 10,45 mg (HMN). A coleta da amostra foi realizada em 0, 4, 8 e 24 horas. Foi realizada a quantificação dos alcaloides em urina, com a presença e ausência de tratamento enzimático, os resultados sem a hidrólise enzimático foram citados: 30,0 – 600,0 ng/mL (DMT), 10,0 – 6.270,0 ng/mL (THH), 20,0 – 510,0 ng/mL (HML), 10,0 – 160,0 ng/mL (HMN), harmol (770,0 – 3.090,0), harmalol (1.250,0 – 4.040,0) e DMT-NO (1.270,0 – 11.060,0). Já os resultados com o processo de hidrólise enzimática foram: 20,0 – 500,0 ng/mL (DMT), 4.850,0 – 7.250,0 ng/mL (THH), 250,0 – 530,0 ng/mL (HML), 60,0 – 210,0 ng/mL (HMN), harmol 38.930,0 – 126.180,0 ng/mL, harmalol 5.320 – 14.160,0 ng/mL e DMT-NO 1.020,0 – 8.740,0 ng/mL. A enzima utilizada para quantificação dos alcalóides da ayahuasca em urina foi B-glucuronidase/sulfatase de lapas (*Patella vulgata*) tipo L-II.

A THH foi o analito em maior quantidade na urina, dentre os alcaloides que foram ou não submetidos a hidrólise enzimática. Podemos observar que os alcaloides da ayahuasca após procedimento de hidrólise enzimática apresentaram diferentes concentrações, a HMN ficou com menor concentração, com relação aos outros alcaloides. Quando analisamos os seus produtos de biotransformação as concentrações harmol, harmalol e DMT-NO, estes estão elevadas quando comparado com a concentração de harmina, harmalina e a DMT, com ou sem hidrolise enzimatica.

Yritia e colaboradores (2002), criaram um método para detecção dos alcaloides da ayahuasca e seus produtos de biotransformação em plasma. A ayahuasca foi administrada em um concentração que varia de, 0,6 a 0,8 mg/kg de DMT. A quantidade de cada analito presente na ayahuasca foram: 0,53 mg/ml (DMT); 0,72 mg/ml (THH); 0,06 mg/ml (HML) e 0,90 mg/ml (HMN). Um total de 11 coletas de plasma foram utilizadas neste estudo, em um tempo de 0 a 24 horas. A concentrações

dos alcaloides no plasma citadas são equivalentes a administração alta da DMT (0,8 mg/kg): 20,0 – 25,0 ng/mL (DMT), 25,0 – 30,0 ng/mL (THH), 4,0 – 6,0 ng/mL (HML e HMN). Podemos observar que há uma diminuição da HML e HMN no plasma. Já os produtos de biotransformação harmol (20 – 25 ng/mL) e harmalol (8 – 10 ng/mL) estão em maior concentração comparado com harmina e hamalina no mesmo estudo.

Um estudo foi desenvolvido com nosso grupo de pesquisa, onde foi desenvolvido um método para analisar os alcalóides da ayahuasca em plasma. A ayahuasca utilizada foi a mesma utilizada no trabalho de Pires e colaboradores (2009) que faz parte do mesmo grupo de pesquisa. As concentrações da ayahuasca foram: 0,32 mg/ml (DMT); 0,49 mg/mL (THH); 0,2 mg/mL (HML) e 0,46 mg/mL (HMN). Assim, como nos outros artigos, as concentrações no plasma citadas, menor e maior, respectivamente foram: 1,2 – 8,0 ng/mL (DMT), 27,1 – 71,4 ng/mL (THH), 2,7 – 15,7 ng/mL (HML) e 1,0 – 15,6 ng/mL (HMN). A THH apresenta maior concentração em relação aos demais alcaloides (OLIVEIRA et al., 2012; PIRES et al., 2009).

O nosso grupo de pesquisa, desenvolveu recentemente um método 100% verde, conforme o conceito do GAT. Este método também foi desenvolvido para quantificação dos alcalóides da ayahuasca em plasma. A dose utilizada no estudo foi de 1mL/kg e as coletas das amostras foram 5 horas após a ingestão da ayahuasca. As concentrações encontradas (menor e maior) dos analitos da ayahuasca em plasma foram: <LoQ – 4,3 ng/mL (DMT), 13,4 – 117,9 ng/mL (THH), <LoQ – 2,1 ng/mL (HML) e <LoQ – 40,6 ng/mL (HMN), sendo que dentre as amostras, uma apresentou ausência de DMT mas, a presença de HML, HMN e THH(SILVEIRA et al., 2021).

Além do método em plasma, Silveira e colaboradores (2021) desenvolveram um método para detecção dos alcaloides da ayahuasca em urina. As concentrações dos alcaloides em urina encontradas foram: 67,5 – 4.120,3 ng/mL (DMT), 30,6 – 908,6 ng/mL (THH), 28,3 – 334,0 ng/mL (HML), 30,5 – 859,4 ng/mL (HMN).

Podemos observar que, em plasma, a concentração da DMT e HML foram baixas, e em alguns casos, não foi possível quantificar, em virtude da demora na coleta. Já a HMN, não foi possível a sua quantificação, por ser facilmente metabolizada no organismo. Já a THH permanece por um longo período de tempo no plasma, devido a isso, foi a mais abundante encontrada. Em urina, a maior concentração encontrada foi da DMT seguido pela THH (SILVEIRA et al., 2021).

Boumba e colaboradores (2017) desenvolveram um método de *screening* para detecção de 132 substâncias psicoativas em cabelo, incluindo a DMT. As 23 amostras foram coletadas durante uma autópsia, baseado em intoxicação por NPS. Entre elas, as amostras 6, 11, 18 e 19 foram positivas para a DMT.

Kintz e colaboradores (2020) desenvolveram um método para quantificação da DMT. Neste caso, foi uma investigação legal, onde o indivíduo alegava que era fumante passivo. O cabelo foi segmentado de um em um centímetro, obtendo 6 fragmentos no total, com concentração de 4,0 a 13,0 pg/mg.

Neste estudo, foi desenvolvido um método para quantificação da DMT em cabelo. Foram analisadas 28 amostras de cabelo e a coleta partiu da raiz até 3 cm. No relato de caso, um indivíduo adquiriu a bebida “ayahuasca” por meio *online* para sanar um trauma psicológico, começou a parar de comer carne, sentir sintomas do efeito da bebida e foi atendido em hospital. Em outro caso, o indivíduo consumiu a bebida ayahuasca em um bar e em uma festa, mas já a tinha experimentado um mês antes. No primeiro caso citado aqui, a concentração de DMT ultrapassou a curva de calibração 1.109,0 pg/mg. Assim, pode ser que o indivíduo utilizou a ayahuasca por longo período ou utilizou DMT na forma fumada e o relato de uso foi de 4 vezes por semana. A concentração obtida da DMT no cabelo foram de 3,0 a 1.109,0pg/mg. Das amostras obtidas apenas três, ficaram abaixo do limite de quantificação (LIU et al., 2021).

Ogalde e colaboradores (2009), desenvolveram um método para identificação da DMT, 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (MeODMT) e triptaminas em 32 amostras de cabelo de múmias do norte do Chile. Dessas 32 amostras, duas foram apresentaram resultados positivos para harmina. Segundo o autor, a harmina presente no estudo foi utilizada em práticas terapêuticas no passado.

Pichini e colaboradores (2014) desenvolveram um método para detecção de drogas alucinógenas em cabelo. Apenas uma amostra de cabelo de indivíduo que confirmou já ter usado ayahuasca foi utilizada no estudo. A concentração encontrada da DMT nesta amostra foi 5,6ng/mg.

Com todos os estudos citados na Tabela 8, podemos observar que na maioria dos estudos em plasma, a DMT, THH e HMN estão em maior concentração, enquanto a HML está em menor concentração. A THH é o alcaloide mais abundante.

Já nos estudos em urina, podemos observar uma quantidade superior da DMT e THH com relação aos outros alcalóides. A HMN e HML apresentam concentração diferentes em ambos os estudos citados em urina.

Já os estudos citados utilizando a matriz cabelo são voltados para a área forense e focam somente na detecção e quantificação da DMT, devido sua utilização como droga de abuso e ser proibido o seu uso na forma isolada perante a lei.

Tabela 8: Concentrações encontradas dos alcalóides da ayahuasca, N,N-dimetiltriptamina (DMT), tetrahydro-harmina (THH), harmalina (HML) e harmina (HMN) em urina, plasma, cabelo e da ayahuasca líquida ou em cápsula liofilizada utilizada nos estudos citados.

Analito	Amostra	Concentração encontrada nas amostras	Conc. das amostras pós hidrólise enzimática	Concentração da ayahuasca utilizada no estudo	Concentração da ayahuasca em cápsula utilizada no estudo	Autores
DMT		30,0 – 600,0 ng/ml	20,0 – 500,0 ng/ml		4,77 mg	
THH	Urina	10,0 – 6.270,0 ng/ml	4850,0 – 7250,0 ng/ml	-	9,04 mg	(MCILHENN Y et al., 2010)
HML		20,0 – 510,0 ng/ml	250,0 – 530,0 ng/ml		0,68 mg	
HMN		10,0 – 160,0 ng/ml	60,0 – 210 ng/ml		10,45 mg	
DMT		67,5 - 4,120.3 ng/mL	-			
THH	Urina	30,6 - 908,6 ng/mL	-	-	-	(SILVEIRA et al., 2020)
HML		28,3 - 334,0 ng/mL	-			
HMN		30,5 - 859,4 ng/mL	-			
DMT		11,5 - 25,5 ng/mL	-	0,24 mg/ml		
THH	Plasma	49,2 - 134,5 ng/mL	-	1,07 mg/ml		(CALLAWAY et al., 1996)
HML		<1,0 - 9,4 ng/mL	-	0,2 mg/ml	-	
HMN		36,4 - 222,3 ng/mL	-	1,70 mg/ml		
DMT		20,0-25,0 ng/ml	-	0,53 mg/ml		
THH	Plasma	25,0-30,0 ng/ml	-	0,72 mg/ml	-	(YRITIA et al., 2002)
HML		4,0-6,0 ng/ml	-	0,06 mg/ml		
HMN		4,0-6,0 ng/ml	-	0,90 mg/ml		
DMT	Plasma	1,2 - 19,8 ng/ml	-	0,32 mg/ml		(OLIVEIRA et al., 2012)
THH		27,1 - 71,4 ng/ml	-	0,49 mg/ml		

HML		2,7 - 15,7 ng/ml	-	0,2 mg/ml	-	
HMN		1,0 - 15,6 ng/ml	-	0,46 mg/ml		
DMT		<LoQ - 4,3ng/ml	-			
THH	Plasma	13,4 - 117,9 ng/ml	-			(SILVEIRA et al., 2021)
HML		<LoQ - 2,1 ng/ml	-			
HMN		<LoQ - 40,6ng/ml	-			
DMT		3,12 - 15,09 ng/ml	-		8,33 mg	
THH	Plasma	25,91 - 55,44 ng/ml	-		11,36 mg	(MCILHENN Y et al., 2011)
HML		2,23 - 4,53 ng/ml	-		0,96 mg	
HMN		0,54 - 5,18 ng/ml	-		14,13 mg	
DMT	cabelo	5,60 ng/mg	-	-	-	(PICHINI et al., 2014)
DMT	cabelo	LoD	-	-	-	(BOUMBA et al., 2017)
HMN	cabelo	-	-	-	-	(OGALDE; ARRIAZA; SOTO, 2009)
DMT	cabelo	3,0 – 1.109,0 pg/mg	-	-	-	(LIU et al., 2021)
DMT	cabelo	4,0 -13,0 pg/mg	-	-	-	(KINTZ; AMELINE; RAUL, 2021)

4.6 AMOSTRAS AUTÊNTICAS

As amostras reais foram obtidas por indivíduos que participam de ritual com a ingestão da ayahuasca por longo período. Conforme a Tabela 9, podemos observar a quantificação feita em seis amostras de cabelo autênticas de indivíduos que participam de ritual com uso da ayahuasca. As amostras de cabelos foram fragmentadas da raiz até se obter três alíquotas, de 20mg de cabelo, obtendo ao total 18 alíquotas. Podemos observar que a DMT é pouco absorvida no cabelo, pois, algumas amostras não foram detectadas e outras estão no LoD. Já as β -carbolinas que apresentam uma maior concentração do que a DMT e apresentaram limites de quantificação acima da curva de calibração, ou seja, superior a 1000pg/mg.

Já quando falamos da matriz cabelo, não existe um método desenvolvido para detectar a DMT e as β -carbolinas. O que existe na literatura são métodos que detectam a presença da DMT, devido atualmente ter sido utilizada como droga de abuso, pela via fumada e injetada. Isso é um problema quando pensamos no uso

religioso onde, é permitido o uso da ayahuasca. Portanto, a importância de se desenvolver um método com a DMT e as β -carbolinas, que pode servir para diferenciar o uso indiscriminado do uso religioso.

As concentrações descritas dos métodos desenvolvidos para a DMT estão listadas na tabela 8. Para o método desenvolvido nesse trabalho, podemos ver que as concentrações em pg/mg ficam em torno de: DMT (21,5 – 204,4); THH (55,5 - >LoQ); HML (42,0 – 988,2) e HMN (163,0 – >LoQ). A DMT na amostra B não foi detectada. Os resultados mostram um aumento das β -carbolinas no geral em relação a DMT. O cabelo possui característica lipofílica devido sua composição, em maior parte, de queratina, isso indica uma maior facilidade das β -carbolinas serem absorvidas nessa matriz.

Tabela 9: Concentração em pg/mg dos alcaloides da ayahuasca em amostras de cabelo autênticas após quantificação por DLLME e LC-MS/MS.

Identificação das amostras	DMT (pg/mg)	THH (pg/mg)	HML (pg/mg)	HMN (pg/mg)
A1	26,3	60,6	64,6	763,3
A2	35,3	55,5	51,6	662,4
A3	27,2	58,6	42,0	744,7
B1	ND	74,7	130,6	163,0
B2	ND	75,1	116,7	183,2
B3	ND	106,6	173,6	221,1
C1	204,4	746,5	519,7	5772,8 ^b
C2	167,6	1117,4 ^b	959,9	3733,4 ^b
C3	177,1	1258,1 ^b	988,2	3234,4 ^b
D1	13,6 ^a	81,5	152,6	652,4
D2	11,9 ^a	90,1	166,2	602,3
D3	21,5	71,3	126,7	640,1
E1	14,1 ^a	177,6	122,9	700,4
E2	11,6 ^a	191,4	133,1	802,7
E3	15,5 ^a	171,1	78,8	643,9
F1	34,2	425,3	382,7	736,9
F2	37,9	442,8	430,4	855,7
F3	30,3	434,3	425,2	845,6

ND- Não detectado; a-limite de detecção; b- ultrapassou o limite de quantificação.

5. CONCLUSÃO

No estudo foi desenvolvido um método de detecção e quantificação dos alcaloides N,N-dimetiltriptamina (DMT), tetrahydro-harmina (THH), harmina (HMN) e harmalina (HML), que são encontrados na bebida alucinógena ayahuasca. Para o método desenvolvido, foi utilizando o equipamento de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS). O tipo de extração foi a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para determinação dos alcaloides da ayahuasca na matriz cabelo.

O método foi validado, seguindo os guias ANSI/ABS Standard e para a recuperação, efeito matriz e eficiência do processo foi utilizado o artigo de Matuszewski e colaboradores (2003). Todos os ensaios ficaram dentro dos parâmetros presentes nos guias.

Podemos ressaltar que o método contou com uma técnica miniaturizada de extração, a DLLME, uma extração simples, rápida e econômica. Com a utilização de pouco volume de solvente, minimizando a exposição ao operador. Assim, respeitando as regras propostas pela Toxicologia Analítica Verde (GAT).

Diferente de outras matrizes como plasma e urina que indicam que o indivíduo está sob efeito recente de determinada substância, o cabelo indica o uso crônico de exposição, assim, é possível diferenciar usuários que utilizaram a ayahuasca no contexto religioso do uso da DMT de forma abusiva.

Por fim, foi quantificada amostras reais de indivíduos que utilizam da ayahuasca. Nestas amostras, foi possível observar uma maior concentração das β -carbolinas em relação a DMT no cabelo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCAO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 215–222, 2002.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: Principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

ANASTAS, P. T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167–175, 1999.

ANSI/ABS STANDARD. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. 1. ed., v. 36, 2019.

ARAÚJO, A. M. et al. The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 8, p. 1151–1173, 2015.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, 1 set. 2009.

BAKER, J. R. Psychedelic sacraments. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, n. 2, p. 179–187, 2005.

BARKER, S. A. Administration of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in psychedelic therapeutics and research and the study of endogenous DMT. **Psychopharmacology**, v. 239, n. 6, p. 1749–1763, 1 jun. 2022.

BARKER, S. A.; MCILHENNY, E. H.; STRASSMAN, R. A critical review of reports of endogenous psychedelic N, N-dimethyltryptamines in humans: 1955-2010. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, n. 7–8, p. 617–635, 2012.

BARKER, S. A.; MONTI, J. A.; CHRISTIAN, S. T. Metabolism of the hallucinogen IV N,N-dimethyltryptamine in rat brain homogenates. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, p. 1049–1057, 1979.

BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 44–52, jan. 2011.

BIENVENU, J. F. et al. Standardized Procedure for the Simultaneous Determination of the Matrix Effect, Recovery, Process Efficiency, and Internal Standard Association. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 14, p. 7560–7568, 18 jul. 2017.

BILHIMER, M. H. et al. Acute Intoxication following Dimethyltryptamine Ingestion. **Case Reports in Emergency Medicine**, p. 1–3, 2018.

BOUMBA, V. A. et al. The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. **Forensic Science International**, v. 279, p. 192–202, 2017.

BRITO-DA-COSTA, A. M. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ayahuasca alkaloids N,N-dimethyltryptamine (DMT), harmine, harmaline and tetrahydroharmine: Clinical and forensic impact. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 1–36, 2020.

BUCKHOLTZ, N. S.; BOGGAN, W. O. Inhibition by β -carbolines of monoamine uptake into a synaptosomal preparation: structure-activity relationships. **Life Sciences**, v. 20, n. 12, p. 2093–2100, 1977.

BUHRMAN, D. L.; PRICE, P. I.; RUDEWICZ, P. J. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. v. 7, n. 11, p. 1099–1105, 1996.

CAKIC, V.; POTKONYAK, J.; MARSHALL, A. Dimethyltryptamine (DMT): Subjective effects and patterns of use among Australian recreational users. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 111, n. 1–2, p. 30–37, 2010.

CALLAWAY, J. C. et al. Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 492–497, 1996.

CALLAWAY, J. C. et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 243–256, 1999.

CAMERON, L. P.; OLSON, D. E. Dark Classics in Chemical Neuroscience: N, N-Dimethyltryptamine (DMT). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 2344–2357, 2018.

CARFORA, A. et al. Long-Term Detection in Hair of Zolpidem, Oxazepam and Flunitrazepam in a Case of Drug-Facilitated Sexual Assault. **Journal of Analytical Toxicology**, p. 1–5, 2020.

CHO, H. S. et al. Detection of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in the hair of drug abusers by LC–MS/MS analysis. **Forensic Science International**, v. 295, p. 219–225, 2018.

COHEN, I.; VOGEL, W. H. Determination and physiological disposition of dimethyltryptamine and diethyltryptamine in rat brain, liver and plasma. **Biochemical Pharmacology**, v. 21, p. 1214–1216, 1971.

CONAD - Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas. **Resolução nº1, de 25 de Janeiro de 2010**, v. 17, p. 57–59, 2010.

COOPER, G. A. A. Anatomy and Physiology of Hair, and Principles for its Collection. Em: **Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology**. [s.l.] Elsevier Science Ltd., 2015b. p. 1–22.

CRUZ, J. I.; NAPPO, S. A. Is Ayahuasca an Option for the Treatment of Crack Cocaine Dependence? **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 50, n. 3, p. 247–255, 27 maio 2018.

CUTLER, C. et al. Investigation of the metabolism of the selective androgen receptor modulator LGD-4033 in equine urine, plasma and hair following oral administration. **Drug Testing and Analysis**, v. 12, n. 2, p. 247–260, 1 fev. 2020.

DA SILVA, M. G. et al. Antidepressant and anxiolytic-like effects of ayahuasca in rats subjected to LPS-induced neuroinflammation. **Behavioural Brain Research**, v. 434, 26 set. 2022.

DA SILVA, M. G.; DAROS, G. C.; DE BITENCOURT, R. M. Anti-inflammatory activity of ayahuasca: therapeutical implications in neurological and psychiatric diseases. **Behavioural Brain Research**, v. 400, 26 fev. 2021.

DE OSÓRIO, F. L. et al. Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: A preliminary report. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 37, n. 1, p. 13–20, 2015.

DE PAULA MEIRELLES, G. et al. Green Analytical Toxicology for the Determination of Cocaine Metabolites. **Journal of analytical toxicology**, v. 46, n. 9, p. 965–978, 24 jan. 2022.

DUAN, C. et al. Simultaneous Determination of Cortisol, Cortisone, and Multiple Illicit Drugs in Hair among Female Drug Addicts with LC-MS/MS. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 2, 1 jan. 2021.

DURANTE, L. et al. Risk assessment of ayahuasca use in a religious context: Self-reported risk factors and adverse effects. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 43, n. 4, p. 362–369, 2020.

ESTRELLA-PARRA, E. A.; ALMANZA-PÉREZ, J. C.; ALARCÓN-AGUILAR, F. J. Ayahuasca: Uses, Phytochemical and Biological Activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 4, p. 251–265, 2019.

FEENEY, K.; LABATE, B. C. The expansion of Brazilian ayahuasca religions: Law, culture and locality. **Prohibition, Religious Freedom, and Human Rights: Regulating Traditional Drug Use**, p. 111–130, 1 ago. 2013.

FERNÁNDEZ, M. DEL M. R. et al. A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates,

opioids and metabolites). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 965, p. 7–18, 15 ago. 2014.

FERNÁNDEZ, P. et al. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, n. 1, p. 88–96, 12 mar. 2013.

FERREIRA, C.; PAULINO, C.; QUINTAS, A. Extraction procedures for hair forensic toxicological analysis : a mini-review Extraction procedures for hair forensic toxicological analysis : A mini-review. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 12, p. 2367–2381, 2019.

FRECSKA, E.; BOKOR, P.; WINKELMAN, M. The therapeutic potentials of ayahuasca: Possible effects against various diseases of civilization. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1–17, 2016.

FRENI, F. et al. Determination of fentanyl and 19 derivatives in hair: Application to an Italian population. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 189, 10 set. 2020.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GAMA, M. R. et al. An overview of the brazilian contributions to green analytical chemistry. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1–33, 2019.

GHOSH, C. Green bioanalysis: Some innovative ideas towards green analytical techniques. **Bioanalysis**, v. 4, n. 11, p. 1377–1391, 2012.

GLENNON, R. A. DUKAT M.; GRELLA, B.; HONG, S.; COSTANTINO, L.; TEITLER, M.; SMITH, C.; EGAN, C.; DAVIS, K.; MATTSON, M.. **Binding of b-carbolines and related agents at serotonin (5-HT 2 and 5-HT 1A), dopamine (D 2) and benzodiazepine receptors Drug and Alcohol Dependence**. v. 60 p. 121 – 132. 1999.

HAMILL, J.; HALLAK J.; DURSUN, S. M.; BAKER, G.. V..Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 2, p. 108–128, 2 mar. 2018.

HOLD, K. M.; CROUGH, D. J.; WILKINS D. G.; ROLLINS, D. E.; MAES, R. A.. Forensic Science Internhml Detection of alprazolam in hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 84, p. 201–209, 1997.

IUPAC. **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Gold Book. p 1 – 1622. 2012

KHAJURIA, H.; NAYAK, B. P.; BADIYE, A. Toxicological hair analysis: Pre-analytical, analytical and interpretive aspects. **Medicine, Science and the Law**, v. 58, n. 3, p. 137–146, 2018.

KINTZ, P. VILLAIN, M.; DUMESTRE-TOULET, V.; LUDES, B.. Drug-facilitated sexual assault and analytical toxicology: the role of LC-MS/MS A case involving zolpidem. **Journal of clinical forensic medicine**, v. 12, n. 1, p. 36–41, fev. 2005.

KINTZ, P.; VILLAIN, M.; BARGUIL, Y.; CHORLOT, J.; CIRIMELE, V.. Testing for atropine and scopolamine in hair by LC-MS-MS after Datura inoxia abuse. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, n. 7, p. 454–457, 2006.

KINTZ, P. Hair Analysis in Forensic Toxicology: An Updated Review with a Special Focus on Pitfalls. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 36, p. 5480–5486, 2018.

KINTZ, P. Hair analysis in forensic toxicology. **WIREs Forensic Science**, v. 1, n. 1, p. 1–11, jan. 2019.

KINTZ, P.; AMELINE, A.; RAUL, J. S. Human hair tests to document drug environmental contamination: Application in a family law case involving N,N-dimethyltryptamine. **Drug Testing and Analysis**, p. 1–4, 1 fev. 2020.

KINTZ, P.; AMELINE, A.; RAUL, J. S. Human hair tests to document drug environmental contamination: Application in a family law case involving N,N-dimethyltryptamine. **Drug Testing and Analysis**, v. 13, n. 2, p. 447–450, 1 fev. 2021.

LANARO, R.; CELEMI, D. B. A.; TOGNI, L. R.; COSTA J. L.; YONAMINE, M.; CAZEVANE, S. O. S.; LINARDI, A..Ritualistic Use of Ayahuasca versus Street Use of Similar Substances Seized by the Police: A Key Factor Involved in the Potential for Intoxications and Overdose? **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 47, n. 2, p. 132–139, 2015.

LIU, M.; YANG, H.; HU, J.; SHEN, B.; XIANG, P.; QIANG, H.; DENG, H.; YU, Z.; SHI, Y.. Analysis of 28 hair samples from users of the hallucinogenic beverage ayahuasca. **Forensic Science International**, v. 323, 1 jun. 2021.

MAAS, A.; MAYER, C.; IWERSEN-BERGMAN, S.; MADEA, B.. Simultaneous extraction of propofol and propofol glucuronide from hair followed by validated LC–MS/MS analyses. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 146, p. 236–243, 30 nov. 2017.

MANSOUR, F. R.; KHAIRY, M. A. Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1061–1062, p. 382–391, 1 set. 2017.

MARK, H. Application of an improved procedure for testing the linearity of analytical methods to pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 1, p. 7–20, 15 set. 2003.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003.

MCELWEE, K. J.; SINCLAIR, R. Hair physiology and its disorders. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 2, p. 163–171, 2008.

MCILHENNY, E. H. RIBA, J.; BARBANOJ, M. J.; STRASSMAN, R.; BARKER, S. A.. Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of the amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 9, p. 970–984, 2010.

MCILHENNY, E. H. E. H. RIBA, J.; BARBANOJ, M. J.; STRASSMAN, R.; BARKER, S. A.. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 3, p. 301–313, 2011.

MCKENNA, D. J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: Rationale and regulatory challenges. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 102, n. 2, p. 111–129, 2004.

MERCIECA, G.; ODOARD, S.; CASSAR, M.; ROSSI, S. S.. Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other

new psychoactive substances in blood and urine by GC–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 494–501, 5 fev. 2018.

NICHOLS, D. E. Hallucinogens. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 101, n. 2, p. 131–181, 2004.

NICHOLS, D. E. Psychedelics. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 264–355, 1 abr. 2016.

OGALDE, J. P.; ARRIAZA, B. T.; SOTO, E. C. Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 2, p. 467–472, 2009a.

OLIVEIRA, C. D. R. et al. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in wistar rats. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 207–212, 2010.

OLIVEIRA, C. D. R. et al. Determination of dimethyltryptamine and β -carbolines (ayahuasca alkaloids) in plasma samples by LC-MS/MS. **Bioanalysis**, v. 4, n. 14, p. 1731–1738, jul. 2012.

OLIVEIRA-LIMA, A. J. et al. Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. **Physiology and Behavior**, v. 142, p. 28–36, 1 abr. 2015.

PALHANO-FONTES, F. et al. Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: A randomized placebo-controlled trial. **Psychological Medicine**, v. 49, n. 4, p. 655–663, 1 mar. 2019.

PANTALEÃO, L. DO N.; PARANHOS, B. A. P. B.; YONAMINE, M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human hair samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1254, p. 1–7, 2012.

PICHINI, S. et al. Ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of hallucinogenic drugs in hair of psychedelic plants and mushrooms consumers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 284–289, 2014.

PIERGIOVANNI, M. et al. Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 492–500, 30 maio 2018.

PIRES, A. P. S. et al. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in Ayahuasca, an amazonian psychoactive plant beverage. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 2, p. 149–153, 2009.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2c} receptors. **Molecular Brain Research**, v. 23, p. 163–178, 1994.

PRAT, D. et al. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 288–296, 13 ago. 2015.

REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 26 maio 2006.

RIBA, J. et al. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 154, n. 1, p. 85–95, 2001.

RIBA, J. et al. Human pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 73–83, 1 jul. 2003.

RIBA, J. et al. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, n. 7–8, p. 610–616, 2012.

RODRIGUES, A. V. S. L.; ALMEIDA, F. J.; VIEIRA-COELHO, M. A. Dimethyltryptamine: Endogenous Role and Therapeutic Potential. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 51, n. 4, p. 299–310, 2019.

SILVEIRA, G. D. O. et al. Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices. **Bioanalysis**, v. 11, n. 4, p. 295–312, 2019.

SILVEIRA, G. DE O. et al. Fast Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction as a Greener Alternative for the Determination of N,N-Dimethyltryptamine and Harmala Alkaloids in Human Urine. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 1–13, 2020.

SILVEIRA, G. DE O. et al. Essential oil-based dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of N,N-dimethyltryptamine and β -carbolines in human plasma: A novel solvent-free alternative. **Talanta**, v. 225, n. 121976, p. 1–11, 1 abr. 2021.

SIMÃO, A. Y. et al. Toxicological Aspects and Determination of the Main Components of Ayahuasca: A Critical Review. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, p. 1–18, 2019.

SITARAM, B. R. et al. Urinary excretion of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine, N,N-dimethyltryptamine and their iv-oxides in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2235–2237, 1987.

STRASSMAN, R. J. Dose-Response Study of N,N-Dimethyltryptamine in Humans. **Archives of general psychiatry**, v. 51, n. 2, p. 98–108, 1994.

SWGTOX. Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452–474, set. 2013.

SZABO, A. et al. Psychedelic N,N-Dimethyltryptamine and 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamine Modulate Innate and Adaptive/Inflammatory Responses through the Sigma-1 Receptor of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. **Receptor of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells.**, v. 9, n. 8, p. 1–12, 1 set. 2014.

SZÁRA, S. DMT at fifty. **Neuropsychopharmacologia Hungarica**, v. 9, n. 4, p. 201–205, 2007.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 328–334, 2005.

WANG, Y. et al. Subchronic toxicity and concomitant toxicokinetics of long-term oral administration of total alkaloid extracts from seeds of *Peganum harmala* Linn: A 28-day study in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, 28 jun. 2019.

WIELENS BECKER, R. et al. Proposal of a new, fast, cheap, and easy method using DLLME for extraction and preconcentration of diazepam and its transformation products generated by a solar photo-Fenton process. **Water Research**, v. 184, 1 out. 2020.

YRITIA, M. et al. Determination of N, N-dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 779, n. 2, p. 271–281, 2002.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1382–1399, 1 out. 2011.

ZHAO, J. et al. G protein-coupled receptors (GPCRs) in Alzheimer's disease: A focus on BACE1 related GPCRs. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. 58, 24 mar. 2016.

ANEXO 1

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação dos alcaloides da ayahuasca em diferentes matrizes aplicando estratégias de química analítica verde

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 66093117.1.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.525.203

Apresentação do Projeto:

A ayahuasca é uma bebida indígena alucinógena usada com propósito xamânico e espiritual, cuja utilização data do período pré-colombiano na região da bacia amazônica. Esta bebida é normalmente preparada através da decoção das plantas *Psychotria viridis* e *Banisteriopsis caapi*. As -carbolinas presentes no cipó *B. caapi* são responsáveis pela inibição da enzima monoaminoxidase-A (MAO-A), permitindo que o alucinógeno DMT (dimetiltriptamina) presente nas folhas de *P. viridis* chegue ao seu sítio ativo e promova a ação alucinógena, sobretudo em receptores serotoninérgicos. Com uso disseminado no Brasil, América do Norte e Europa, o chá da ayahuasca desperta grande interesse no meio científico e é objeto de estudo de vários grupos de pesquisa no Brasil. Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam a determinação dos principais alcaloides desta bebida em diversas matrizes representa grande importância e é demanda constante no Laboratório de Análises Toxicológicas da USP por pesquisadores provenientes de várias instituições no Brasil. Além disso, nossa equipe de pesquisa acredita na importância de promover o desenvolvimento de tecnologia analítica de extração de amostras que respeitem a tendência global de desenvolvimento sustentável através da aplicação de estratégias de 'química analítica verde' (Green Analytical Chemistry - GAC), a saber: minimização do consumo de solventes e energia, eliminação de agentes derivatizantes, baixo custo e facilidade de execução.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000

UF: SP **Município:** SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 4.525.203

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Verificar a possibilidade de detectar e quantificar os alcaloides da ayahuasca em amostras de chá, plasma, urina e cabelo, utilizando métodos baseados em Química Analítica Verde.

Objetivo Primário:

O objetivo deste projeto é o desenvolvimento e validação de uma série de métodos para determinação dos principais alcaloides da ayahuasca (DMT, harmina, harmalina e tetrahydroarmina) na própria bebida e em amostras biológicas como plasma, urina e cabelo aplicando estratégias de química analítica verde (GAC).

Objetivo Secundário:

- Desenvolver métodos analíticos ecologicamente viáveis, validados segundo guias internacionais, para estudos envolvendo alcaloides da ayahuasca;
- Reduzir ou eliminar o uso de solventes orgânicos nas técnicas de extração aplicadas e promover gerenciamento adequado do resíduo gerado;
- Aplicar alternativas que diminuam o consumo de energia, tais como ultrassom e micro-ondas;
- Desenvolver técnicas analíticas mais seguras para o operador e de baixo custo;
- Gerar colaborações e publicações com grupos de pesquisa em ayahuasca de todo o Brasil, contexto esse que incitou o desenvolvimento deste projeto

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco à saúde do participante será mínimo, no entanto, a coleta de sangue periférico (sangue circulante nas suas veias) pode causar alguns efeitos indesejados (hematoma, pequenas manchas escuras, que podem ser castanhas, encarnadas ou azul-negro, localizada sob a pele, dor no local da picada). A coleta será realizada por profissional da saúde, proporcionando mínimo desconforto.

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos aos participantes doadores de amostra, mas os novos testes laboratoriais desenvolvidos poderão auxiliar os estudos sobre ayahuasca produzidos no Brasil e no mundo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Amostras de plasma, urina e cabelo (n = 10, cada) serão coletadas de indivíduos participantes de uma comunidade religiosa estabelecida em Capela do Alto - SP, no interior de São Paulo. Dez

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 4.525.203

amostras do chá, coletadas em diferentes meses do ano serão obtidas do mesmo grupo, de acordo com o preparo ritualístico habitual. Todas as amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Análises Toxicológicas da USP, onde serão realizadas as análises confirmatórias dos analitos de interesse, com o intuito de comprovar a viabilidade e confiabilidade dos métodos desenvolvidos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este projeto já está aprovado e todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

é uma solicitação de inclusão de pesquisadora Fabiana Pereira Santos, aluna de pos-graduação do curso de Farmácia no presente projeto de pesquisa. Foi apresentado a declaração de participação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1693203 E1.pdf	23/01/2021 15:55:21		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_de_participacao_Fabiana.pdf	23/01/2021 15:54:30	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Emenda_Fabiana.pdf	23/01/2021 15:52:39	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	23/06/2017 14:30:07	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Doutorado_Rev2.docx	23/06/2017 14:28:48	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Cartaauxiliocoleta.pdf	17/03/2017 16:31:12	Mauricio Yonamine	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoGabriela.pdf	17/03/2017 16:14:37	Mauricio Yonamine	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FCF/USP



Continuação do Parecer: 4.525.203

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Departamento.pdf	09/03/2017 17:34:38	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Declaracao_de_Participacao_Gabriela.pdf	09/03/2017 17:34:11	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Declaracao_de_participacao_Menck.pdf	09/03/2017 17:33:47	Mauricio Yonamine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoayahuascaRevCEP.pdf	09/03/2017 17:29:05	Mauricio Yonamine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Fevereiro de 2021

Assinado por:

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br