

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Concentração Toxicologia

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

Gabriela de Oliveira Silveira

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Concentração Toxicologia

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

Gabriela de Oliveira Silveira

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2020

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 eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a 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

S587d Silveira, Gabriela de Oliveira
Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação dos alcaloides da ayahuasca em diferentes matrizes aplicando estratégias de química analítica verde / Gabriela de Oliveira Silveira. - São Paulo, 2020.
141 p.

Tese (doutorado) - 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. Toxicologia. 2. Alucinogênicos. 3. Química Verde. 4. Cromatografia Líquida. 5. Espectrometria de Massas. I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

Gabriela de Oliveira Silveira

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

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Área de Concentração Toxicologia

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, de de 2020.

Agradecimentos

Desde o início, e mesmo antes do ingresso no doutorado, contei com grande apoio e incentivo, dentro e fora do ambiente acadêmico; portanto, jamais poderia deixar de mostrar minha gratidão. Sou grata em primeiro lugar à minha mãe, Maria Cremilde, que dedicou sua vida aos sonhos dos filhos e foi graças à sua luta conquistei os meus. Ao meu pai Domingos e aos meus irmãos Bianca, Igor e Isabela pela disposição e apoio incondicionais. Aos meus avós Chico, Marilene e Leônia e as minhas tias Selma e Nivalda sempre atentos, preocupados e à disposição em todos os momentos. À toda minha família, origem do meu caráter. Agradeço a Micael, meu companheiro, por tanto amor e cuidado. Agradeço às minhas professoras Tânia Marcourakis, Elizabeth Nascimento, Silvia Cazenave e Alice Chasin, mulheres incríveis e grande inspiração profissional. Aos amigos e colegas que fiz no Bloco 13B, compartilhando as aflições, conquistas e aprendizados, Beatriz, Everson, Kátia, Jefferson, Ana Luiza, Felipe, Gabriela, Fabiana, Karina e Carla, muito obrigada! Agradeço infinitamente às minhas companheirinhas da vida, as ToxiGirls Ana Miguel, Maita, Idylla, Sarah e Flávia. Obrigada por me permitirem essa amizade e pelos ensinamentos sobre a vida e a Toxicologia Analítica! Obrigada ao nosso ToxiGuru, Anax, pela inspiração pessoal e profissional. Agradeço a Vitor e ao Dr. Rafael Guimarães pela colaboração nos estudos sobre ayahuasca e contribuição na coleta de amostras. Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro nas formas de bolsa e auxílio à pesquisa, sob os processos número 2016/06810-2 e 2018/24770-3. À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela infraestrutura e oportunidade. Finalmente, serei eternamente grata ao meu orientador, Dr. Mauricio Yonamine, pela confiança, paciência, orientação, por me possibilitar ser a cientista que sempre quis ser e trabalhar da forma que acredito. A todos que tornaram esse trabalho de algum modo possível, muito obrigada!

“Se o conhecemos [um objeto] quantitativamente [...] percebemos parte da sua beleza e temos acesso ao seu poder e à compreensão que ele propicia. Ter medo da quantificação equivale a renunciar aos nossos direitos civis, abrindo mão de uma das esperanças mais potentes de compreender e transformar o mundo”.

Carl Sagan, 1997, p.30.

RESUMO

SILVEIRA, G.O. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação dos alcaloides da ayahuasca em diferentes matrizes aplicando estratégias de química analítica verde. 2020. 141f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A ayahuasca é uma bebida de origem indígena com propriedades psicodélicas, historicamente utilizada com propósito espiritual e xamânico pelos habitantes da região da bacia amazônica. Atualmente de uso disseminado no Brasil e em diversos outros países do mundo, o chá da ayahuasca é normalmente preparado por meio da decocção das plantas *Psicotria viridis* e *Banisteriopsis caapi*. O efeito sinérgico que ocorre entre as β-carbolinas presentes no cipó *B. caapi* e o alucinógeno dimetiltriptamina (DMT) presente nas folhas de *P. viridis* permite a ação psicoativa em receptores serotoninérgicos e confere à bebida uma posição de destaque e interesse na comunidade científica devido a seu potencial terapêutico. À vista disso, diversos métodos têm sido desenvolvidos com o intuito de determinar os constituintes ativos da ayahuasca em matrizes diversas nos contextos clínico, experimental e forense. Adicionalmente, tendo em conta a demanda por metodologias analíticas que respeitem o meio ambiente, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma série de métodos para a determinação dos alcaloides da ayahuasca no chá propriamente dito, mas também nas matrizes urina e plasma, aplicando estratégias de Química Analítica Verde (GAC) e cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Portanto, o trabalho a seguir é apresentado como uma combinação de métodos não publicados e coletânea de artigos, descritos entre os capítulos 4 e 8. Inicialmente, desenvolveu-se um método simples de diluição em solução tampão para amostras de chá da ayahuasca posteriormente aplicado em dezenas de amostras autênticas obtidas em colaborações diversas. Tal método foi aplicado na investigação da estabilidade de amostras de chá armazenadas em três diferentes condições, por períodos de até 12 meses, de modo a gerar o artigo apresentado no capítulo 6 (Artigo II). No capítulo 5, apresenta-se o estudo (Artigo I) derivado da revisão do conhecimento existente a respeito da aplicação da GAC sobretudo em contexto forense. No capítulo 7 dá-se início a miniaturização das técnicas de extração, estratégia de grande valor quando da aplicação da GAC. Como descrito no Artigo III, o método consiste em uma microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para tratamento da matriz urina. Após otimizado por uso de ferramentas de desenho de experimentos e completamente validado, a técnica demonstrou ótimo desempenho quando aplicado em amostras autênticas de urina. A seguir, um método de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), apresentado no capítulo 8 (Artigo IV), foi desenvolvido e validado para extração da matriz plasma. Esta técnica apresentou a possibilidade da substituição de solventes orgânicos tóxicos por óleo essencial, uma alternativa de impacto ambiental negligível com origem natural, relatada pela primeira vez no presente trabalho. Por fim, conclui-se que as técnicas de preparo e extração empregadas neste estudo respeitam os princípios GAC e permitem a redução, substituição e eliminação do uso de solventes orgânicos. Além de ecologicamente viáveis, os métodos desenvolvidos apresentaram rapidez, baixo custo e promoção da segurança do analista.

Palavras-chave: Ayahuasca. DMT. β-carbolinas. Microextração. Química Analítica Verde.

ABSTRACT

SILVEIRA, G.O. Development of analytical methods for the determination of ayahuasca alkaloids in different matrices applying green analytical chemistry strategies. 2020. 141f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Ayahuasca is an indigenous beverage with psychedelic properties, historically used for shamanic and spiritual purposes by the inhabitants of the Amazon basin region. With its widespread use in Brazil and other countries, the ayahuasca tea is usually prepared by decoction of the *Psicotria viridis* and *Banisteriopsis caapi* plants. The synergistic effect that occurs between the β-carboline alkaloids (present in the *B. Caapi* vine) and the hallucinogen DMT (dimethyltryptamine, present in the leaves of *P. viridis*) allows the final psychoactive response in serotoninergic receptors, which grants a prominent position to ayahuasca beverages in the scientific community due to its therapeutic potential. Therefore, several methods have been developed to determine the active constituents of ayahuasca in different matrices, which are associated with clinical, experimental, and forensic contexts. Additionally, taking into account the current requirements for more eco-friendly analytical alternatives, the aim of the current study was to develop a series of analytical methods for the determination of ayahuasca alkaloids in the beverage, as well as in human plasma and urine applying Green Analytical Chemistry strategies (GAC) and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Thus, the current study is presented as a combination of unpublished data and article collection, according to chapters 4 to 8. Initially, a simple dilute-and-shoot method using a buffer solution has been developed for the analysis of tea samples and applied to several authentic specimens obtained from various collaborators. This method has been also applied for the investigation of the stability of tea samples submitted to three different storage conditions for periods up to 12 months. The results of this evaluation have generated the manuscript presented in chapter 6 (Article II). Chapter 5 presents Article I, a study derived from the review of existing knowledge regarding the application of GAC, particularly in forensic contexts. The miniaturization of extraction techniques – a valuable strategy when applying GAC principles – is first presented in chapter 7. As described in Article III, the method consists in a hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) for the treatment of urine specimens. After optimization by design of experiments and full validation, this technique has showed great performance when used for the analysis of real urine samples. Then, a dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) alternative is presented in chapter 8 (Article IV), which has been developed and validated for the analysis of plasma samples. This technique has demonstrated the opportunity to replace toxic organic solvents for essential oils, an alternative of negligible environmental impact from natural sources which has been reported for the first time in the current study. Finally, it may be concluded that the extraction and preparation alternatives employed in the present work fit the GAC requirements and allow the reduction, replacement, and elimination of extraction solvents. Nevertheless, the developed methods are eco-friendly, cost-effective, time-saving, and safe.

Keywords: Ayahuasca. DMT. β-carbolines. Microextraction. Green Analytical Chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das espécies vegetais que compõem o chá da <i>ayahuasca</i> . A. Cipó <i>Banisteriopsis caapi</i> . B. Folhas de <i>Psicotria viridis</i>	16
Figura 2 - Representação das estruturas químicas dos principais componentes do chá da <i>ayahuasca</i>	19
Figura 3 - Vias de biossíntese da N,N-dimetiltriptamina (DMT), serotonina (5-HT) e 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina (2-MTHBC).....	21
Figura 4 - Vias de biotransformação da N,N-dimetiltriptamina (DMT, em vermelho).....	24
Figura 5 - Classificação de alguns solventes clássicos segundo o guia de seleção de solventes CHEM21.....	39
Figura 6 - Linha do tempo sobre as principais técnicas de extração miniaturizadas desenvolvidas em 1990 e 2013.	41
Figura 7 - Representação esquemática do sistema de três fases da microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME).....	43
Figura 8 - Representação esquemática da transferência do analito na microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME)	45
Figura 9 - Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra autêntica de <i>ayahuasca</i> . A amostra contém 1. dimetiltriptamina (DMT, 223,0 ng/mL), 2. DMT- <i>d</i> ₆ (padrão interno), 3. tetraidro-harmina (THH, 226,5 ng/mL), 4. harmalina (HRL, 45,1 ng/mL) e 5. harmina (HRM, 257,5 ng/mL) após diluição seguida por análise em LC-MS/MS. Os valores de <i>m/z</i> (razão massa/carga) foram utilizados na quantificação dos analitos.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Íons precursores, íons produto, tempos de retenção, voltagem do cone e energia de colisão dos analitos dimetiltriptamina deuterada (DMT- <i>d</i> ₆), dimetiltriptamina (DMT), tetraidro-harmina (THH), harmalina (HRL) e harmina (HRM).....	53
Tabela 2 - Limites de detecção (LoD, ng/mL), limites de quantificação (LoQ, ng/mL), equações de regressão linear, fatores de ponderação (FP) e coeficientes de determinação (<i>r</i> ²) para dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) após o procedimento de diluição.....	58
Tabela 3 - Precisão inter-ensaio, precisão intra-ensaio e exatidão para dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) após o procedimento de diluição.....	59
Tabela 4 - Faixa de concentração (mg/mL) e concentração média ± desvio padrão (mg/mL) de dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) após o procedimento de diluição em amostras autênticas provenientes de diferentes grupos ayahuasqueiros.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina, serotonina
CA	Controle alto
CB	Controle baixo
CM	Controle médio
CV%	Coeficiente de variação
DMT	Dimetiltriptamina
DLLME	Microextração dispersiva líquido-líquido, do inglês <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
GAC	Química analítica verde, do inglês <i>green analytical chemistry</i>
GC	Cromatografia em fase gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
HF-LPME	Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca, do inglês <i>hollow-fiber liquid-phase microextraction</i>
HRL	Harmalina
HRM	Harmina
LC	Cromatografia em fase líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i>
LC--MS/MS	Cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, do inglês <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LoD	Límite de Detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LoQ	Límite de Quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>
LLME	Microextração Líquido-Líquido, do inglês <i>liquid-liquid microextraction</i>
MAO-A	Monoamino Oxidase tipo A
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>

SLM	Fase Líquida Suportada em Membrana, do inglês <i>supported liquid membrane</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>solid-phase extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>solid-phase microextraction</i>
THH	Tetrahidroarmina
UDV	União do Vegetal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Origem e uso ritualístico.....	15
1.2. Estimativas de uso e considerações legais	17
1.3. Caracterização fitoquímica	18
1.4. Aspectos Toxicológicos	22
1.5. Potencial Terapêutico.....	29
1.6. Alternativas analíticas para a determinação dos alcaloides da <i>ayahuasca</i>	33
1.7. Química Analítica Verde.....	36
1.8. Técnicas de extração miniaturizadas	40
2. OBJETIVOS.....	47
3. APRESENTAÇÃO DOS DADOS	49
4. MÉTODO DE DILUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ALCALOIDES DA AYAHUASCA EM AMOSTRAS DE CHÁ	51
5. ARTIGO I.....	63
6. ARTIGO II.....	66
7. ARTIGO III.....	70
8. ARTIGO IV.....	73
9. CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS	123
ANEXO I.....	135
APÊNDICE I	138

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e uso ritualístico

A busca pela alteração do estado de consciência é um comportamento humano compatível com civilizações ancestrais e historicamente associado com rituais místico-religiosos em diversas culturas (GAUJAC et al., 2012; MILLER et al., 2019). Tal estado de alteração da percepção ou consciência pode ser definido como a modificação no funcionamento mental regular para um estado de hiper ou hipo excitação capaz de alterar os sentidos, o curso do pensamento, o humor, bem como os senso de realidade e de si (PRELLER; VOLLENWEIDER, 2017; SAYIN, 2012). Para este fim, são empregadas substâncias com propriedades alucinógenas provenientes de plantas e fungos, tais como a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), psilocibina, mescalina e a dimetiltriptamina (DMT), algumas das quais têm uso estabelecido desde o período pré-colombiano (ESTRELLA-PARRA; ALMANZA-PÉREZ; ALARCÓN-AGUILAR, 2019; GAUJAC et al., 2012). Os termos psicodélico, ou de forma ainda mais apropriada, enteógeno, são também utilizados para acessar o caráter não recreacional relacionado ao uso tradicional de alucinógenos de origem natural, provenientes especialmente de plantas, com propósito ritualístico, religioso ou xamânico (GLASS-COFFIN, 2010; MILLER et al., 2019).

É no contexto da prática ancestral do uso de enteógenos por povos indígenas que se encontra a bebida denominada no Brasil como *ayahuasca*. O termo, originado do idioma andino Quechua, pode ser definido como “vinho das almas” ou “vinho dos mortos” e refere-se ao produto da decocção do cipó da espécie *Banisteriopsis caapi* combinado a diversas outras plantas, mas mais comumente às folhas do arbusto *Psicotria viridis*, **Figura 1** (HAMILL et al., 2018; MCKENNA; RIBA, 2016). O chá da *ayahuasca* pode ainda ser designado pelos nomes de *yagé*, *caapi*, *natema*, *hoasca*, entre outros, a depender da região da bacia amazônica em que é encontrado, uma vez que esta preparação etnobotânica, em suas diversas formas, é também tradicionalmente encontrada em outros países como Colômbia, Peru, Equador e Bolívia. Em todos eles, a bebida era empregada em contexto espiritual, curativo e em ritos de iniciação (DOS SANTOS; HALLAK, 2019; LABATE; CAVNAR; GEARIN, 2017).

Figura 1 - Representação das espécies vegetais que compõem o chá da ayahuasca. A. Cipó *Banisteriopsis caapi*. B. Folhas de *Psicotria viridis*.



Fonte: A. Imagem gentilmente doada pelo Dr. Eduardo Schenberg. B. A autora.

Embora a origem exata da instituição do consumo da ayahuasca não esteja bem estabelecida, supõe-se que sua utilização era verdadeira já entre os primeiros habitantes indígenas da bacia amazônica (ESTRELLA-PARRA; ALMANZA-PÉREZ; ALARCÓN-AGUILAR, 2019; HAMILL et al., 2018). No entanto, evidências mais concretas demonstram o consumo de *Banisteriopsis* em múmias andinas datadas entre 400 e 900 anos d.C. e a presença dos constituintes da ayahuasca em artefatos arqueológicos com cerca de 1000 anos (MILLER et al., 2019; OGALDE; ARRIZA; SOTO, 2009;). No Brasil, embora a utilização da ayahuasca tenha sido limitada a região amazônica até o início do século XX, quando esta prática era específica dos povos indígenas e mestiços, o uso em contexto ritualístico difundiu-se a partir dos anos 1930 - 1960 com o surgimento das chamadas religiões ayahuasqueiras brasileiras (DOS SANTOS; HALLAK, 2019; HAMILL et al., 2018; LOIZAGA-VELDER; VERRES, 2014). Santo Daime, União do Vegetal (UDV) e Barquinha são historicamente os grupos religiosos de maior importância na prática do consumo do chá da ayahuasca no Brasil. O primeiro, possivelmente mais antigo, comprehende elementos da liturgia cristã com rituais mais dinâmicos e musicais, enquanto a UDV incorpora práticas meditativas e de harmonia com a natureza (HAMILL et al., 2018; MCKENNA; RIBA, 2016).

Apesar da Barquinha, de núcleo afro-brasileiro, ter permanecido com a prática concentrada na região norte, os demais grupos ayahuasqueiros uniram praticantes em todas as regiões do país e contribuíram para a disseminação global do consumo da *ayahuasca* que alcançou os demais países americanos, Europa, Ásia, Austrália e Japão no curso dos últimos 30 anos (FOTIOU; GEARIN, 2019; LABATE; CAVNAR; GEARIN, 2017; LOIZAGA-VELDER; VERRES, 2014). Atualmente, a bebida é parte de diversas práticas culturais e religiosas que envolvem contextos neo-xamânicos, psicoterapêuticos, recreativos e até mesmo turísticos (LABATE; CAVNAR; GEARIN, 2017; TUPPER, 2008).

1.2. Estimativas de uso e considerações legais

A despeito do uso globalmente disseminado da *ayahuasca*, dados referentes à sua utilização nos contextos supracitados são escassos. O Relatório Mundial sobre Drogas lançado no ano de 2019 pelo *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), embora não faça referência à bebida, descreve dados das apreensões de DMT, princípio ativo responsável pelos efeitos psicodélicos da *ayahuasca* presente nas folhas de *Psicotria viridis*, em todo o mundo. O relatório indica que esta substância passou a dominar as apreensões de alucinógenos após 2010, de modo a alcançar posição predominante nas apreensões desta classe nos anos de 2016 e 2017 nos países das Américas, Europa, Ásia e Oceania (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2019). No Brasil, o III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira publicado em 2017 (III LNUD), estimou que mais de meio milhão de brasileiros (567.000 indivíduos) entre 12 e 65 anos de idade fizeram uso do chá da *ayahuasca* alguma vez na vida; os números caem para 181.000 e 118.000 quando referente ao consumo no último ano (2015) e nos últimos 30 dias, respectivamente (BASTOS et al., 2017).

No que diz respeito ao posicionamento legal sobre *ayahuasca*, devido especialmente a presença da DMT, diferentes países tomam ações diversas, o que torna este um tema complexo e por vezes controverso (LOIZAGA-VELDER; VERRES, 2014). No âmbito internacional, por exemplo, a DMT é categorizada na lista I da Convenção de 1971 sobre Substâncias Psicotrópicas das Nações Unidas, que se refere a compostos que representam sério risco à saúde pública e não

possuem valor terapêutico. No entanto, a mesma convenção não determina que o chá *ayahuasca* ou as espécies vegetais que o constituem estejam sob controle internacional (LABATE; CAVNAR; GEARIN, 2017; LABATE; FEENEY, 2012). Similarmente, a DMT é parte da lista I da *U.S. Drug Enforcement Administration* enquanto o uso religioso da bebida por membros da UDV e Santo Daime é permitido em âmbito federal (LABATE; FEENEY, 2012; MCKENNA; RIBA, 2016).

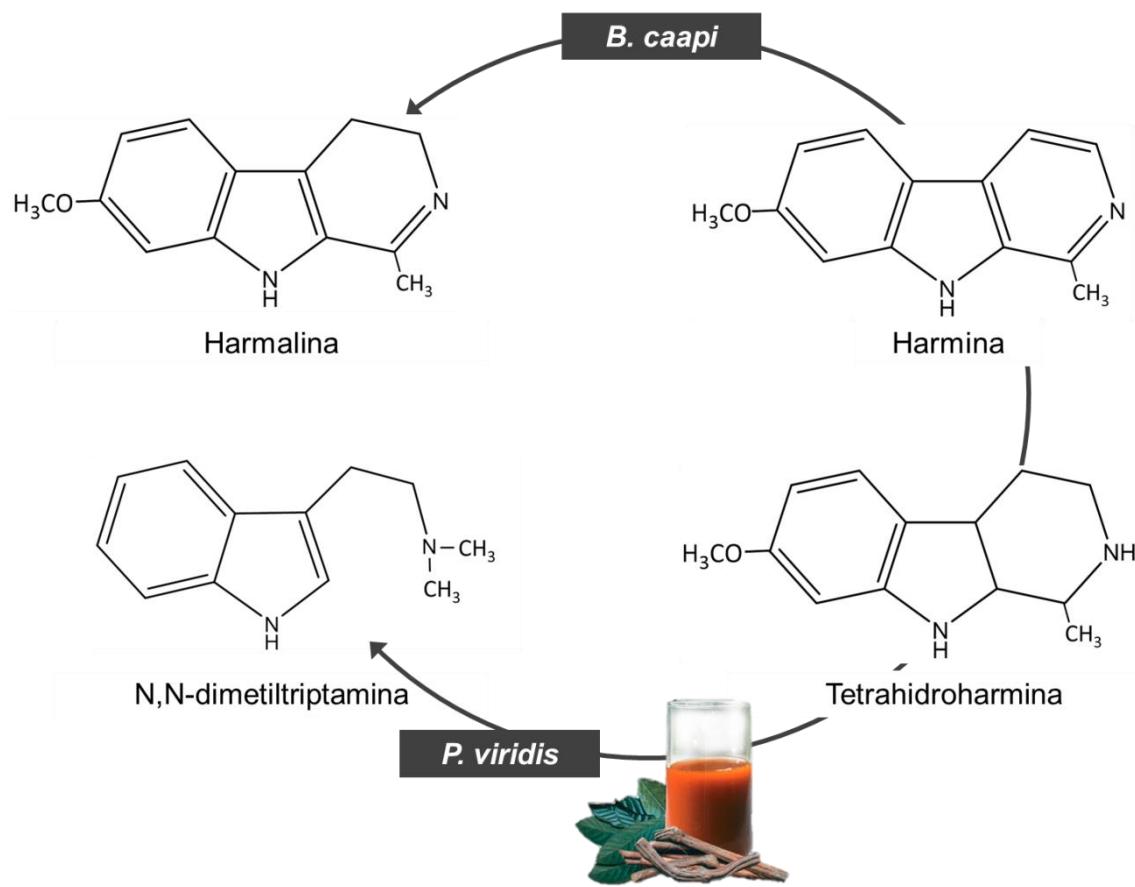
No Brasil, as primeiras medidas legais direcionadas à *ayahuasca* datam da segunda metade da década de 1980, quando em 1986 as espécies vegetais que constituem a bebida foram provisoriamente suspensas das listas da Divisão de Medicamentos (DIMED), por Resolução do Conselho Federal de Entorpecentes (CONFEN, nº 06, de 4 de fevereiro de 1986). Nos anos seguintes a suspensão tornou-se definitiva e em 2004, o extinto Conselho Nacional de Políticas Sobre Drogas (CONAD) reconheceu juridicamente a legitimidade do uso religioso da *ayahuasca* e reafirmou a importância de garantir o direito constitucional ao culto (Resolução nº 5 de 04 de novembro de 2004) (BRASIL, 2004). Finalmente, a Resolução CONAD nº 1 de janeiro de 2010, definiu os aspectos jurídicos e éticos para regulamentação do uso religioso, incluindo a regulação da produção, uso, envio e transporte da *ayahuasca*, bem como procedimentos de recepção de novos interessados e definição de uso terapêutico (BRASIL, 2010). No entanto, vale reafirmar que assim como em outros países do mundo, a DMT é uma substância de uso proscrito segundo a lista F2 da Portaria Nº 344, de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 1998).

1.3. Caracterização fitoquímica

Tal como anteriormente mencionado, a apresentação mais habitual do chá da *ayahuasca* é aquela preparada a partir das folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) submetidas à decocção junto ao cipó macerado de *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae). O arranjo das duas espécies de plantas é fundamental uma vez que as folhas de *P. viridis*, também conhecida por chacrona, contém o alcaloide N,N-dimetiltriptamina (DMT, **Figura 2**) capaz de induzir efeitos psicodélicos. Adicionalmente, o cipó de *B. caapi* (cipó de mariri) é constituído de uma classe de substâncias, as β-carbolinas, que impedem a degradação da DMT, de tal forma que

a interação farmacológica entre ambas as espécies vegetais é responsável pelos efeitos enteógenos atribuídos a bebida (CALLAWAY et al., 1999; GAUJAC et al., 2012; WANG et al., 2010).

Figura 2 - Representação das estruturas químicas dos principais componentes do chá da ayahuasca.



Fonte: A autora.

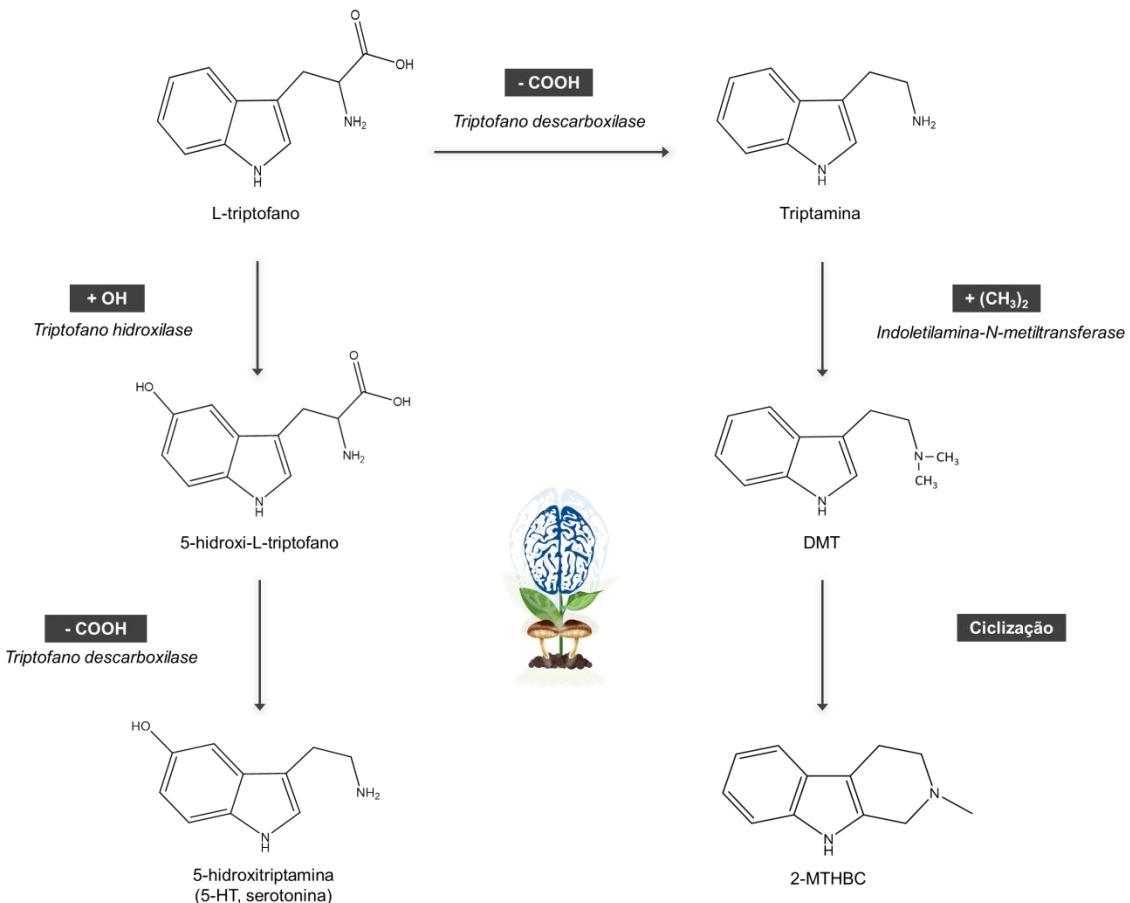
Ainda que a combinação supracitada seja considerada a mais frequente, outras plantas, de espécies ou mesmo famílias distintas, podem ser empregadas no preparo do chá da ayahuasca ou de bebidas com propriedades análogas. Outras espécies do gênero *Psicotria spp.*, a exemplo de *P. carthaginensis*, *P. psychotriæfolia* e *P. poeppigiana*, bem como espécies pertencentes aos gêneros *Phalaris*, *Delosperma*, *Acacia*, *Desmodium*, *Mimosa* e *Virola* representam importantes fontes de DMT (CARBONARO; GATCH, 2016; GAUJAC et al., 2012). Além da *B. caapi*, as β-carbolinas podem ser encontradas em *B. argentea*, *B. inebrians*, *B. muricata* e *Peganum harmala*. Esta última é uma espécie vegetal de

uso ritualístico ancestral da qual é possível extrair β-carbolinas a partir das sementes. Além de ter originado o termo alcaloides da harmala, comum para se referir a classe das β-carbolinas, *P. harmala* é frequentemente empregada em diversos países do mundo na produção de bebidas análogas a *ayahuasca* (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; GAUJAC et al., 2012).

Embora N-metiltriptamina (NMT) e 2-metil-1,2,3,4-tetra-hidro-β-carbolina (2-MTHBC) estejam presentes em *P. viridis*, a DMT representa, de fato, o alcaloide majoritário nesta espécie (ESTRELLA-PARRA; ALMANZA-PÉREZ; ALARCÓN-AGUILAR, 2019; MCKENNA, 2004). A DMT pertence a classe das indolaquilaminas que possui um núcleo indol como estrutura básica e ao qual se atribui suas propriedades alucinógenas. Assim como os demais derivados da triptamina, esta substância é biossinteticamente proveniente do triptofano, um amino ácido essencial amplamente distribuído na natureza. De forma concisa, como descrito na **Figura 3**, o triptofano sofre descarboxilação por meio da enzima triptofano descarboxilase que gera a triptamina. Enquanto a hidroxilação da triptamina na posição 5 do anel indólico catalisada pela triptofano hidroxilase culmina na formação de 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), a transmetilação induzida pela enzima indoletilamina-N-metiltransferase (INMT) resulta na adição de dois grupamentos metila no nitrogênio da cadeia lateral e então formação da DMT (ARAÚJO et al., 2015; CARBONARO; GATCH, 2016; MCKENNA; RIBA, 2016).

A DMT é então caracterizada como uma molécula pequena (188,27 g/mol) e hidrofóbica ($\log P = 2,6$), capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e estruturalmente similar ao neurotransmissor serotonina (CAMERON; OLSON, 2018). Além da larga distribuição entre plantas e fungos, esta molécula está endogenamente presente em animais, tais como coelhos, ratos e humanos. Na espécie humana, entretanto, é produzida em quantidades extremamente baixas e sua possível função no sistema nervoso central (SNC) não está bem esclarecida (CAMERON; OLSON, 2018; CARBONARO; GATCH, 2016; RODRIGUES; ALMEIDA; VIEIRA-COELHO, 2019).

Figura 3 - Vias de biossíntese da N,N-dimetiltriptamina (DMT), serotonina (5-HT) e 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina (2-MTHBC).



Fonte: A autora.

No que diz respeito a composição fitoquímica de *B. Caapi*, as substâncias harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) são as β-carbolinas presentes em maior magnitude, enquanto outras como harmol, harmalol e norharmano são relatadas a nível de traços (ESTRELLA-PARRA; ALMANZA-PÉREZ; ALARCÓN-AGUILAR, 2019). HRM, HRL e THH são alcaloides indólicos tricíclicos relacionados às triptaminas, tanto do ponto de vista biossintético quanto farmacológico (MCKENNA, 2004). Em sua estrutura tricíclica, como demonstrado na **Figura 2**, a cadeia lateral do núcleo triptamínico está incorporado na forma de um terceiro anel heterocíclico (HAMILL et al., 2018; MCKENNA; RIBA, 2016). Esta classe de substâncias é sintetizada a partir da condensação de indolaminas precursoras, como o triptofano, com aldeídos ou α-ceto-ácidos (MCKENNA, 2004;

SIMÃO et al., 2019). Assim como a DMT, as β-carbolinas são largamente distribuídas na natureza, na qual possuem amplo espectro de ação. No entanto, estão especialmente presentes em espécies de fungos e vegetais, por vezes nas mesmas espécies em que se encontram as triptaminas com propriedades alucinógenas (HAMILL et al., 2018; MCKENNA; RIBA, 2016; SIMÃO et al., 2019).

1.4. Aspectos Toxicológicos

1.4.1. Farmacocinética dos alcaloides da ayahuasca

Do ponto de vista toxicológico, DMT, harmina, harmalina e tetraidro-harmina são as principais substâncias ativas presentes no chá da *ayahuasca* (FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016). Como já descrito, a caracterização enteógena desta bebida é fruto da interação farmacológica entre esses compostos, presentes no cipó de *B. caapi* e nas folhas de *P. viridis*. Este sinergismo farmacocinético ocorre pelo fato de que a DMT é suscetível à rápida biotransformação por meio da enzima monoamino oxidase tipo A (MAO-A) presente no trato gastrointestinal, de modo que, isolada, a DMT não possui atividade por via oral. Por outro lado, os alcaloides β-carbolinas são inibidores seletivos e resersíveis daquela enzima, permitindo que a DMT seja absorvida, alcance a circulação sistêmica e, finalmente, exerça sua função no SNC (CALLAWAY et al., 1999; RIBA et al., 2012; TUPPER, 2008).

Após ingestão do chá da *ayahuasca*, o pico e duração de ação psicoativa coincidem com o aumento da concentração de DMT no plasma. Em geral, os efeitos iniciam entre 30 e 45 minutos após a ingestão e as alterações subjetivas atingem intensidade máxima entre 60 e 120 minutos, similarmente ao T_{MAX} da DMT, após o qual as condições retornam gradualmente ao basal num período entre 4 e 6 horas (CALLAWAY et al., 1999; RIBA et al., 2003). Contudo, um padrão não-linear no aumento da concentração de DMT ao longo do tempo foi observado em diferentes doses, uma vez que uma maior biodisponibilidade da DMT é descrita em doses mais altas, possivelmente por conta da maior quantidade de β-carbolinas presente na bebida e que causam maior intensidade de inibição da MAO-A (RIBA et al., 2003).

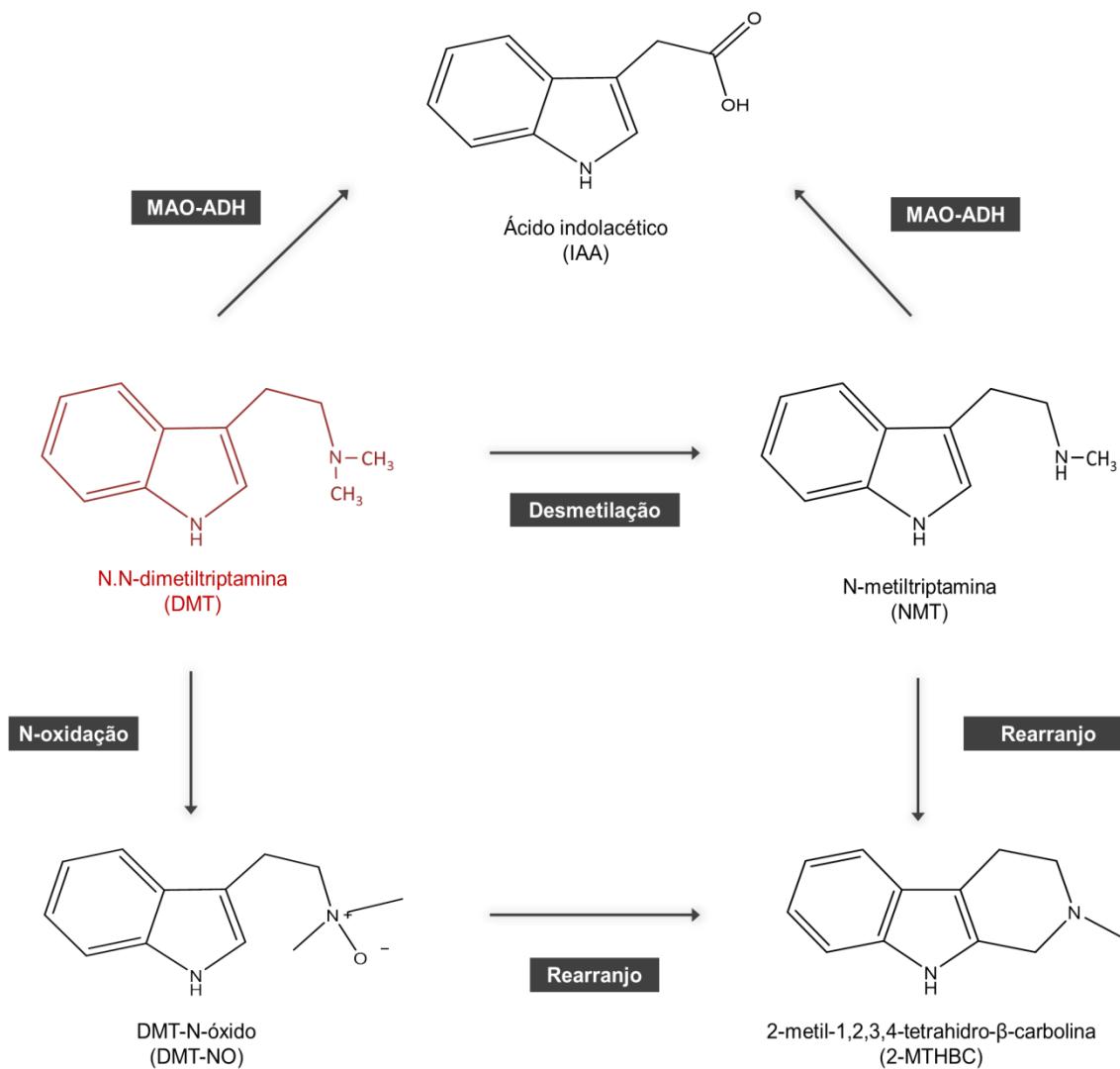
De forma distinta do que é descrito para a DMT, em geral os parâmetros cinéticos dos alcaloides da harmala não apresentam correlação clara com o curso dos efeitos após a ingestão da bebida, visto que harmalina e THH expressam valores de T_{MAX} mais longos que os observados para a DMT, quando os efeitos psicodélicos já não são importantes (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; RIBA et al., 2003). Além disso, a THH parece não ter um papel significativo na inibição da MAO, visto que possui baixa afinidade por esta enzima e que seus parâmetros farmacocinéticos, a exemplo do longo T_{MAX} e $T_{1/2}$ (cerca de 3 e 9 horas, respectivamente), sugerem certa independência da interação observada entre aquela enzima e a harmina (T_{MAX} e $T_{1/2}$ ambos aproximadamente iguais a 2 horas) (CALLAWAY et al., 1999).

No que diz respeito à biotransformação, apenas 1% da DMT é recuperada na forma inalterada na urina. Assim como representado na **Figura 4**, o produto da desaminação oxidativa da DMT, via descrita para MAO-A, é o ácido indolacético (IAA), que corresponde ao produto de biotransformação majoritário da DMT presente na urina. Embora a via da MAO-A seja, de fato, a mais significativa na biotransformação da DMT, uma vez que altas concentrações de IAA são encontradas já nas primeiras 4 horas após a ingestão da ayahuasca, a inibição da MAO pelos alcaloides da harmala, especialmente harmina e harmalina, parece ser incompleta ou de curta duração. Não obstante, a *N*-oxidação foi identificada como a segunda via mais importante, potencialmente predominante quando da inibição da MAO-A, resultando na formação de DMT-N-óxido (DMT-NO). Além disso, vias minoritárias, como a desmetilação e a ciclização representam alternativas que resultam na produção de NMT e 2-MTHBC, respectivamente (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; RIBA et al., 2012).

Embora possa haver considerável variação, a THH é a β -carbolina inalterada mais abundante presente na urina, seguida de harmalina e harmina. No entanto, estes alcaloides sofrem extensa biotransformação, de modo que a O-desmetilação mediada pelas CYPs 2D6, 1A2 e 2C9, representa a via de prioritária, de forma a gerar como principais produtos o tetraidro-harmol, harmol e harmalol. Estes dois últimos, além de serem os mais abundantes, são excretados na urina nas formas conjugadas a sulfato e glicuronídeo. A hidroxilação mediada pelas CYPs 1A2 e 1A1 é também relevante para harmina e harmalina. Ademais, as baixas concentrações de tetraidro-harmol recuperadas em urina, parecem indicar que a THH seja

biotransformada por outras vias além da supracitada (MCILHENNY et al., 2011; RIBA et al., 2012; ZHAO et al., 2012).

Figura 4 - Vias de biotransformação da N,N-dimetiltriptamina (DMT, em vermelho).



Fonte: a autora. MAO:monoamino-oxidase. ADH: aldeído-desidrogenase.

1.4.2. Mecanismos de ação dos alcaloides da ayahuasca

A despeito do mecanismo de ação dos alucinógenos ainda não estar completamente esclarecido, a atividade da DMT é majoritariamente atribuída a sua

ação na neurotransmissão serotoninérgica, devido não somente a sua similaridade estrutural com a serotonina mas também a alta afinidade por receptores 5-HT, especialmente aos subtipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/2C}. A ação agonista em 5-HT_{2A} está diretamente associada ao efeito de alteração da consciência, ao passo que a propriedade agonista da DMT em 5-HT_{1A} exerce, contrariamente, ação ansiolítica. Esta é fruto da atividade inibitória, especificamente nos receptores daquele subtipo presentes no núcleo da rafe e responsáveis pela redução do tônus serotoninérgico. Tal mecanismo, portanto, contribui na modulação dos efeitos gerais da DMT embora não possua ação primordial nos efeitos psicodélicos (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; RODRIGUES; ALMEIDA; VIEIRA-COELHO, 2019).

De maneira geral, a ação agonista em 5-HT_{2A} parece levar a consequente ativação de receptores glutamatérgicos, responsáveis pela modulação do efeito da DMT e por desencadear a cascata intracelular pertinente a ação alucinógena. Estudos publicados nos últimos anos sugerem que o aumento de glutamato na sinapse é capaz de potencializar os efeitos psicodélicos da DMT e de outros alucinógenos clássicos, de modo a estimular a atividade cortical e o processamento de informações. Além disso, este mecanismo promove a expressão de diversos fatores ligados a neuroplasticidade (neuritogênese, espinogênese e sinaptogênese em neurônios do córtex pré-frontal). Não obstante, a ação no subtipo 2A está associada a estimulação simpatomimética potencialmente relacionada a alguns dos efeitos fisiológicos periféricos da *ayahuasca*. Uma vez que os receptores 5-HT_{2C} são altamente suscetíveis ao fenômeno de tolerância, seu papel em promover efeitos alucinógenos é considerada menos significante (CARBONARO; GATCH, 2016; DOS SANTOS; HALLAK, 2020; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; HAMILL et al., 2018).

No entanto, uma vez que a serotonina e outras substâncias agonistas de 5-HT_{2A} não exercem efeitos alucinógenos ou visuais, a atividade mediada por receptores 5-HT se mostra, por si só, deficiente em explicar a função psicodélica da DMT. Desta forma, diversos receptores pelos quais a DMT apresenta afinidade têm sido investigados, sendo os mais relevantes o receptor associado a amina-traço (TAAR, do inglês *trace amine receptor*) e receptor sigma-1 (Sig-1) (BRIERLEY; DAVIDSON, 2012; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016). A função fisiológica do TAAR ainda não é completamente caracterizada, o que impede a compreensão

do seu papel na mediação dos efeitos da DMT. No entanto, evidências demonstram modulação da função imune e da neurotransmissão dopaminérgica com aparente inibição dos efeitos reforçadores e de recompensa associados às drogas de abuso (CARBONARO; GATCH, 2016; RODRIGUES; ALMEIDA; VIEIRA-COELHO, 2019). A DMT é um dos poucos agonistas endógenos conhecidos do receptor Sig-1, embora apresente afinidade relativamente baixa para este receptor, em ordem micromolar. Contudo, apesar das concentrações endógenas de DMT serem reduzidas demais para interagir com o receptor Sig-1, investigações recentes lançaram a hipótese de que a DMT exogenousmente administrada produz efeitos neuroprotetores, neuroregeneradores e imunomoduladores por meio da ação neste receptor (CAMERON; OLSON, 2018; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; RODRIGUES; ALMEIDA; VIEIRA-COELHO, 2019).

Embora a ação da DMT no SNC exerça um papel central, há evidências de que os alcaloides da harmala contribuem para a experiência psicodélica relacionada ao consumo da *ayahuasca* para além inibição periférica da MAO-A (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016). As β-carbolinas podem exercer função psicoativa em preparações vegetais na ausência de DMT, função esta que é atribuída a inibição reversível da MAO no SNC causada por harmina e harmalina, bem como inibição da recaptação da serotonina pela tetraidro-harmina. Além destes, harmina e harmalina agem em vias dopaminérgicas de modo a promover o efluxo de dopamina em células estriatais e inibir a MAO-A. Uma vez que harmina apresenta moderada afinidade por receptores 5-HT e nenhuma afinidade por receptores de dopamina, este efeito parece ser mediado pela ação em 5-HT_{2A}. Ainda, harmina inibe a captação de dopamina pelos transportadores de dopamina, responsáveis por modular a neurotransmissão dopaminérgica (BRIERLEY; DAVIDSON, 2012; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; HAMILL et al., 2018).

Outros mecanismos menos estudados incluem inibição da quinase-1A de especificidade dual regulada via fosforilação da tirosina (DYRK1A, *tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*) responsável por controlar a recaptação de dopamina, afinidade pelo receptor imidazolínico I₂ potencialmente relacionada aos efeitos psicodélicos atribuídos ao alcaloides da harmala e agonismo inverso em receptores GABA-A (BRIERLEY; DAVIDSON, 2012; HAMILL et al., 2018). Ademais, a proximidade dos receptores Sig-1 à enzima MAO no interior das células sugere a possibilidade de que o sinergismo farmacológico dos alcaloides da *ayahuasca*

acontece também em células da glia e nos neurônios, uma vez que sem a inibição da MAO no SNC a concentração de DMT que alcança os receptores Sig-1 poderia não antingir aquela necessária para ativação do receptor. Finalmente, a ação psicoativa das β-carbolinas corrobora com os relatos de que grupos ayahuasqueiros possam consumir a bebida preparada apenas com *B. caapi* (CALLAWAY, 2005; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; HAMILL et al., 2018).

1.4.3. Efeitos associados ao consumo de ayahuasca

De modo geral, os efeitos agudos associados a ingestão do chá da *ayahuasca* podem ser categorizados como subjetivos (ou psicológicos) e somáticos (ou fisiológicos). Enquanto a primeira classe descreve principalmente as sensações de alteração da percepção, o segundo tipo diz respeito especialmente às mudanças neuroendócrinas, cardiovasculares e autonômicas. Dentre os efeitos subjetivos mais marcantes, são relatadas alterações visuais complexas, vívidas, coloridas e dose-dependentes que, apesar de não persistirem durante todo o período de ação do chá, acontecem de forma flutuante. Embora descritas como vívidas, essas alterações distinguem-se das alucinações observadas com substâncias como o LSD, uma vez que o chá da *ayahuasca* geralmente não induz dissociação da realidade e o indivíduo permanece consciente de que aquele é um estado induzido pela bebida (CALLAWAY et al., 1999; DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; RIBA et al., 2001, 2003).

As visões são acompanhadas de complexas modificações na percepção geral, cognição e processos afetivos, e apesar de haver sentimento temporário de ansiedade e medo, também descreve-se euforia e bem estar (CALLAWAY et al., 1999; RIBA et al., 2001, 2003). Sujeitos que consumiram *ayahuasca* relatam mudança na percepção do tempo, bem como aguçamento da audição e maior responsividade a estímulos externos, os quais podem ser seguidos por sinestesia. Ainda, o aumento na velocidade do pensamento e o direcionamento das memórias às questões psicológicas do próprio indivíduo, ocasionam um estado de introspecção que pode ser acompanhado de reações emocionais diversas e da reinterpretação de conflitos pessoais, similarmente ao que se espera da psicoterapia (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; HAMILL et al., 2018; RIBA et al., 2001).

Dentre as alterações somáticas, usuários da bebida descrevem queimação no estômago, formigamento nos membros, mudança na temperatura corporal, sensibilidade na pele e náusea leve entre os primeiros efeitos após o consumo da bebida (RIBA et al., 2001). Após 40 minutos da ingestão do chá ocorre aumento significativo no diâmetro da pupila (midríase), frequência respiratória e temperatura corporal. Os efeitos cardiovasculares são moderados, com algum aumento na pressão sistólica, diastólica e na frequência cardíaca. Dentre as alterações neuroendócrinas são observados aumento nos níveis de cortisol, hormônio do crescimento e prolactina já nos primeiros 20 minutos após o consumo do chá, tal elevação é atribuída à estimulação de receptores serotoninérgicos. Os efeitos “purgativos” comumente descritos incluem náusea, vômito e diarreia, possivelmente ocasionados pelo aumento periférico dos níveis de serotonina consequente à inibição da MAO (CALLAWAY et al., 1999; HAMILL et al., 2018; RIBA et al., 2003).

No que diz respeito aos efeitos em longo prazo, grande parte dos estudos é centrada na avaliação do impacto na saúde mental decorrente do consumo frequente do chá da *ayahuasca* em contexto ritualístico. Neste aspecto, diversas investigações demonstraram que características como cognição, bem-estar psicossocial, personalidade e incidência de psicopatologias não foram prejudicadas com o uso repetido do chá durante longos períodos. De fato, relata-se que tais parâmetros progrediram de forma mais positiva nos indivíduos que consomem a bebida quando comparados aos indivíduos do grupo controle. No entanto, a avaliação deficiente do impacto do contexto ritualístico, bem como falhas no desenho experimental de alguns destes estudos, sugere que a interpretação destas informações deve ser conduzida de forma cautelosa (BARBOSA et al., 2012; BOUSO et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016; JIMÉNEZ-GARRIDO et al., 2020). Não obstante, um estudo publicado por Bouso e colaboradores (2015) identificou redução da espessura do córtex de usuários crônicos de *ayahuasca*. Neste caso, os autores sugerem que estas alterações estruturais no SNC podem estar relacionadas a modificações na personalidade direcionadas a espiritualidade e religiosidade destes indivíduos (BOUSO et al., 2015).

Estudos desenvolvidos em animais demonstraram que a *ayahuasca* administrada em altas doses durante o período gestacional produz toxicidade materna, fetal e no desenvolvimento (doses superiores àquelas utilizadas por indivíduos em contexto religioso). No entanto, evidências provenientes de

investigações envolvendo adolescentes e mulheres grávidas que consumiram o chá da *ayahuasca* cronicamente não descrevem a presença de desfechos relacionados à potencial toxicidade da bebida (DA MOTTA et al., 2018; GUIMARÃES DOS SANTOS, 2013; OLIVEIRA et al., 2010;).

De modo geral, substâncias alucinógenas apresentam baixo potencial de reforço e, consequentemente, considera-se que é improvável que o chá da *ayahuasca* possa causar dependência. Embora haja relatos de que esta bebida possa induzir episódios psicóticos e de mania em sujeitos com predisposição e histórico familiar, os dados de episódios de psicose em participantes da UDV são similares aqueles observados na média da população brasileira. Tais episódios são, portanto, considerados raros e, muita vezes, a associação direta dos sintomas psiquiátricos ao consumo do chá da *ayahuasca* não pode ser estabelecida de forma clara (ANDERSON et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; HAMILL et al., 2018; SZMULEWICZ; VALERIO; SMITH, 2015).

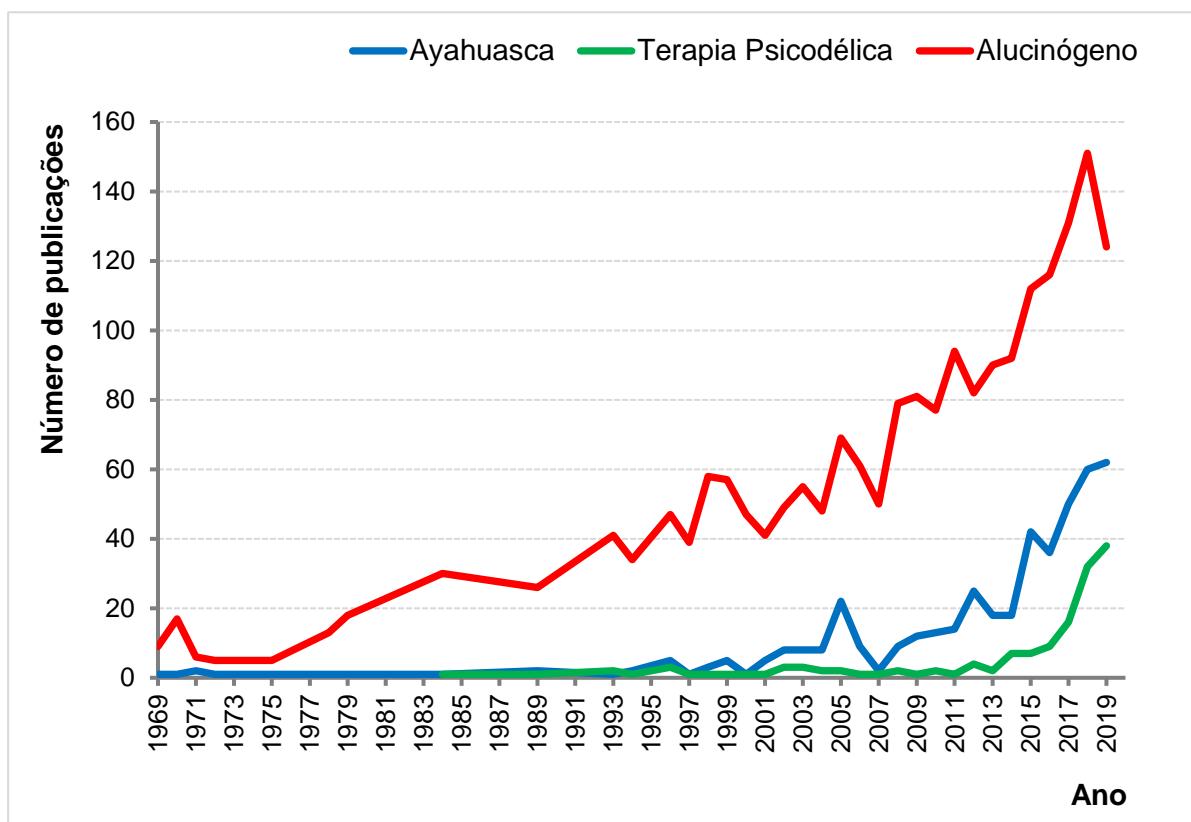
Além disso, usuários com experiência prolongada defendem ausência de efeitos adversos à saúde mesmo após décadas de uso. De fato, um estudo conduzido com o intuito de avaliar o impacto do consumo frequente e prolongado desta bebida em parâmetros hepáticos não identificou qualquer prejuízo na função do órgão. Finalmente, o uso ritualístico do chá da *ayahuasca* é atualmente considerado seguro, embora seja imprescindível a continuidade da avaliação dos impactos desta prática na saúde pública (ANDERSON et al., 2012; ESTRELLA-PARRA; ALMANZA-PÉREZ; ALARCÓN-AGUILAR, 2019; MELLO et al., 2019).

1.5. Potencial Terapêutico

Tendo em consideração que o consumo da *ayahuasca* no cenário religioso tem continuamente demonstrado sua segurança, visto que não há aumento da incidência de psicopatologias ou prejuízo no funcionamento neuropsicológico e que usuários crônicos apresentam, de fato, benefícios à qualidade de vida e saúde mental, o potencial terapêutico associado ao consumo desta bebida tem atraído grande atenção da comunidade científica mundial. Com efeito, a atual crise da psicofarmacologia relativa a dificuldade no desenvolvimento de novos medicamentos eficazes no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos parece ter desencadeado

um crescente interesse no emprego de substâncias de caráter alucinógeno e entactógeno no contexto, especialmente, da chamada terapia psicodélica (DOS SANTOS; HALLAK, 2020; JIMÉNEZ-GARRIDO et al., 2020; MUTTONI; ARDISSINO; JOHN, 2019;).

Gráfico 1 – Representação gráfica do aumento do número de publicações científicas relacionadas aos termos *ayahuasca*, terapia psicodélica (*psychedelic therapy*) e alucinógeno (*hallucinogen*) fornecidas pela plataforma *Web of Science* (<https://www.webofknowledge.com/>).



Fonte: A autora.

O **Gráfico 1** exibe os números de publicações anuais, no curso dos últimos 50 anos, resultantes da pesquisa dos tópicos *ayahuasca*, terapia psicodélica (*psychedelic therapy*) e alucinógeno (*hallucinogen*) fornecidas pela plataforma *Web of Science* (<https://www.webofknowledge.com/>). Após um longo período de hiato, devido a instituição da lista I da Convenção de 1971 sobre Substâncias Psicotrópicas das Nações Unidas, que inclui substâncias de caráter alucinógeno como DMT, LSD e psilocibina, nos últimos 10 anos a pesquisa pelo potencial

terapêutico destas substâncias retomou destaque. Dentre o crescente número de publicações científicas referentes a *ayahuasca*, estudos observacionais, clínicos e pré-clínicos têm investigado seu papel no tratamento de depressão maior refratária, ansiedade e dependência (CAMERON; OLSON, 2018; DOS SANTOS; HALLAK, 2020; REIFF et al., 2020).

Conforme previamente descrito, o chá da *ayahuasca* apresenta uma combinação única de espécies vegetais e compostos ativos, os quais podem ser responsáveis por um complexo e diverso espectro de mecanismos de ação terapêutica, atribuídos tanto à mistura quanto a cada composto em particular (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2016; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016). A ação ansiolítica e antidepressiva da *ayahuasca* é em geral atribuída ao agonismo serotoninérgico produzido pela DMT e inibição da MAO no SNC pelos alcaloides da harmala. Embora tais mecanismos ainda não sejam bem compreendidos, há crescente evidência do potencial destas substâncias em promover plasticidade neuronal (habilidade dos neurônios em alterar conexões sinápticas) e, por este motivo, são designadas psicoplastogênicas. Desta forma, a DMT e as β-carbolinas, especialmente a harmina, seriam capazes de desencadear alterações na expressão gênica, modificar a arquitetura e a comunicação entre neurônios localizados em regiões do SNC associadas ao controle da motivação, medo e recompensa (DOS SANTOS; HALLAK, 2019; DUNLAP et al., 2020; FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; JIMÉNEZ-GARRIDO et al., 2020).

De modo geral, os efeitos antidepressivos e ansiolíticos em humanos apresentam início rápido e podem durar algumas semanas. Observa-se melhora em sintomas como sentimento de tristeza, pensamento pessimista, ideação suicida, dificuldade de concentração, fadiga, dificuldades no sono, irritabilidade, compulsão, obsessão, desesperança e sintomas associados ao pânico (BARBOSA et al., 2009; DE OSÓRIO et al., 2015; JIMÉNEZ-GARRIDO et al., 2020; SANTOS et al., 2007). Além disso, há melhora geral na qualidade de vida e bem estar, na capacidade de lidar com problemas pessoais e na modulação do cortisol (envolvido na etiologia da depressão) (GALVÃO et al., 2018; JIMÉNEZ-GARRIDO et al., 2020). Com o intuito de eliminar o viés representado pelo cenário ritualístico, estudos em roedores e primatas demonstram alterações comportamentais e bioquímicas positivas associadas com redução dos sintomas de ansiedade e depressão (CAMERON et al., 2018; DA SILVA et al., 2019; RODRIGUES; ALMEIDA; VIEIRA-COELHO, 2019).

Além destes, estudos, sobretudo observacionais, indicam que usuários de *ayahuasca* pertencentes aos grupos UDV e Santo Daime apresentam menor prevalência de uso de drogas de abuso, tais como álcool, barbitúricos, cocaína, anfetaminas, opiáceos e solventes, embora não haja modificação significativa no consumo de maconha. Similarmente, há minimização dos problemas relacionados ao uso destas substâncias, visto que tais indivíduos reduzem o consumo após iniciarem a participação em grupos ayahuasqueiros. Adicionalmente, o consumo desta preparação vegetal contribui para a redução da fissura em indivíduos que sofrem de dependência (CATA-PRETA et al., 2018; CRUZ; NAPPO, 2018; HAMILL et al., 2018; LOIZAGA-VELDER; VERRES, 2014). Do ponto de vista subjetivo, indivíduos submetidos a terapia assistida com *ayahuasca* descrevem melhora geral na qualidade de vida, nas relações com familiares, no sofrimento emocional e o aumento na conexão consigo mesmo, fatores estes importantes na redução do uso problemático e da fissura à drogas de abuso (ARGENTO et al., 2019; BERLOWITZ et al., 2019).

Em animais, a administração de *ayahuasca* impede o desenvolvimento e expressão de comportamentos associados a dependência ao álcool. Há evidências de que as plantas que constituem a bebida reduzem a recompensa associada a administração de etanol tanto isoladamente quanto em combinação (CATA-PRETA et al., 2018; OLIVEIRA-LIMA et al., 2015). Outras investigações identificaram alterações comportamentais e bioquímicas atribuídas a desfechos positivos relacionados a dependência à cocaína e anfetaminas em animais tratados com harmina ou *ayahuasca* (BRIERLEY; DAVIDSON, 2013; GODINHO et al., 2017). Embora, mais uma vez, o exato mecanismo que promove tais efeitos não esteja completamente descrito, sugere-se que a *ayahuasca* tenha ação direta e indireta na neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica nos neurônios da via mesolímbica. Ademais, o potencial efeito psicoplastogênico modifica os circuitos neurais relacionados a dependência e estimula a produção de novas sinapses associadas a novos comportamentos, de modo que a *ayahuasca* facilitaria a reestruturação neurológica das vias de recompensa no SNC (FRECSKA; BOKOR; WINKELMAN, 2016; OLIVEIRA-LIMA et al., 2015).

Além dos transtornos mentais supracitados, estudos observacionais com *ayahuasca* demonstraram ação promissora no manejo e tratamento de outras disfunções, tais como distúrbios alimentares, propensão ao suicídio, luto e

personalidade *borderline* (DOMÍNGUEZ-CLAVÉ et al., 2019; GONZÁLEZ et al., 2020; LAFRANCE et al., 2017; ZEIFMAN et al., 2019). O consumo do chá da ayahuasca ou seus constituintes para fins terapêuticos em contexto ritualístico num ambiente adequado demonstra segurança. Todavia, o principal efeito adverso relatado nos estudos com humanos foi a ocorrência de vômito. Embora promissores, na maior parte dos estudos não é possível determinar relação de causa, bem como não é possível distinguir a importância do cenário religioso nos efeitos observados (DOS SANTOS; HALLAK, 2020).

1.6. Alternativas analíticas para a determinação dos alcaloides da ayahuasca

De modo geral, como descrito nas seções anteriores, diversos fatores têm contribuído para o contínuo interesse da comunidade científica em respeito à ayahuasca, entre eles estão o crescente número de publicações que demonstram seu potencial uso terapêutico, bem como o difundido uso em caráter religioso e a necessidade de adequada avaliação da segurança do consumo dessa bebida. Consequentemente, torna-se imprescindível o desenvolvimento de técnicas analíticas apropriadas e de alto rendimento para a determinação dos alcaloides constituintes do chá da ayahuasca nos contextos clínico, experimental e forense. De fato, número substancial de alternativas analíticas foram descritas com o intuito de determinar DMT, THH, HRL e HRM tanto nos diversos tipos de preparados vegetais, quanto em amostras biológicas e material apreendido (DE OLIVEIRA SILVEIRA et al., 2020; ELLER et al., 2020; SIMÃO et al., 2019).

O **Quadro 1** exibe o resumo das alternativas analíticas previamente relatadas para a análise de DMT e alcaloides da harmala em amostras de chá da ayahuasca. Neste cenário, os tipos de preparo de amostra mais comuns são a extração líquido-líquido (LLE) e a simples diluição em solvente ou fase móvel (CALLAWAY, 2005; CALLAWAY et al., 1996; DE MORAIS et al., 2018; GAMBELUNGHE et al., 2008; HUHN et al., 2005; LANARO et al., 2015; MCILHENNY et al., 2009a; MOURA et al., 2010).

Quadro 1 - Resumo de alternativas analíticas para a determinação dos alcaloides da ayahuasca em amostras de chá.

Referência	Preparo da Amostra	Modo de Detecção	Uso de Solvente
Callaway et al. (1996); Callaway (2005)	LLE Diluição	GC-NPD HPLC-Flu	Cloreto de n-butila 5 - 10 mL
Huhn et al. (2005)	Diluição	CE-MS	None
Gambelunghe et al. (2008)	LLE	GC-MS	Éter dietílico Metanol > 10 mL
Pires et al. (2009)	SPE	GC-NPD	Metanol Acetonitrila 1 - 5 mL
Mcilhenny et al. (2009)	Diluição	LC-MS/MS	Acetonitrila 1 - 5 mL
Moura et al. (2010)	LLE	qNMR	Hexano 5 mL
Gaujac et al. (2013)	SPME	GC-MS	None
Lanaro et al. (2015)	Diluição	HPLC-DAD	Metanol Acetonitrila 1 - 5 mL
Lesiak e Musah (2016)	Análise Direta	HRMS	Nenhum
Santos, Navickiene e Gaujac (2017)	SPE	HPLC-DAD	Metanol 5 - 10 mL
de Moraes et al. (2018)	LLE	LC-MS/MS	Éter metil terc-butílico 1 mL
Souza et al. (2019)	Diluição	LC-MS/MS	Metanol ^a

Fonte: a autora. ^a Volume não descrito. CE-MS: eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas. GC-NPD: cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo. GC-MS: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. HPLC-DAD: cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. HPLC-Flu: cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. HRMS: espectrometria de massas de alta

resolução. LC-MS/MS: cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas. LLE: extração liquid-líquido. qNMR: ressonância magnética nuclear quantitativa. SPE: extração em fase sólida.

A extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) e a análise direta também foram aplicadas com sucesso na determinação dos analitos de interesse por Gaujac et al. (2013), Lesiak e Musah (2016), Pires et al. (2009) e Santos, Navickiene e Gaujac (2017). Embora em pelo menos um dos métodos do **Quadro 1** fase móvel aquosa tenha sido utilizada no processo de diluição (HUHN et al., 2005), solventes orgânicos, tais como metanol e acetonitrila, foram as alternativas mais empregadas e em volumes relativamente altos. Além disso, a cromatografia em fase líquida (LC), a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia em fase gasosa (GC) foram amplamente empregadas para separação dos analitos, particularmente quando acopladas à espectrometria de massas (MS).

Já no contexto específico do consumo da bebida psicodélica, a análise de DMT, THH, HRL e HRM em urina humana foi desenvolvida por métodos de diluição e precipitação de proteínas, seguidos por detecção e quantificação por LC-MS/MS (cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas). Nestas alternativas, fase móvel aquosa foi utilizada nos métodos de diluição, enquanto acetonitrila e éter metil terc-butílico foram aplicados no processo de precipitação de proteínas, ambos em quantidades iguais ou superiores a 1,0 mL (BJORNSTAD; BECK; HELANDER, 2009; DE MORAIS et al., 2018; MCILHENNY et al., 2011; MEYER et al., 2014; POPE et al., 2019). Similarmente, o preparo de amostras de plasma humano foi alcançado por meio de precipitação de proteínas, mas também com o emprego dos métodos de LLE e SPE. Callaway et al. (1996) e Yritia et al. (2002) utilizaram cloreto de n-butila e n-pentano como solventes extratores nos procedimentos de LLE e SPE para a extração de DMT a partir da matriz plasma, ambos seguidos da determinação por GC-NPD (cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo). A precipitação das proteínas plasmáticas foi obtida com a aplicação de éter metil terc-butílico, acetato de etila, acetonitrila e metanol em volumes entre 0,5 e 2,0 mL (CALLAWAY et al., 1996; DE MORAIS et al., 2018; MCILHENNY et al., 2012; MEYER et al., 2014). Adicionalmente, Yritia et al. (2002) e Oliveira et al. (2012) desenvolveram métodos de SPE para os quais era necessário o uso de cerca de 2,0 mL de metanol por unidade extraída. Em grande parte dos

métodos mencionados, as técnicas de escolha para detecção dos analitos foram a LC-MS/MS ou a HPLC-Flu (cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de fluorescência).

Não obstante, dois métodos adicionais identificados na literatura científica descrevem a determinação dos alcaloides da *ayahuasca* em matrizes alternativas. No trabalho recentemente publicado por Tavares et al. (2020) amostras de suor foram submetidas a SPE e GC-MS (cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas) num método que empregou metanol e acetonitrila em volumes acima de 4,0 mL. Finalmente, DMT e outras substâncias alucinógenas foram extraídas de amostras de cabelo por meio de digestão da matriz seguida de diluição utilizando um tampão aquoso, procedimento este seguido pela determinação por LC-MS/MS (PICHINI et al., 2014).

1.7. Química Analítica Verde

Algumas das estratégias analíticas previamente citadas, tais como precipitação de proteínas e diluição, promoveram grande contribuição na simplificação dos métodos de preparo de amostra. No entanto, o uso substancial de solventes orgânicos empregados nestas alternativas gera importante preocupação na área de Química Analítica (TURNER, 2013). De fato, desde a publicação de Anastas e Warner na década de 90 com respeito ao conceito e aos princípios da Química Verde, a preocupação com o desenvolvimento de métodos sustentáveis ou ecologicamente viáveis (*eco-friendly*, em língua inglesa) alcançou os laboratórios de Química Analítica (ANASTAS, 1999; ANASTAS; WARNER, 1998; GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

Este conceito de Química Verde, primeiramente desenvolvido com foco em síntese química, foi em seguida descrito por Anastas (1999) como “o uso de metodologias e técnicas químicas que visam reduzir ou eliminar o uso ou geração de insumos, produtos, subprodutos, solventes, reagentes, etc. que representem risco para a saúde humana ou para o meio-ambiente”. Portanto, a incorporação deste modelo às atividades da Química Analítica gerou um outro conceito chamado de Química Analítica Verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*). Dessa forma, a GAC é centrada no uso de procedimentos analíticos sustentáveis, particularmente

aqueles que minimizam o emprego de todos os tipos de recursos, incluindo solventes orgânicos, reagentes potencialmente tóxicos e consumo de energia, de modo a resultar em melhora na segurança do analista e na redução de custos, resíduos e tempo geral de análise (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; PŁOTKA-WASYLKĘ; NAMIEŚNIK, 2019; SILVEIRA et al., 2019).

No entanto, um dos maiores desafios associados ao emprego da GAC diz respeito à harmonização simultânea entre a qualidade dos parâmetros relacionados ao desempenho dos métodos (como sensibilidade, seletividade, exatidão e reproduzibilidade) e o potencial sustentável dos mesmos (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; SILVEIRA et al., 2019; TURNER, 2013). Adicionalmente, de modo geral, o preparo de amostra é uma etapa indispensável do processo analítico e que representa importante impacto ambiental devido ao consumo de diversos recursos e consequente geração de resíduos. Visto que é improvável eliminar esta etapa, especialmente nos métodos empregados para a análise matrizes biológicas complexas (como com o uso de análise direta por espectrometria de massas, por exemplo), inúmeras estratégias baseadas em GAC têm sido desenvolvidas com o intuito de minimizar o impacto ao meio ambiente e produzir extratos compatíveis com as técnicas de separação e detecção (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017; KEITH; GRON; YOUNG, 2007).

Em geral, métodos tradicionais de extração de amostras, em particular a SPE e a LLE, têm sido efetivamente empregados para o preparo de diversos tipos de matrizes, os quais resultam em excelente reproduzibilidade, sensibilidade, recuperação e *clean-up*. Entretanto, do ponto de vista da GAC, a configuração usual destes métodos inclui processos laboriosos divididos em múltiplas etapas e que necessitam do uso de grandes volumes de amostras e solventes potencialmente tóxicos, na ordem de mililitros. Em face da ascenção de alternativas analíticas baseadas em GAC, diminuir o volume de amostra, reduzir, substituir ou eliminar o emprego de solventes orgânicos, bem como otimizar o consumo de energia estão entre as estratégias mais importantes aplicadas no presente (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; OCAÑA-GONZÁLEZ et al., 2016; SILVEIRA et al., 2019).

A maneira mais óbvia para a minimização do consumo de energia é desenvolver métodos tão simples quanto possível que possam ser conduzidos à

temperatura ambiente. Uma vez que esta é uma condição nem sempre apropriada, a extração assistida por microondas (MAE) e a extração assistida por ultrassom (UA) representam alternativas que podem diminuir substancialmente o tempo de extração. Enquanto a MAE promove o aquecimento da mistura composta por amostra e solvente de modo a acelerar a transferência de massa entre as fases, a UA é baseada no fenômeno de cavitação, o qual gera alta pressão e temperatura no interior de microbolhas presentes no meio de extração, o que leva ao aumento da área de superfície entre as fases (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; MADEJ, 2009; SANTOS; CAPELO, 2007).

Consecutivas melhorias minoritárias em métodos analíticos já bem estabelecidos também representam uma estratégia efetiva em direção à sustentabilidade. A exemplo, destaca-se a substituição de um solvente de alta toxicidade por outra alternativa que apresente menor risco. Neste contexto, a Iniciativa sobre Medicamentos Inovadores (IMI-CHEM21), um consórcio Europeu que promove a sustentabilidade de métodos biológicos e químicos, fez o compilamento de dados provenientes de uma série de guias de seleção de solventes orgânicos publicamente disponíveis e classificou os solventes mais comuns em quatro categorias, a saber: recomendado, problemático, perigoso e altamente perigoso (KEITH; GRON; YOUNG, 2007; PRAT et al., 2015). Os principais solventes incluídos nesta classificação estão sumarizados na **Figura 5**.

A partir desta perspectiva, a seleção criteriosa de solventes mais seguros para o meio ambiente e para o analista deve ser fundamentada na anulação do uso de solventes categorizados como perigosos e altamente perigosos, tais como hidrocarbonetos, solventes clorados e alguns éteres. Não obstante, alternativas com base no uso de água são sempre prepostas, seguidas do emprego de álcoois e acetona. A despeito de ser um dos solventes mais populares em bioanálise, a acetonitrila foi caracterizada como solvente problemático segundo a classificação supracitada. Portanto, a substituição e minimização do uso deste solvente representa um importante desafio nos laboratórios que se utilizam de métodos baseados em GAC (DE LA GUARDIA; ARMENTA, 2010; KALJURAND; KOEL, 2012; KOEL, 2016; TOBISZEWSKI, 2016).

Figura 5 - Classificação de alguns solventes clássicos segundo o guia de seleção de solventes CHEM21.



Fonte: a autora. DMSO: Dimetilsulfóxido. MTBE: Éter metil terc-butílico. Baseado nos dados publicados por Prat et al (2015).

Além disso, líquidos iônicos (IL) e solventes eutéticos profundos (DES) representam excelentes substitutos para os solventes orgânicos tradicionais e são, inclusive, considerados os solventes mais ecologicamente viáveis disponíveis atualmente. ILs são sais que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C e que são produzidos por uma mistura de ânions e cátions de pressão de vapor e flammabilidade excepcionalmente baixas, o que torna inferior seu impacto ambiental. Os DESs são similares aos ILs, no entanto estes são sintetizados por meio da combinação de doares prótons presentes na natureza (ácidos graxos, uréia, glicose e glicerol) com moléculas aceitoras (cloreto de colina) que resultam numa mistura eutética de baixíssima volatilidade e impacto ambiental ainda inferior aos ILs (DE LA GUARDIA; ARMENTA, 2010; DWAMENA, 2019; SILVEIRA et al., 2019).

Por fim, a extração acelerada por solvente (ASE) e a extração por fluido supercrítico (SFE) representam alternativas capazes de eliminar ou reduzir o uso de solventes orgânicos. Na primeira, altas pressões e temperaturas são aplicadas a

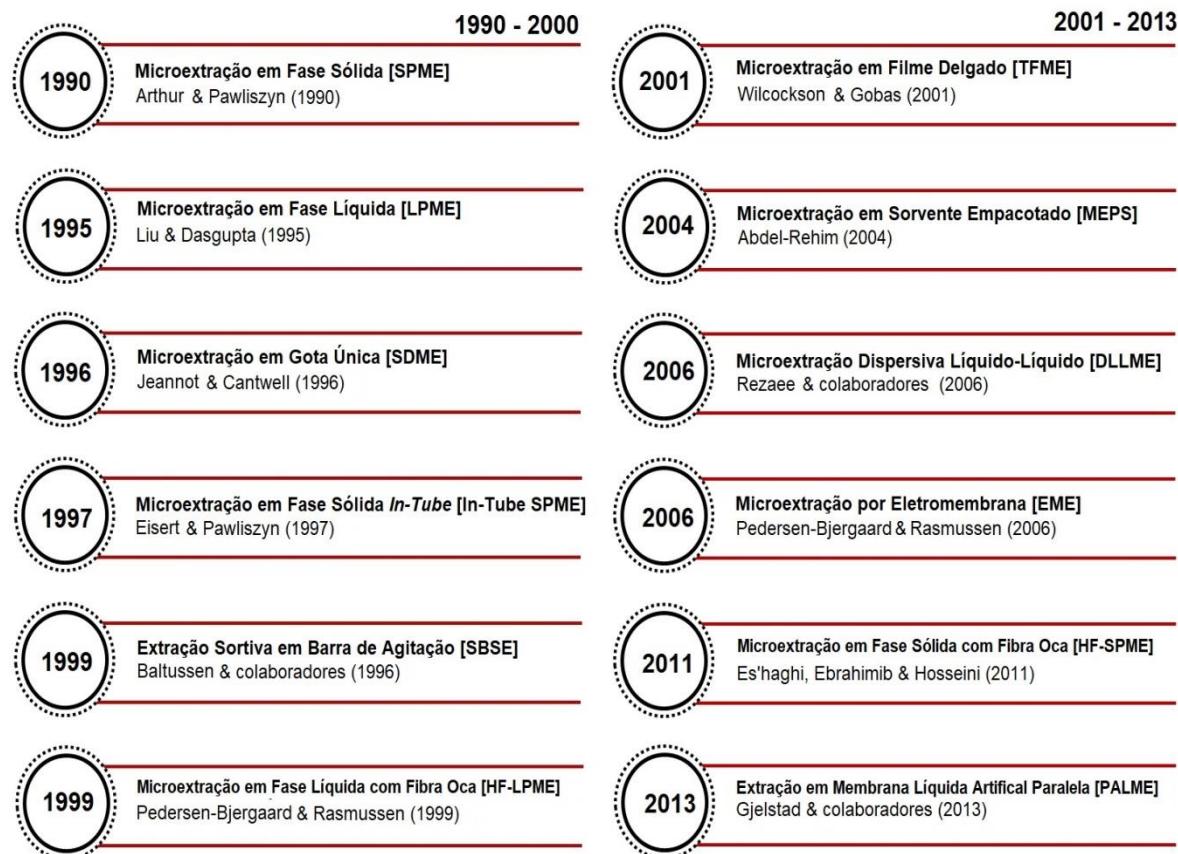
soluções aquosas de modo a permitir a extração de substâncias a partir de matrizes sólidas. Com respeito a SFE, dióxido de carbono e água supercrítica são utilizadas para extração da amostra. Entretanto, embora caracterizada como alternativa “verde”, métodos de SFE normalmente empregam pequenas quantidades de solventes clorados (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008; KEITH; GRON; YOUNG, 2007).

1.8. Técnicas de extração miniaturizadas

Além das estratégias mencionadas acima, a miniaturização das técnicas de extração representa uma das mais notáveis alternativas empregadas no intuito de reduzir, eliminar e mesmo substituir o uso dos solventes tradicionais. A transformação de um sistema de extração para a escala miniaturizada permite a restrição integral da quantidade de recursos utilizados, incluindo volumes de amostras e solventes, os quais podem ser reduzidos à magnitude de microlitros, ao passo que a velocidade de extração pode ser acelerada sem prejuízo nos parâmetros de desempenho do método (BURATO et al., 2020; OCAÑA-GONZÁLEZ et al., 2016; SPIETELUN et al., 2014).

De maneira geral, as alternativas miniaturizadas disponíveis no presente são derivadas das tradicionais SPE e LLE. O desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME) por Arthur e Pawliszyn (1990) foi o ponto fundamental da miniaturização dos métodos de preparo de amostras. De fato, a SPME não só contribuiu na anulação das desvantagens providas pela técnica precursora, como permitiu a completa eliminação do emprego de solventes orgânicos. Isto foi alcançado por meio da aplicação de uma fase estacionária revestida numa fibra de sílica em formato de agulha, a qual é capaz de extrair os analitos a partir de uma matriz aquosa contida no interior de um vial hermeticamente fechado (BURATO et al., 2020; HAMIDI; ALIPOUR-GHORBANI; HAMIDI, 2018; MARRUBINI et al., 2020). A **Figura 6**, a seguir, apresenta uma linha do tempo com as mais importantes técnicas de extração miniaturizadas derivadas da LLE e da SPE ao curso dos últimos 30 anos.

Figura 6 - Linha do tempo sobre as principais técnicas de extração miniaturizadas desenvolvidas em 1990 e 2013.



Fonte: a autora.

Após a introdução da SPME, diversas alternativas miniaturizadas foram elaboradas. No ano de 1995, Liu e Dasgupta (1995) desenvolveram o primeiro sistema de extração alternativo à LLE baseado no uso de microvolumes. Esta microextração líquido-líquido (LLME) ou microextração de fase líquida (LPME) foi inicialmente fundamentada no emprego de gotas suspensas num tubo capilar de sílica com o objetivo de extrair os analitos a partir de um fluxo de ar (LIU; DASGUPTA, 1995). De forma quase simultânea, uma alternativa similar identificada como microextração em gota única (SDME) foi criada por Jeannot e Cantwell (1996). Neste novo arranjo, uma pequena gota de solvente imiscível em água foi disposta na ponta de uma haste de teflon, a qual fica posteriormente submersa na solução que contém a matriz (JEANNOT; CANTWELL, 1996). Dentre as alternativas mencionadas na **Figura 6**, maior descrição será provida a respeito da microextração

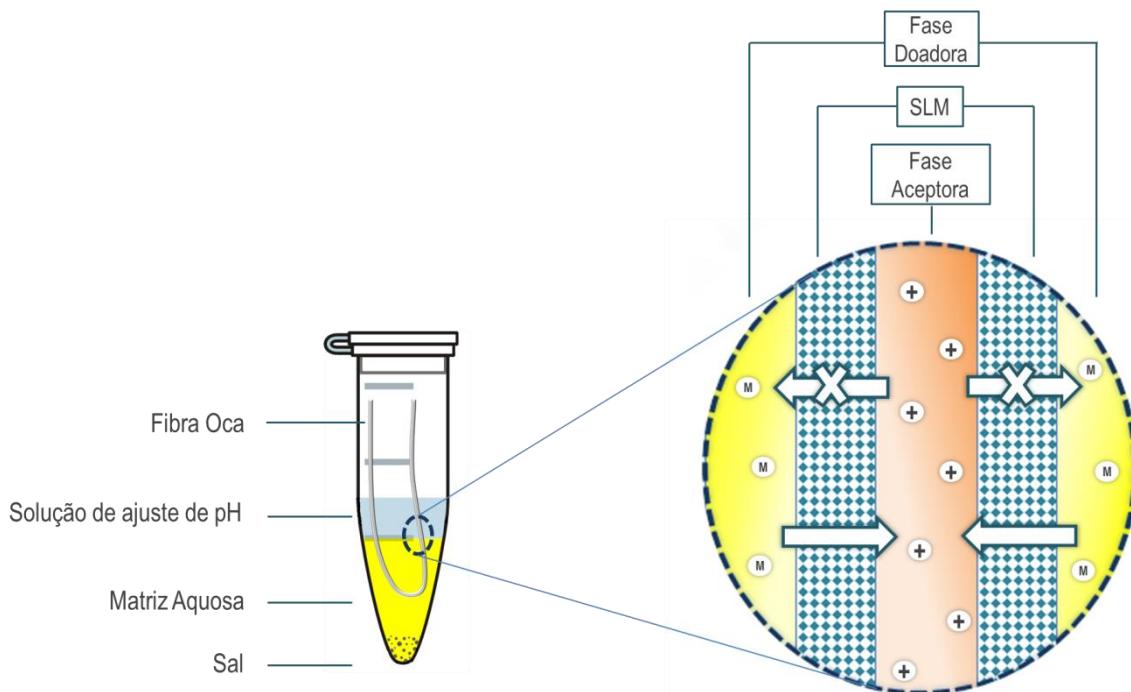
em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e da microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME).

1.8.1. Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca (HF-LPME)

A microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) é um arranjo alternativo da supracitada LLME desenvolvida por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999). De acordo com esta técnica, uma fibra de polipropileno porosa e oca (HF) é impregnada com volumes mínimos de um solvente imiscível em água, de modo a formar a chamada fase líquida suportada em membrana (SLM, do inglês *supported liquid membrane*), através da qual os analitos serão extraídos. A seguir, a SLM é preenchida com uma solução aceptora e inserida no interior da amostra aquosa, então denominada solução doadora. Este sistema é usualmente agitado para promover a transferência do analito a partir da fase doadora através da SLM até a fase aceptora, na qual as substâncias de interesse permanecerão concentradas por aprisionamento iônico (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Embora possa haver algum grau de variação entre diferentes dispositivos, a porosidade da fibra oca é de aproximadamente 70% com um diâmetro interno de 1,2 mm, poros de 0,2 µm e 200 µm de espessura da parede. A depender da constituição da solução aceptora, a HF-LPME pode ser apresentada como sistema de duas ou três fases. Na HF-LPME de duas fases, o lúmen da fibra é preenchido com o mesmo solvente que compõe a SLM, enquanto a HF-LPME de três fases é composta de uma fase aceptora aquosa ácida ou básica. O sistema de três fases, portanto, é limitado para a extração de substâncias ácidas ou básicas que possuam grupamentos ionizáveis em sua estrutura. Em detalhe, quando substâncias básicas são extraídas, o pH da amostra é ajustado para uma faixa alcalina e a fase aceptora é composta de uma solução de caráter ácido. Dessa forma, o analito estará na forma molecular na primeira fase de modo que assim será capaz de atravessar a SLM e concentrar-se na fase aceptora na forma ionizada, o que caracteriza o aprisionamento iônico (CARASEK; MERIB, 2015; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). A **Figura 7** representa um sistema HF-LPME em três fases.

Figura 7 - Representação esquemática do sistema de três fases da microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME).



Fonte: a autora. SLM: fase líquida suportada em membrana. M: analito não ionizado. +: analito ionizado.

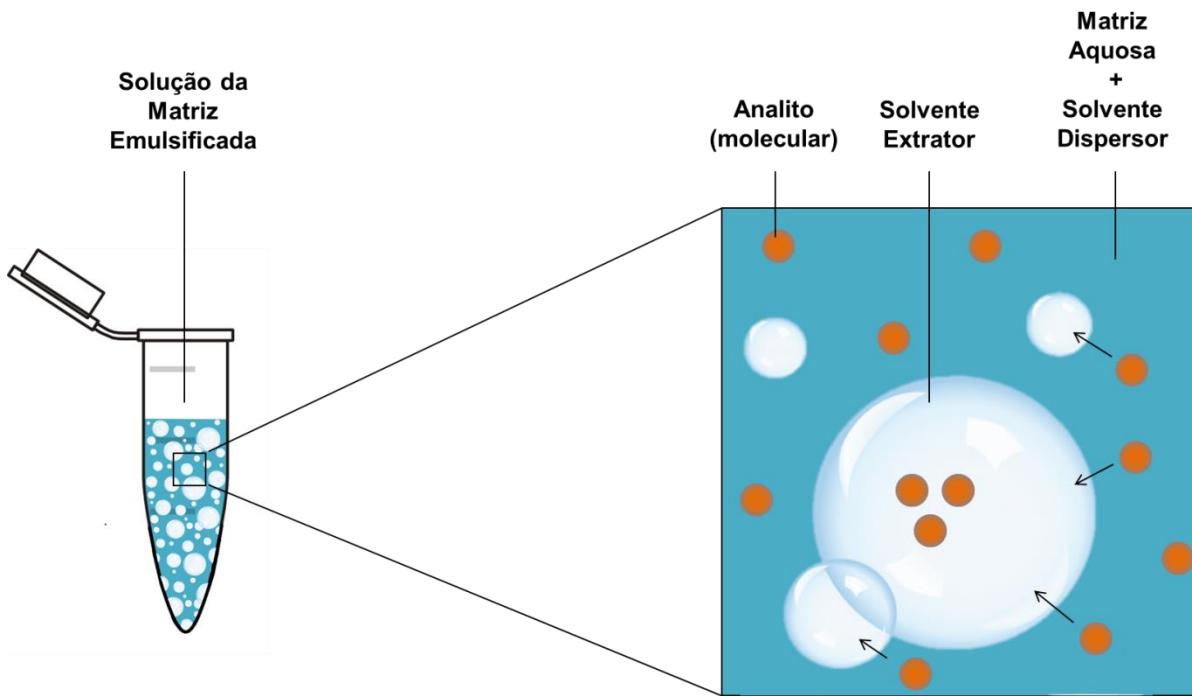
Além das características intrínsecas aos analitos, tais como coeficientes de partição e constantes de dissociação, a razão entre as fases doadora e acepтора, bem como o pH da amostra, solução de ajuste do pH, força iônica, tipo de solvente, tempo de extração, composição da solução acepтора e modo de agitação são alguns parâmetros importantes a serem otimizados quando do desenvolvimento de um método HF-LPME (CARASEK; MERIB, 2015). Assim como em outras formas miniaturizadas da extração líquido-líquido, esta alternativa permite drástica redução dos volumes de solventes utilizados, dos mililitros comumente aplicados em LLE para os poucos microlitros empregados na construção da SLM. Adicionalmente, esta técnica de extração permite um alto fator de enriquecimento, visto que as substâncias são transferidas para volumes de solução acepтора extremamente baixos (cerca de 25 µL para um segmento de fibra com 8 cm), além de excelente seletividade devido a filtração dos interferentes da matriz por meio da SLM, a qual permite apenas a passagem de substâncias não ionizadas de baixo peso molecular. Não obstante, o

uso de fibras descartáveis praticamente elimina o risco de *carryover* durante o processo de extração. Dessa forma, a técnica de HF-LPME tem sido continuamente aplicada com o objetivo de atender os requisitos propostos pela Química Verde ao passo que demonstra grande simplicidade, rapidez e baixo-custo (BURATO et al., 2020; KOKOSA, 2019).

1.8.2. Microextração Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME)

A microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) é uma das técnicas de microextração mais recentes, introduzida por Rezaee et al. (2006) para a determinação de compostos orgânicos em amostras de água. No arranjo tradicional, a DLLME existe como sistema de três fases, no qual alguns microlitros ($< 100 \mu\text{L}$) de um solvente orgânico extrator com densidade superior que a da água (clofórmio e diclorometano, por exemplo) é misturado a um solvente dispersor, como acetonitrila ou metanol, que é miscível tanto com o solvente extrator quanto com a solução da amostra. A combinação de solventes é então rapidamente injetada na matriz líquida, com auxílio de uma seringa, de modo a produzir uma solução emulsificada, a qual é formada por diversas gotículas de solvente dispersas através do líquido. A emulsificação provoca uma alta superfície de contato entre o solvente e amostra, de modo a aumentar a eficiência de extração e reduzir o tempo para o estado de equilíbrio, o que minimiza de forma significativa os tempos de extração. Por fim, o sistema passa por centrifugação e o solvente extrator pode ser coletado do fundo do tubo ou vial constituído de um solvente imiscível com a água (solvente extrator), um solvente miscível com a água (solvente dispersor) e a amostra líquida (REZAEI et al., 2006; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010). A **Figura 8** exibe de forma simplificada o modo de transferência do analito para a fase extratora na técnica de DLLME.

Figura 8 - Representação esquemática da transferência do analito na microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME).



Fonte: a autora.

Após a publicação inicial, a popularidade da técnica de DLLME progrediu continuamente de modo que diversas modificações foram consecutivamente introduzidas. Da perspectiva da GAC, mesmo volumes mínimos de solventes clorados devem ser eliminados. Portanto, álcoois de cadeia longa com densidade inferior a da água passaram a ser empregados como solvente extrator, num arranjo chamado DLLME com solvente de baixa densidade (LDS-DLLME, do inglês *low density solvent DLLME*). No entanto, a aplicação de tais solventes foi acompanhada da dificuldade em coletar a gota de solvente orgânico, agora posicionada como sobrenadante. Foi com o intuito de superar este problema que criou-se a DLLME com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO, do inglês *DLLME based on the solidification of the organic drop*), na qual o sistema trifásico é submetido a baixas temperaturas para provocar a solidificação do solvente orgânico, que poderá então ser coletado da superfície com auxílio de uma espátula (AN et al., 2017; SARAJI; BOROUJENI, 2014; SERESHTE; KHORRAM; NOURI, 2019).

ILs e DESs também têm sido empregados com sucesso na substituição de solventes clorados, resultando nas versões IL-DLLME e DES-DLLME. Não obstante, com o objetivo de tornar a DLLME ainda mais “verde”, o solvente dispersor foi

substituído por diferentes modo de dispersão, a saber: surfactantes (SA-DLLME, do inglês *surfactant assisted DLLME*), agitação por vórtex (VA-DLLME, do inglês *vortex assisted DLLME*), injeção de ar (AA-DLLME, do inglês *air assisted DLLME*) e ultrassom (UA-DLLME, do inglês *ultrasound assisted DLLME*) (AN et al., 2017; SARAJI; BOROUJENI, 2014; SERESHTI; KHORRAM; NOURI, 2019).

A despeito da modificação introduzida, esta técnica apresenta inúmeras vantagens. Além de oferecer uma alternativa simples, rápida, de baixo custo e ecologicamente viável à clássica LLE, esta técnica possibilita alto fator de enriquecimento e eficiência de extração devido à abundante superfície de contato entre as fases. No entanto, a aplicabilidade da DLLME é limitada quando em matrizes complexas por conta do restrito potencial de *clean-up*, o qual pode ser resolvido por meio do acoplamento a outras técnicas de extração, tais como SBSE<EME e SFE. Finalmente, a DLLME possui larga variedade de aplicações em Toxicologia Clínica e Forense, particularmente para análise de drogas de abuso, praguicidas, metais e substâncias relacionadas em matrizes biológicas diversas (JAIN; SINGH, 2016REZAE; YAMINI; FARAJI, 2010; SARAJI; BOROUJENI, 2014).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar uma série de métodos de preparo de amostras baseada em estratégias de Química de Química Analítica Verde (GAC) para a determinação dos principais alcaloides do chá da ayahuasca (N,N-dimetiltriptamina, tetraidro-harmina, harmina e harmalina) na própria bebida, urina e plasma com a aplicação de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Para tanto, o estudo foi conduzido segundo os seguintes objetivos específicos:

- a. Integrar os princípios da GAC em todos os estágios de desenvolvimento do método;
- b. Miniaturizar o preparo de amostras;
- c. Reduzir, eliminar ou substituir o uso de solventes orgânicos;
- d. Otimizar os métodos por meio de desenho experimental, quando apropriado;
- e. Validar os métodos em acordo com guias internacionalmente reconhecidos;
- f. Promover segurança do analista e baixo custo de análise;
- g. Colaborar com pesquisas brasileiras relacionadas à ayahuasca.

3. APRESENTAÇÃO DOS DADOS

3. APRESENTAÇÃO DOS DADOS

Os dados obtidos no presente estudo serão apresentados a seguir como uma combinação de resultados não publicados e coletânea de artigos. O **Capítulo 4** é composto dos métodos, resultados e discussão de um método de diluição, não publicado, utilizado na determinação dos alcaloides da ayahuasca em amostras de chá. Este método foi validado em acordo com o guia do *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) e aplicado em quarenta e seis amostras de chá de origens distintas, as quais foram doadas por pesquisadores de várias regiões do Brasil.

Em seguida, a coletânea de artigos será apresentada em ordem cronológica a partir do material com publicação, aceite ou submissão mais antigo para o mais recente. Todos os artigos foram transcritos de forma integral, segundo a versão finalizada em língua inglesa. Dessa forma, o **Capítulo 5** é referente ao artigo de revisão publicado no periódico *Bioanalysis*, intitulado “*Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices*”. O **Capítulo 6** apresenta um artigo de comunicação que reporta a aplicação do método de diluição, já citado, na investigação da estabilidade de amostras de chá da ayahuasca. Este artigo foi publicado na revista *Molecules*, sob o título: “*Stability evaluation of DMT and harmala alkaloids in ayahuasca tea samples*”.

No **Capítulo 7** será apresentado o artigo “*Fast hollow-fiber liquid-phase microextraction as a greener alternative for the determination of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human urine*”, aceito para publicação no periódico *Frontiers in Chemistry*. Por fim, o manuscrito mais recente, submetido na revista *Talanta*, intitulado “*Essential oil-based dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of DMT and β-carbolines in human plasma: a novel solvent-free alternative*” será descrito no **Capítulo 8**.

**4. MÉTODO DE DILUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ALCALOIDES DA
AYAHUASCA EM AMOSTRAS DE CHÁ**

4. MÉTODO DE DILUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ALCALOIDES DA AYAHUASCA EM AMOSTRAS DE CHÁ

4.1. Material e métodos

4.1.1. Padrões, solventes e reagentes

A solução padrão de N,N-dimetiltriptamina (DMT) foi adquirida da empresa Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA). Os padrões de referência de harmina (HRM) e harmalina (HRL) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). O padrão de N,N-dimetiltriptamina deuterada (DMT-*d*₆), empregado como padrão interno (PI), foi sintetizado como descrito por Oliveira et al. (2012). Já a tetraidro-harmina (THH) foi sintetizada a partir da harmalina (HRL) de acordo com o método descrito por Callaway et al. (1996). Formiato de amônio, ácido fórmico e methanol grau HPLC foram obtidos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Um sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, Massachusetts) foi utilizado na produção de água ultrapura.

A solução metanólica de DMT foi adquirida na concentração de 1,0 mg/mL. DMT-*d*₆, THH, HRL e HRM estavam disponíveis na forma de pó e, portanto, foram pesados e solubilizados em metanol de modo a resultar em soluções estoque de 1,0 mg/mL. Quando necessário, estas soluções foram sequencialmente diluídas, com fatores de 1:1000 ou superior, com o auxílio de vidraria volumétrica, para a obtenção de soluções de trabalho nas concentrações de 1,0, 0,1 ou 0,01 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas em temperatura de -20°C antes do uso.

4.1.2. Análise por LC-MS/MS

As análises foram conduzidas em um sistema UPLC Acquity integrado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo Quattro Premier com ionização por eletrospray (ESI) e operado no modo positivo (Waters Corporation, Milford, MA). A separação cromatográfica foi alcançada com o auxílio de uma coluna Acquity UPLC BEH C18 nas dimensões 2,1 mm x 100 mm, ID 1,7 µm. A solução de fase

móvel aquosa (A) foi constituída por tampão formiato de amônio 2 mM em ácido fórmico 0.1% e a solução de fase móvel B foi composta de metanol em ácido fórmico 0.1%. O seguinte gradiente de eluição foi empregado a fluxo constante de 300 µL/min: 10%B (0 a 0,5 min.); 10 - 50%B (0,5 a 7,0 min.); 50 - 10%B (7,0 a 7,1 min.) e 10%B até 8 minutos. As amostras foram introduzidas no sistema utilizando 5 µL de volume de injeção.

O espectrômetro de massas foi operado em modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), com determinação de três transições para cada analito. As principais configurações do espectrômetro de massas foram: fluxo do gás de dessolvatação de 1100 L/h; fluxo do gás do cone de 200 L/h; temperatura de dessolvatação 350 °C; temperatura da fonte 100 °C; voltagem do capilar 1000 V. As informações relativas à quantificação de cada um dos analitos está detalhada na **Tabela 1**. Os dados cromatográficos brutos foram extraídos do software MassLynx™ (Waters Corporation, Milford, MA) e plotados no programa Microsoft Excel® 2010.

Tabela 1 - Íons precursores, íons produto, tempos de retenção, voltagem do cone e energia de colisão dos analitos dimetiltriptamina deuterada (DMT-d₆), dimetiltriptamina (DMT), tetraidro-harmina (THH), harmalina (HRL) e harmina (HRM).

Analito	Tempo de retenção (minutos)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
DMT-d ₆	2,87	195,1	63,9 ¹	15	14
			114,9		36
			143,8		22
DMT	2,88	188,9	57,8 ¹	25	11
			116,7		29
			143,8		17
THH	4,37	217,1	172,8	25	29
			187,9 ¹		17
			200,0		13
HRL	5,27	215,2	130,4	50	41
			171,7 ¹		33
			199,9		25
HRM	5,56	213,2	143,8	50	41
			169,8 ¹		33
			198,0		25

Fonte: a autora. ¹ Transição utilizada para quantificação. m/z: razão massa/carga.

4.1.3. Material etnobotânico e preparo da amostra

As amostras de chá da *ayahuasca* foram providas por diferentes grupos associados a União do Vegetal, Santo Daime e Barquinha localizados em várias regiões do Brasil. Além dessas, uma amostra foi doada pela tribo Huni Kuin estabelecida no estado do Acre, na região norte do país. Todas as amostras foram preparadas entre os anos de 2013 a 2019 e as análises foram realizadas entre maio de 2017 e janeiro de 2020. Informações detalhadas sobre a origem das amostras estão descritas no **Apêndice I**. A totalidade do material etnobotânico quantificado ao curso deste trabalho fez parte de estudos colaborativos desenvolvidos com grupos de pesquisa em *ayahuasca*.

O preparo das amostras consistiu no processo de diluição em solução de fase móvel A constituída de tampão formiato de amônio 2 mM em ácido fórmico 0.1% para uma razão final 1:5000, em três estágios (1:10 x 1:10 x 1:50). Inicialmente, uma alíquota de 100 µL da amostra de chá foi adicionada em 900 µL da solução de diluição. Em seguida, 100 µL da amostra diluída na primeira etapa foi adicionada em 900 µL de solução A. No terceiro estágio da diluição, uma nova alíquota de 100 µL da solução anterior foi diluída em 4900 µL da solução A. Finalmente, 10 µL do padrão interno (DMT-d₆ 1 µg/mL) foram adicionados a 100 µL da solução de chá previamente diluída. Após este procedimento, injetou-se 5 µL no sistema LC-MS/MS. Feita a quantificação, o valor obtido a partir da regressão linear foi multiplicado por 5000 com o intuito de corrigir a diluição.

4.1.4. Validação do método

A validação do método foi realizada por meio da determinação dos limites de detecção (LoD), limites de quantificação (LoQ), linearidade, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio) e exatidão de acordo com o guia da UNODC (UNODC, 2009). Por conseguinte, o LoD foi definido como a menor concentração com razão sinal-ruído (S/N) ≥ 3 na qual foi possível identificar a presença de três transições e um coeficiente de variação (CV) ≤ 20% entre as replicatas. O LoQ foi determinado a

partir da menor concentração com uma razão sinal-ruído de pelo menos 10, com três transições distinguíveis e o valor do CV ≤ 15%.

O parâmetro de linearidade, por sua vez, foi avaliado entre LoQ até 400 ng/mL para todos os analitos, em seis diferentes níveis de concentração (1,5, 50, 100, 200, 300 e 400 ng/mL), cada concentração foi realizada em seis replicatas. A área relativa, calculada como a razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno, foi utilizada na análise de regressão linear. Adicionalmente, os dados da regressão linear foram testados para a presença de heteroscedasticidade, seguida da aplicação da regressão dos mínimos quadrados ponderados. Diferentes fatores de ponderação ($1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^2$) foram avaliados e aqueles que resultaram nas menores somas de erro relativo e coeficientes de determinação (r^2) ≥ 0,99 foram selecionados e aplicados durante a quantificação.

Os estudos de precisão e exatidão foram conduzidos por meio da análise da fase móvel aquosa fortificada com os analitos em três níveis de concentração (controles, C): baixo (5 ng/mL, CB), médio (160 ng/mL, CM) e alto (320 ng/mL, CA) ao curso de três dias consecutivos e seis replicatas em cada nível. Estes resultados foram expressos como desvio padrão relativo (%RSD), calculado por ANOVA de uma via. O critério de aceitação para precisão consistiu em RSD ≤ 20% para o CB e ≤ 15% para o CM e o CA. O parâmetro de exatidão foi determinado pela quantificação de seis replicatas de cada concentração de controle e expresso como a porcentagem da concentração esperada (concentração obtida/concentração adicionada x 100). O critério para aceitação da exatidão foi de 80 a 120% para o CB e 85 a 115% para o CM e o CA.

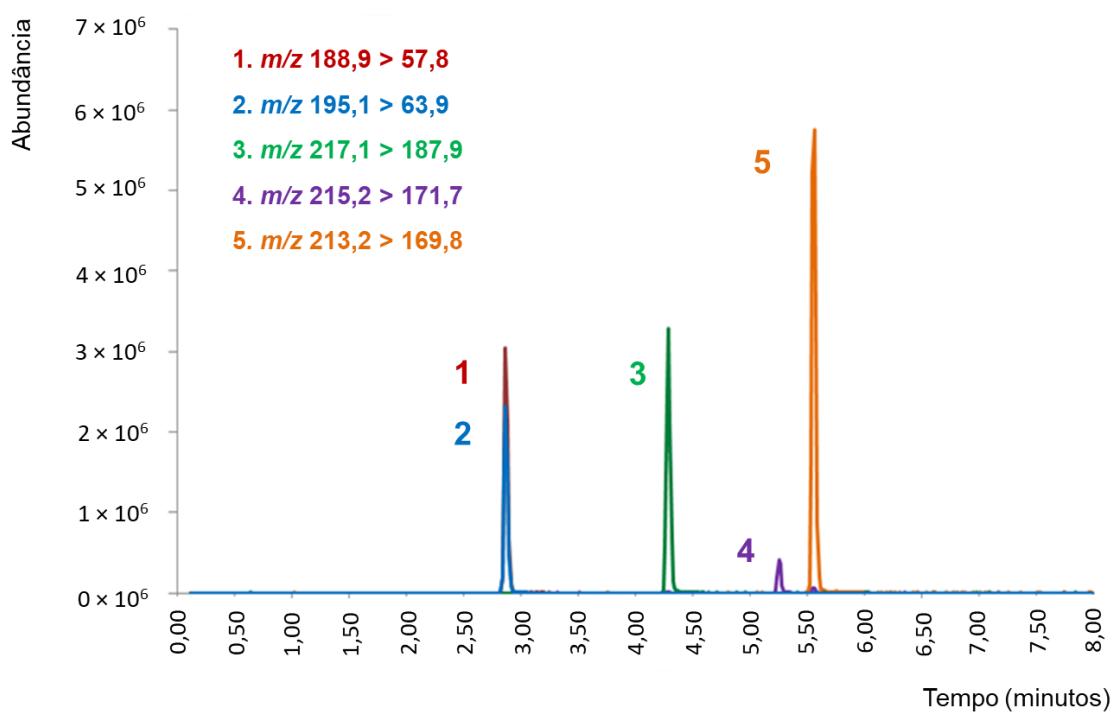
4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Análise por LC-MS/MS

A **Figura 9** exibe o cromatograma obtido da análise de uma amostra autêntica de ayahuasca contendo DMT, HRM, HRL, THH e DMT-d₆ após ter sido submetida ao método de preparo por diluição proposto no presente estudo. A análise por LC-

MS/MS demonstrou ser adequada para a identificação e quantificação de todos os analitos em uma corrida de apenas 8 minutos. A despeito da separação cromatográfica não ser imprescindível quando da utilização do MRM, a técnica apresentou excelente resolução dos picos, particularmente daqueles relativos às estruturalmente similares β -carbolinas. Após sucessivas modificações no gradiente de eluição e substituição da composição da solução de fase móvel B de acetonitrila para metanol, alcançou-se completa separação, especialmente entre HRM e HRL, para as quais a sobreposição foi julgada potencial fonte de supressão de sinal.

Figura 9 - Cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra autêntica de ayahuasca. A amostra contém 1. dimetiltriptamina (DMT, 223,0 ng/mL), 2. DMT-d₆ (padrão interno), 3. tetraidro-harmina (THH, 226,5 ng/mL), 4. harmalina (HRL, 45,1 ng/mL) e 5. harmina (HRM, 257,5 ng/mL) após diluição seguida por análise em LC-MS/MS. Os valores de *m/z* (razão massa/carga) foram utilizados na quantificação dos analitos.



Fonte: a autora.

Conforme previamente apresentado, o presente estudo tem foco no desenvolvimento de alternativas para o preparo de amostra que demonstrem ser ecologicamente viáveis. No entanto, é inegável que as técnicas de separação e detecção que seguem a etapa de preparo da matriz são de fundamental importância

na escolha no tipo de extração ou preparo, especialmente em termos de sensibilidade e seletividade. De maneira geral, a cromatografia em fase gasosa é considerada de menor impacto ambiental se comparada à cromatografia em fase líquida, uma vez que aquela não necessita do emprego de solventes orgânicos como fase móvel (GHOSH, 2012). Todavia, o impacto ambiental proporcionado pela LC pode ser minimizado pelo uso de algumas estratégias, tais como: preferência por fases móveis de composição aquosa, substituição da acetonitrila por etanol ou metanol e redução do comprimento da coluna e tamanho de partícula. Estes últimos podem ser aplicados em cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (utilizada para o desenvolvimento deste trabalho), a qual permite corridas cromatográficas mais rápidas, bem como reduzidos volumes de fase móvel e de injeção (GHOSH, 2012; KALJURAND; KOEL, 2012). Além disso, a contínua evolução na seletividade e sensibilidade da técnica de MS/MS resulta em níveis por vezes negligíveis de interferentes da matriz, de modo a permitir a simplificação do preparo de amostras (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003).

4.2.2. Validação do método

A simples diluição de amostras aquosas antes da análise por LC-MS/MS, usualmente referida em inglês como *dilute-and-shoot*, é um modo elementar de preparo de amostra que pode ser facilmente aplicado em amostras nas quais a interferência da matriz é reduzida numa proporção maior que o sinal do analito enquanto o fator de diluição é aumentado (CHIU et al., 2010). Portanto, a diluição é uma alternativa adequada para matrizes contendo o analito em abundância, como no caso das amostras de chá da *ayahuasca*. Segundo revisão de literatura, as concentrações dos alcaloides na bebida diferem largamente entre diferentes origens e grupos religiosos, de modo a alcançar valores na magnitude de 10 mg/mL para os alcaloides mais abundantes, normalmente HRM e THH. Em contrapartida, a HRL, β-carbolina menos abundante, é comumente encontrada na ordem de microgramas (CALLAWAY, 2005; LANARO et al., 2015; SOUZA et al., 2019).

Conforme descrito na **Tabela 2**, os valores de LoD e LoQ foram 1,0 e 1,5 ng/mL, respectivamente, para todos os analitos. Estes valores foram julgados adequados à sua finalidade e permitem sensibilidade satisfatória. Embora algumas

publicações anteriores utilizando LC-MS/MS tenham alcançado LoDs abaixo de 1,0 ng/mL, os valores obtidos no presente método são inferiores àqueles publicados por Mcilhenny et al. (2009) (100 - 220 ng/mL) e apenas ligeiramente superiores aos determinados por de Morais et al. (2018) (1,0 ng/mL). Possivelmente devido à grande distinção entre as concentrações dos alcaloides encontradas nas amostras de *ayahuasca*, a faixa de linearidade avaliada em estudos prévios apresenta ampla divergência. No presente trabalho, o método foi linear na faixa que compreendeu o LoQ até 400 ng/mL, a qual foi adequada para a quantificação de amostras autênticas após a aplicação de um fator de diluição de 1:5000. A diluição nesta magnitude provou ser necessária para a prevenção da sobrecarga da coluna e saturação da fonte de íons. A **Tabela 2** exibe as equações e coeficientes de determinação obtidos na regressão linear, bem como os fatores de ponderação aplicados para cada analito.

Tabela 2 - Limites de detecção (LoD, ng/mL), limites de quantificação (LoQ, ng/mL), equações de regressão linear, fatores de ponderação (FP) e coeficientes de determinação (r^2) para dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) após o procedimento de diluição.

Analito	LoD	LoQ	Regressão linear	FP	r^2
DMT			$y=0,0444x - 0,0639$	$1/y^{1/2}$	0,9958
THH			$y=0,0180x + 0,0085$	$1/y^{1/2}$	0,9944
HRL	1,0	1,5	$y=0,0405x + 0,0038$	$1/x^2$	0,9911
HRM			$y=0,1213x + 0,1280$	$1/x^2$	0,9936

Fonte: a autora.

A **Tabela 3** descreve os valores de RSD% obtidos após a análise de variância aplicada nos ensaios de precisão. Estes resultados estão em conformidade com os critérios de aceitação já estabelecidos, com variação de 5,4% (HRM, CA, intra-ensaio) a 15,4% (HRM e HRL, CA, inter-ensaio). Adicionalmente, o método revelou desempenho satisfatório no ensaio de exatidão, abrangendo uma variação de 86,9% (HRM, CM) a 114,4% (HRM, CB). Vale salientar que após a aplicação de um fator de diluição de 5000 vezes, a matriz analisada é predominantemente composta por fase móvel aquosa. Além disso, visto que não é possível obter o chá da *ayahuasca* livre de DMT ou alcaloides da harmala, não há matriz “branca” desta bebida. À vista

disso, a validação do método foi desenvolvida por meio da adição dos analitos de interesse em alíquotas da solução tampão formiato de amônio 2 mM em ácido fórmico 0.1% (fase móvel). Ademais, não foi possível avaliar o efeito matriz do método apresentado; no entanto, o estudo realizado por Mcilhenny et al. (2009a) revelou ausência de efeito matriz após a aplicação de um fator de diluição na ordem de 200 vezes. Por conseguinte, a presença de interferência quando da aplicação de um fator de diluição de 5000 vezes foi julgada negligível.

Tabela 3 - Precisão inter-ensaio, precisão intra-ensaio e exatidão para dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) após o procedimento de diluição.

Analito	Controle (ng/mL)	Precisão (%RSD, n = 6, dias = 3)		Exatidão (%, n = 6)
		Inter-ensaio	Intra-ensaio	
DMT	5	10,6	10,7	97,1
	160	9,8	7,4	89,3
	320	13,5	7,5	92,5
THH	5	8,6	12,6	99,9
	160	9,5	6,8	90,6
	320	11,4	8,5	98,7
HRL	5	15,4	12,9	103,0
	160	6,4	6,1	96,3
	320	13,8	8,1	110,3
HRM	5	15,4	7,4	114,4
	160	11,1	6,3	86,9
	320	11,7	5,4	93,7

Fonte: a autora. %RSD: desvio padrão relativo.

4.2.3. Quantificação dos alcaloides da ayahuasca em amostras de chá

Quarenta e seis amostras de ayahuasca foram analisadas pelo método de diluição proposto neste estudo. As concentrações de DMT variaram de 0,06 a 3,1 mg/mL, ao passo que THH e HRM demonstraram maior abundância, apresentando variação entre 0,5 a 2,9 mg/mL e 0,3 a 3,25 mg/mL, respectivamente. Em contrapartida, a HRL foi o analito menos abundante, com concentrações que partiram de 0,03 a 0,35 mg/mL. Conforme discutido em publicações anteriores, as baixas concentrações e mesmo a ausência de HRL é possível tanto nas plantas *B.*

caapi quanto na bebida final (CALLAWAY, 2005; CALLAWAY; BRITO; NEVES, 2005). O **Gráfico 2** apresenta uma visão geral da distribuição das concentrações dos alcaloides entre todas as amostras avaliadas.

A grande variabilidade entre os perfis dos alcaloides presente no preparado etonobotânico pode ter origem em diversos fatores (CALLAWAY, 2005; LANARO et al., 2015; SOUZA et al., 2019). Callaway e colaboradores (2005) descreveram uma ampla oscilação das concentrações de DMT em *P. viridis* associada às variações circadianas. Em consequência, a concentração de DMT é mais pronunciada durante os períodos mais quentes do dia (entre 6:00 da manhã e 6:00 da noite), de modo que o horário em que a planta é coletada pode afetar a quantidade de DMT na decocção. Não obstante, estudos indicam que as decocções de ayahuasca apresentam quantidades de alcaloides superiores àquelas encontradas nas plantas de origem devido ao repetido processo de concentração da bebida. Além disso, condições usuais responsáveis por causar variações fitoquímicas nas plantas de origem incluem clima, estação do ano, condições do solo e localização geográfica (CALLAWAY; BRITO; NEVES, 2005; LANARO et al., 2015; MCKENNA, 2004).

Contudo, diferentes proporções de *B. caapi* e *P. viridis*, bem como diferentes combinações de plantas podem ser utilizadas por grupos religiosos distintos ou mesmo por diferentes ramificações do mesmo grupo religioso (GAUJAC et al., 2012; PIRES et al., 2009). A **Tabela 4** descreve as faixas de concentrações encontradas para cada uma das substâncias associadas aos principais grupos ayahuasqueiros. As amostras provenientes da Barquinha ($n = 4$) apresentaram as quantidades mais abundantes das substâncias de interesse. De forma geral, as decocções obtidas da UDV foram mais ricas em β-carbolinas do que em DMT, ao passo que as amostras do Santo Daime apresentaram o perfil oposto. Adicionalmente, questões relacionadas à estabilidade da decocção submetida a diversas condições de armazenamento pode ter implicação na variabilidade observada entre as amostras, como será discutido no artigo apresentado no **Capítulo 6** (DE OLIVEIRA SILVEIRA et al., 2020).

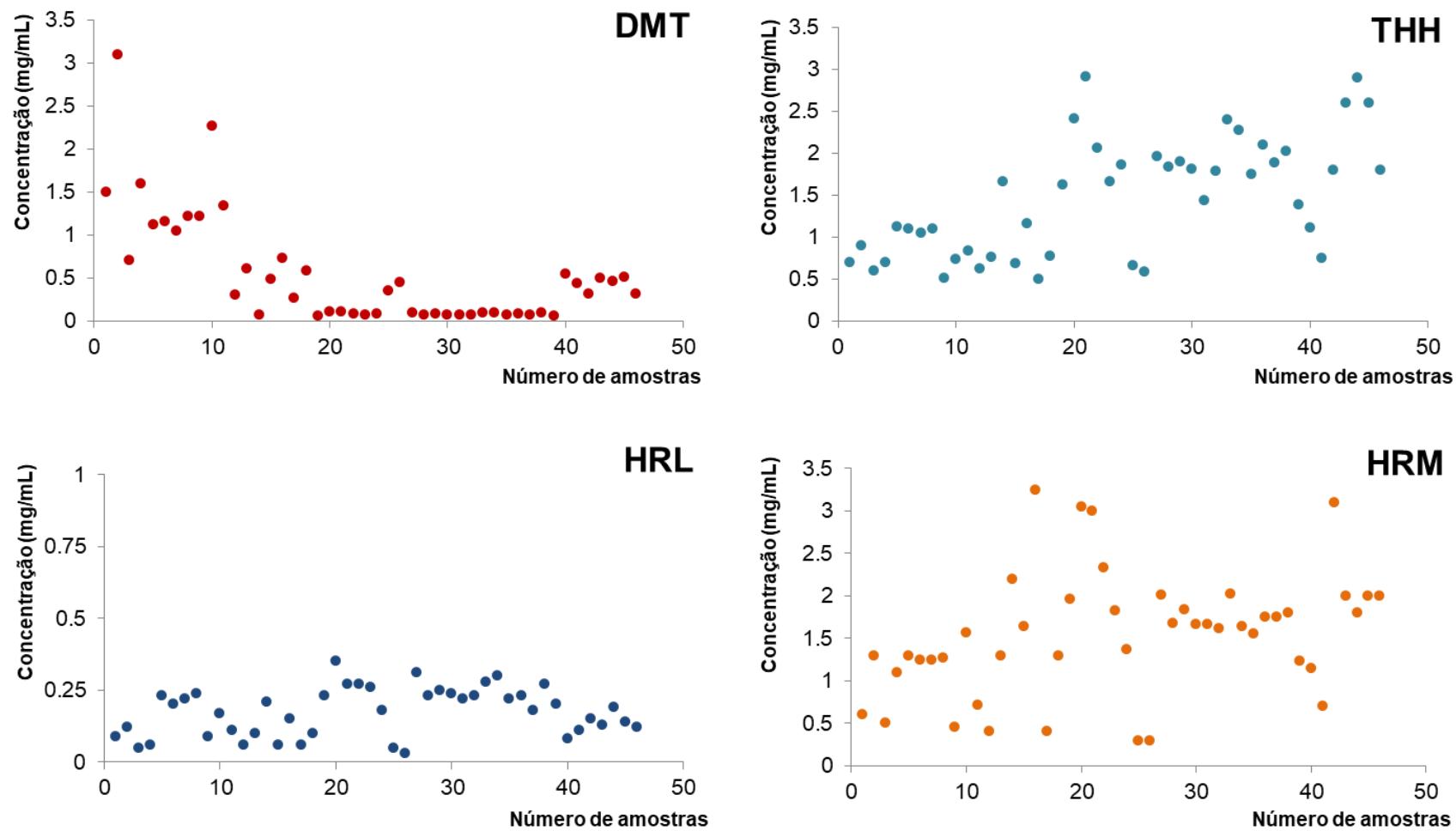
Por conta da alta variação encontrada, algumas amostras foram submetidas a nova diluição, alcançando fatores de 1:7500 ou 1:10000, com o intuito de respeitar a faixa linear. Em todos os casos, o método demonstrou desempenho satisfatório para determinação de DMT e alcaloides da harmala em chá de ayahuasca. Informações adicionais sobre as amostras estão descritas no **Apêndice I**.

Tabela 4 - Faixa de concentração (mg/mL) e concentração média ± desvio padrão (mg/mL) de dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) após o procedimento de diluição em amostras autênticas provenientes de diferentes grupos ayahuasqueiros.

Grupo religioso (<i>n</i>)	DMT	THH	HRL	HRM
Santo Daime (10)	0,27 - 3,10	0,50 - 0,90	0,03 - 0,17	0,29 - 1,57
	1,06 ± 0,96	0,68 ± 0,12	0,09 ± 0,04	0,79 ± 0,51
UDV (27)	0,06 - 0,55	0,75 - 2,92	0,08 - 0,35	0,70 - 3,10
	0,17 ± 0,17	1,94 ± 0,50	0,22 ± 0,07	1,88 ± 0,54
Barquinha (4)	1,04 - 1,22	1,05 - 1,13	0,20 - 0,24	1,24 - 1,29
	1,13 ± 0,07	1,10 ± 0,03	0,22 ± 0,02	1,26 ± 0,02
Outros ou não identificado (n=5)	0,48 - 1,60	0,60 - 1,17	0,05 - 0,15	0,50 - 3,25
	0,97 ± 0,48	0,80 ± 0,22	0,09 ± 0,04	1,44 ± 1,10

Fonte: a autora. UDV: União do Vegetal. *n*: número de amostras.

Gráfico 2 - Gráficos de dispersão exibindo a distribuição geral da concentrações dimetiltriptamina (DMT), harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetraidro-harmina (THH) em diferentes amostras de chá da ayahuasca.



Fonte: a autora.

5. ARTIGO I

5. ARTIGO I**Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices**

Gabriela de Oliveira Silveira, Ana Miguel Fonseca Pego, Jefferson Pereira e Silva
& Mauricio Yonamine

DOI: 10.4155/bio-2018-0208

Bioanalysis

ISSN 1757-6180

Review

Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices

Gabriela de Oliveira Silveira^{*,1}, Ana Miguel Fonseca Pego², Jefferson Pereira e Silva¹ & Mauricio Yonamine¹

¹ Department of Clinical & Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, 13B, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

² Research Group Analysis Techniques in the Life Sciences, Avans University of Applied Sciences, Breda, The Netherlands

*Author for correspondence: Tel.: +55 11 3091 2194; Fax: +55 11 3091 2194; silveirago@usp.br

The sample preparation is the most critical step involved in the bioanalytical process. When dealing with green analytical chemistry, sample preparation can be even more challenging. To fit the green analytical chemistry principles, efforts should be made toward the elimination or reduction of the use of toxic reagents and solvents, minimization of energy consumption and increased operator safety. The simplest sample preparations are more appropriate for liquid biological matrices with little interfering compounds such as urine, plasma and oral fluid. The same does not usually occur with complex matrices that require more laborious procedures. The present review discusses green analytical approaches for the analyses of drugs of abuse in complex biological matrices, such as whole blood, breast milk, meconium and hair.

First draft submitted: 31 July 2018; Accepted for publication: 5 December 2018;
Published online: 21 January 2019

Keywords: drugs of abuse • sample preparation • green analytical chemistry

6. ARTIGO II

6. ARTIGO II**Stability Evaluation of DMT and Harmala Alkaloids in Ayahuasca Tea Samples**

Gabriela de Oliveira Silveira, Rafael Guimarães dos Santos, Felipe Rebello Lourenço, Giordano Novak Rossi, Jaime E. C. Hallak and Mauricio Yonamine

DOI:10.3390/molecules25092072

Molecules

ISSN 1420-3049

Communication

Stability Evaluation of DMT and Harmala Alkaloids in Ayahuasca Tea Samples

Gabriela de Oliveira Silveira^{1,*}, Rafael Guimarães dos Santos^{2,3}, Felipe Rebello Lourenço⁴, Giordano Novak Rossi², Jaime E. C. Hallak^{2,3} and Mauricio Yonamine¹

¹Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 05508-000, SP, Brazil; yonamine@usp.br

²Department of Neurosciences and Behaviour, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil; banisteria@gmail.com (R.G.d.S.); gionorossi@gmail.com (G.N.R.); jechallak@gmail.com (J.E.C.H.)

³National Institute of Science and Technology—Translational Medicine, 14049-900, Brazil

⁴Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 05508-000, SP, Brazil; feliperl@usp.br

*Correspondence: silveirago@usp.br

Academic Editors: Monika Waksmundzka-Hajnos; Miroslaw Hawryl

Received: 04 April 2020; Accepted: 24 April 2020; Published: date

Abstract: Ayahuasca tea is a hallucinogenic beverage used for religious purposes in Brazil and many other countries that has therapeutic potential in the treatment of some mental health disorders. In the context of psychedelic research, quantification of the tea's main alkaloids prior to its administration in animal or human studies is essential. For this reason, this study aims to provide information regarding the stability of the main ayahuasca alkaloids (dimethyltryptamine, DMT; harmine, HRM; tetrahydroharmine, THH; harmaline, HRL) in three different conditions: (1) A year stored in a refrigerator either in plastic or glass containers, (2) seven days at 37 °C to reproduce usual mail transportation, and (3) after three freeze–thaw cycles. Samples were quantified after a dilute-and-shoot procedure using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS). There was no significant degradation of DMT concentration over time in all tested conditions. Harmala alkaloids (THH, HRL, and HRM) showed important variations after long-term and high-temperature storages. Although DMT has proven to be stable in all studied conditions, the harmala alkaloids revealed intense degradation and even concentration increment.

This may be caused by degradation, alkaloid inter-conversion, and leaching from tea precipitate material. Therefore, ayahuasca quantification before administration in controlled sets is mandatory.

Keywords: ayahuasca; stability; harmala alkaloids; DMT; LC–MS/MS

7. ARTIGO III

7. ARTIGO III**Fast hollow-fiber liquid-phase microextraction as a greener alternative for the determination of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human urine**

Gabriela de Oliveira Silveira, Felipe Rebello Lourenço, Vitor Bruno,
Mauricio Yonamine

DOI: 10.3389/fchem.2020.558501 (In Press)

Frontiers in Chemistry

ISSN: 2296-2646

Research Article**Fast hollow-fiber liquid-phase microextraction as a greener alternative for the determination of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human urine**

Gabriela de Oliveira Silveira^{1*}, Felipe Rebello Lourenço², Vitor Bruno¹, Mauricio Yonamine¹

¹Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil.

*Correspondence: Corresponding Author silveirago@usp.br

Keywords: liquid-phase microextraction, green analytical chemistry, ayahuasca, DMT, harmala alkaloids, LC-MS/MS.

Abstract

The ayahuasca tea is an entheogen hallucinogenic beverage used for shamanic and spiritual purposes, prepared by the decoction of different Amazonian plants containing N,N-dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. Since the therapeutic potential of this tea has been broadly studied in recent years, mainly for the treatment of psychiatric disorders, the determination of the ayahuasca tea components in human and animal matrices is of utmost importance. In order to avoid the use of large amounts of toxic solvents, typically employed in traditional sample preparation methods, hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) presents a greener and time-saving alternative. The present study aims to fully develop and apply an HF-LPME method for the determination of DMT, harmine (HRM), harmaline (HRL) and tetrahydroarmine (THH) in human urine samples using LC-MS/MS. Fractional factorial and Box-Behnken designs were used to identify and optimize significant method variables. Once optimized, validation has shown an LoD of 1.0 ng/mL for DMT and 2.0 ng/mL for the harmala alkaloids. The LoQ was of 5.0 ng/mL for all analytes. The method has shown to be linear over a concentration range of 5 ng/mL to 200 ng/mL ($r^2 \geq 0.99$). Intra/inter-day precision and accuracy met the acceptance criteria at the three quality control (QC) levels studied (15.0, 90.0 and 170.0 ng/mL, n= 6, each). Matrix effect evaluation showed predominant ion enhancement and recovery values were above 80%. Dilution factors of 10- and 20-fold have shown acceptable values of accuracy. Selectivity studies showed no interferences. Analysis of eight authentic samples collected from four subjects proved method feasibility. A simple, time-saving and green alternative for the analysis of DMT and harmala alkaloids in human urine samples was developed, optimized using design of experiments, fully validated and applied to authentic samples.

8. ARTIGO IV

8. ARTIGO IV

**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**

Gabriela de Oliveira Silveira, Felipe Rebello Lourenço, Ana Miguel Fonseca Pego,
Rafael Guimarães dos Santos, Giordano Novak Rossi, Jaime E. C. Hallak and
Mauricio Yonamine

First Submitted on September 25, 2020

Talanta

ISSN: 1873-3573

Research Article**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**

Gabriela de Oliveira Silveira^{a,*}, Felipe Rebello Lourenço^b, Ana Miguel Fonseca Pego^c, Rafael Guimarães dos Santos^{d,e}, Giordano Novak Rossi^d, Jaime E. C. Hallak^{d,e} and Mauricio Yonamine^a

^a Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil;

^b Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil;

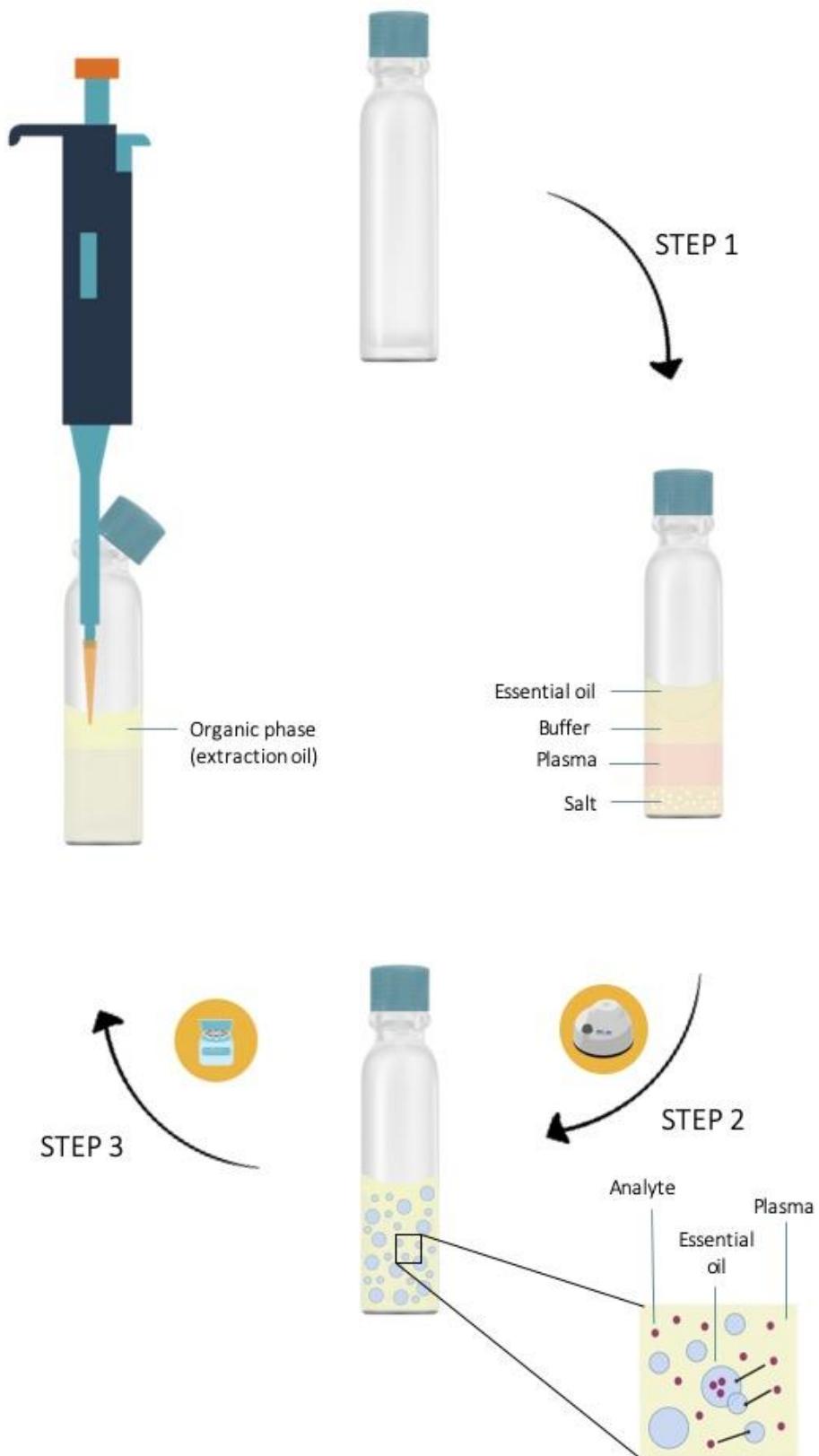
^c Dutch Screening Group, Maastricht, 6229 GS, Netherlands;

^d Department of Neurosciences and Behaviour, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil;

^e National Institute of Science and Technology—Translational Medicine, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil.

* Corresponding author: Tel.: +55 (11) 3091-2194

E-mail: silveirago@usp.br (G.O.S.)

Graphical Abstract

Abstract

The present study describes the development of a novel solvent-free vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction alternative based on a natural essential oil as extracting solvent (VA-EO-DLLME) for the determination of N,N-dimethyltryptamine (DMT), harmine (HRM), harmaline (HRL) and tetrahydroarmine (THH) (compounds found in the ayahuasca tea, a psychedelic plant preparation) in human plasma. After optimization through full factorial and Box-Behnken experimental designs, this VA-EO-DLLME followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was completely validated and applied to authentic plasma specimens. Sample preparation consisted in the addition of 60 mg of NaCl, 100 μ L of borate buffer and 100 μ L of *Eucalyptus globulus* essential oil to a 200 μ L aliquot of human plasma. After 30 seconds of vortex agitation followed by 5 minutes of centrifugation (10,000 rpm), 80 μ L of the oil supernatant was dried and resuspended in mobile phase prior to injection into the UHPLC-MS/MS system. Once optimized, the validated method yielded LoDs \leq 1.0 ng mL $^{-1}$ for all analytes. LoQ was 1.0 ng mL $^{-1}$ for DMT, HRL and HRM and 2.0 ng mL $^{-1}$ for THH. The method has shown to be linear over the range of LoQ up to 150 ng mL $^{-1}$ ($r^2 \geq 0.9926$). Intra/inter-day precision and accuracy met the acceptance criteria at three quality control (QC) levels. An additional intermediate precision study demonstrated that, except for THH and HRL at low and medium QCs, the overall method performance was similar for the three different oil sources. Matrix effect evaluation showed predominant ion suppression and recovery ranged from 33 up to 101%. Selectivity studies showed no interferences. Analysis of thirteen authentic samples proved method feasibility. Finally, we believe that our novel VA-EO-DLLME approach offers a quite simple, fast, cost-effective and eco-friendly alternative based on the use of an easily accessible and entirely green material as an extracting solvent. This may represent a new opportunity on the research of natural essential oils as substitutes of organic solvents for microextraction methods in forensic and clinical contexts.

Keywords: dispersive liquid-liquid microextraction, essential oil, solvent-free, green analytical chemistry, dimethyltryptamine, ayahuasca.

1. Introduction

One of the major current challenges in modern Analytical Chemistry is to compromise performance parameters such as sensitivity, selectivity, accuracy and precision while simultaneously adhering to sustainable methods [1,2]. The movement devoted to achieving such agreement is that referred to as Green Analytical Chemistry (GAC), a concept derived from the Green Chemistry philosophy initiated

by Anastas and collaborators in the late 90s, which focused on synthetic chemistry and the development of products and processes that could contribute to the reduction or elimination of both the use and generation of hazardous substances [2-4]. Having this into consideration, GAC is dedicated to the diminution of the use of resources, especially organic solvents and other potentially toxic reagents, as well as minimizing energy consumption, which can result in the improvement of analyst safety, reduction of waste, costs and time within analytical laboratories [1,5,6]. Therefore, sample preparation is a primary target of GAC, considering that this step is not easily nullified and it is substantially solvent- and time-consuming [6,7]. However, several strategies may be employed in order to minimize the impact of sample preparation, being miniaturization possibly one of the most prominent, as it provides systems with overall reduction on resource volumes (both samples and solvents may be used at a microliter scale), speed and great analytical features [8-10].

Miniaturized extraction techniques derive from classical approaches using liquid phase or solid/stationary phase extractions [10]. The former is represented by the traditional liquid-liquid extraction (LLE) whilst the latter refers to solid-phase extraction (SPE). Both techniques have been continuously applied over time, resulting in great extraction performances. However, from the GAC perspective these alternatives are not suitable for they are based on laborious multi-stage procedures and in the use of high volumes of sample and toxic organic solvents, which usually generate important amounts of residues [6,10,11]. To overcome the drawbacks of classical SPE approaches, a potentially solvent less alternative defined as solid phase microextraction (SPME) was created by Arthur and Pawliszyn (1990) [12]. From this point forward, various miniaturized alternatives have emerged up until a micro-scale alternative for LLE, known as liquid-phase microextraction (LPME), was developed by Pedersen-Bjergaard and Rasmussen [13]. Some of the most popular liquid-phase microextraction techniques are the liquid-liquid microextraction (LLME or LPME), single drop microextraction (SDME), hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), as recently reviewed [6,9,10].

Since its introduction by Rezaee and co-workers in 2006, DLLME has been widely studied and applied for the extraction of a variety of substances from different matrices [8,14-17]. This alternative is based on the rapid injection of a mixture

containing a small amount of both an extracting organic solvent and a disperser solvent into the sample solution in order to form a cloudy, turbid system (emulsion) [18]. In its classical setup, the extracting solvent presents higher density than water while the disperser is miscible in both the aqueous sample and the organic solvent [19]. The emulsion is then characterized by tiny solvent droplets dispersed throughout the sample with substantial surface areas between phases, which allows for the equilibrium state to be shortly reached, consequently diminishing the extraction time while enhancing the enrichment factor [18,19].

Several modifications of the abovementioned DLLME format have been introduced over time. Normally, these variations may be categorized according to changes related to: (*i*) the extracting solvent, (*ii*) the disperser solvent or mode, (*iii*) coupling to other extraction techniques. To overcome the use of the toxic chlorinated solvents required in the initial DLLME designs, long chained alcohols or hydrocarbons were applied as the extracting portion in the so-called low density solvent DLLME (LDS-DLLME), which was followed by introduction of DLLME-SFO (solidification of a floating organic drop) as an alternative to facilitate the collection of the organic supernatant [17]. In addition, ionic liquids (IL) and deep eutectic solvents (DES) are being considered as the greenest solvents available to replace both chlorinated and low density solvents, and regardless of presenting several configurations, these approaches are usually named IL-DLLME and DES-DLLME [20]. Efforts have also been made to replace or eliminate the usual disperser solvents, such as acetonitrile, methanol, ethanol, and acetone [21]. In the surfactant-assisted DLLME (SA-DLLME), a surfactant was used to substitute the disperser and provide emulsification [22]. Other approaches have achieved successful dispersion of the extracting solvent by the use of ultrasound (UA-DLLME), vortex (VA-DLLME), air-assisted (AA-DLLME), temperature controlled (TC-DLLME) settings, among others [21,23]. Because DLLME was initially developed to be used in simple matrices, applying this technique to extracts obtained from a previous extraction method may be necessary when dealing with more complex samples [17]. LLE, SPE, stir bar sorptive extraction (SBSE), supercritical fluid extraction (SFE) and electromembrane extraction (EME) are among the options that can be combined to DLLME in order to achieve cleaner extracts and to reduce matrix effects [22,23].

Ayahuasca is an ethnobotanical psychedelic preparation traditionally used by the indigenous people of the Amazon Basin and its use is currently being spread by

neoshamanic groups all around the globe [24 - 26]. Conventionally presented as a tea, this drink is frequently prepared by decoction of the *Psychotria viridis* leaves and the *Banisteriopsis caapi* vine [24]. The former plant contains N,N-dimethyltryptamine (DMT), an hallucinogen compound that acts in the serotonergic receptors, while the latter is rich in β-carboline alkaloids, a class of monoamine oxidase A (MAO-A) inhibitors [25]. The simultaneous ingestion of those plants initiates a synergistic effect in which β-carbolines prevents DMT degradation by MAO-A within the gastrointestinal tract allowing the hallucinogen to reach its central nervous system receptors [26]. For these unusual characteristics, ayahuasca has been drawing attention by the scientific community, especially regarding its possible role in the therapy of mental health disorders, such as depression and drug addiction [25,27 – 31]. In light of the increasing interest in ayahuasca research, the requirements for suitable analytical methods has been correspondingly growing. In fact, various methods have been developed for the determination of ayahuasca alkaloids in different matrices [32]. Methods previously reported for the analysis of plasma samples were limited to SPE, LLE and protein precipitation (PP) approaches that employ important amounts of acetonitrile, n-butyl chloride, butyl acetate, ethyl acetate, n-pentane, methyl *tert*-butyl ether and methanol [33 – 38].

In the current study, the analysis of ayahuasca alkaloids will be taking a step forward through a novel solvent-free DLLME approach governed by GAC principles during the entire method development and based on the use of a natural essential oil as an extracting solvent. Therefore, we have designed a vortex-assisted essential oil-based DLLME (VA-EO-DLLME) followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the determination of DMT and β-carbolines (harmine, harmaline and tetrahydroharmine) in human plasma samples. The method has been optimized by design of experiments in two stages, fully validated according to international guidelines and its feasibility proof was achieved by the analysis of 13 authentic samples obtained from healthy individuals who have participated in a randomized trial involving the administration of a single oral dose of ayahuasca.

2. Experimental

2.1 Reagents, Standards and Materials

N,N-Dimethyltryptamine (DMT) was acquired from Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA). Harmine (HRM) and harmaline (HRL) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Deuterated dimethyltryptamine (DMT-d₆) was used as internal standard (IS) and it was synthetized as described by Oliveira and collaborators [36]. Tetrahydroharmine (THH) was synthetized from harmaline (HRL), according to the method described by Callaway and co-workers [33]. DMT stock solution was available at 1.0 mg mL⁻¹ in methanol. All other analytes (obtainable as powders) were weighted out to produce methanolic stock solutions at the concentration of 1 mg mL⁻¹. Whenever necessary, standard solutions were diluted at variable proportions with methanol in volumetric glassware to obtain working solutions at concentrations of 100, 10.0, 1.0 or 0.4 µg mL⁻¹. All standard solutions were stored in the freezer at -20°C until further usage.

Eucalyptus radiata, rosemary, cedarwood, clove, lemon, lemongrass, lime, peppermint, wild orange and lavender essential oils were purchased from dōTERRA International, LLC (Utah, EUA). *Eucalyptus globulos* essential oils were obtained from three different brands: BioEssência ® (São Paulo, Brazil), LASZLO© (Minhas Gerais, Brazil) and Via Aroma Indústria de Aromatizadores de Ambientes LTDA (Rio Grande do Sul, Brazil).

Methanol HPLC grade, sodium bicarbonate, sodium carbonate, sodium borate, sodium chloride, ammonium formate and formic acid (98%-100% grade) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water was produced using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, Massachusetts). Corning® gel-loading pipet tips (200 µL round 0.5mm thick) were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

2.2 LC-MS/MS Instrumentation

A Waters UPLC Acquity System coupled to a Quattro Premier XE mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA) with an electrospray interface (ESI) was operated in the positive ion mode for all analyses. Chromatographic separation

was achieved on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1mm x 100 mm, 1.7 µm) eluted with 2 mM ammonium formate buffer with 0.1% formic acid (mobile phase A) and 0.1% formic acid in methanol (mobile phase B) at a constant flow rate of 0.3 mL/min and column oven temperature at 40°C. The chromatographic run time was of 8.0 minutes with the following gradient elution: 0 to 0.5 minutes, 0%B; 0.5 to 7 minutes, 10 to 50%; 7.0 to 7.1 minutes, 50 to 10%; and 7.1 to 8.0 minutes, 0%. The injection volume was 3 µL.

The mass spectrometer was operated under the multiple-reaction monitoring mode (MRM), considering three transitions for each analyte. MS settings were established as follows: desolvation gas flow rate, 1100 L/h; cone gas flow rate, 200 L/h; desolvation temperature, 350 °C; source temperature, 100 °C; capillary voltage, 1000 V. The retention times, capillary voltage, collision energy and m/z transitions used for quantification of each analyte are displayed in **Table 1**. Raw chromatographic data was extracted using MassLynx™ Software (Waters Corporation, Milford, MA) and plotted on Microsoft Excel® 2010 to improve image resolution.

Table 1. Mass spectrometry parameters for dimethyltryptamine (DMT), deuterated dimethyltryptamine (DMT-d₆), tetrahydroharmine (THH), harmaline (HRL), and harmine (HRM). Quantifying transition marked with an asterisk).

Analyte	Retention Time (min)	Precursor ion, Q1 (<i>m/z</i>)	Product ion, Q3 (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
DMT-d ₆	3.3	195.1	63.9*		14
			114.9	15	36
			143.8		22
DMT	3.3	188.9	57.8*		11
			116.7	25	29
			143.8		17
THH	4.7	217.1	172.8		29
			187.9*	25	17
			200.0		13
HRL	5.6	215.2	130.4		41
			171.7*	50	33
			199.9		25
HRM	5.9	213.2	143.8		41
			169.8*	50	33
			198.0		25

2.3 Plasma Specimens

Thirteen authentic samples were obtained from 13 healthy volunteers (one sample from each volunteer) who participated in a randomized trial involving the administration of a single oral dose of ayahuasca (1 mL/kg). All samples were collected from volunteers 5 hours after ayahuasca intake. The drug-free samples were obtained from non-users, pooled and used throughout the entire method optimization and validation. After collection, samples were stored untreated at -20°C until further analysis. The study protocol was approved by the Ethics Committee of School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (ethics protocol approval number 2.267.476) and the Ethics Committee of the Clinics Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (protocol approval number 2.690.290). Informed consent was obtained from all volunteers.

2.4 Sample Preparation

A 200 µL plasma aliquot was placed in a thin 1 mL glass tube containing 60 mg (± 10 mg) of NaCl, followed by the addition of 50 µL of the IS (final IS concentration of 100 ng mL⁻¹) and 100 µL of 0.5 M borate buffer pH 9.8. Then, 100 µL of *Eucalyptus globulus* essential oil was added to the mixture and the entire system was vortexed for 30 seconds to achieve a cloudy solution. After agitation, the glass tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. The oil supernatant was then drawn using gel-loading pipet tips, transferred to a vial and dried under nitrogen stream at 50 °C. Finally, the dried residue was resuspended with 50 µL of aqueous mobile phase before injection (3 µL) into the LC-MS/MS system.

2.5 Design of Experiments

Minitab® 19 software (LLC, State College, Pennsylvania, EUA) tools were used to accomplish method optimization by design of experiments (DoE). An initial screening step was performed comprising of four factors selected during preliminary

experiments (not shown) included in a two-level full factorial design (2^4) containing three central points. Nineteen random experiments were performed as single replicates. Once the significant method variables were determined, a Box-Behnken design was performed with three variables at three levels resulting in fifteen experiments that were randomly executed at a single replicate. The results were evaluated according to absolute response areas for all analytes under study. The factors and levels evaluated are summarized in **Table 2**. Experimental matrices are displayed in **Table S1** and **S2**.

Table 2. Factors and levels evaluated by full factorial and Box-Behnken designs.

Factors	Levels		
	-1	0	+1
A Sample Volume (μL)	100	150	200
B Buffer Volume (μL)	100	150	200
C Buffer pH	9.5	10.0	10.5
D IS Volume (μL) ^a	50	75	100

^a Evaluated only in the full factorial design.

2.6 Method Validation

The method was fully validated in accordance to international guidelines [39,40] and specialized literature [41 – 43]. Limit of detection (LoD), limit of quantification (LoQ), selectivity, linearity, precision (intra and inter assay), accuracy, matrix effect (ME), recovery (RE) and process efficiency (PE) studies were performed. An additional intermediate precision study was also developed to assess possible variations in method performance when using different essential oil brands [44,45]. Validation assays were performed in six replicates, except when stated otherwise.

Selectivity was assessed by three different methods. First, ten urine blank samples collected from different subjects were tested for the presence of endogenous interferences. After that, possible interferences from exogenous substances was evaluated by the analysis of urine samples spiked at concentrations above the calibration curve with 37 common drugs and some of their metabolites, inculding: caffeine, nicotine, cannabinoids, cocaine related substances,

amphetamines, opioids, barbiturates, antidepressants and anxiolytics. The absence of interfering peaks at the retention times of DMT, THH, HRL, HRM and DMT-*d*₆ was used to determine selectivity. The potential interferences of the IS were also assessed by analyzing a single urine sample fortified with DMT-*d*₆ and investigated for the presence of non-labeled DMT as a contaminant.

LoD was established when the lowest concentration, showing a signal-to-noise ratio (S/N) of at least 3, presented all transitions clearly distinguished and the relative standard deviation (RSD) was $\leq 20\%$. LoQ was determined as the lowest concentration with a S/N ratio of at least 10 and a RSD $\leq 15\%$. The linearity study was carried over the LOQ to 150 ng mL⁻¹ range for all analytes, at five different concentrations. The peak area ratios of the compounds to the IS were used for linear regression analysis and then expressed by regression equations and determination coefficients ($r^2 \geq 0.99$).

Precision and accuracy studies were performed by analyzing fortified urine specimens at three quality control (QC) levels: low (LQC, 3 or 6 ng mL⁻¹), medium (MQC, 60 ng mL⁻¹) and high (HQC, 120 ng mL⁻¹) during three successive days. These results were expressed as %RSD, calculated with one-way ANOVA. Acceptance criteria for both intra and inter-assay precision were RSD $\leq 20\%$ for the LQC and $\leq 15\%$ for MQC and HQC. Intermediate precision for three different oil manufacturers was similarly accomplished. Accuracy was calculated through the comparison between the quantified and the expected concentration at each QC level and then expressed as a percentage of the known concentration.

Three experimental sets were used to assess ME, RE and PE at the three QC levels (each QC replicate was collected from a different subject). Set 1: the standard solutions were simply diluted in mobile phase. Set 2: QC samples were spiked after the extraction procedure. Set 3: QC samples were spiked before the extraction process. For RE calculation, absolute peak areas from Set 3 were compared to those of Set 2; for the ME, absolute peak areas from Set 2 were compared to those of Set 1 and for PE absolute peak areas from Set 3 were compared to those of Set 1.

3. Results and Discussion

3.1 LC-MS/MS Analysis

The LC-MS/MS method, which has been previously described for the analysis of ayahuasca tea and urine samples [46], has now demonstrated excellent separation and sensitivity features for all analytes in a short run time (8 minutes) after extraction from plasma matrices, as displayed in **Figure 1**.

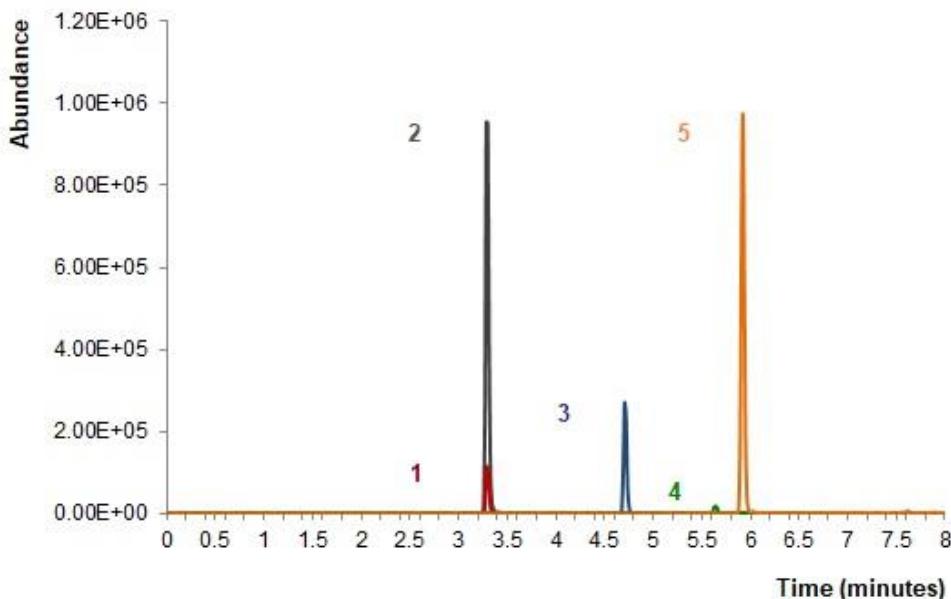


Figure 1. Chromatogram obtained from an authentic plasma sample containing (1) dimethyltryptamine, (2) internal standard (DMT-d_6) (3) tetrahydroharmine, (4) harmaline, and (5) harmine.

Despite the MRM mode allowing for indubitable analyte identification devoid of chromatographic separation, complete separation of HRM and HRL analytes has proven to be imperative given their structural similarity and the ion suppression caused by HRM over HRL. This was achieved when replacing acetonitrile for methanol as the organic mobile phase, which turned out to be a more sustainable option since, as stated by the Innovative Medicines Initiative (IMI)-CHEM21 [47], acetonitrile is considered a problematic solvent. Not only the use of methanol, ethanol and aqueous solutions is recommended but several other strategies may be used towards the development of greener chromatographic analysis. The ultra-high pressure liquid chromatography (UPLC) system, as the one used in the present study, has a reduced column length, diameter and particle size that shortens down the run time and consequently decreases the consumption of organic solvents

[6,48,49]. Nonetheless, gas chromatography (GC) and supercritical fluid chromatography (SFC) are considered greener alternatives when compared to LC, however, the higher sensitivity provided by the latter, allows for the use of more eco-friendly sample preparations, especially miniaturized approaches that require lower sample volumes as well as little or no organic solvents and toxic reagents at all, which contributes to an overall eco-friendly LC analysis [6,49-52].

3.2 Method Optimization

The optimization of analytical methods has been conventionally carried out by estimating the influence of one-variable-at-a-time (OVAT) in the extraction procedures [53]. This laborious approach usually requires several runs that results in poor experimental data since the interaction between the factors are not measured, meaning that an overall optimal setting is hardly achieved. A careful review of the published DLLME methods for the determination of psychoactive substances in human plasma reveals that less than 40% (10 out of 27 published articles since 2008) have used proper experimental design during method optimization (**Table S3**). The design of experiments (DoE) approach allows the analyst to identify significant variables affecting the extraction system, assess the magnitude of factor interactions, reduce systematic errors and set up optimal conditions for multiple responses in a very limited number of runs [54,55].

The VA-EO-DLLME set up described in this work was developed using an initial step that consisted of a two-level full factorial design (FFD), which is one of the foremost alternatives to screen several variables and determine both main effects and two-factor interactions significantly affecting the alkaloids responses [56]. In addition, a Box-Behnken design (BBD) was performed to explore the quadratic response surface, build a second-order model and find the optimal extraction settings. Both statistical models were evaluated accordingly by analysis of variance (ANOVA) and considered adequate when the regression effects were significant (p -values ≤ 0.05) and the lack of fit was non-significant ($p \geq 0.05$). The large F values suggests that at least one factor had a significant effect on the model. Finally, the adjusted determination coefficient (r^2 adj.), that accounts for the number of

experiments and coefficients in the model, has been used to determine the percent of variance of the data explained by the proposed model [55,57].

3.2.1 Selection of essential oils

The rationale of the current study has followed the one proposed by Pedersen-Bjergaard and Rasmussen (2004) as well as Bairros et al. (2014) regarding the successful use of essential oils as an extraction medium in liquid-phase microextraction (LPME) [58,59]. Selecting the appropriate extracting solvent in DLLME is paramount and some properties must be carefully acknowledged, such as: (i) different density relative to water, (ii) proper chromatographic behavior, (iii) ease of evaporation, (iv) extracting potential, (v) low solubility in water, and (vi) ability to produce a cloudy solution [60,61].

In order to overcome possible drawbacks of injecting an essential oil into the LC-MS/MS system, several essential oils have been evaluated according to their readiness of evaporation under a gentle nitrogen stream and a temperature not higher than 50°C with special attention to the time taken to achieve complete dryness. For this purpose, *Eucalyptus radiata*, *Eucalyptus globulus*, rosemary, cedarwood, clove, lemon, lemongrass, lime, peppermint, wild orange and lavender essential oils were tested. Although eucalyptus, rosemary, wild orange and lemon have been successfully dried under the aforementioned conditions, all of them, but *Eucalyptus globulus*, took at least 30 minutes to produce a clean residue. Therefore, considering that in the GAC philosophy one must spend as less as possible of all resources available, including energy and time, the following DoE approach applied for method optimization, has continued using only *Eucalyptus globulus* oil as the extractant solvent. Nevertheless, most of the oils evaluated are easily dried when submitted to higher temperatures (70 °C, for example), which could not be employed in the present method because of analyte degradation, mainly THH, when exposed to temperatures higher than 50 °C. This demonstrates that a variety of essential oils could be used for the extraction of other thermo stable substances.

Several preliminary experiments were performed, considering experimental system restrictions, to optimize the extraction conditions and select the parameters prone to the chemometrics optimization using a reduced number of runs. One of the

designations of liquid microextractions states it as sample preparation techniques using solvent volumes $\leq 100 \mu\text{L}$ [9,62]. Therefore, the volume of essential oil was established at $100 \mu\text{L}$ since approximately 20% of it is lost during extraction, resulting in the recovery of about $80 \mu\text{L}$ after centrifugation. In addition, to use an even lower volume would complicate the collection of the oil supernatant, although this step has been largely simplified using gel-loading pipet tips and narrow glass tubes. In addition, because of the nature of miniaturized techniques, the samples are handled using small volumes, occasionally under restricted extraction conditions [56]. The optimum extraction conditions were addressed by varying other factors at restricted levels while keeping the essential oil volume unchanged.

3.2.2 Two-level full factorial design

Initially, an FFD was carried out to investigate the significance of sample volume (A), buffer volume (B), buffer pH (C) and IS volume (D) on extraction efficiency as means of analyte absolute peak areas (sensitivity). This design is described as 2^k , where 2 represents the number of levels and k stands for the number of factors, hence this approach estimates both main effects and factor interactions [53,54]. In the proposed experimental design, the main goal was to achieve the best extraction conditions using the most economic micro-scale setting. All experiments were performed in a random order to minimize systematic errors and a central point (three replicates) was included to evaluate the probability of curvature.

The Pareto charts (95% confidence interval) displayed on **Figure 2** show the standardized main effects that were statistically significant (vertical dashed lines). The charts reveal linear, interaction and quadratic terms affecting the extraction system suggesting loss of linearity. As it can be seen in **Table 3**, the ANOVA analysis resulted in large F values and low p values as well as a non-significant lack of fit, which proves the model to be adequate to predict response variables and that the deviations in the model are originated from random errors.

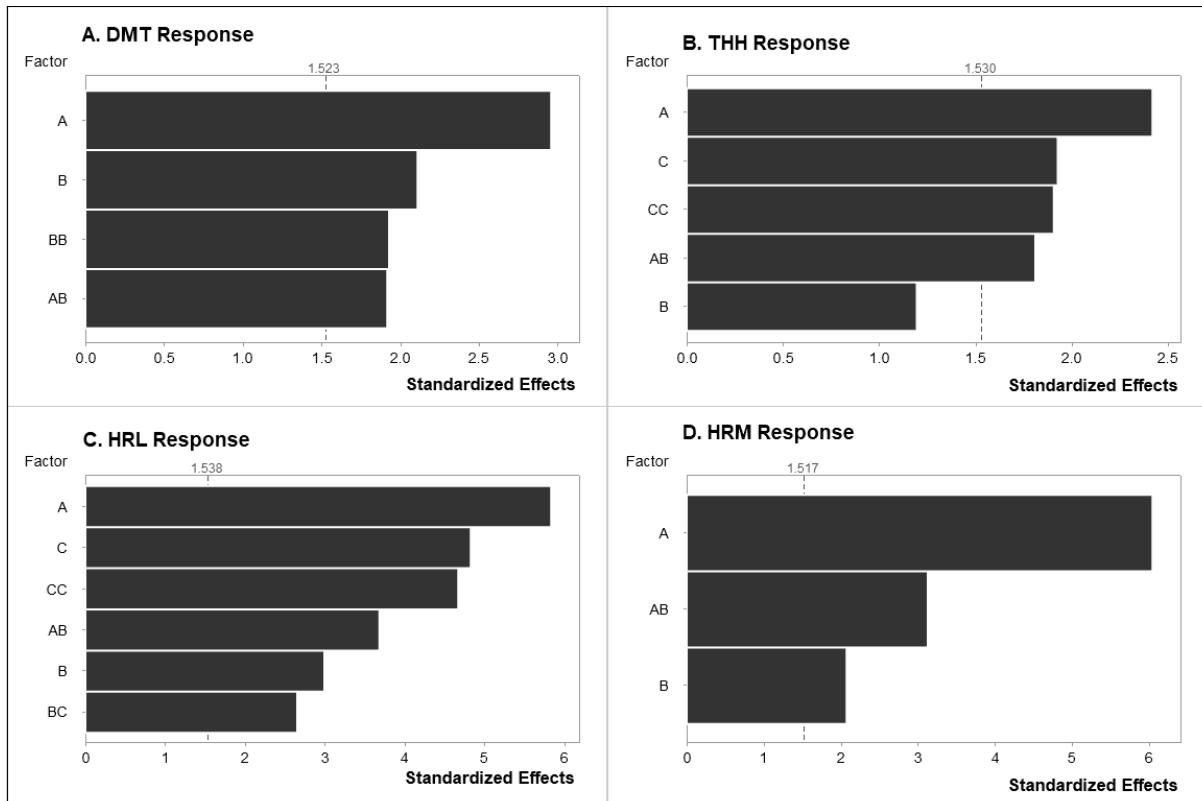


Figure 2. Standardized main effect Pareto charts for the fractional factorial design of A. dimethyltryptamine (DMT); B. tetrahydroharmine (THH); C. harmaline (HRL); D. harmine (HRM). Factors: A - Sample volume. B - Buffer volume. C - Buffer pH.

Since the IS is diluted in methanol, its volume (factor D) was investigated to access a possible role as disperser agent. Both Pareto charts (**Figure 2**) and regression equations (**Table 3**) reveal that none of the analytes have suffered the influence of methanol addition, this may happen because the vortex agitation allows enough dispersion of the essential oils droplets through the sample solution enhancing the surface area between the latter and the extraction solvent, consequently the rate of mass transfer, reaches its maximum and the equilibrium state is established, thus making the methanol addition insignificant. In addition, preliminary studies (not shown) have demonstrated that extraction times above 30 seconds had no improvement on extraction efficiency, this suggests that the equilibrium state is rapidly achieved, which is one of the most remarkable features of DLLME. Hence, the IS volume was kept to the minimum, which was 50 µL.

Through the FFD it was possible to verify that the method sensitivity varied as linear and quadratic function of sample volume, buffer volume and buffer pH, and their interaction, in different manners for each analyte. However, the assumption of

curvature by this approach may not be sufficient, since the FFD presents a very limited number of points to adjust for a complex model. In addition, the adjusted determination coefficients obtained for DMT and THH were unsatisfactory, thus a more complete quadratic model must be used to describe the response as a function of the abovementioned factors by applying a more accurate Response Surface Methodology (RSM).

Table 3. Summary of the regression analysis of absolute response areas from full factorial design (FFD) and Box-Behnken Design (BBD) for N,N-dimethyltryptamine (DMT), harmine (HRM), harmaline (HRL) and tetrahydroarmine (THH).

Experimental Design	Analyte	Regression Equation	Model summary				Lack of fit	
			r ² (aj.) % ^a	Mean Square	F value	p-value	Sum of squares	p-value
FFD	DMT	- 59736 + 242.2A + 843B - 2.51 B ² - 0.993AB	54.5	1.7x10 ⁸	6.4	0.004	2.3x10 ⁸	0.95
	THH	-592336 + 46.2A + 22.8B + 117108C - 5792C ² - 0.219AB	43.5	5.5x10 ⁶	3.8	0.025	9.1x10 ⁶	0.98
	HRL	-2585024 + 190.2A + 625B + 501314C - 24247C ² - 0.760AB - 54.8BC	90.2	1.5x10 ⁸	28.7	0.000	4.7x10 ⁷	0.34
	HRM	-24938 + 1119A + 384B - 3.67AB	85.8	5.1x10 ⁹	37.3	0.000	1.9x10 ⁹	0.25
BBD	DMT	-2768385 + 1836A + 542762C - 26573 C ² - 170.2AC	80.4	2.5x10 ⁸	15.4	0.000	1.6x10 ⁸	0.11
	THH	-294792 + 190A + 57034C - 2750C ² - 17.5AC	63.6	1.8x10 ⁶	7.1	0.006	2.5x10 ⁶	0.15
	HRL	-1900038 + 400A + 371657C - 0.878 A ² - 18254C ²	84.6	1.4x10 ⁸	20.2	0.000	5.1x10 ⁷	0.68
	HRM	-1069260 + 9145A + 109048C - 839AC	82.9	4.6x10 ⁹	23.5	0.000	1.9x10 ⁹	0.47

^a adjusted determination coefficient. A: Sample Volume. B: Buffer Volume. C: Buffer pH.

3.2.3 Box-Behnken design

After the significant factors have been adequately identified during the screening phase, a response surface methodology was applied to generate the experimental data to be modeled through the least squares fitting. This was achieved using the data obtained through BBD, which was then fitted in the polynomial model of multiple linear regressions to build the response surface. The model was refined by removing the non-significant variables by step-wise regression ($\alpha=0.15$), thus resulting in the simplest model that could explain the system.

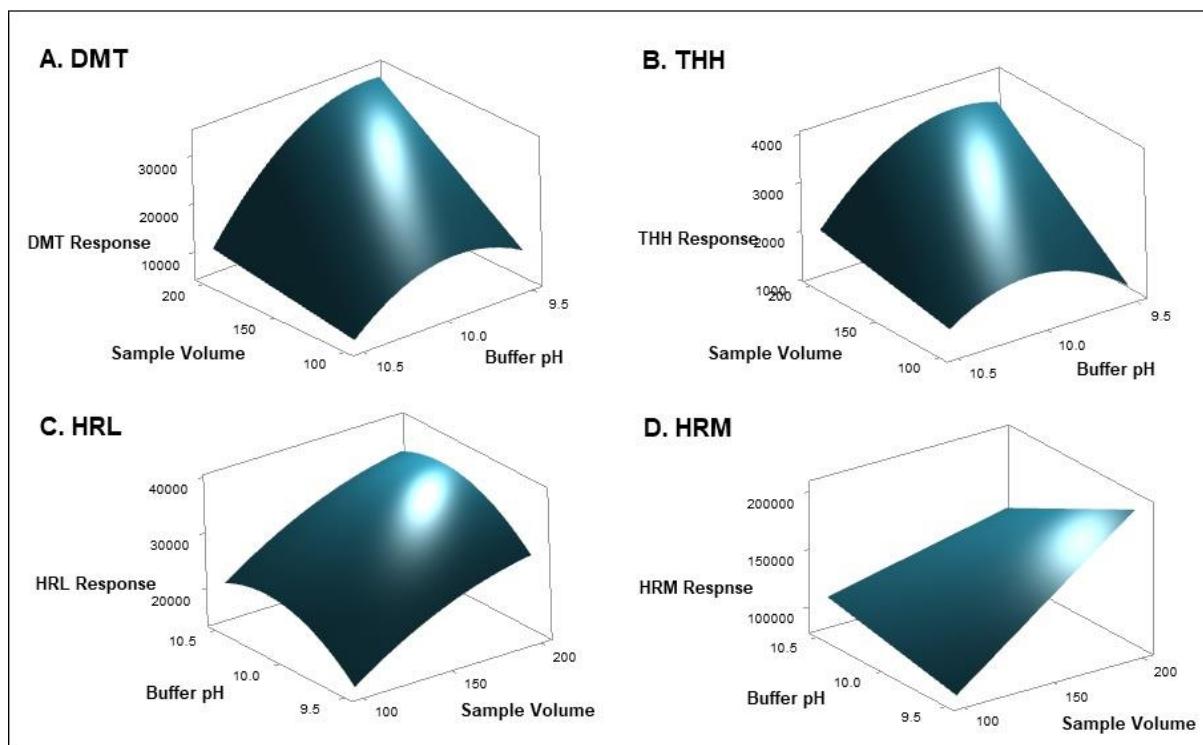


Figure 3. Comparative response surface plots for absolute response areas of A. dimethyltryptamine (DMT); B. tetrahydroharmine (THH); C. harmaline (HRL); D. harmine (HRM) from Box-Behnken design.

Similarly to those of the FFD, these experiments were randomly performed to prevent the effect of noise factors and to reduce systematic errors. The relationship between the variables studied and the responses are described in the response surface plots in **Figure 3**. Once again, model suitability was evaluated by ANOVA

which confirmed that the model was acceptable to predict response variables by means of F value, *p*-value, r^2 adj. and lack of fit, displayed in **Table 3**. Nonetheless, despite the r^2 adj. for the THH response demonstrates that only 63.6% of this analyte variance is explained by the model, the same coefficient for DMT, HRL and HRM have shown a reasonable fit of the experimental data ($\geq 80\%$), thus considered adequate.

The ANOVA results suggest that the linear, quadratic and the interactions of sample volume and buffer pH considerably affect the responses. Although in the screening step the buffer volume has been considered important, after changing the model by way of BBD analysis, the relationship amongst the factors has also changed, resulting in a distinct and more accurate equation that describes the studied system. The aim of investigating the buffer volume was to estimate the magnitude to which sample dilution, by means of buffer addition, could influence the surface area between acceptor (essential oil) and donor (plasma) phases and consequently, improve the extraction efficiency (or the opposite). Since this factor was regarded as non-important, buffer volume was also kept to a minimum amount (100 μ L).

In any type of liquid microextraction the sample pH poses an important role, especially if it comprises of substances with acidic or basic moieties [60]. The neutral form of a weak base, such as the studied analytes, is more efficiently extracted by means of an organic solvent than its protonated form. For this reason, the sample pH was adjusted using a 0.5 M borate buffer or a 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer, depending on the expected pH value, in order to ensure that all analytes would be predominantly in their deprotonated form when extracted. The sample volume, on the other hand, concerns to the complex relationship between the surface area ratio of acceptor and donor phases when dealing with a non-exhaustive extraction procedure. In this regard, increasing the sample volume does not always leads to an equivalent improvement in analyte recovery, whereas when the equilibrium state is reached the mass transfer process is ceased. According to **Figure 3** different optimal conditions may be implied for each analyte response. Nevertheless, the use of multiple response optimization techniques allows for the unraveling of the best settings for the simultaneous extraction of several substances [63]. In the current study, this was accomplished by applying the desirability function, which converts the response of each analyte into individual desirability values (*d*) that range from 0 to 1.

The goal is to achieve an overall desirability (D) as close to 1 as possible, where D represents the geometric mean of the individual desirability values for all investigated responses [53,56,57]. Finally, a sample volume of 200 µL and 0.5M borate buffer pH 9.8 were established as the optimal conditions for the simultaneous extraction of the ayahuasca alkaloids showing a D value of 0.79 as exhibited in **Figure S1**.

3.3 Method Validation

Among the several advantages featured in DLLME methods, such as speed, simplicity, high recovery and enrichment factors, the latter is particularly responsible for the good sensitivity that may be achieved with this technique.

In the current study, the LoD and LoQ values showed in **Table 4** are fit-for-purpose, once reported quantification of authentic samples has shown that alkaloid concentrations in human plasma hardly reach less than 1.0 ng mL⁻¹ values [24,33,34,36-38,64]. Although LoD figures are, in general, higher than the ones previously published with similar instrumentation, it remained ≤ 1.0 ng mL⁻¹ which has proved to be satisfactory for the analysis of authentic samples [36-38,64]. In addition, the LoQ values are similar to most of the reported approaches, except for the one published by Oliveira and co-workers (2012), which has achieved LoQs between 0.2 and 0.4 ng mL⁻¹ after a non-eco-friendly SPE procedure [36].

Table 4. Limits of detection (LoD), limits of quantification (LoQ), linear regression equation and determination coefficients for dimethyltryptamine (DMT), harmine (HRM), harmaline (HRL) and tetrahydroarmine (THH) in fortified plasma samples.

Analyte	LoD (ng mL ⁻¹)	LoQ (ng mL ⁻¹)	Linear regression equation	Determination coefficient (r ²)
DMT	0.7	1.0	y = 0.0444x - 0.0174	0.9926
THH	1.0	2.0	y = 0.0034x - 0.0009	0.9984
HRL	0.8	1.0	y = 0.0272x - 0.0010	0.9969
HRM	0.7	1.0	y = 0.1287x - 0.1069	0.9947

Previous reports regarding the kinetics of ayahuasca alkaloids following oral administration, describe average maximum plasma concentrations of approximately 23.0, 91.0, 6.3 and 115.0 ng mL⁻¹ for DMT, THH, HRL and HRM, respectively [24,33,34,64,65]. Despite these concentration levels may fluctuate unpredictably, a linearity range from the LoQ to 150 ng mL⁻¹ was considered appropriate for the analysis of authentic samples. As displayed in **Table 4**, along with regression equations, determination coefficients were of ≥ 0.9926 and obtained after the application of the F-test to the linearity data which has revealed method heteroscedasticity. Consequently, the weighted least squares linear regression resulted in the weighting factors of $1/x^2$ for β -carbolines and $1/x$ for DMT having the lowest relative errors.

Table 5. Validation parameters for N,N- dimethyltryptamine (DMT), harmine (HRM), harmaline (HRL) and tetrahydroarmine (THH) after extraction by EO-VA-DLLME in fortified plasma samples.

Analyte	QC Level ^a (ng mL ⁻¹)	Precision (RSD%)		Accuracy (%)	Matrix Effect (%)	Recovery (%)	Process Efficiency (%)
		Inter assay ^b	Intra assay				
DMT	3	10.1	7.5	99.5	56.0	87.5	49.0
	60	10.4	3.7	103.6	61.1	52.0	31.8
	120	11.7	6.7	113.8	76.6	50.1	38.4
THH	6	9.2	9.2	93.0	81.7	45.7	37.3
	60	13.9	8.3	101.7	71.2	37.5	26.7
	120	8.7	9.7	114.5	71.0	35.2	25.0
HRL	3	10.6	8.4	119.5	68.8	51.6	35.5
	60	8.4	4.6	104.8	74.7	33.0	24.6
	120	8.9	4.8	108.0	78.6	36.6	28.8
HRM	3	9.7	7.6	114.0	83.4	50.1	41.8
	60	7.9	6.0	104.2	78.7	43.8	34.5
	120	12.1	6.8	110.3	77.6	51.0	39.6
DMT-d ₆	100				62.4	76.2	47.5

^a QC levels analysed as six replicates, ^b Inter assay precision over three consecutive days.

All intra-day precision, inter-day precision and accuracy results met the acceptance criteria at three QC levels, as exhibited in **Table 5**. Given that the LoQ for THH was double of that determined for the rest of the analytes, its LQC has also doubled and therefore established at 6.0 ng mL^{-1} , instead of 3.0 ng mL^{-1} , as estimated for the remaining substances. RSD values for intra-day precision have ranged from 3.7% (DMT, MQC) to 9.7% (THH, HQC) while inter-day precision has revealed RSD results ranging from 7.9% (HRM, MQC) to 13.9% (THH, MQC). Accuracy varied from 93% (THH, LQC) to 119.5% (HRL, LQC).

Table 6. Intermediate precision (RSD%) for N,N- dimethyltryptamine (DMT), harmine (HRM), harmaline (HRL) and tetrahydroarmine (THH) after extraction by EO-VA-DLLME using different essential oil brands/sources in fortified plasma samples.

Analyte	QC Level (ng mL ⁻¹)	Between sources	Within sources
DMT	3	16.4	5.9
	60	14.1	7.1
	120	5.5	5.3
THH	6	50.2	13.8
	60	45.4	8.9
	120	10.5	9.2
HRL	3	38.8	7.7
	60	27.3	5.8
	120	18.3	4.9
HRM	3	7.2	8.6
	60	6.8	8.2
	120	7.1	11.7

An additional set of precision experiments were performed in order to assess a possible variation on method performance related to essential oil characteristics and origin. Studies have reported that the time of harvest may cause differences in composition of the essential oils, for *Eucalyptus* genus specifically, composition may fluctuate seasonally and diurnally, depending on environmental conditions [66,67].

To estimate this effect, *Eucalyptus globulus* oils from three different manufacturers were evaluated in terms of intermediate precision, as indicated in **Table 6**. Intermediate precision is a concept used by the ICH that is cited by USP as ruggedness, which describes the reproducibility of a method measured when similar samples are analysed by varying normal test conditions [68]. In other words, samples are repeatedly tested after changing non-procedure-related factors, such as different instruments, different days, or, in this case, different reagent lots, hence their influence can also be evaluated using ANOVA [45,68-70].

The results showed in **Table 6** reveal that all oils tested are perfectly capable of extracting the analytes with excellent repeatability (within sources), which varied from 4.9% (HRL, HQC) to 13.8% (THH, LQC). However, when comparing one brand to another, both THH and HRL exhibited great variance at LQC and MQC (27.3% to 50.2%) whilst DMT and HRM remained unaffected (RSD \leq 16.4%, DMT, LQC). After a closer investigation of the ANOVA results, it was concluded that one of the oils had increased extracting potential, which led to this high variation. We believe that this is not impulsive of method application, but rather an alert for those who might be interested in using EO-VA-DLLME, that choosing high quality essential oils is preferred and that the essential oil source used to prepare the calibration curve, QCs and samples must be the same.

ME, RE and PE were performed as described by Matuszewski and co-workers (2003) and the results are shown in **Table 5**. Although matrix effects have ranged from 56% (DMT, LQC) to 83% (HRM, LQC) the estimated mean value \pm standard deviation was 72.4 \pm 8.4% whilst recovery ranged from 33% (HRL, MQC) to 87.5% (DMT, LQC) with an average of 50 \pm 15.8%. Once the ME results have demonstrated the occurrence of some ion suppression, these RE values may have been underestimated. However, as proven by the validation results, method accuracy and precision were not affected by ion suppression or low recoveries, as well as adequate LoDs and LoQs were acquired. Comparison between these figures and previously published solvent-free DLLME methods is very limited since only two approaches using deep eutectic solvents [71] and ionic liquids [72] have been reported for the analysis of psychoactive substances (antidepressants) in human plasma. The former has found RE ranging from 64% to 72% and ME varied from 87 to 96% whilst the latter described only RE values, which ranged from 91.4% to 92.2%. Since the PE is expressed as ME \times RE, it resulted in values not higher than

49% (DMT, LQC). Further discussion on recoveries and matrix effects will be provided in **Section 3.5**.

Selectivity studies have confirmed the absence of interfering peaks due to endogenous sources or 37 different exogenous substances at the retention times of DMT, THH, HRL and HRM. In addition, non-labeled DMT was not identified as an impurity when analyzing the deuterated internal standard.

3.4 Authentic Samples

Method feasibility was evaluated by the analysis of 13 real case samples obtained from healthy individuals who participated in a randomized trial involving the administration of a single oral ayahuasca dose (1 mL/kg). Volunteers ingested ayahuasca 5 hours prior to plasma collection. According to **Table 7**, DMT has not been detected in one sample, but the remaining specimens presented DMT concentrations ranging from 0.7 (LoD) to 4.3 ng mL⁻¹. HRL and HRM concentrations have varied from the LoD to 2.1 ng mL⁻¹ and 40.6 ng/mL, respectively. THH has been identified as the most abundant alkaloid, which has shown concentrations varying from 13.4 to 117.9 ng mL⁻¹. The calibration range validated in this study has proven to be suitable for the quantification of ayahuasca alkaloids in all analyzed samples.

The low concentrations of DMT, HRL and HRM are in accordance with the pharmacokinetic profile of ayahuasca after oral ingestion, as previously reported [24,73,74]. The T_{MAX} of DMT and HRL after oral administration of ayahuasca has been shown to be around 1.5 to 2.0 hours. Regarding specifically to DMT, the C_{MAX} is simultaneous to its subjective effects which are resolved after 4 to 6 hours. This pharmacokinetic profile explains the low concentrations of DMT and HRL quantified herein since samples have been collected after a 5-hour interval. Although the plasma concentration of HRM has been shown to peak later than DMT and HRL, previous studies have suggested that HRM may be readily metabolized in some subjects what can generate the low concentrations identified in most individuals. Finally, THH is not only one of the most abundant alkaloid in ayahuasca beverages but in addition it also exhibits longer T_{MAX} and T_{1/2} values (reaching 3 and 9 hours, respectively). As a consequence, THH is supposed to be quantified in plasma for

longer periods of time and, in this case, higher amounts of this analyte were expected [24,73,74].

Table 7. Concentrations (ng mL^{-1}) of ayahuasca alkaloids in authentic samples after quantification by VA-EO-DLLME and UPLC-MS/MS.

SAMPLE ID	DMT	THH	HRL	HRM
01	1.2	80.0	0.8 ^a	3.9
02	0.7 ^a	24.5	0.8 ^a	0.7 ^a
03	N.D.	23.2	0.8 ^a	0.7 ^a
04	1.7	76.0	0.8 ^a	3.2
05	0.7 ^a	13.4	0.8 ^a	0.7 ^a
06	0.7 ^a	42.7	0.8 ^a	0.7 ^a
07	2.6	61.1	2.1	40.6
08	3.7	116.6	1.7	25.9
09	3.1	93.1	1.8	17.0
10	1.3	56.6	1.7	2.1
11	0.7 ^a	27.4	1.6	1.9
12	0.7 ^a	77.6	1.7	1.6
13	4.3	117.9	1.6	11.7

N.D.: not detected. ^a limit of detection.

3.5 Attributes and Challenges of VA-EO-DLLME

Essential oils (EO) are natural complex mixtures extracted from several aromatic plants present in tropical and Mediterranean countries, which are liquid, lipophilic, volatile and usually colorless compounds with lower density than water [75]. In general, EO s are regarded as safe products, with the potential to obviate negative impacts to human health and the environment [76]. These compounds have demonstrated low persistence in soil, as well as lack of toxicity to mammals, birds and fish [77]. In addition, the main constituents of *Eucalyptus* genus oils (monoterpenes) are also not considered toxic for mammalian species and have been

used as green pesticides [76,78]. Based on the eco-friendly properties of EOs, in the current study, a completely novel solvent-free VA-DLLME alternative has been described.

Solvent-free DLLME has been reported based on the use of ionic liquids (ILs) and deep eutectic solvents (DES). Both alternatives are currently the greenest solvents available, featuring much lower toxicity than classic organic solvents. However, there has been some controversies regarding the magnitude of toxicity of these compounds, as well as the complexity of their synthesis and the high costs associated with it, especially for ILs [79,80]. In this context, EOs may represent an easily accessible and cheap alternative from botanical origin with great extracting potential in microextraction approaches. Additionally, withdrawing the organic supernatant poses a rather important issue when using low density solvents in DLLME. However, in the proposed method this issue was solved by employing very narrow glass tubes that provided a sufficiently large layer that can be easily collected with a gel-loading pipette tip.

Despite of the aforementioned advantages, improvements shall be introduced to maximize method performance concerning ME and RE outcomes. Method optimization focused on increasing recovery and minimizing matrix and EO effects shall be performed in further studies in order to achieve better performance, similar to that often attributed to DLLME based on the use of ILs and DESs.

Most DLLME methods reported for the analysis of psychoactive substances in human plasma summarized in **Table S3** employ a previous protein precipitation step, which increases solvent and time consumption. In the current VA-EO-DLLME this step has been eliminated but resulted in suitable sensitivity, precision and accuracy. However, adding a protein precipitation step, may, in fact, improve sample cleanup, increase method recovery and minimize ion suppression. Nevertheless, a potential role of EO components as a source interference should also be considered since it can contribute to ion suppression and low recovery. We herein highlight that the selectivity studies could have identified contaminants from the EO, which has not occurred. In addition, seasonal or environmental variance on EO constituents' profile should not be of great concern if reliable manufacturers are selected and the same brand is used during the entire analysis.

4. Conclusions

The current study described the design of the first solvent-free VA-DLLME approach based on the use of an essential oil as extracting solvent. The method termed VA-EO-DLLME was applied for the determination of DMT and β -carbolines using low amounts of plasma samples from ayahuasca users. Essential oils, which are complex mixtures naturally present in aromatic plants, comply with the Green Analytical Chemistry requirements, such as negligible toxicity on the environment. Moreover, the developed method represents not only an eco-friendly, but also a cheap, easily accessible and fast alternative for the analysis of the ayahuasca alkaloids in plasma matrix. However, further studies on the use of essential oils as an extracting solvent in liquid microextractions are required in order to maximize its performance, especially regarding recovery and matrix effects, which can be achieved by the use of design of experiments during method optimization. For this reason, we believe that essential oils have great potential within the suggested role. Figures of merit from validation studies reveal adequate sensitivity and excellent precision and accuracy which have been proved when method feasibility was tested in authentic samples. Finally, we believe that this may represent a new opportunity on the research of natural essential oils as substitutes of organic solvents for microextraction methods in both forensic and clinical contexts.

Acknowledgments

Financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are gratefully acknowledged.

Funding

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant numbers 2016/06810-2 and 2018/24770-3.

References

- [1] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [2] C. Turner, Sustainable analytical chemistry—more than just being green, *Pure Appl. Chem.* 85 (2013) 2217–2229. <https://doi.org/10.1351/pac-con-13-02-05>.
- [3] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, NY, USA, 1998.
- [4] P.T. Anastas, Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167–175. <https://doi.org/10.1080/10408349891199356>.
- [5] J. Płotka-Wasylka, J. Namieśnik, Green Chemistry and Sustainable Technology Green Analytical Chemistry, *Green Anal. Chem.* (2019) 449. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9105-7>.
- [6] G.D.O. Silveira, A.M.F. Pego, J. Pereira E Silva, M. Yonamine, Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices, *Bioanalysis*. 11 (2019) 295–312. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0208>.
- [7] M. Koel, Do we need Green Analytical Chemistry?, *Green Chem.* 18 (2016) 923–931. <https://doi.org/10.1039/c5gc02156a>.
- [8] J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M.Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta*. 905 (2016) 8–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.041>.
- [9] A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, M. De La Guardia, J. Namieśnik, Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques, *Talanta*. 119 (2014) 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.050>.
- [10] J.S. da S. Burato, D.A.V. Medina, A.L. de Toffoli, E.V.S. Maciel, F.M. Lanças, Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 202–225. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900776>.
- [11] E. Carasek, J. Merib, Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: a review, Elsevier B.V. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.049>.
- [12] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [13] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary

- Electrophoresis, Anal. Chem. 71 (1999) 2650–2656. <https://doi.org/10.1021/ac990055n>.
- [14] O. Zuloaga, M. Olivares, P. Navarro, A. Vallejo, A. Prieto, Dispersive liquid-liquid microextraction: Trends in the analysis of biological samples, Bioanalysis. 7 (2015) 2211–2225. <https://doi.org/10.4155/bio.15.141>.
- [15] F.R. Mansour, M.A. Khairy, Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1061–1062 (2017) 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.055>.
- [16] R. Jain, R. Singh, Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology, TrAC - Trends Anal. Chem. 75 (2016) 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.007>.
- [17] H. Yan, H. Wang, Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction, J. Chromatogr. A. 1295 (2013) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.053>.
- [18] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid – liquid microextraction, J. Chromatogr. A. 1116 (2006) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>.
- [19] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 2342–2357. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>.
- [20] J. An, M.J. Trujillo-Rodríguez, V. Pino, J.L. Anderson, Non-conventional solvents in liquid phase microextraction and aqueous biphasic systems, J. Chromatogr. A. 1500 (2017) 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.012>.
- [21] H. Sereshti, P. Khorram, N. Nouri, Recent trends in replacement of disperser solvent in dispersive liquid-liquid microextraction methods, Sep. Purif. Rev. 48 (2019) 159–178. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1460851>.
- [22] M. Saraji, M.K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction Microextraction Techniques, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7467-z>.
- [23] M.I. Leong, M.R. Fuh, S. Da Huang, Beyond dispersive liquid-liquid microextraction, J. Chromatogr. A. 1335 (2014) 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021>.
- [24] J.C. Callaway, D.J. McKenna, C.S. Grob, G.S. Brito, L.P. Raymon, R.E. Poland, E.N. Andrade, E.O. Andrade, D.C. Mash, Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans, J. Ethnopharmacol. 65 (1999) 243–256. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00168-8).
- [25] E.A. Estrella-Parra, J.C. Almanza-Pérez, F.J. Alarcón-Aguilar, Ayahuasca: Uses, Phytochemical and Biological Activities, Nat. Products Bioprospect. 9

- (2019) 251–265. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0210-5>.
- [26] K.W. Tupper, The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization?, *Int. J. Drug Policy.* 19 (2008) 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2006.11.001>.
 - [27] E. Frecska, P. Bokor, M. Winkelman, The Therapeutic Potentials of Ayahuasca: Possible Effects against Various Diseases of Civilization, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00035>.
 - [28] S. Muttoni, M. Ardissono, C. John, Classical psychedelics for the treatment of depression and anxiety: A systematic review, *J. Affect. Disord.* 258 (2019) 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.07.076>.
 - [29] R.G. dos Santos, J.E.C. Hallak, Therapeutic use of serotonergic hallucinogens: A review of the evidence and of the biological and psychological mechanisms, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 108 (2020) 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.001>.
 - [30] L. Orsolini, U. Volpe, F. Vellante, S. Chiappini, D. Papanti, R. Latini, M. Fornaro, C. Tomasetti, D. De Berardis, How does ayahuasca work from a psychiatric perspective ? Pros and cons of the entheogenic therapy, (2020). <https://doi.org/10.1002/hup.2728>.
 - [31] F. Palhano-Fontes, D. Barreto, H. Onias, K.C. Andrade, M. Novaes, J. Pessoa, S. Mota-Rolim, F.L. Osorio, R. Sanches, R. dos Santos, L. Tofoli, G. Silveira, M. Yonamine, J. Riba, F.R. Santos, A.A. Silva-Junior, J. Alchieri, N. Galvao-Coelho, B. Lobao-Soares, J. Hallak, E. Arcoverde, J. Maia-de-Oliveira, D.B. de Araujo, Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomised placebo-controlled trial, *BioRxiv*. (2017) 103531. <https://doi.org/10.1101/103531>.
 - [32] Simão, Gonçalves, Duarte, Barroso, Cristóvão, Gallardo, Toxicological Aspects and Determination of the Main Components of Ayahuasca: A Critical Review, *Medicines*. 6 (2019) 106. <https://doi.org/10.3390/medicines6040106>.
 - [33] J.C. Callaway, L.P. Raymon, W.L. Hearn, D.J. McKenna, C.S. Grob, G.S. Brito, D.C. Mash, Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca., *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 492–497. <https://doi.org/10.1093/jat/20.6.492>.
 - [34] M. Yritia, J. Riba, J. Ortuno, A. Ramirez, A. Castillo, Y. Alfaro, R. De Torre, M.J. Barbanoj, Determination of N , N -dimethyltryptamine and b -carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca, *J. Chromatogr. B*. 779 (2002) 271–281.
 - [35] E.H. McIlhenny, J. Riba, M.J. Barbanoj, R. Strassman, S.A. Barker, Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 301–313. <https://doi.org/10.1002/bmc.1657>.
 - [36] C.D. Oliveira, G.G. Okai, J.L. da Costa, R.M. de Almeida, D. Oliveira-Silva, M. Yonamine, Determination of dimethyltryptamine and beta-carbolines

- (ayahuasca alkaloids) in plasma samples by LC-MS/MS, *Bioanalysis*. 4 (2012) 1731–1738. <https://doi.org/10.4155/bio.12.124>.
- [37] M.R. Meyer, A. Caspar, S.D. Brandt, H.H. Maurer, A qualitative/quantitative approach for the detection of 37 tryptamine-derived designer drugs, 5 ??-carbolines, ibogaine, and yohimbine in human urine and plasma using standard urine screening and multi-analyte approaches, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 225–237. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7425-9>.
- [38] D.R. de Morais, R. Lanaro, I.L. Barbosa, J.M. Santos, K.F. Cunha, V.V. Hernandes, E.P. Tessaro, C.S. Gomes, M.N. Eberlin, J.L. Costa, Ayahuasca and Kambo intoxication after alternative natural therapy for depression, confirmed by mass spectrometry, *Forensic Toxicol.* 36 (2018) 212–221. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0394-5>.
- [39] United Nations Office On Drugs and Crime (UNODC), Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, 2009.
- [40] Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), ASB Standard 036 , First Edition Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, *J. Anal. Toxicol.* (2018) 1–40.
- [41] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>.
- [42] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>.
- [43] F.T. Peters, D.K. Wissenbach, F.P. Busardo, E. Marchei, S. Pichini, Method Development in Forensic Toxicology, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2018) 5455–5467. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622113331>.
- [44] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 723–753. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00529-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00529-X).
- [45] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Ruggedness and robustness testing, *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.086>.
- [46] G. de Oliveira Silveira, R. Guimarães dos Santos, F. Rebello Lourenço, G. Novak Rossi, J. Hallak, M. Yonamine, Stability Evaluation of DMT and Harmala Alkaloids in Ayahuasca Tea Samples, *Molecules*. 25 (9) (2020) 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules25092072>.
- [47] D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C.R. McElroy, S. Abou-Shehada, P.J. Dunn, CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents, *Green Chem.* 18 (2015) 288–296. <https://doi.org/10.1039/c5gc01008j>.

- [48] M.A. Korany, H. Mahgoub, R.S. Haggag, M.A.A. Ragab, O.A. Elmallah, Green Chemistry : Analytical and Chromatography, 6076 (2017). <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1373672>.
- [49] H. Shaaban, T. Górecki, Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments, *Talanta.* 132 (2015) 739–752. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.050>.
- [50] H. Shaaban, New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6929–6944. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9726-2>.
- [51] J. Płotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Górecki, J. Namieśnik, Green chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1307 (2013) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>.
- [52] C. Ghosh, Green bioanalysis: Some innovative ideas towards green analytical techniques, *Bioanalysis.* 4 (2012) 1377–1391. <https://doi.org/10.4155/bio.12.31>.
- [53] H. Ebrahimi-Najafabadi, R. Leardi, M. Jalali-Heravi, Experimental design in analytical chemistry -Part I: Theory, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 3–11. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEEbrahimi1>.
- [54] S. Costa, M. Barroso, A. Castañera, M. Dias, Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: Application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2533–2542. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3447-8>.
- [55] G. Marrubini, S. Dugheri, G. Cappelli, G. Arcangeli, N. Mucci, P. Appelblad, C. Melzi, A. Speltini, Experimental designs for solid-phase microextraction method development in bioanalysis: A review, *Anal. Chim. Acta.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.012>.
- [56] L. Mousavi, Z. Tamiji, M.R. Khoshayand, Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review, *Talanta.* 190 (2018) 335–356. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.002>.
- [57] L. Vera Candioti, M.M. De Zan, M.S. Cámaras, H.C. Goicoechea, Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta.* 124 (2014) 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>.
- [58] A.V. de Bairros, R. Lanaro, R.M. de Almeida, M. Yonamine, Determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction using an essential oil as supported liquid membrane, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.04.016>.
- [59] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium - Towards elimination of

- synthetic organic solvents in sample preparation, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1511–1516. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401870>.
- [60] E. Ranjbari, A.A. Golbabanezhad-Azizi, M.R. Hadjmhommadi, Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography, *Talanta*. 94 (2012) 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.004>.
- [61] A. Amiri Pebdani, S. Dadfarnia, A.M. Haji Shabani, S. Khodadoust, M.S. Talebianpoor, Modified dispersive liquid-phase microextraction based on sequential injection solidified floating organic drop combined with HPLC for the determination of phenobarbital and phenytoin, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 509–517. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701111>.
- [62] J.M. Kokosa, Advances in solvent-microextraction techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.020>.
- [63] F. Bianchi, M. Careri, Experimental Design Techniques for Optimization of Analytical Methods. Part II: Spectroscopic and Electroanalytical Techniques, *Curr. Anal. Chem.* 4 (2008) 142–151. <https://doi.org/10.2174/157341108784587830>.
- [64] E.H. Mcilhenny, J. Riba, M.J. Barbanjo, R. Strassman, S.A. Barker, Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of the amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 970–984. <https://doi.org/10.1002/bmc.1551>.
- [65] J. Riba, M. Valle, G. Urbano, M. Yritia, A. Morte, M.J. Barbanjo, Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 (2003) 73–83. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.049882>.
- [66] K. Sebei, F. Sakouhi, W. Herchi, M.L. Khouja, S. Boukhchina, Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves, *Biol. Res.* 48 (2015) 1–5. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-48-7>.
- [67] J.M. Ben Jemâa, S. Haouel, M. Bouaziz, M.L. Khouja, Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five *Eucalyptus* essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia, *J. Stored Prod. Res.* 48 (2012) 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.001>.
- [68] USP42-NF37, Validation of Compendial Procedures, Usp. (2019) 8046. https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1225_1SUSP40.pdf.
- [69] A.F. Aubry, N. Weng, So you think your assay is robust?, *Bioanalysis*. 7 (2015) 2969–2971. <https://doi.org/10.4155/bio.15.198>.
- [70] A. Procedures, Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 20857 (1996) 301–827. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm%5Cnhttp://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

- [71] A. Mohebbi, S. Yaripour, M.A. Farajzadeh, M.R. Afshar Mogaddam, Combination of dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent-based air-assisted liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic antidep, *J. Chromatogr. A.* 1571 (2018) 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.022>.
- [72] G. Vaghari-Lahijani, M. Saber-Tehrani, P. Aberoomand-Azar, M. Soleimani, Extraction and determination of two antidepressant drugs in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction–HPLC, *J. Anal. Chem.* 73 (2018) 145–151. <https://doi.org/10.1134/S1061934818020144>.
- [73] J. Riba, M. Valle, G. Urbano, M. Yritia, A. Morte, M.J. Barbanjo, Human pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 (2003) 73–83. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.049882>.
- [74] E. Domínguez-Clavé, J. Soler, M. Elices, J.C. Pascual, E. Álvarez, M. de la F. Revenga, P. Friedlander, A. Feilding, J. Riba, Ayahuasca: pharmacology, neuroscience and therapeutic potential, *Brain Res. Bull.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.002>.
- [75] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils - A review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- [76] R. Kuttan, V.B. Liju, Safety Evaluation of Essential Oils, *Essent. Oils Food Process. Chem. Saf. Appl.* (2017) 339–358. <https://doi.org/10.1002/9781119149392.ch12>.
- [77] O. Koul, S. Walia, G.S. Dhalwal, Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints, *Biopestic. Int.* 4 (2008) 63–84. <https://doi.org/10.9734/0973-483X/08/63-84>.
- [78] A.K. Dhakad, V. V. Pandey, S. Beg, J.M. Rawat, A. Singh, Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review, *J. Sci. Food Agric.* 98 (2018) 833–848. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8600>.
- [79] Z. Yang, Toxicity and Biodegradability of Deep Eutectic Solvents and Natural Deep Eutectic Solvents, *Deep Eutectic Solvents.* (2019) 43–60. <https://doi.org/10.1002/9783527818488.ch3>.
- [80] B. Kudłak, K. Owczarek, J. Namieśnik, Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 11975–11992. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4794-y>.

Supporting Information

Table S1. Experimental matrix for the 2⁴ Full Factorial design.

Experiment t	Random Order	Sample volume (µL)	Buffer volume (µL)	Buffer pH	IS volume (µL)
1	13	100	100	10.5	100
2	6	200	100	9.5	100
3	15	100	200	10.5	100
4	14	200	100	10.5	100
5 ^a	18	150	150	10	75
6	2	200	100	9.5	50
7	3	100	200	9.5	50
8	5	100	100	9.5	100
9	16	200	200	10.5	100
10 ^a	17	150	150	10	75
11	1	100	100	9.5	50
12	7	100	200	9.5	100
13	8	200	200	9.5	100
14	4	200	200	9.5	50
15	11	100	200	10.5	50
16	12	200	200	10.5	50
17	10	200	100	10.5	50
18 ^a	19	150	150	10	75
19	9	100	100	10.5	50

^a central point.

Table S2. Experimental matrix for the Box-Behnken design.

Experiment	Random Order	Sample volume (μL)	Buffer volume (μL)	Buffer pH
1	10	150	200	9.5
2	6	200	150	9.5
3	2	200	100	10
4	11	150	100	10.5
5	5	100	150	9.5
6	4	200	200	10
7 ^a	13	150	150	10
8	1	100	100	10
9	7	100	150	10.5
10 ^a	15	150	150	10
11	12	150	200	10.5
12 ^a	14	150	150	10
13	9	150	100	9.5
14	3	100	200	10
15	8	200	150	10.5

^a central point.

Table S3. Summary of DLLME methods for the determination of psychoactive substances in human plasma.

Reference	Analyte/Class	Type	Sample Volume	Disperser solvent	Extracting solvent	pH solution	Extraction time	Optimization
[1]	Antidepressants	DLLME	0.5 mL	1.0 mL, methanol	18 µL, carbon tetrachloride	12, 1 M NaOH	2 min.	OVAT
[2]	Fentanyl and analogues	DLLME	1.25 mL	2.0 mL, methanol	162 µL, chloroform	^a , 0.5 M NaOH	10 sec.	OVAT
[3]	Methadone	DLLME	0.5 mL	2.5 mL, methanol	250 µL, chloroform	10 ^a	^b	OVAT
[4]	Opium alkaloids	DLLME-SFO	1 mL	0.5 mL, acetone	30 µL, undecanol	9, NaOH	30 sec.	OVAT
[5]	Benzodiazepines	UA-DLLME	0.5 mL	2.0 mL, methanol	250 µL, chloroform	9, ^a	2 min.	ASD
[6]	Chlordiazepoxide	DLLME	0.5 mL	1.8 mL methanol	210 µL, chloroform	7, ^a	1 min.	CCD
[7]	Antidepressants	EME-DLLME	24 mL ^c	0.15 mL, methanol	10 µL, carbon tetrachloride	12, ^a	^b	CCD
[8]	Duloxetine	DLLME-SFO	1 mL		50 µL, undecanol	10, 1M NaOH	1 min.	OVAT
[9]	Carbamazepine	SA-DLLME	3 mL	1.5 mL, CTAB	50 µL, octanol	0.2 M NaOH	^b	OVAT

Continue

Reference	Analyte/ Class	Type	Sample Volume	Disperser solvent	Extracting solvent	pH solution	Extraction time	Optimization
[10]	Opioids and cocaine	UA-DLLME	0.5 mL	3.2 mL, acetonitrile	220 μ L, chloroform	10.6, 0.5M NaOH	3.5 min.	OVAT, DD
[11]	Benzodiazepines	SA-DLLME	2.0 mL	1.0 mL, CTAB	70 μ L, octanol	9, ^a	^b	OVAT
[12]	Methadone	DLLME-SFO	1.0 mL	0.58 mL, methanol	58 μ L, undecanol	8.9, borate buffer	^b	OVAT, CCD
[13]	Antidepressants	AA-DLLME-BE	0.8 mL		95 μ L, dichloroethane	11.25, ^a	1 min.	CCD
[14]	Antidepressants	DLLME-BE	0.5 mL		100 μ L, carbon tetrachloride	13, ^a	2 min.	OVAT
[15]	Antidepressants	UA-DLLME	0.5 mL	2.0 mL, acetonitrile	200 μ L, chloroform	9, ^a	3 min.	SSD and RSM
[16]	Benzodiazepines	DLLME-BE	2.0 mL	1.0 mL, acetone	150 μ L, dodecane and butylacetate	10, 1 M NaOH and HNO ₃	2 min.	OVAT
[17]	Fluoxetine	AA-DLLME	20.0 mL ^c	0.4 mL, methanol	172 μ L, octanol	11.3, 0.1 M phosphate buffer	1 min.	PBD and BBD
[18]	Amphetamines	MSPE-DLLME	1.0 mL	1.0 mL, methanol	55 μ L, carbon disulfide	4, 2.0 M HCl and TCA	5 min.	OVAT
[19]	Antidepressants	DLLME	0.5 mL	0.2 mL, acetone	50 μ L, chlorobenzene	10.5, 0.5 M phosphate buffer	1 min.	OVAT

Continue

Reference	Analyte/Class	Type	Sample Volume	Disperser solvent	Extracting solvent	pH solution	Extraction time	Optimization
[20]	Benzodiazepines	SPE-DLLME	5.0 mL	1.5 mL, ethanol	112 µL, dichloromethane	^a	1 min.	OVAT
[21]	Citalopram	AA-DLLME	1.0 mL	0.40 mL, methanol	172 µL, octanol	10.3, ^a	1 min.	PBD and BBD
[22]	Barbiturates	DLPME-SI-SFOD	2.0 mL		30 µL, undecanol	7, ^a	^b	BBD
[23]	Antidepressants	LLE - DLLME	1.0 mL		15 µL, dibromoethane	0.25M ammonia solution	^b	OVAT
[24]	Antidepressants	A-DLLME	0.5 mL		40 µL, toluene	10, NaOH	4 min.	OVAT
[25]	Antidepressants	dSPE-DES-ALLME	1.0 mL		150 µL, ChCl: 4-chlorophenol	10, 0.5 M ammoniacal buffer	^b	OVAT
[26]	Antidepressants	UA-IL-DLLME	1.0 mL		45 µL, [C ₈ MIM][PF ₆]	11, 0.4 M NaOH	6 min.	OVAT
[27]	Antidepressants	EME-DLLME	0.1 mL	30 µL, methanol	5 µL, tetrachloroethene	12, NaOH	6 min.	OVAT

^a Not specified. ^b Minimum or not specified. ^c After dilution. **A-DLLME:** Air-dispersed liquid-liquid microextraction. **AA-DLLME:** alcohol-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **AA-DLLME-BE:** air-agitated dispersive liquid-liquid microextraction followed by back-extraction. **ASD:** asymmetrical screening design. **BBD:** Box-Behnken design. **CCD:** Central Composite Design. **CTAB:** cetyltrimethyl ammonium bromide. **DD:** Doehlert design. **dSPE-DES-ALLME:** dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction. **DLLME-SFO:** dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop. **DLPME-SI-SFOD:** Dispersive liquid-phase microextraction based on sequential injection solidified floating organic drop. **EME- DLLME:** electromembrane extraction and dispersive liquid-liquid microextraction. **LLE-DLLME:** liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction.

MSPE-DLLME: Mixed-Hemimicelle Solid Phase Extraction Followed by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **OVAT:** one-variable-at-a-time. **PBD:** Plackett-Burman design. **RSM:** response surface methodology. **SA-DLLME:** surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction. **SSD:** Symetric screening design. **TCA:** trichloroacetic acid. **UA-DLLME:** ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **UA-IL-DLLME:** ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction.

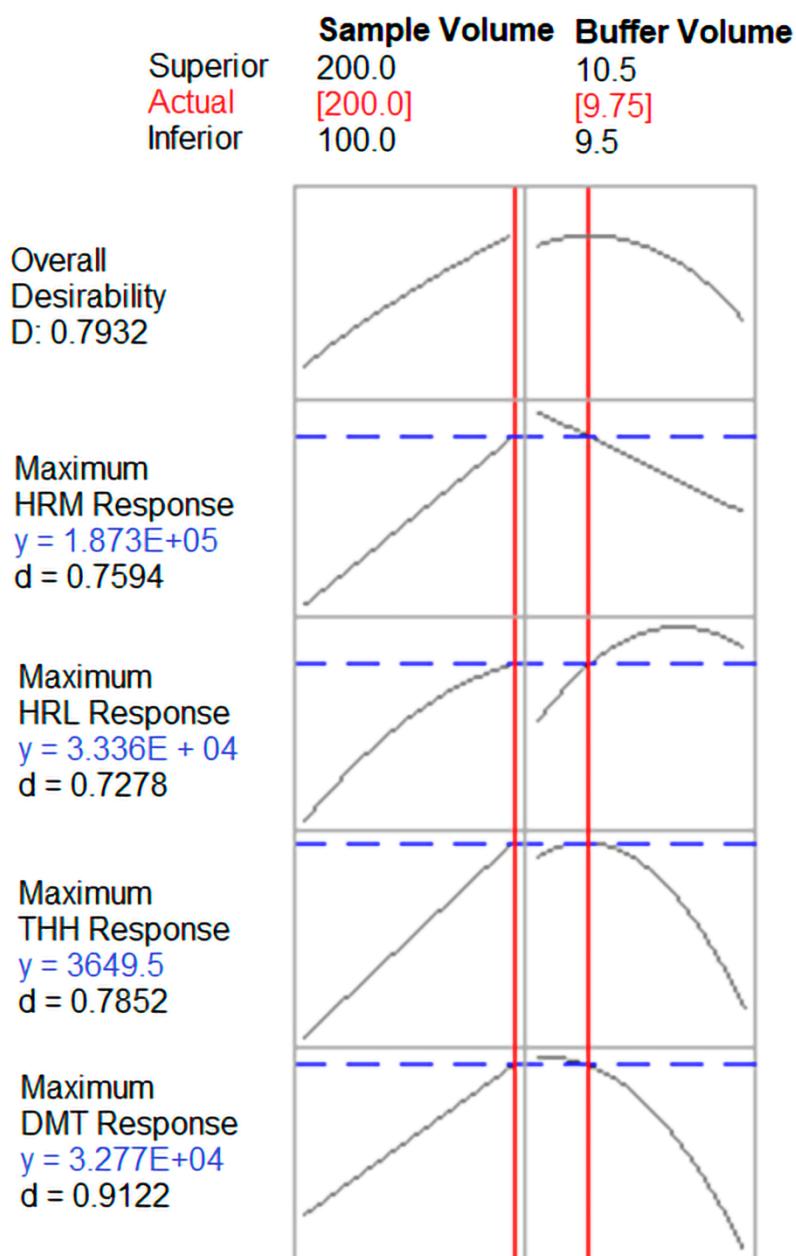


Figure S1. Optimization plots presenting the best combined response for dimethyltryptamine (DMT), tetrahydroharmine (THH), harmaline (HRL) and harmine (HRM). d: individual desirability function; D = overall desirability function. Results from Box-Behnken design.

References (Supporting Information)

- [1] A.S. Yazdi, N. Razavi, S.R. Yazdinejad, Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection, *Talanta*. 75 (2008) 1293–1299. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.039>.
- [2] M. Saraji, M. Khalili Boroujeni, A.A. Hajialiakbari Bidgoli, Comparison of

- dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2149–2158. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4874-x>.
- [3] E. Ranjbari, A.A. Golbabanezhad-Azizi, M.R. Hadjimohammadi, Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography, *Talanta*. 94 (2012) 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.004>.
 - [4] T. Ahmadi-Jouibari, N. Fattahi, M. Shamsipur, M. Pirsahab, Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection to determination of opium alkaloids in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 85 (2013) 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.030>.
 - [5] P. Fernández, C. González, M. Teresa Pena, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, 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, *Anal. Chim. Acta*. 767 (2013) 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.016>.
 - [6] S. Khodadoust, M. Ghaedi, Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design for preconcentration of chlordiazepoxide drug and its determination by HPLC-UV, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1734–1742. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300085>.
 - [7] S. Seidi, Y. Yamini, M. Rezazadeh, Combination of electromembrane extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 913–914 (2013) 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.008>.
 - [8] J.H. Suh, Y.Y. Lee, H.J. Lee, M. Kang, Y. Hur, S.N. Lee, D.H. Yang, S.B. Han, Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75 (2013) 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.041>.
 - [9] M. Behbahani, F. Najafi, S. Bagheri, M.K. Bojdi, M. Salarian, A. Bagheri, Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for preconcentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples, *J. Chromatogr. A* 1308 (2013) 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.088>.
 - [10] P. Fernández, M. Regenjo, A.M. Bermejo, A.M. Fernández, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography, *J. Appl. Toxicol.* 35 (2015) 418–425. <https://doi.org/10.1002/jat.3035>.

- [11] K. Molaei, A.A. Asgharinezhad, H. Ebrahimzadeh, N. Shekari, N. Jalilian, Z. Dehghani, Surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of nitrazepam and lorazepam from plasma and urine samples followed by high-performance liquid chromatography with UV analysis, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3905–3913. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500586>.
- [12] S. Taheri, F. Jalali, N. Fattahi, R. Jalili, G. Bahrami, Sensitive determination of methadone in human serum and urine by dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet followed by HPLC-UV, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3545–3551. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500636>.
- [13] M. Bazregar, M. Rajabi, Y. Yamini, Z. Saffarzadeh, A. Asghari, Tandem dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient method for determination of basic drugs in complicated matrices, *J. Chromatogr. A.* 1429 (2016) 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.087>.
- [14] B. Fahimirad, A. Asghari, M. Bazregar, M. Rajabi, E. Fahimi, Application of tandem dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of doxepin, citalopram, and fluvoxamine in complicated samples, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 4828–4834. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600673>.
- [15] P. Fernández, V. Taboada, M. Regenjo, L. Morales, I. Alvarez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.041>.
- [16] M. Ghambarian, F. Tajabadi, Y. Yamini, A. Esrafili, Dispersive liquid-liquid microextraction with back extraction using an immiscible organic solvent for determination of benzodiazepines in water, urine, and plasma samples, *RSC Adv.* 6 (2016) 114198–114207. <https://doi.org/10.1039/C6RA23770C>.
- [17] R. Hamedi, M.R. Hadjmohammadi, Optimization of alcohol-assisted dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design for the rapid determination of fluoxetine in biological samples, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 4784–4793. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600667>.
- [18] F. Khalilian, M. Rezaee, Mixed-hemimicelle solid phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction of amphetamines from biological samples, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 2105–2113. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160101>.
- [19] E. Lin, T. Chiu, M. Hsieh, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with acetonitrile stacking through capillary electrophoresis for the determination of three selective serotonin reuptake inhibitor drugs in body fluids, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 4841–4850. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600952>.
- [20] H.A. Mashayekhi, F. Khalilian, Development of Solid-Phase Extraction Coupled with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Simultaneous Determination of Three Benzodiazepines in Human Urine and Plasma, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 1068–1073. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw031>.

- [21] R. Hamedi, M.R. Hadjimohammadi, Application of dispersive liquid–liquid microextraction with alcoholic solvents followed by HPLC–UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of citalopram in biological samples using an experimental design, *J. Iran. Chem. Soc.* 14 (2017) 985–993. <https://doi.org/10.1007/s13738-017-1048-6>.
- [22] A. Amiri Pebdani, S. Dadfarnia, A.M. Haji Shabani, S. Khodadoust, M.S. Talebianpoor, Modified dispersive liquid-phase microextraction based on sequential injection solidified floating organic drop combined with HPLC for the determination of phenobarbital and phenytoin, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 509–517. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701111>.
- [23] M.A. Farajzadeh, M. Abbaspour, Development of new extraction method based on liquid–liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of three tricyclic antidepressants in plasma samples, *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1002/bmc.4251>.
- [24] F. Mofazzeli, H. Asaadi Shirvan, F. Mohammadi, Extraction and determination of tricyclic antidepressants in real samples using air-dispersed liquid–liquid microextraction prior to gas chromatography and flame ionization detection, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 4340–4347. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800359>.
- [25] A. Mohebbi, S. Yaripour, M.A. Farajzadeh, M.R. Afshar Mogaddam, Combination of dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent–based air–assisted liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic antidep, *J. Chromatogr. A.* 1571 (2018) 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.022>.
- [26] G. Vaghar-Lahijani, M. Saber-Tehrani, P. Aberoomand-Azar, M. Soleimani, Extraction and determination of two antidepressant drugs in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction–HPLC, *J. Anal. Chem.* 73 (2018) 145–151. <https://doi.org/10.1134/S1061934818020144>.
- [27] M. Karami, Y. Yamini, Y.A. Asl, M. Rezazadeh, On-chip pulsed electromembrane extraction as a new concept for analysis of biological fluids in a small device, *J. Chromatogr. A.* 1527 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.049>.

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

No presente estudo foi desenvolvida uma série de métodos analíticos para a determinação dos alcaloides N,N-dimetiltriptamina (DMT), tetraidro-harmina (THH), harmalina (HRL) e harmina (HRM), constituintes da bebida psicodélica *ayahuasca*. Os métodos desenvolvidos foram seguidos do uso de cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas e incluíram: (i) método de diluição para a matriz composta do chá propriamente dito, (ii) método de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) para tratamento da matriz urina, e (iii) método de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) para extração da matriz plasma. As técnicas de preparo e extração empregadas respeitam os princípios Química Analítica Verde, com ênfase na miniaturização do preparo de amostra, bem como na redução, substituição e eliminação do uso de solventes orgânicos. Além de ecologicamente viáveis, os métodos desenvolvidos apresentaram rapidez, baixo custo e promoção da segurança do analista.

Inicialmente, o conhecimento adquirido a partir do estudo da aplicação da Química Analítica Verde em contexto Forense resultou em artigo de revisão sobre o tema. No que diz respeito à análise de amostras de chá da *ayahuasca*, o método de diluição apresentado, validado em acordo com guia internacionalmente reconhecido, demonstrou excelente aplicabilidade em quarenta e seis amostras obtidas em colaborações com grupos religiosos e de pesquisa em *ayahuasca* localizados em diferentes regiões do Brasil. Adicionalmente, o método de diluição foi aplicado na determinação da estabilidade de amostras de chá submetidas a diferentes condições de armazenamento, de modo a resultar num artigo publicado no periódico *Molecules*, no qual concluiu-se a estabilidade da DMT nas condições avaliadas por um período de até 12 meses, ao passo que os alcaloides da harmala pareceram sofrer intensa flutuação quando armazendas por longos períodos ou expostas a altas temperaturas.

Ademais, o método de HF-LPME, além de ecologicamente viável, demonstrou ser aplicável quando da determinação dos alcaloides da *ayahuasca* em oito amostras autênticas de urina. O máximo desempenho da técnica foi obtido por meio da otimização com desenho experimental em duas etapas, seguida de completa validação. Tais resultados geraram a submissão de artigo no periódico *Frontiers in*

Chemistry. Por fim, a técnica de DLLME, após otimização e validação similares às anteriores, demonstrou ser promissora, tendo em vista a possibilidade da substituição de solventes orgânicos tóxicos por óleo essencial, uma alternativa de impacto ambiental negligível com origem natural, relatada pela primeira vez no presente trabalho. Tal método possibilitou a submissão de um novo artigo no periódico *Analytica Chimica Acta*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 801, n. 2, p. 317–321, 2004.
- AN, J. et al. Non-conventional solvents in liquid phase microextraction and aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1500, p. 1–23, 2017.
- 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.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998.
- ANDERSON, B. T. et al. Statement on ayahuasca. **International Journal of Drug Policy**, v. 23, n. 3, p. 173–175, 2012.
- ARAÚJO, A. M. et al. The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 8, p. 1151–1173, 2015.
- ARGENTO, E. et al. Exploring ayahuasca-assisted therapy for addiction: A qualitative analysis of preliminary findings among an Indigenous community in Canada. **Drug and Alcohol Review**, v. 38, n. 7, p. 781–789, 2019.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2–8, 2015.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- BALTUSSEN, E. et al. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) , a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. **Journal Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737–747, 1999.
- BARBOSA, P. C. R. et al. A six-month prospective evaluation of personality traits, psychiatric symptoms and quality of life in Ayahuasca-Naïve Subjects. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 41, n. 3, p. 205–212, 2009.
- BARBOSA, P. C. R. et al. Health status of ayahuasca users. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, p. 601–609, 2012.

BASTOS, F. I. P. M. et al. **III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira.** Rio de Janeiro, RJ: ICICT/FIOCRUZ, 2017.

BERLOWITZ, I. et al. Short-Term Treatment Effects of a Substance Use Disorder Therapy Involving Traditional Amazonian Medicine. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 51, n. 4, p. 323–334, 2019.

BJORNSTAD, K.; BECK, O.; HELANDER, A. A multi-component LC-MS/MS method for detection of ten plant-derived psychoactive substances in urine. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 11–12, p. 1162–1168, 2009.

BOUSO, J. C. et al. Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of ayahuasca: A longitudinal study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–13, 2012.

BOUSO, J. C. et al. Long-term use of psychedelic drugs is associated with differences in brain structure and personality in humans. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 483–492, 2015.

BRASIL. Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Brasília: Ministério da Saúde; 1998. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html> Acesso em: 30 de junho 2020.

BRASIL. Conselho Nacional sobre Drogas. Resolução CONAD nº 4 de 04 de novembro de 2004. Dispõe sobre o uso religioso e sobre a pesquisa da ayahuasca. Disponível em: <https://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-4-2004_100851.html> Acesso em 30 de junho de 2020.

BRASIL. Conselho Nacional sobre Drogas. Resolução CONAD nº 1 de 25 de janeiro de 2010. Dispõe sobre a observância, pelos órgãos da Administração Pública, das decisões do Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas - CONAD sobre normas e procedimentos compatíveis com o uso religioso da Ayahuasca e dos princípios deontológicos que o informam. Disponível em: <https://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-1-2010_113527.html> Acesso em 30 de junho de 2020.

BRIERLEY, D. I.; DAVIDSON, C. Developments in harmine pharmacology - Implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 263–272, 2012.

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

BURATO, J. S. DA S. et al. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 1, p. 202–225, 2020.

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, n. 3, p. 243–256, 1999.

CALLAWAY, J. C. Various alkaloid profiles in decoctions of Banisteriopsis caapi. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, n. 2, p. 151–155, 2005.

CALLAWAY, J. C.; BRITO, G. S.; NEVES, E. S. Phytochemical analyses of banisteriopsis caapi and psychotria viridis. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, n. 2, p. 145–150, 2005.

CAMERON, L. P. et al. Effects of N, N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 1582–1590, 2018.

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.

CARASEK, E.; MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 8–25, 2015.

CARBONARO, T. M.; GATCH, M. B. Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. **Brain Research Bulletin**, v. 126, n. 12, p. 74–88, set. 2016.

CATA-PRETA, E. G. et al. Ayahuasca and Its DMT- and β-carbolines - Containing ingredients block the expression of ethanol-induced conditioned place preference in mice: Role of the treatment environment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–14, 2018.

CHIU, M. L. et al. Matrix Effects-A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. **JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 15, n. 3, p. 233–242, 2010.

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, 2018.

DA MOTTA, L. G. et al. Maternal and developmental toxicity of the hallucinogenic plant-based beverage ayahuasca in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 77, p. 143–153, 2018.

DA SILVA, F. S. et al. Acute effects of ayahuasca in a juvenile non-human primate model of depression. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 41, n. 4, p. 280–288, 2019.

DE LA GUARDIA, M.; ARMENTA, S. Green Solvents for Analytical Separation and Analyses. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation**. Nova Jersey, USA: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

DE MORAIS, D. R. et al. Ayahuasca and Kambo intoxication after alternative natural therapy for depression, confirmed by mass spectrometry. **Forensic Toxicology**, v. 36, n. 1, p. 212–221, 2018.

DE OLIVEIRA SILVEIRA, G. et al. Stability Evaluation of DMT and Harmala Alkaloids in Ayahuasca Tea Samples. **Molecules**, v. 25 (9), n. 2072, p. 1–11, 2020.

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.

DOMÍNGUEZ-CLAVÉ, E. et al. Ayahuasca: Pharmacology, neuroscience and therapeutic potential. **Brain Research Bulletin**, v. 126, p. 89–101, 2016.

DOMÍNGUEZ-CLAVÉ, E. et al. Ayahuasca improves emotion dysregulation in a community sample and in individuals with borderline-like traits Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modelling and Simulation. p. 573–580, 2019.

DOS SANTOS, R. G. et al. The current state of research on ayahuasca: A systematic review of human studies assessing psychiatric symptoms, neuropsychological functioning, and neuroimaging. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 12, p. 1230–1247, 2016.

DOS SANTOS, R. G.; HALLAK, J. E. C. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. **Epilepsy and Behavior**, p. 2–7, 2019. In Press.

DOS SANTOS, R. G.; HALLAK, J. E. C. Therapeutic use of serotonergic hallucinogens: A review of the evidence and of the biological and psychological mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 108, p. 423–434, 2020.

DUNLAP, L. E. et al. Identification of Psychoplastogenic N, N-Dimethylaminoisotryptamine (isoDMT) Analogues through Structure-Activity Relationship Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 1142–1155, 2020.

DWAMENA, A. K. Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction. **Separations**, v. 6, n. 1, 2019.

EISERT, R.; PAWLISZYN, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 16, p. 3140–3147, 1997.

ELLER, S. et al. A rapid analytical strategy for the determination of ayahuasca alkaloids in non-ritualistic approaches by UHPLC-MS/MS. **Forensic Science International**, v. 312, 2020.

ES'HAGHI, Z.; EBRAHIMI, M.; HOSSEINI, M. S. Optimization of a novel method for determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in hair and waste water samples by carbon nanotubes reinforced sol-gel based hollow fiber solid phase microextraction and gas chromatography using factorial ex. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3400–3406, 2011.

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.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 44–62, 2017.

FOTIOU, E.; GEARIN, A. K. Purging and the body in the therapeutic use of ayahuasca. **Social Science and Medicine**, v. 239, p. 1–9, 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.

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

GALVÃO, A. C. D. M. et al. Cortisol modulation by ayahuasca in patients with treatment resistant depression and healthy controls. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, p. 1–10, 2018.

GAMBELUNGHE, C. et al. Identification of N,N-dimethyltryptamine and β-carbolines in psychotropic ayahuasca beverage. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 1056–1059, 2008.

GAUJAC, A. et al. Analytical techniques for the determination of tryptamines and beta-carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, p. 636–648, 2012.

GAUJAC, A. et al. Determination of N,N-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry. **Talanta**, v. 106, p. 394–8, 2013.

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

GJELSTAD, A.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 3, p. 921–928, 2009.

GLASS-COFFIN, B. Shamanism and San Pedro through Time: Some notes on the archaeology, history, and continued use of an entheogen in northern Peru. **Anthropology of Consciousness**, v. 21, n. 1, p. 58–82, 2010.

GODINHO, A. F. et al. Ayahuasca Modifies Amphetamine Self Ingestion and Modifies Anxiety and Locomotor Activity in Adolescent Rats. **Electronic Journal of Biology**, v. 13, 2017.

GONZÁLEZ, D. et al. Therapeutic potential of ayahuasca in grief: a prospective, observational study. **Psychopharmacology**, v. 237, p. 1171–1182, 2020.

GUIMARÃES DOS SANTOS, R. Safety and Side Effects of Ayahuasca in Humans-An

Overview Focusing on Developmental Toxicology. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 45, n. 1, p. 68–78, 2013.

HAMIDI, S.; ALIPOUR-GHORBANI, N.; HAMIDI, A. Solid Phase Microextraction Techniques in Determination of Biomarkers. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 239–251, 2018.

HAMILL, J. et al. Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 2, p. 108–128, 2018.

HUHN, C. et al. Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence-electrospray ionization-mass spectrometry: A case study. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7–8, p. 1389–1397, 2005.

JAIN, R.; SINGH, R. Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 227–237, 2016.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236–2240, 1996.

JIMÉNEZ-GARRIDO, D. F. et al. Effects of ayahuasca on mental health and quality of life in naïve users: A longitudinal and cross-sectional study combination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

KALJURAND, M.; KOEL, M. Green Bioanalytical Chemistry. In: DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. (Eds.) . **Handbook of Green Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012. p. 425–447.

KEITH, L. H.; GRON, L. U.; YOUNG, J. L. Green analytical methodologies. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2695–2708, 2007.

KOEL, M. Do we need Green Analytical Chemistry? **Green Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 923–931, 2016.

KOKOSA, J. M. Trends in Analytical Chemistry Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 238–247, 2019.

LABATE, B. C.; CAVNAR, C.; GEARIN, A. K. The shifting journey of ayahuasca in diaspora. In: LABATE, B. C.; CAVNAR, C.; GEARIN, A. K. (Eds.). **The World Ayahuasca Diaspora: Reinventions and Controversies**. 1st. ed. New York: Routledge, 2017. p. 1–16.

LABATE, B. C.; FEENEY, K. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: Implications and challenges. **International Journal of Drug Policy**, v. 23, n. 2, p. 154–161, 2012.

LAFRANCE, A. et al. Nourishing the Spirit: Exploratory Research on Ayahuasca Experiences along the Continuum of Recovery from Eating Disorders. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 49, n. 5, p. 427–435, 2017.

LANARO, R. et al. 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.

LESIAK, A. D.; MUSAH, R. A. Application of ambient ionization high resolution mass spectrometry to determination of the botanical provenance of the constituents of psychoactive drug mixtures. **Forensic Science International**, v. 266, p. 271–280, 2016.

LIU, S.; DASGUPTA, P. K. Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 2042–2049, 1995.

LOIZAGA-VELDER, A.; VERRES, R. Therapeutic Effects of Ritual Ayahuasca Use in the Treatment of Substance Dependence-Qualitative Results. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 46, n. 1, p. 63–72, 2014.

MADEJ, K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 436–446, 2009.

MARRUBINI, G. et al. Experimental designs for solid-phase microextraction method development in bioanalysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1119, p. 77–100, 2020.

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.

MCILHENNY, E. H. et al. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 51, p. 8960–8968, 2009.

MCILHENNY, E. H. et al. 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, 2011.

MCILHENNY, E. H. et al. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 3, p. 301–313, 2012.

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.

MCKENNA, D.; RIBA, J. New World Tryptamine Hallucinogens and the Neuroscience of Ayahuasca. In: NICHOLS, D. E.; HALBERSTADT, A. L.; VOLLENWEIDER, F. X. (Eds.). **Behavioral Neurobiology of Psychedelic Drugs**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016. p. 283–311.

MELLO, S. M. et al. Effect of Ritualistic Consumption of Ayahuasca on Hepatic Function in Chronic Users. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 51, n. 1, p. 3–11, 2019.

MEYER, M. R. et al. A qualitative/quantitative approach for the detection of 37 tryptamine-derived designer drugs, 5 beta-carbolines, ibogaine, and yohimbine in human urine and plasma using standard urine screening and multi-analyte approaches. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 1, p. 225–237, 2014.

MILLER, M. J. et al. Chemical evidence for the use of multiple psychotropic plants in a 1,000-year-old ritual bundle from South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 166, n. 23, p. 11207–11212, 2019.

MOURA, S. et al. qNMR: An applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 79–83, 2010.

MUTTONI, S.; ARDISSINO, M.; JOHN, C. Classical psychedelics for the treatment of depression and anxiety: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 258, p. 11–24, 2019.

OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A. et al. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 8–23, 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, 2009.

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, 2015.

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

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.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 817, n. 1, p. 3–12, 2005.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 2, p. 183–190, 2006.

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.

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.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; NAMIEŚNIK, J. Green Chemistry and Sustainable Technology Green Analytical Chemistry. **Green Analytical Chemistry**, p. 449, 2019.

POPE, J. D. et al. Harmala Alkaloids Identify Ayahausca Intoxication in a Urine Drug Screen. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. e23–e27, 2019.

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

PRELLER, K. H.; VOLLENWEIDER, F. X. Phenomenology, Structure, and Dynamic of Psychedelic States. **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**, v. 36, p. 221–256, 2017.

REIFF, C. M. et al. Psychedelics and Psychedelic-Assisted Psychotherapy. **The American Journal of Psychiatry**, v. 177, n. 5, p. 391–410, 2020.

REZAEE, 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, 2006.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, 2010.

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. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 73–83, 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. 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.

SANTOS, H. M.; CAPELO, J. L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. **Talanta**, v. 73, n. 5, p. 795–802, 2007.

SANTOS, M. C.; NAVICKIENE, S.; GAUJAC, A. Determination of tryptamines and β -carbolines in Ayahuasca beverage consumed during brazilian religious ceremonies. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 820–824, 2017.

SANTOS, R. G. et al. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 507–513, 2007.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction Microextraction Techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2027–2066, 2014.

SAYIN, Ü. A Comparative Review of the Neuro- Psychopharmacology of Hallucinogen-Induced Altered States of Consciousness: The Uniqueness of Some Hallucinogens. **NeuroQuantology**, v. 10, n. 2, p. 316–340, 2012.

SERESHTI, H.; KHORRAM, P.; NOURI, N. Recent trends in replacement of disperser solvent in dispersive liquid-liquid microextraction methods. **Separation and Purification Reviews**, v. 48, n. 2, p. 159–178, 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.

SIMÃO et al. Toxicological Aspects and Determination of the Main Components of Ayahuasca: A Critical Review. **Medicines**, v. 6, n. 4, p. 106, 2019.

SOUZA, R. C. Z. et al. Validation of an analytical method for the determination of the main ayahuasca active compounds and application to real ayahuasca samples from Brazil. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1124, p. 197–203, 2019.

SPIETELUN, A. et al. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, v. 119, p. 34–45, 2014.

SZMULEWICZ, A. G.; VALERIO, M. P.; SMITH, J. M. Switch to mania after ayahuasca consumption in a man with bipolar disorder: a case report. **International Journal of Bipolar Disorders**, v. 3, n. 4, p. 1–3, 2015.

TAVARES, L. et al. Investigation of Ayahuasca β-Carboline Alkaloids and Tryptamine in Sweat Samples from Religious Community Participants by GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, n. 6, p. 1–9, 2020.

TOBISZEWSKI, M. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 2993–2999, 2016.

TUPPER, K. W. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? **International Journal of Drug Policy**, v. 19, n. 4, p. 297–303, 2008.

TURNER, C. Sustainable analytical chemistry—more than just being green. **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 2217–2229, 2013.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs**

in Seized Materials and Biological Specimens. New York, USA: United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8, 2009.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. World Drug Report: Cannabis and Hallucinogens. Vienna, Austria: United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8, 2019.

WANG, Y. H. et al. Composition, standardization and chemical profiling of Banisteriopsis caapi, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 662–671, 2010.

WILCOCKSON, J. B.; GOBAS, F. A. P. C. Thin-film solid-phase extraction to measure fugacities of organic chemicals with low volatility in biological samples. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 7, p. 1425–1431, 2001.

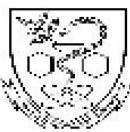
YRITIA, M. et al. Determination of N,N-dimethyltryptamine and β-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. **Journal of Chromatography B**, v. 779, p. 271–281, 2002.

ZEIFMAN, R. J. et al. The impact of ayahuasca on suicidality: Results from a randomized controlled trial. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1–10, 2019.

ZHAO, T. et al. Metabolic pathways of the psychotropic-carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1096–1105, 2012.

ANEXO I

Parecer Consustanciado 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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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: 2

CAAE: 66093117.1.0000.0067

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

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.267.476

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer anterior, o pesquisador atendeu a recomendação deste CEP, no que tange a inclusão de “risco moderado por alucinação”, tendo em vista a ingestão do chá em estudo, Unidade Bárico de Saúde de Capela do Alto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer anterior

Recomendações:

Conforme parecer anterior

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram adequadamente atendidas.

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

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

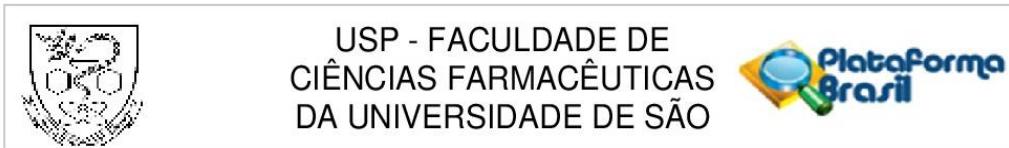
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 2.267.476

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_874855.pdf	23/06/2017 14:37:56		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
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, 11 de Setembro de 2017

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

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	

APÊNDICE I

Quadro de Informações Adicionais sobre Amostras de Chá da *Ayahuasca*

Amostra	Colaborador, Instituição	Data de preparo	Data de análise	Grupo religioso, Local
AYA 018	Rafael Guimarães dos Santos, USP	Junho de 2016	Agosto de 2017	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 019	Rafael Guimarães dos Santos, USP	*	Agosto de 2017	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 100	Tânia Marcourakis, USP	*	Agosto de 2017	*
AYA Q	Tânia Marcourakis, USP	*	Agosto de 2017	*
AYA 020	Dráulio Barros de Araújo, UFRN	Novembro de 2013	Outubro de 2017	Barquinha, Ji-Paraná - RO
AYA 021	Dráulio Barros de Araújo, UFRN	Novembro de 2013	Outubro de 2017	Barquinha, Ji-Paraná - RO
AYA 022	Dráulio Barros de Araújo UFRN	Novembro de 2013	Outubro de 2017	Barquinha, Ji-Paraná - RO
AYA 023	Dráulio Barros de Araújo UFRN	Novembro de 2013	Outubro de 2017	Barquinha, Ji-Paraná - RO
AYA 024	Rafael Guimarães dos Santos, USP	Junho de 2016	Fevereiro de 2018	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 025	Rafael Guimarães dos Santos, USP	*	Fevereiro de 2018	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 026	Tânia Marcourakis, USP	*	Fevereiro de 2018	*
AYA 027	Rafael Guimarães dos Santos, USP	Junho de 2016	Outubro de 2018	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 028	Rafael Guimarães dos Santos, USP	*	Outubro de 2018	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 031	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2018	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 032	Francisney Pinto Nascimento, UFABC	Julho - Dezembro 2017	Outubro de 2018	Tribo Huni Kuin, Acre
AYA 033	Francisney Pinto Nascimento, UFABC	Julho - Dezembro 2017	Outubro de 2018	Tribo Huni Kuin, Acre
AYA 034	Rafael Guimarães dos Santos, USP	Junho de 2016	Outubro de 2018	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP

Continua

Continuação

Amostra	Colaborador, Instituição	Data de preparo	Data de análise	Grupo religioso, Local
AYA 035	Rafael Guimarães dos Santos, USP	*	Outubro de 2018	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 036	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2018	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 037	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2018	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 039	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Fevereiro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 040	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Fevereiro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 041	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Fevereiro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 042	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Fevereiro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 043	Rafael Guimarães dos Santos, USP	Junho de 2016	Fevereiro de 2019	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 044	Rafael Guimarães dos Santos, USP	*	Fevereiro de 2019	Santo Daime, Ribeirão Preto - SP
AYA 047	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Maio de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 048	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Maio de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 049	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Maio de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 050	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Maio de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 051	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Maio de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 052	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Maio de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 053	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP

Continua

Continuação

Amostra	Colaborador, Instituição	Data de preparo	Data de análise	Grupo religioso, Local
AYA 054	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 055	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 056	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 057	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 058	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 059	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 060	Fulvio Rieli Mendes, UFABC	Agosto de 2018	Outubro de 2019	UDV, Mogi das Cruzes - SP
AYA 061	Cristina Aparecida Jark Stern, UFPR	2017	Outubro de 2019	UDV, Curitiba - PR
AYA 062	Francisco Cid Coelho Pinto, UFC	Março de 2019	Fevereiro de 2020	UDV, Fortaleza - CE
AYA 063	Francisco Cid Coelho Pinto, UFC	Outubro de 2019	Fevereiro de 2020	UDV, Fortaleza - CE
AYA 064	Francisco Cid Coelho Pinto, UFC	Outubro de 2019	Fevereiro de 2020	UDV, Fortaleza - CE
AYA 065	Francisco Cid Coelho Pinto, UFC	Outubro de 2019	Fevereiro de 2020	UDV, Fortaleza - CE
AYA 066	Francisco Cid Coelho Pinto, UFC	Agosto de 2019	Fevereiro de 2020	UDV, Fortaleza - CE

Conclusão.

Fonte: a autora. * Informação não disponível.

USP: Universidade de São Paulo. UFRN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. UFABC: Universidade Federal do ABC. UFPR: Universidade Federal do Paraná. UFC: Universidade Federal do Ceará. UDV: União do Vegetal.