

# Desenvolvimento de método analítico para determinação de MDMA e derivados anfetamínicos em drogas apreendidas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica

## XXIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Palavras-Chave: Toxicologia Forense, Cromatografia Líquida, N-Metil-3,4-Metilenodioxianfetamina, Produtos Apreendidos.

**Autores:**

**João V A Brossi [FCF - Unicamp]**

**Prof. Dr. José Luiz da Costa (orientador) [FCF - Unicamp]**

### INTRODUÇÃO:

#### 1. *Ecstasy*

O *ecstasy* é uma droga utilizada principalmente por jovens, que procuram nele os efeitos do princípio ativo 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), que incluem euforia, melhora na autoconfiança, maior percepção dos sentidos, melhor sociabilidade e conexão com outras pessoas. Porém essa droga vai muito além disso, tanto nos efeitos quanto na composição.

Em 2017, foram estimados 21,3 milhões de usuários de *ecstasy* (1). A dose recreacional é em torno de 1 a 2 comprimidos, cada um com um intervalo médio de 60 a 120 mg de MDMA, o que representa 0,75 a 4 mg/kg, para pessoas de 60 a 80 kg, e os efeitos agudos podem durar de 4 a 6 horas (2).

Uma das consequências imediatas do consumo de *ecstasy* mais conhecida é a hipertermia, a qual contribui para outros

efeitos sistêmicos graves, que se deve à estimulação dos receptores alfa e beta-adrenérgicos, além da ativação do sistema simpático-adrenal. Em consequência, observa-se a desnaturação protéica das fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise). Assim como as demais drogas inibidoras da MAO, o *ecstasy* pode causar necrose hepática maciça. Nos rins, observa-se acúmulo de proteínas nos capilares glomerulares e interstício renal, levando à glomerulonefrite e à necrose tubular, gerando insuficiência renal aguda. O metabolismo natural do organismo também é afetado pelo *ecstasy* e culmina em alterações, tais como: acidose, hipercalemia, hiponatremia e secreção intensa de hormônio antidiurético (3).

#### 2. Composição usual do *ecstasy*

O *ecstasy* é comercializado comumente na forma de comprimidos de bom aspecto físico, de grande variedade de cores,

formas e tamanhos, estampados com diferentes figuras e logotipos. À semelhança de outras drogas vendidas no mercado ilícito, não existe controle sobre a composição destes comprimidos, podendo existir grande variação no que diz respeito a quantidade e ao tipo de princípio ativo (4-6).

Comprimidos vendidos como *ecstasy* nem sempre contém a MDMA (7). Analisando comprimidos apreendidos na Holanda, Vogels e colaboradores (2009) identificaram a presença das substâncias metanfetamina, 2,5-dimetoxi-4-bromofeniletamina (2-CB), 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB), p-metoxi-metanfetamina (PMA), m-clorofenilpiperazina (mCPP), benzilpiperazina (BZP), atropina, cetamina, lidocaína, procaína, efedrina e cafeína. Cole e colaboradores (2002) analisaram 136 amostras de comprimidos apreendidos no Reino Unido durante o ano de 2001 e observaram que a quantidade de MDMA presente nestes comprimidos possuiu grande variação (entre 20 e 109 mg de MDMA por comprimido).

No Brasil, estudo realizado pela Polícia Científica do Estado de São Paulo mostrou que comprimidos provenientes de apreensões varia mais de 7 vezes (5). Outro estudo realizado em São Paulo identificou 20 substâncias nos comprimidos apreendidos. O MDMA estava presente em apenas 44,7% (embora não tenham sido encontrados seus análogos MDA e MDEA) dessas apreensões analisadas, enquanto 22% continham metanfetamina e 6,67, cafeína com cetamina e clorobenzorex (7).

Vê-se também que a variabilidade dentro do lote e entre lotes de comprimidos é muito alta, como mostrada por (8). Dessa forma, com a comparação feita no estudo, no mesmo lote, um comprimido pode ter mais de 12 vezes a concentração de outro, e entre lotes, mais de sete vezes (8).

## **METODOLOGIA:**

### **1. Reagentes**

Os reagentes utilizados para preparo de amostras e análise cromatográfica (metanol, acetonitrila, trietilamina, ácido fosfórico) estavam disponíveis no laboratório. A água utilizada foi ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Materiais de referência das substâncias investigadas (MDMA, MDEA, MDA, anfetamina, metanfetamina, fentermina) foram adquiridos da empresa Cerilliant (Round Rock, EUA).

### **2. Procedimento analítico**

Todo desenvolvimento e validação do método será realizado com materiais certificados (padrões) disponíveis comercialmente e isentos de controle de acordo com a legislação vigente.

Após o desenvolvimento e validação do método, serão analisados comprimidos de drogas sintéticas apreendidos pelas forças policiais do Estado de São Paulo e encaminhados para exame pericial nos Núcleos de Perícias Criminalísticas de Campinas, Instituto de Criminalística, Superintendência da Polícia Técnico Científica de São Paulo. As amostras serão trazidas para análise no laboratório por um

Perito Criminal, que acompanhará todas as análises e ficará responsável pela destinação do excedente do material (nenhum material das amostras ficará guardado na UNICAMP).

As análises serão realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector espectrofotométrico ultravioleta e visível (HPLC Primaide, Hitachi, Japão). A separação dos compostos será realizada em coluna cromatográfica de sílica monolítica Chromolith® (100 mm x 4,6 mm) com fase estacionária C18, mantida a 30 °C. A separação dos analitos será feita utilizando fase móvel A composta de 0,1% de trietilamina em água ultrapura (pH=3,0, ajustado com ácido fosfórico), e fase móvel B de metanol 100% (eluição isocrática 95:5 v/v). A vazão da fase móvel está ajustada para 2 mL/min. A detecção será realizada em 210 nm. A identificação dos analitos será pelo tempo de retenção previamente definido por uma solução padrão.

### 3. Validação do método

Antes da análise das amostras, o procedimento será validado acordo com guias internacionais de validação para análises de drogas apreendidas (9). Para isso, o método será validado considerando os parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação).

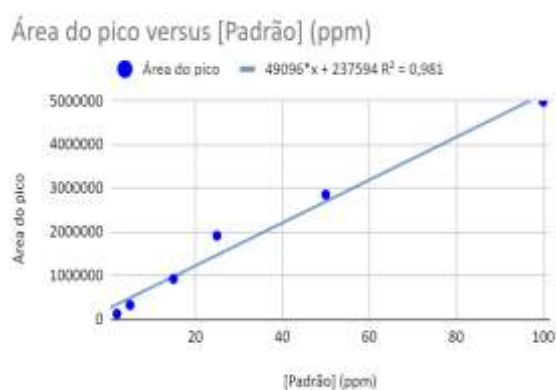
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 1. Curva de calibração e linearidade

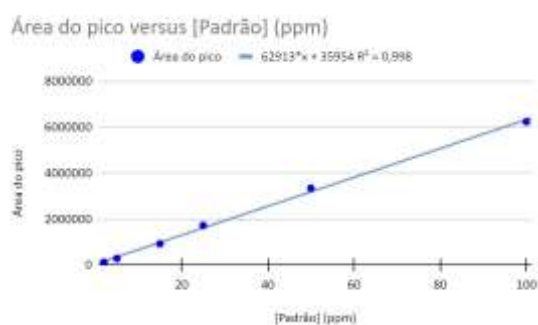
Com base no preparo de amostras e concentrações dos comprimidos geralmente

encontrados na literatura, fizemos uma curva de 6 pontos, sendo eles de 2, 5, 15, 25, 50 e 100 mg/L.

Os testes com o padrão não se mostraram lineares em algumas análises (gráfico 1), indicando alterações necessárias a serem feitas no fluxo, fase móvel ou ponderação. Após algumas alterações realizadas nos parâmetros referidos, houve uma melhora da linearidade (gráfico 2).



**Gráfico 1:** Relação entre a área do pico e a concentração do padrão, montando uma relação de linearidade, que foi utilizada para o cálculo das concentrações.



**Gráfico 2:** Relação entre a área do pico e a concentração do padrão, montando uma relação de linearidade, que foi utilizada para o cálculo das concentrações.

Posteriormente, para facilitar o preparo dos padrões, a curva foi atualizada para os

pontos de 1, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L, sem alterar a qualidade da linearidade.

## 2. Testes de repetibilidade e *carryover*

Nas concentrações mais baixa e alta da curva de calibração, 2 e 100 mg/L (posteriormente 1 e 50 mg/L), respectivamente, foi feito um teste de repetibilidade e detecção de *carryover*, repetindo a injeção do padrão 4 vezes em ambas concentrações. Como o equipamento não possui amostrador automático, foi detectado *carryover* devido a higienização da seringa de injeção. Após alguns testes concluiu-se que lavar a seringa 15 vezes com acetonitrila 100% deixa uma margem segura para impedir o *carryover* por esse motivo (5,7).

## 3. Colunas cromatográficas

Em comparação às colunas particuladas comuns, a Chromolith®, inteiriça, permite análises bem mais rápidas, visto que tem gera uma menor pressão relativa ao fluxo de fase móvel. Isso dado por sua estrutura bimodal, com meso e macroporos, que conferem uma alta área de adsorção e passagem de elevado fluxo de fase móvel a baixa pressão, respectivamente. Além disso, ela também possui uma boa flexibilidade à mudança de fluxo, agilizando o condicionamento do equipamento antes e durante as análises e sua vida útil aumenta significativamente, ponto muito importante para a rotina forense (10).

## 4. Variáveis da fase móvel (FM)

- Testes de resolução verificando a proporção de FM

Após a troca da coluna, foram feitos testes com a proporção de fase móvel, visando encontrar alguma que melhorasse o número de pratos entre os compostos, principalmente entre a metanfetamina e a fentermina, buscando então uma melhor resolução do cromatograma.

Dessa forma os testes foram feitos com o padrão de MDMA, com fluxo fixo, variando as proporções de fase móvel inorgânica:orgânica, em porcentagem, nos seguintes valores 90:10, 92,5:7,5, 95:5 e 97,5:2,5 (5). Analisando o número de pratos teóricos, resolução e pensando na vida útil da coluna foram consideradas as opções de 95:5, com 5% de fase B de metanol 100%, e 92,5:7,5, com 7,5% de fase B de metanol 100%.

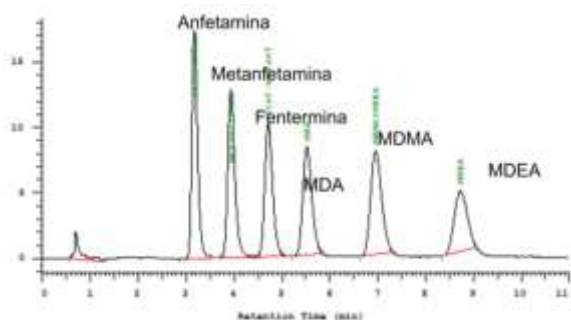
Subst(%)	Res(2,5)	Res(5,0)	Res(7,5)	Res(10)	N(2,5)	N(5,0)	N(7,5)	N(10)
Anfetamina	-	-	-	-	3781	3420	3180	2980
Metanfetamina	4,27	3,19	2,37	1,76	3900	3525	3273	3000
Fentermina	3,73	2,75	2,07	1,54	4316	3878	3583	3327
MDA	3,30	2,47	1,76	1,34	4280	3970	3557	3090
MDMA	2,36	3,68	4,39	1,80	4851	4192	3806	3500
MDEA	2,53	3,76	1,736	-	-	4614	3780	3500

**Tabela 3:** Compilação dos resultados do teste apresentados pelo software. Em verde e vermelho estão os melhores e piores resultados, respectivamente, para cada analito. Legenda: Res = resolução; N = número de pratos teóricos; os números entre parênteses após Res e N representam a proporção em porcentagem de fase móvel B.

## CONCLUSÕES:

O desenvolvimento do método está quase pronto, faltando sua validação e então

começar as análises das amostras. A ordem dos analitos na curva de calibração é anfetamina, metanfetamina, fentermina, MDA, MDMA e MDEA (figura 1).



**Figura 1:** Ordem dos anfetamínicos no cromatograma.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Drug Report - United Nations Office on Drugs and Crime (2019).
2. Morgan, Michael John. "Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects." *Psychopharmacology* 152.3 (2000): 230-248.
3. Souza, Larissa M. Veloso, et al. "Revisão toxicológica e tratamento da intoxicação pelo êxtase." *Revista Neurociências* 11.1 (2003): 18-22.
4. Vogels N, Brunt TM, Rigter S, van Dijk P, Vervaeke H, Niesink RJ. Content of ecstasy in the Netherlands: 1993-2008. *Addiction*. 2009;104(12):2057-66.
5. Costa Jld, Pintao ER, Corrigliano CMC, Neto ON. Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de Ecstasy por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF). *Quim Nova*. 2009;32(4):965-9.
6. Lasmar MC, Leite EMA. Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico em fase gasosa para análise da 3,4-

metilenodioximetanfetamina (ecstasy) e outros derivados anfetamínicos em comprimidos. *Rev Bras Ciências Farm*. 2007;43(2):223-30.

7. Togni, Loraine R., et al. "The variability of ecstasy tablets composition in Brazil." *Journal of forensic sciences* 60.1 (2015): 147-151.

8. Costa, José Luiz da, et al. "Determinação de 3, 4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de Ecstasy por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF)." *Química Nova* 32.4 (2009): 965-969.

9. 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 [Available from: [http://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf)].

10. Chromolith® HPLC Columns | Analytics and Sample Preparation. Merck, 2013. Disponível em: <[https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/chromolith-hplc-columns/Rk2b.qB.cMMAAAE\\_hPB3.Lxi,nav#benefits](https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/chromolith-hplc-columns/Rk2b.qB.cMMAAAE_hPB3.Lxi,nav#benefits)>. Acesso em: 5 de março de 2021 .