

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANÁLISE DE EFEDRINAS E ANFETAMINA EM URINA EMPREGANDO

SPE E SPME POR CG/EM/EM

VIVIANE CRISTINA SEBBEN

PORTO ALEGRE, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANÁLISE DE EFEDRINAS E ANFETAMINA EM URINA EMPREGANDO

SPE E SPME POR CG/EM/EM

Dissertação apresentada por

Viviane Cristina Sebben para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^ª. Dr. Renata Pereira Limberger

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.08.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carmem Regla Vargas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Flávia Valadão Thiesen
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Sílvia Spalding
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Solange Cristina Garcia
Universidade Federal de Santa Maria

S443a Sebben, Viviane Cristina

Análise de efedrinas e anfetamina em urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM / Viviane Cristina Sebben – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xvi, 127 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Anfetaminas. 2. Efedrina. 3. Extração em fase sólida. 4. Microextração em fase sólida. 5. Cromatografia gasosa. 6. Espectrometria de massa. 7. Uroanálise. I. Limberger, Renata Pereira. II. Título.

CDU: 615.9:616-074.12

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido com orientação da Prof^a. Dr. Renata Pereira Limberger nos laboratórios de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Núcleo de Análise Laboratorial do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul da Fundação Estadual de Produção Pesquisa em Saúde (NAL/CIT/FEPPS) que disponibilizou todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr. Renata Pereira Limberger pela dedicação, amizade, compreensão e oportunidade de realizar esta dissertação.

À Prof^ª. Dr. Vera Maria Steffen pelo apoio, confiança, incentivo, dedicação, pelo amor a profissão, pelo conhecimento sempre compartilhado e principalmente pela amizade.

À Química Prof^ª. Dr. Adriana Mendes Aleixo, da Faculdade de Farmácia da Universidade Metodista de Piracicaba (Piracicaba, SP), pelas discussões e revisões na parte de desempenho dos reagentes de derivatização.

Aos meus amigos do coração Marcelo e Fabiane sem eles este mestrado não teria acontecido.

À Kátia pela amizade e paciência.

Aos bolsistas Guilherme, Elisa, Carol e, principalmente, a Patrícia pelo auxílio na execução dos experimentos e pela amizade.

Aos farmacêuticos, auxiliares e bolsistas do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia/UFRGS, por todo apoio e incentivo.

Ao diretor Alberto Nicoletta e ao coordenador do núcleo de análise e prevenção do CIT/RS Hudson Abella por permitirem e apoiarem a realização deste trabalho no NAL/CIT/FEPPS.

À Renata, Rose, Iolanda, Iodete, Sandra e estagiários do NAL/CIT/FEPPS pela compreensão, auxílio e apoio durante o período de realização deste trabalho.

À minha mãe Élia, por todo amor, aos meus irmãos Vera, Roseli e Roberto, aos meus sobrinhos Jean Pierre, Pablo César, Víctor Augusto e meus cunhados César e Maria de Lurdes, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivos Gerais.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 Compostos Anfetamínicos.....	13
3.1.1 Aspecto geral.....	13
3.1.2 Relação estrutura atividade.....	14
3.1.3 Padrões de uso.....	19
3.1.4 Toxicocinética.....	22
3.1.5 Toxicodinâmica.....	24
3.1.6 Dependência e tolerância.....	25
3.1.7 Efeitos tóxicos.....	25
3.2 Metodologias Analíticas.....	26
3.2.1 Imunoensaio enzimático homogêneo (EMIT).....	26
3.2.2 Cromatografia a gás/espectrometria de massas/massas (CG/EM/EM).....	27
3.3 Métodos de Preparo de Amostras.....	28
3.3.1 Extração líquido-líquido (ELL).....	28
3.3.2 Extração em fase sólida (SPE).....	29
3.3.3 Microextração em fase sólida (SPME).....	31
3.4 Derivatização.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Amostras.....	39
4.2 Soluções-padrão.....	39
4.3 Análises de Triagem por EMIT.....	39
4.4 Análises Confirmatórias por CG/EM.....	40
4.5 Estudo dos Reagentes de Derivatização (RD).....	42
4.5.1 Reagentes de derivatização (RD).....	42
4.5.2 Sistemas de solventes (SS).....	42
4.5.3 Procedimentos empregados nos estudos de RD e SS.....	43
4.5.4 Determinação das condições de tempo e temperatura de derivatização.....	44
4.5.5 Tempo de estabilidade do derivado formado.....	44
4.6 Métodos de Extração.....	45
4.6.1 Extração líquido-líquido (ELL).....	45
4.6.2 Extração em fase sólida (SPE).....	45
4.6.3 Microextração em fase sólida (SPME).....	48
4.7 Validação do Método Analítico.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Escolha do Reagente de Derivatização (RD).....	53
5.1.1 Anidrido acético (AA).....	54
5.1.2 Anidrido acético+piridina (AA+P; 3:1, v/v).....	60
5.1.3 Anidrido trifluoroacético (ATFA).....	62
5.1.4 <i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA).....	63

5.1.5 <i>N</i> -(<i>tert</i> -butildimetilsilil)- <i>N</i> -metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA)	67
5.1.6 Anidrido acético (AA) + <i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA)	70
5.1.7 <i>N</i> -(<i>tert</i> -butildimetilsilil)- <i>N</i> -metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) + <i>N</i> -metil- <i>N</i> - trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA)	74
5.1.8 Ciclohexanona (CH)	76
5.1.9 Desempenho dos reagentes de derivatização (RD)	80
5.2 Otimização das Condições de Derivatização com CH	82
5.2.1 Tempo e temperatura	82
5.2.2 Tempos entre a reação e a injeção no CG/EM.....	83
5.2.3 Comportamento da CH com diferentes concentrações de PEF e EF.....	84
5.2.4 Confirmação da identificação das substâncias.....	85
5.2.5 Extrapolação dos parâmetros analíticos para anfetamina	86
5.3 Métodos de Extração.....	87
5.3.1 Extração líquido-líquido (ELL)	87
5.3.2 Extração em fase sólida (SPE).....	88
5.3.3 Microextração em fase sólida (SPME).....	90
5.4 Validação da metodologia	92
5.5. Aplicação Prática do Método Proposto por SPME	93
6. CONCLUSÃO	97
7. REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Forma isomérica de algumas anfetaminas.....	17
Figura 3.2: Estruturas químicas de algumas ANFs.	19
Figura 3.3: Resumo da atividade adrenérgica não-específica de efedrina.....	21
Figura 3.4: Esquema parcial da metabolização de efedrinas em urina..	24
Figura 3.5: Princípio da técnica SPE. Fonte: Lanças (2004).	30
Figura 3.6: Princípio da técnica SPME.	32
Figura 3.7: Ilustração esquemática do método SPME – <i>Headspace</i>	33
Figura 4.1: Formação dos principais íons m/z 58, 77 e 107 da EF em detalhes.	41
Figura 4.2: Padrão de fragmentação de massas da ANF, MA e EF	41
Figura 4.3: Fluxograma do procedimento de derivatização.....	44
Figura 5.1: Cromatogramas sobrepostos de EF e PEF sem derivatizar.....	53
Figura 5.2: Gráfico do desempenho do AA como RD.....	55
Figura 5.3: Cromatogramas das amostras VII (A) e XV (B) com AA.	56
Figura 5.4: Cromatogramas das amostras IX derivatizadas com AA	56
Figura 5.5: Esquema da reação de acetilação da EF com AA.	57
Figura 5.6: Cromatograma e espectros de massas (EM ³) das EFs derivatizadas ...	58
Figura 5.7: Esquemas de protonização da EF.....	59
Figura 5.8: Cromatogramas sobrepostos de EF/PEF s/derivatizar e EF/PEF c/AA..	60
Figura 5.9: Gráfico do desempenho do AA+P como RD	61
Figura 5.10: Esquema da reação de acetilação da EF com ATFA.....	63
Figura 5.11: Gráfico do desempenho do MSTFA como RD	64
Figura 5.12: Cromatograma e espectro de massas da amostra I com MSTFA.	64
Figura 5.13: Esquema da reação de sililação da EF com MSTFA	65
Figura 5.14: Cromatogramas sobrepostos de EF com MSTFA e sem derivatizar.....	66
Figura 5.15: Gráfico do desempenho do MTBSTFA como RD.....	67
Figura 5.16: Cromatograma da amostra I derivatizada com MTBSTFA	68
Figura 5.17: Esquema da reação de sililação da EF com MTBSTFA.....	69
Figura 5.18: Cromatogramas sobrepostos das amostras EF e PEF com MTBSTFA	70
Figura 5.19: Gráfico do desempenho do AA e MSTFA como RD.....	71
Figura 5.20: Cromatogramas das amostras I / III (EF), II / IV (PEF) c/AA + MSTFA	72
Figura 5.21: Esquema da reação de sililação da N-acetilfedrina com MSTFA.....	72
Figura 5.22: Esquema de protonização da N-acetil-N-O-ditrimetilsililefedrina.....	73
Figura 5.23: Cromatogramas sobrepostos das amostras de PEF/EF com MSTFA+MTBSTFA.	75
Figura 5.24: Cromatogramas sobrepostos das amostras de PEF e da EF com MTBSTFA+MSTFA.	76
Figura 5.25: Gráfico do desempenho da CH como RD	77
Figura 5.26: Cromatograma da amostra I derivatizada com CH.....	78
Figura 5.27: Esquema da reação de adição da EF com CH	78
Figura 5.28: Cromatogramas sobrepostos das amostras EF/PEF com CH.....	80
Figura 5.29 Gráfico da temperatura x tempo para EF derivatizada com CH.	83
Figura 5.30: Cromatogramas de EF não-derivatizada e derivatizada com CH.....	84
Figura 5.31: Cromatograma, espectro e fragmentos de massas para ANF+CH	87
Figura 5.32: Gráfico da recuperação da EF em urina, após extração/SPE.	89
Figura 5.33: Gráfico da influência do pH da amostra na recuperação da EF/SPE. ...	90
Figura 5.34: Cromatogramas de amostras de urina contendo PEF (A) e ANF (B) obtidos nos três tipos de extração ELL, SPE e SPME.....	91
Figura 5.35: Cromatograma de uma amostra comercial de <i>Ephedra sinica</i>	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Anidrido Acético
AA+P	Anidrido Acético + Piridina
ANF	Anfetamina
ANFs	Anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, efedrina, pseudoefedrina MDA, MDMA, entre outros)
ATFA	Anidrido Trifluoracético
BSA	N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida
BSTFA	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CG/EM	Cromatografia à gás / Espectrometria de massas
CH	Ciclohexanona
NAL/CIT/FEPPS	Núcleo de Análise Laboratorial / Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul / Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
DMA	((±)-2,5-dimetoxi-alfa-metilfenetilamina)
DOB	4-bromo-2,5dimetoxianfetamina
DOM	2,5-dimetoxi-alfa,4-dimetilfenetilamina
EF	Efedrina
EFS	Efedrinas (Efedrina e Pseudoefedrina)
ELL	Extração Líquido-Líquido
EMIT	do inglês, Enzyme Multiplied Immunoassay Technique - Imunoensaio enzimático homogêneo
IE	Impacto Eletrônico
IQ	Ionização Química
IM	Íon Molecular
MA	Metanfetamina
MDA	α -metil-3,4-(metilenodioxi)fenetilamina
MDMA	((±)-n,alfa-dimetil-3,4-(metilenodioxi)fenetilamina ou 3,4 metilenodioximetanfetamina
MM	Massa Molecular
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-(tert-butildimetilsilil)- N-metiltrifluoroacetamida
PEF	Pseudoefedrina
RD	Reagente de Derivatização
PDMS	Polidimetilsiloxano
SAX	do ingles, Strong Acid Exchanger
SCX	do inglês, Strong Cation Exchanger
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	do inglês, Solid Phase Extraction
SPME	do inglês, Solid Phase Microextraction
SS	Sistema(s) Solvente(s)
TBS	Terbutildimetilsilil
TMS	Trimetilsilil
TR	Tempo de Retenção

RESUMO

O Brasil ocupa posição de destaque no consumo mundial de anfetaminas, contrariamente à tendência mundial de retração. Devido aos efeitos colaterais e ao alto potencial de abuso, a produção e comercialização de anfetaminas vêm sendo controladas no mundo inteiro. Com a restrição de uso, houve um retorno a procura pelos equivalentes naturais, especialmente as efedrinas presentes em diversas especialidades farmacêuticas, utilizadas no tratamento de doenças respiratórias. São componentes de vários compostos emagrecedores, suplementos alimentares e dietéticos utilizados para perda de peso e ganho de massa muscular. Face ao uso indiscriminado e a grande incidência de resultados falso-positivos nos testes de triagem para anfetaminas por imunoensaio enzimático homogêneo, fazem-se necessários testes confirmatórios. Neste sentido, este trabalho se propôs a desenvolver um método confirmatório simples e rápido para detecção, identificação e quantificação de efedrinas (efedrina/pseudoefedrina) em amostras de urina por cromatografia a gás / espectrometria de massas-massas (CG/EM/EM), passível de ser adotado na rotina de laboratórios de análises toxicológicas. Devido à complexidade da matriz e as peculiaridades do analito, inicialmente procedeu-se o estudo do tratamento da amostra, considerando as etapas de derivatização, extração, pré-concentração e purificação, de modo a fornecer um extrato límpido, livre de impurezas, interferentes e com melhor sensibilidade, linearidade e seletividade analítica. Os métodos de extração usados foram extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME). Os resultados indicaram que o reagente de derivatização ciclohexanona foi o que apresentou melhor desempenho, menor custo e promoveu maior seletividade dos diastêromeros EF/PEF em colunas normais de CG. Sendo que o método mais apropriado para a detecção e identificação de efedrinas/anfetamina por CG/EM é a SPME levando em consideração características como simplicidade, rapidez, custo, recuperação e ausência de interferentes. Entretanto, considera-se válido o uso de SPE para a quantificação, devido à possibilidade de pré-concentração do analito.

Palavras-chave: anfetamina, efedrina, pseudoefedrina, SPE, SPME, CG/EM

ABSTRACT

ANALYSIS OF EPHEDRINES AND AMPHETAMINE IN URINE USING SPE AND SPME BY GC/MS/MS

Brazil is one of the biggest amphetamine consumers in the world, going against the worldwide retraction tendency. Due to serious adverse effects and high abuse potential, the production and commercialization of amphetamines has been controlled around the world. With the restriction of its use, there was a return in the search of natural equivalents, especially the ephedrines found in many medicines utilized in the treatment of respiratory diseases. Furthermore, they are components of dietary supplements used to lose weight and muscular mass gain. Because of the indiscriminate use and the high incidence of false-positive results in the amphetamines screening tests by enzyme immunoassay technique, it is necessary confirmatory tests. In this way, the aim of this work is to develop a confirmatory simple and quickly method for the detection and quantification of ephedrines (ephedrine and pseudoephedrine) gas chromatography / mass-mass spectrometry (GC/MS/MS), with possibility to be adopted in toxicological analyses laboratorial routine. Due to the complexity of the matrix and analyte peculiarities, initially proceeds the study of sample treatment, considering the derivatization, extraction, pre-concentration and purification steps, obtaining a limpidous extract, free of impurities, interferents and with better sensitivity, linearity and analytical selectivity. The extraction method used were liquid-liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction (SPME). The results indicate that cyclohexanone was the derivatization agent with the best performance, lower price and good selectivity in diastereomers EF/PEF separation in normal GC columns. The most appropriate method for detection and identification of ephedrines/amphetamine by GC/MS is SPME, considering characteristics as simplicity, speed, cost, recovery and absence of interferents. However, the use of SPE must be considered to quantification, since it allowed analyte pre-concentration.

Keywords: amphetamine, ephedrine, pseudoephedrine, SPE, SPME, GC/MS

1. INTRODUÇÃO

A Toxicologia Social considera estimulante toda substância utilizada voluntariamente com a finalidade de obtenção de estados alterados de consciência, caracterizados por euforia decorrente da estimulação do sistema nervoso central (SNC). No Brasil, são utilizadas para esse fim fármacos proscritos como a cocaína e medicamentos como os compostos anfetamínicos (CHASIN e SILVA, 2003).

Segundo relatório do *International Narcotic Control Board* – INCB (2006), o Brasil está entre os países onde o consumo de anfetaminas (ANFs) vem crescendo, contrariamente à tendência mundial de retração, juntamente com países como Argentina, Austrália, Coreia e Singapura. Parte desse uso pode ser explicado pelo grande apelo social à utilização desses fármacos para o controle da obesidade, resultando no uso abusivo dos compostos anfetamínicos.

O uso de estimulantes apresenta nítido predomínio do sexo feminino sobre o masculino, sendo que, no total, as mulheres tiveram quase três vezes mais uso na vida do que os homens. A prevalência de respostas que afirmaram ser muito fácil obter compostos anfetamínicos gira em torno dos 40% subindo para 50% na faixa etária de 25 – 34 anos (CARLINI *et al.*, 2002).

Pesquisa realizada, em 2004, com estudantes do ensino fundamental e médio das redes municipal e estadual, demonstrou que o uso de compostos anfetamínicos no Brasil é de 4,3% e em Porto Alegre de 5,5%, com diferença estatística significativa entre os sexos (GALDURÓZ *et al.*, 2005). Em recente pesquisa realizada com 915 estudantes do ensino médio de escolas da rede estadual da cidade de Porto Alegre, houve maior consumo na vida de ANFs por alunos do sexo feminino (9,2%) (VIANA, 2006).

No último triênio (2004 a 2006), no Núcleo de Análise Laboratorial do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – NAL/CIT/FEPPS, foram realizadas 536 análises para pesquisa de ANFs, sendo destas 15% com resultados positivos no teste de triagem por imunoenensaio enzimático homogêneo (EMIT) não confirmados por outra metodologia¹, como cromatografia a gás / espectrometria de massas (CG/EM).

¹ Informações obtidas do Núcleo de Análise Laboratorial do CIT/RS

Em estudos conduzidos com ANFs utilizando sangue pós-morte, Hino e col. (2003) concluíram que os resultados dos testes por EMIT, quando comparados aos obtidos por CG/EM no quesito especificidade, apresentaram apenas 54% de concordância (n=95) com 42 testes positivos e 53 negativos por CG/EM, e por EMIT 36 testes positivos, 6 falso negativos, 28 negativos, 24 falso positivos e 1 amostra rejeitada. Segundo Melgar e Kelly (1993), de dez amostras de urina de pacientes positivas para ANFS por EMIT todas foram negativas por imunofluorescência polarizada e por CG/EM. Estes resultados demonstram a relevância de estudos comparativos, entre os métodos de triagem e o método confirmatório CG/EM, especialmente para urina, por esta ser o fluido biológico mais utilizado para pesquisa de compostos anfetamínicos.

Desse modo, o estabelecimento de métodos mais específicos para análise de compostos anfetamínicos como as ANFs em urina consiste em uma importante área de investigação. Neste âmbito, CG/EM combina um eficiente poder de separação detecção e identificação das substâncias com alta sensibilidade e especificidade; sendo considerado padrão-ouro em toxicologia analítica por ser um método conclusivo e confirmatório, sobretudo para análise de fármacos na urina e outras matrizes biológicas (NIDA, 1997; MOFFAT *et al.*, 2004).

O objetivo dos procedimentos de confirmação é certificar-se de que a identificação e/ou quantificação do analito foi correta e excluir qualquer deficiência da técnica utilizada no procedimento de *screening*. Já que o objetivo dos testes confirmatórios é de acumular informação adicional com respeito a uma conclusão adversa, o procedimento de confirmação deve ser mais seletivo/discriminatório que os procedimentos de *screening* (WADA, 2004a).

Entretanto, para se alcançar capacidade analítica por CG/EM se faz necessário o desenvolvimento de técnicas de purificação, pré-concentração e remoção do analito de sua matriz biológica. Como métodos alternativos e modernos temos a extração em fase sólida (SPE) e a microextração em fase sólida (SPME), que precisam ser otimizados, de forma a viabilizar o emprego destas metodologias na rotina laboratorial.

Outro aspecto a ser considerado é a necessidade de se comprovar a qualidade das análises bioanalíticas realizadas pelos laboratórios de ensaio, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade dos resultados. A NBR ISO/IEC 17025, norma específica para laboratórios de ensaio, apresenta os requisitos gerenciais e técnicos o qual aborda a “validação de métodos” como um dos itens necessários para a garantia da qualidade e define validação como a “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT, 2001).

Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se ao credenciamento de um órgão vigente de âmbito nacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia – INMETRO, ou internacional, a *World Anti-Doping Agency* – WADA. Esta é uma fundação independente criada pelo *Comitê Olímpico Internacional* – COI que tem competência para credenciar laboratórios responsáveis pela análise de amostras antidoping, preparar e revisar a Lista anual de substâncias e métodos proibidos, por intermédio do Código da Agência Mundial Antidoping – AMA (WADA, 2004a; WADA, 2006).

No que tange a análise de compostos anfetamínicos, conforme o Levantamento de Laboratórios Analíticos de Toxicologia Forense (BRASIL, 2004) realizado pela ANVISA/REBLAS em março de 2004, nenhum dos laboratórios da região sul participante da pesquisa declarou realizar o teste presuntivo e a confirmação do estimulante EF.

Neste sentido, este trabalho se propôs a desenvolver métodos analíticos confirmatórios para identificação de EFs e ANF em amostras de urina utilizando métodos de extração por SPE e SPME, as quais foram submetidas previamente a análises de triagem toxicológicas para ANFs. Devido à semelhança estrutural das ANFs, da maior complexidade e maior disponibilidade da EF, esta foi utilizada como protótipo para estudos de otimização dos parâmetros envolvidos nas análises. O melhor resultado obtido com EF foi extrapolado para ANF.

Para tanto, este trabalho está dividido de forma a apresentar inicialmente uma revisão da literatura sobre compostos anfetamínicos e metodologias analíticas associadas, seguido dos materiais e métodos, resultados e discussão e conclusões.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estabelecer um método confirmatório simples e rápido para detecção, identificação e quantificação de efedrinas (efedrina/pseudoefedrina) em amostras de urina por cromatografia a gás / espectrometria de massas-massas (CG/EM/EM), bem como extrapolar a metodologia proposta para análise de anfetamina em urina, passível de ser adotado na rotina de laboratórios de análises toxicológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudo do pré-tratamento de amostra de urina contendo efedrinas
 - Avaliação do uso de diferentes reagentes de derivatização;
 - Otimização de protocolo analítico para extração e pré-concentração por SPE e SPME;
- Determinar as condições analíticas apropriadas para a detecção, identificação e quantificação de efedrinas em urina por CG/EM/EM;
- Extrapolar a metodologia proposta para amostra de urina de pacientes (amostras reais) e amostras vegetais contendo efedrinas;
- Extrapolar a metodologia proposta para amostras de urina de pacientes (amostras reais) contendo anfetamina;
- Comparar os resultados positivos obtidos com os testes de triagem de ANFs por EMIT com os resultados obtidos por CG/EM/EM.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Compostos Anfetamínicos

3.1.1 Aspecto geral

O termo “anfetamínicos” refere-se ao grupo de substâncias composto pela anfetamina e seus derivados. Quimicamente, apresentam o esqueleto básico da β -fenetilamina e farmacologicamente atuam como aminas simpatomiméticas (DIAS *et al.*, 2001; CHASIN e SILVA, 2003; SULZER *et al.*, 2005).

Os compostos anfetamínicos são derivados sintéticos das efedrinas (EFs), protoalcalóides encontrados em espécies do gênero *Ephedra* (Ephedraceae) de ocorrência na Eurásia (TYLER, 1993). A efedrina (EF) foi isolada pela primeira vez em 1887 e classificada farmacologicamente como adrenérgico (SIMÕES *et al.*, 2003; SULZER *et al.*, 2005). Devido a grande demanda e as limitações da obtenção comercial a partir de fontes naturais, muitos anfetamínicos sintéticos foram lançados no mercado, projetados de forma a aumentar seu espectro de ação. Dentre os derivados mais importantes estão a ANF, a MA (metilanfetamina ou speed), a metilendioxianfetamina (MDA) e a metilendioximetanfetamina (MDMA ou êxtase).

Há séculos seu uso com fins terapêuticos já era disseminado pela Medicina Tradicional Chinesa (MTC), que preconizava o uso de extrato da planta desidratada (chamada de Ma Huang) como estimulante e para o tratamento de afecções respiratórias (TYLER *et al.*, 1996; FOSTER e TYLER, 1999).

A anfetamina (ANF) foi sintetizada em 1887, sendo seus efeitos farmacológicos estudados no final da década de 20, época em que foi largamente utilizada no tratamento da obesidade, narcolepsia e hipotensão (KARCH, 1998; CHASIN e SILVA, 2003), e mais recentemente, o derivado metilfenidato tem sido usado na síndrome de hiperatividade (déficit de atenção). A MA, o MDA e o MDMA entre outros derivados anfetamínicos são conhecidos como drogas de síntese (*designer drugs* ou drogas projetadas) e são largamente utilizadas com fins recreativos. A MA foi sintetizada em 1919 e seu dextro isômero é considerado o derivado anfetamínico com maior potencial de abuso (KARCH, 1998; CHASIN e SILVA, 2003).

Atualmente, segundo a RDC nº 18, 2003, a ANF e MA são controladas pela Portaria nº 344 (1998) fazendo parte da Lista "A3" Lista das Substâncias Psicotrópicas (Sujeitas a Notificação de Receita "A"). A anfepramona (dietilpropiona) e femproporex fazem parte da Lista "B2" Lista das Substâncias Psicotrópicas Anorexígenas (Sujeitas a Notificação de Receita "B"). Os compostos anfetamínicos: DMA ((±)-2,5-dimetoxi-alfa-metilfenetilamina), DOM (2,5-dimetoxi-alfa, 4-dimetilfenetilamina), DOB (4-bromo-2,5dimetoxianfetamina); MDA (α -metil-3,4 - (metilenodioxo)fenetilamina e MDMA (3,4 metilenodioximetanfetamina ou (±)-n,alfa-dimetil-3,4-(metilenodioxo)-fenetilamina) fazem parte da Lista "F2" Lista das Substâncias de Uso Proscrito no Brasil - Substâncias Psicotrópicas. A efedrina (EF) e pseudoefedrina (PEF) fazem parte da Lista "D1" Lista de Substâncias Precursoras de Entorpecentes e/ou Psicotrópicos (Sujeitas a Receita Médica sem Retenção) devido a produção clandestina ou ilegal de MA a partir destas. Ficam também sob controle seus sais, éteres, ésteres e isômeros. Fenilefrina não faz parte desta Portaria (BRASIL, 2003b).

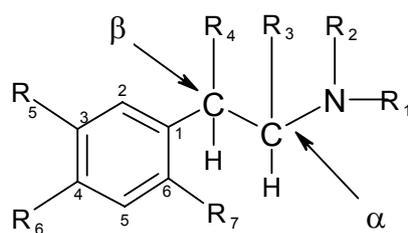
3.1.2 Relação estrutura atividade

As ANFs apresentam a estrutura básica da β -fenetilamina sendo formada por um anel benzênico e uma cadeia lateral de etilamina. Sua estrutura permite substituições (R) no anel aromático, nos carbonos alfa (α) e beta (β) e no grupo amino terminal originando muitos derivados, vide Tabela 3.1.

As modificações na estrutura da fenetilamina são dirigidas em dois sentidos: no âmbito terapêutico na busca de substâncias com predomínio do efeito anorexígeno sobre o efeito estimulante do SNC e no âmbito ilícito na busca de estruturas com ação estimulante se transformarem em alucinógenas com maior potência (UTRILLA, 2000; UNITED NATIONS, 2006).

Segundo uma compilação de dados reportados por Korolkovas e Burckhalter (1982), Solomons (1996), Karch (1998), Utrilla (2000), Goodman & Gilman's (2001), Silva (2002), Chasin e Silva (2003), United Nations (2006) as seguintes características estruturais relacionadas com a atividade farmacológica de fenetilaminas podem ser citadas:

Tabela 3.1: Características estruturais da β -fenetilamina e seus derivados.



β -fenetilamina - estrutura geral

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
anfetamina	H	H	CH ₃	H	H	H	H
anfepramona	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	=O	H	H	H
efedrina/pseudoefedrina	H	CH ₃	CH ₃	OH	H	H	H
femproporex	CH ₂ CH ₂ CN	H	CH ₃	H	H	H	H
fenfluramina	CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	H	CF ₃	H	H
fenilefrina	H	CH ₃	H	OH	OH	H	H
metanfetamina	H	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H
sinefrina	H	CH ₃	H	OH	H	OH	H
DMA	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃
DOM	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃
DOB	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	Br	OCH ₃
MDA	H	H	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		H
MDMA	CH ₃	H	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		H

Adaptada de Chasin e Silva (2003) e United Nations (2006).

- Substituição na cadeia lateral

A maior atividade simpatomimética ocorre quando dois átomos de carbono separam o anel do grupo amino.

- Substituições no grupo amino (R1 e R2)

Em geral, quanto menor for o volume do substituinte, maior será a sua seletividade α adrenérgica, porém quanto maior o volume do substituinte, maior a atividade β adrenérgica, embora a N-metilação aumente a potência das aminas primárias, a ação broncodilatadora e o efeito anorexígeno e anule a ação vasopressora.

- Substituição no carbono α (R3)

Bloqueia a oxidação pela monoamino oxidase (MAO), o que prolonga a duração da ação das não catecolaminas (moléculas que não possuem hidroxila nas posições 3 e 4 do anel), cuja detoxificação depende muito da degradação através da MAO.

- Substituição no carbono β (R4)

A substituição de um grupo OH, em geral, reduz a ação estimulante central, em grande parte devido à diminuição da lipossolubilidade desse composto. Contudo, tal substituição, aumenta a atividade agonista em ambos os receptores α e β adrenérgicos. Portanto, a efedrina é menos potente que a metanfetamina como estimulante central, mas é mais potente na dilatação dos bronquíolos e no aumento da pressão sangüínea e da freqüência cardíaca.

- Substituições nos carbonos α e β

As substituições nos carbonos α e β fornecem isômeros ópticos. As anfetaminas podem ser encontradas sob ambas formas isoméricas *d* (dextroanfetamina) e *l* (levoanfetamina) (Figura 3.1). O isômero *l* é levemente mais potente que o isômero *d* nas suas ações periféricas, enquanto o isômero *d* é três ou quatro vezes mais potente na estimulação do SNC. É também importante notar que *d* e *l* enantiômeros podem ter diferentes atividades farmacológicas, e também variar características farmacocinéticas. Na natureza ocorrem os isômeros *d* e *l* como é o caso da *l*-efedrina e *d*-pseudoefedrina. A *d*-efedrina não só não tem atividade terapêutica, como impede a ação do enantiômero *l*-efedrina.

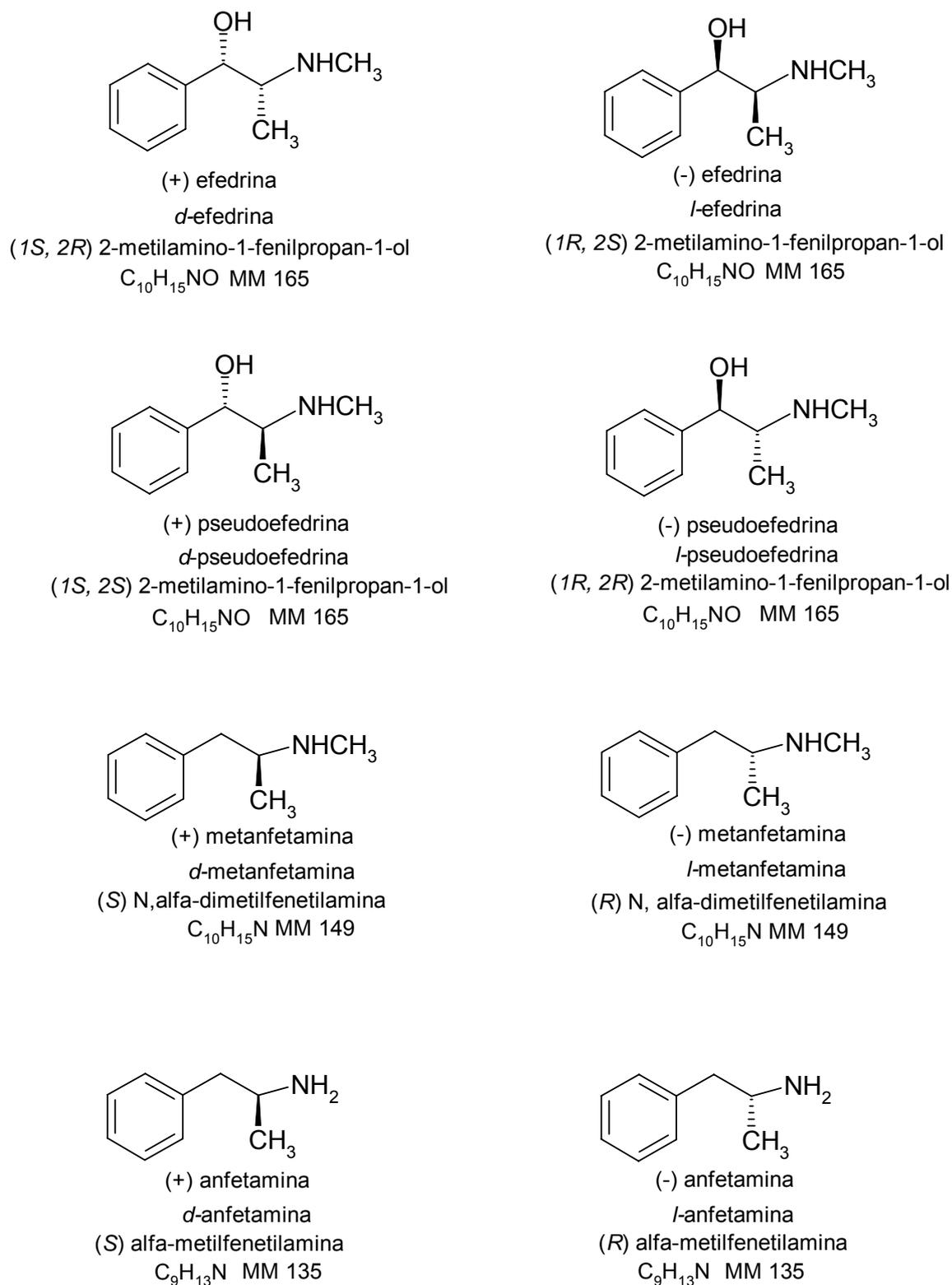


Figura 3.1: Forma isomérica de alguns compostos anfetamínicos. Fontes: The Merck Index (2001), Martindale (2005), British Pharmacopoeia (1999), USP 27 (2004), Ganzera e col. (2005) e Wang e col. (2005).

- Substituição no anel aromático

No caso dos compostos anfetamínicos com substituição no anel, a adição dos grupos metoxi, dimetoxi ou trimetoxi altera drasticamente o espectro de ação destas substâncias. A substituição destes grupos na posição 3 ou 5 do anel aromático confere propriedades alucinógenas a esses compostos, exemplo DMA, MDA, MDMA, DOM, DOB. Além disso, anfetaminas halogenadas na posição R6 apresentam efeitos semelhantes a agentes liberadores de serotonina.

As substituições nas posições 3 ou 5 e 4 do anel benzênico e no carbono β (R4) da cadeia lateral determinam se um fármaco simpatomimético terá ação direta ou indireta. Para ação direta nos receptores adrenérgicos, um composto deve ter substituições em pelo menos duas dessas posições (fenilefrina e sinefrina). Aos compostos que tem apenas uma ou nenhuma substituição nestas três posições da molécula atribuem-se de ação indireta (ANF, MA, EF, PEF). O mecanismo de ação mais provável das ANFs parece ser a liberação dos neurotransmissores das vesículas sinápticas na ausência de despolarização da terminação nervosa, bem como inibição da recaptação dos mesmos, como conseqüente aumento da concentração sináptica (RANG *et al.*, 2001; SULZER *et al.*, 2005).

Metoxilação progressiva do anel aromático praticamente elimina a habilidade desses compostos de inibir a recaptação de noradrenalina e de liberá-la de seus sítios de ligação. Sendo assim, esses fármacos atuam diretamente sobre o receptor.

As atividades α e β adrenérgicas máximas dependem da presença simultânea de grupos hidroxila nas posições 3 e 4 do anel aromático (R5 e R6). Quando um ou ambos os grupos estão ausentes, sem outra substituição aromática, a potência total diminui, como é o caso da efedrina, que possui atividade α e β adrenérgica menor que a sinefrina. As não catecolaminas possuem maior atividade estimulante do SNC, como é o caso da EF, ANF e MA. Somando-se a isso, a ausência de grupo hidroxila polar resulta em perda de atividade simpatomimética periférica direta.

A duração da ação das catecolaminas, assim denominadas devido à hidroxila substituída nas posições 3 e 4 do anel aromático, é curta, sendo as mesmas ineficazes após administração oral, porque são rapidamente inativadas na mucosa intestinal e no fígado, antes de chegarem à circulação sistêmica. Compostos sem

um ou ambos substituintes OH nestas posições não são transformados pela catecol-o-metiltransferase (COMT), tendo eficácia oral e duração da ação maior.

3.1.3 Padrões de uso

As ANFs sintéticas foram amplamente usadas no tratamento terapêutico da obesidade devido ao efeito anorexígeno. Atualmente, em função de seu potencial de abuso, apenas anfepramona, femproporex e fenfluramina são usadas com esta finalidade. Também, o metilfenidato (Ritalina®) tem sido muito utilizado para o tratamento de narcolepsia e síndrome hipercinética (disfunção cerebral mínima) – doença da infância caracterizada por hiperatividade, déficit de atenção e alto grau de comportamento impulsivo (DIAS *et al.*, 2001; OLSON, 2004). Na Figura 3.2 estão ilustradas algumas estruturas químicas de ANFs.

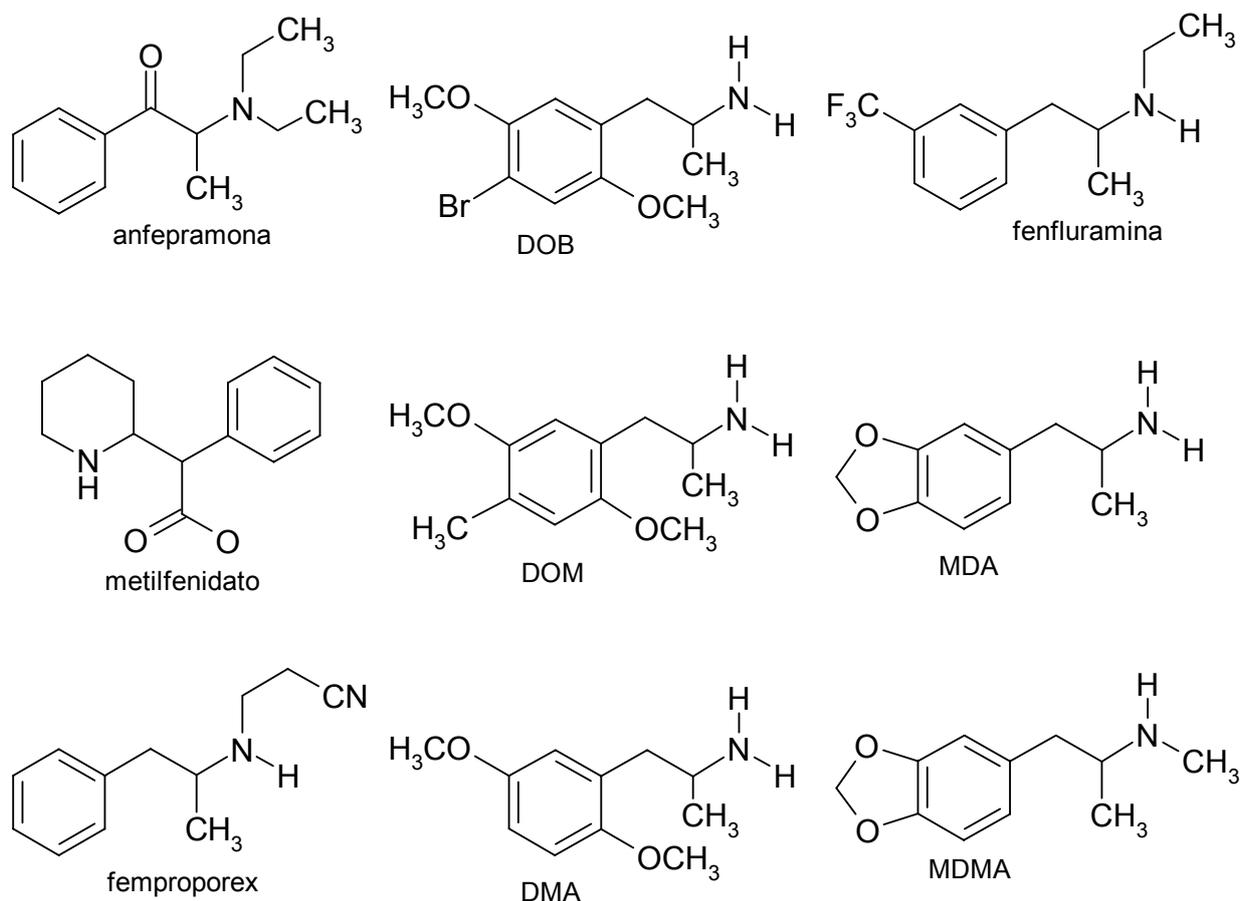


Figura 3.2: Estruturas químicas de algumas ANFs.

No Brasil, as ANFs são importantes fármacos de abuso entre os motoristas, que fazem uso dos chamados “rebites” para enfrentar as extenuantes jornadas de

trabalho. Para avaliar a gravidade do consumo de drogas por motoristas profissionais durante a jornada de trabalho foi realizado um estudo por Yonamine (2004) com motoristas das estradas de Pernambuco, São Paulo, Espírito Santo e Rio Grande do Sul. Os resultados obtidos podem ser considerados preocupantes: 4,14% das amostras (n=483) foram positivas para a presença das drogas analisadas (ANF, MA, femproporex, canabinóides e cocaína). Dos resultados positivos, 85% foi para ANF. Por aumentar o estado de alerta físico e mental, também são muito populares entre estudantes que necessitam de prolongada vigília, sendo femproporex o mais utilizado (SILVA, 2002).

Devido às propriedades estimulantes da atividade motora, as ANFs são muito utilizadas em competições esportivas, como agentes de dopagem, com vistas à melhora de desempenho (CHASIN e SILVA, 2003). Segundo a Agência Anti-Doping - WADA, no ano de 2007, foram incluídas na lista de substância sujeitas a monitoramento a cafeína, fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina, sinefrina, entre outras, não sendo consideradas substâncias proibidas. Já a EF é proibida quando a sua concentração na urina for maior que 10 µg/mL e os demais estimulantes, como ANF, MA, MDMA, anfepramona e femproporex não possuem limites de corte (*cut-off*), entretanto, o método analítico deve fornecer um valor mínimo requerido para limites de detecção de 500 ng/mL (WADA, 2004b; WADA, 2006).

Devido a sérios efeitos colaterais e ao alto potencial de abuso, a produção e comercialização de ANFs vêm sendo controladas no mundo inteiro. Com a restrição de uso, houve um retorno a procura pelos equivalentes naturais, especialmente as EFs.

As EFs (efedrina, pseudoefedrina, norpseudoefedrina, metilpseudoefedrina, metilefedrina e norefedrina) são aminas simpatomiméticas presentes em diversas especialidades farmacêuticas, utilizadas no tratamento de doenças respiratórias como asma, resfriados e congestão nasal, devido a sua ação descongestionante, broncodilatadora e hipertensora (OLSON, 2004; MARTINDALE, 2005). São componentes de vários compostos emagrecedores, suplementos alimentares e dietéticos utilizados para perda de peso e ganho de massa muscular (ANDRAWS *et*

al., 2005, TSENG *et al.*, 2006), normalmente na forma de extrato de efedra (Ma Huang) padronizado em EF.

Os efeitos sobre o trato respiratório e como descongestionante nasal devem-se à ação das EFs sobre os receptores β_2 e α_1 -adrenérgicos, que causa relaxamento da musculatura lisa pulmonar e vasoconstrição periférica. Já a utilização da planta para perda de peso deve-se à estimulação dos receptores β_3 -adrenérgicos, a qual provoca um aumento da lipólise dos adipócitos. A Figura 3.3 representa, de forma sintética, as interações da EF com cada um dos receptores adrenérgicos e seus respectivos efeitos farmacológicos (FOSTER e TYLER, 1999; TAGLIARI, 2003; BOFF, 2006).

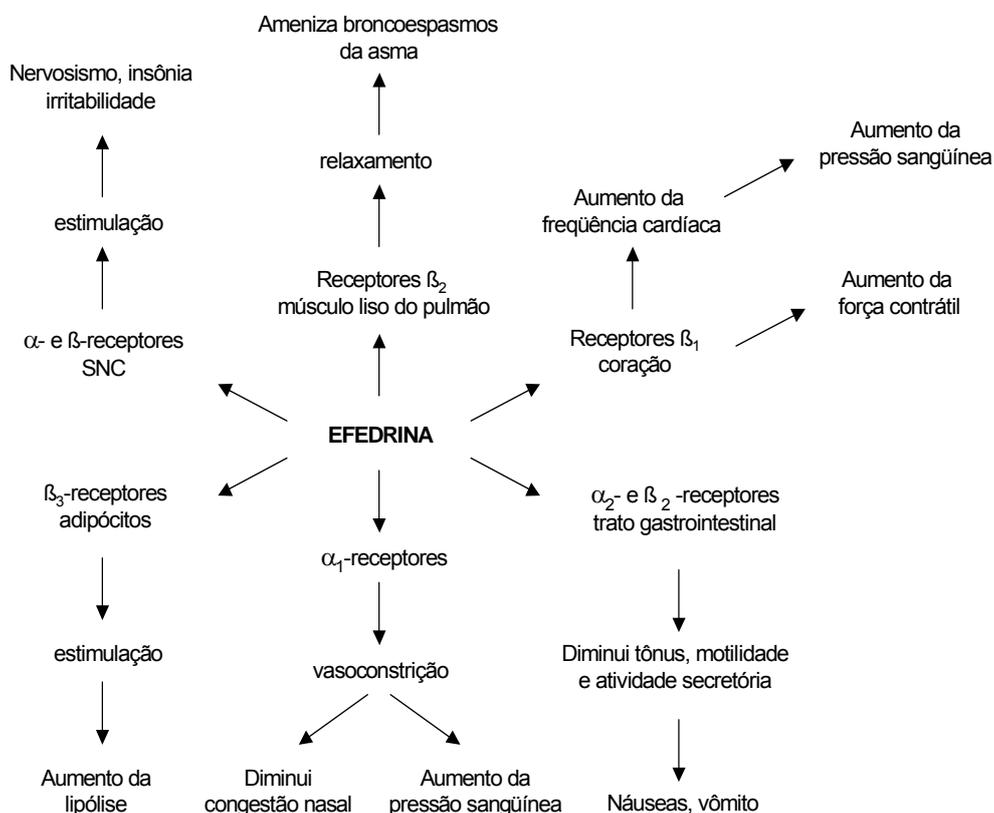


Figura 3.3: Resumo da atividade adrenérgica não-específica da efedrina. Fonte: Tagliari (2003) e Boff (2006).

Em compostos anorexígenos e termogênicos, a EF geralmente encontra-se associada a outros produtos de efeito sinérgico, como extratos à base de cafeína, sendo utilizados como alternativas para derivados de ANFs (OLSON, 2004). Estas associações, denominadas ECA (Efedrina + Cafeína + Aspirina), constituem um

coquetel bastante conhecido entre fisiculturistas e pessoas que buscam emagrecer e parecem ser mais eficazes na redução de peso que placebo ou um dos agentes isolados, entretanto, apresentam seus efeitos tóxicos potencializados, a aspirina é utilizada para prolongar o tempo de ação da efedrina. Evidências clínicas sobre o uso e eficácia da EF em perda de peso e desempenho atlético demonstram modestos, mas consistentes efeitos de perda de peso em curto prazo (FUCHS *et al.*, 2004).

A PEF possui menor ação sobre o SNC, quando comparada a EF, por isso é mais utilizada em medicamentos para aliviar a congestão da membrana nasal em casos de resfriado comum, rinite alérgica, coriza aguda, sinusite, entre outros e atua sobre os receptores α e β -adrenérgicos (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2004).

O DOM, DMA, DOB, MDMA e MDA são substâncias ilicitamente produzidas em laboratórios clandestinos, distribuídas e utilizadas como estimulantes e alucinógenos (DIAS *et al.*, 2001). A EF e PEF são substâncias usadas popularmente para a obtenção clandestina ou ilícita da MA (UNITED NATIONS, 2006).

3.1.4 Toxicocinética

A toxicocinética é o estudo da relação entre a quantidade de um agente tóxico que atua sobre o organismo e a concentração dele no plasma, relacionando os processos de absorção, distribuição e eliminação (biotransformação e excreção) do agente, em função do tempo (KLAASSEN *et al.*, 1996; OGA, 2003). Com relação aos compostos anfetamínicos, de um modo geral, podemos considerar:

a) absorção: pelo trato gastrintestinal, efeitos em 30 min após administração de 10 a 15 mg, concentração plasmática máxima de 1-2 h, absorção completa de 4-6 h (KARCH, 1998; CHASIN e SILVA, 2003; SONI *et al.*, 2004).

b) distribuição: cérebro, rins, pulmões, fígado, liga-se 16-20% às proteínas plasmáticas. O restante fica na forma livre com alta afinidade tecidual atingindo elevadas concentrações no SNC e no líquido (KARCH, 1998).

c) eliminação: de uma forma geral, durante as etapas de biotransformação, as ANFs sofrem hidroxilação do anel aromático, levando a formação de *p*-OH-derivados que são excretados inalterados na urina ou conjugados com ácido glicurônico.

Também podem sofrer β -hidroxilação da cadeia lateral; *n*-desalquilação, com formação de amina primária e desaminação oxidativa com formação de fenilacetona e ácido benzóico, o qual é conjugado com glicina (formando ácido hipúrico) ou com ácido glicurônico (LARINI e CARVALHO, 1993; KARCH, 1998). As EFs sofrem *n*-demetilação a norefedrina, desaminação oxidativa resultando na formação 1-fenilpropano-1,2diol e oxidação da cadeia lateral a ácido benzóico e ácido hipúrico (KARCH, 1998; SONI *et. al.*, 2004).

A maioria dos derivados anfetamínicos pode ser convertida em ANF e /ou MA. Quando as MAs são administradas, parte é biotransformada a ANF. O femproporex sofre *n*-desalquilação a ANF, a seleginina (anti-parkinsoniano) é biotransformada em MA, que por sua vez é biotransformada em ANF (LARINI e CARVALHO, 1993).

A excreção dependente de vários fatores entre eles volume de urina, fatores individuais e pH urinário. Os produtos hidroxilados são normalmente excretados conjugados com sulfato, sendo que 50% são eliminados na forma inalterada. Como os ANFs, de uma forma geral, são bases orgânicas fracas, em meio ácido elas são facilmente eliminados pois a ionização evita a reabsorção (SILVA, 2002). Em pH ácido (5,5-6,0) 90% da dose é excretada inalterada em 48 h, enquanto que em pH básico (7,5-8,0) apenas 3-7% para o mesmo período. Portanto, a meia-vida de excreção varia de 7-8 h em urina ácida e de 18-33 h em urina alcalina. A redução da quantidade inalterada excretada em pH básico se deve ao fato de que, ocorrendo uma reabsorção renal neste pH, os ANFs se tornam mais disponíveis para serem biotransformados (CHASIN e SILVA, 2003).

A EF sofre biotransformação hepática, sendo grande parte excretada na forma inalterada na urina (DIAS *et al.*, 2001). A meia vida da EF/PEF é de 3-7 h (OLSON, 2004). Segundo Tseng e col. (2006), 40,9% da EF é eliminada na forma inalterada após uma única dose de 25 mg e 72,3% de PEF é eliminada na urina após uma única dose de 30 mg conforme demonstrado na Figura 3.4. Ainda, segundo este mesmo autor a EF e a PEF são excretadas na urina entre 2-24 h, sendo a maior quantidade entre 2-6 h, após a administração de uma única dose.

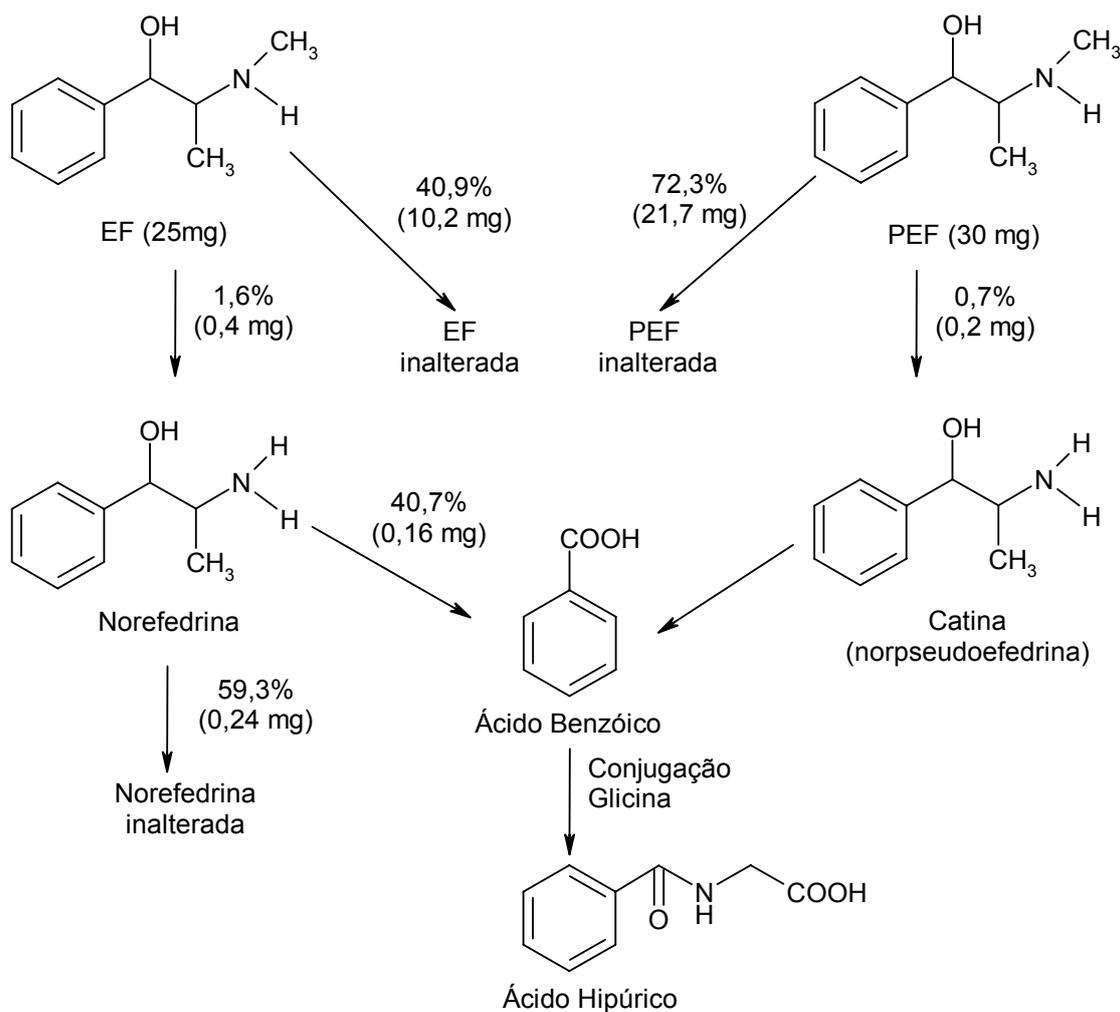


Figura 3.4: Esquema parcial da biotransformação e excreção de efedrina. Quantidade total de EF e PEF administradas e percentuais de recuperação das mesmas em urina. Adaptado de Karch (1998) e Tseng e col. (2006).

3.1.5 Toxicodinâmica

A toxicodinâmica é o estudo da natureza da ação tóxica exercida por determinada substância sobre o sistema biológico, ou seja, o mecanismo de ação tóxico de xenobióticos, sob os pontos de vista bioquímico e molecular (OGA, 2003).

A ANF e seus análogos atuam como aminas simpatomiméticas em nível de receptores α e β adrenérgicos e em potências variáveis, de acordo com as diferentes substituições e estereoquímica (CHASIN e SILVA, 2003). O mecanismo de ação mais provável parece ser a liberação direta dos neurotransmissores das vesículas sinápticas, bem como inibição da recaptação dos mesmos, como conseqüente aumento da concentração sináptica (RANG *et al.*, 2001; SULZER *et al.*, 2005).

Além disso, os derivados anfetamínicos são inibidores da MAO, enzima responsável pela oxidação dos neurotransmissores. Os efeitos comportamentais gerados pelas ANFs estão principalmente associados à liberação de dopamina (RANG *et al.*, 2001; SULZER *et al.*, 2005), enquanto que a noradrenalina é responsável pela estimulação locomotora (CHASIN e SILVA, 2003). A EF aumenta a liberação de noradrenalina na fenda sináptica (GOODMAN & GILMAN'S, 2001).

3.1.6 Dependência e tolerância

De uma forma geral, os compostos anfetamínicos apresentam um alto potencial de abuso, o que propicia o desenvolvimento de farmacodependência, com tolerância acentuada (GOODMAN & GILMAN'S, 2001). Propriedades de reforço parecem estar relacionadas com o aumento extracelular de dopamina no núcleo *accumbens* (área límbica) e núcleo caudado (área subcortical motora) (CHASIN e SILVA, 2003)

A síndrome de abstinência chega a atingir cerca de 87% dos usuários de compostos anfetamínicos (CANTWELL e MCBRIDGE, 1998). Sintomas depressivos e exaustão podem suceder períodos prolongados de uso ou abuso (fissura intensa, ansiedade, pesadelos, falta de energia, depressão) (GOODMAN & GILMAN'S, 2001).

3.1.7 Efeitos tóxicos

Os ANFs em geral causam agitação psicomotora, euforia, tremor, náuseas, vômitos, cefaléia, irritabilidade, insônia, hiperreflexia, midríase, rubor, hiperatividade, confusão, hipertensão, sudorese, taquipnéia, taquicardia, hipertermia, alucinações auditivas, idéias delirantes persecutórias, delírios, mania, auto-escoriações, arritmias ventriculares, falência renal, colapso circulatório, convulsão ou coma, colapso cardiovascular, sendo essa a principal causa de morte além da hipertermia e hemorragia intracraniana (GOODMAN & GILMAN'S, 2001; OLSON, 2004; UNITED NATIONS, 2006).

O maior efeito tóxico causado pelas EFs é a hipertensão, além de taquicardia, cefaléia, tremor, midríase, arritmia cardíaca, hemorragia intracraniana, infarto do miocárdio e até a morte (normalmente em casos de associação com cafeína), sendo

que os sintomas relacionados ao SNC são menos pronunciados na intoxicação por esse fármaco, overdoses são raras (DIAS *et al.*, 2001; OLSON, 2004; ANDRAWS *et al.*, 2005, TSENG *et al.*, 2006). Estes efeitos podem ser intensificados durante exercícios físicos e quando associados a outros fármacos estimulantes do SNC, como a cafeína (LIEBERMAN, 2001).

3.2 Metodologias Analíticas

3.2.1 Imunoensaio enzimático homogêneo (EMIT)

O imunoensaio (radioimunoensaio, enzimaimunoensaio e imunoensaio de fluorescência polarizada) tem sido rotineiramente usado na pesquisa de medicamentos e drogas de abuso em matrizes biológicas por ser um método rápido e de baixo custo operacional para análises de emergência e para monitoramento terapêutico (KARCH, 1998; PELLEGRINI *et al.*, 2002; MOFFAT *et al.*, 2004). Atualmente executa-se um número elevado de pesquisa de ANFs em urina, sendo o EMIT a metodologia mais utilizada como teste de triagem.

O EMIT consiste em um imunoensaio enzimático homogêneo em que o antígeno (analito) presente na amostra compete com o que está marcado com a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase pelos sítios de ligação do anticorpo. Essa enzima requer o co-fator NAD que é convertido em NADH quando está na forma livre para reagir com o substrato. À medida que ocorre a reação do anticorpo com o antígeno proveniente da amostra, a atividade da enzima aumenta, provocando um aumento na absorvância que é proporcional à concentração do analito na amostra e é medido espectrofotometricamente (EMIT, 2002; HINO *et al.*, 2003; LU e TAYLOR, 2005).

Entretanto, o EMIT, para pesquisa de ANFs em urina, apresenta interferências nos resultados na presença de cloroquina, clorpromazina, metoxifenamina, quinacrina, fentermina, ranitidina, isometeptina, benzfetamina, procainamida e seu metabólito N-acetilprocainamida, os quais causam resultado falso positivo (EMIT, 2002). Por causa das semelhanças estruturais as EFs podem levar a resultado falso positivos no EMIT para ANFs (EL-HAJ *et al.*, 2003). A

presença de prometazina e difenidramina também pode levar a resultados falso positivos para ANF por EMIT, devido a semelhança estrutural de seus produtos de biotransformação com a estrutura nitrogenada da ANF (DOMINGOS, 2006).

3.2.2 Cromatografia a gás/espectrometria de massas/massas (CG/EM/EM)

CG/EM/EM é uma metodologia normalmente usada como confirmatória da identificação de substâncias e atualmente vem sendo utilizada também para quantificação de substâncias em amostras forense (UNITED NATIONS, 2006). O maior fator limitante de seu uso, entretanto, é o elevado custo e complexidade de operação.

O sistema mais difundido é o do tipo *ion trap* (captura de íons por quadropolos tridimensionais), o qual apresenta uma série de vantagens em relação ao sistema quadropolo, entre elas facilidade de limpeza, robustez, massa seqüencial de estágios múltiplos (EMⁿ) e melhor sensibilidade no modo *full scan*, pois os íons são analisados no mesmo local em que são originados. Além disto, o uso de EM/EM confere aumento de seletividade para as análises.

Equipamentos como o Saturno 2000 opera no modo Impacto Eletrônico (IE) para *full scan* e para Selected Ion Monitoring (SIM) e no modo Ionização Química (IQ) para EM/EM. A IQ é interna e automatizada com reagente líquido (acetonitrila na forma deuterada). Fornece informações importantes como a determinação da massa molecular, pela presença do ion molecular protonizado (MH⁺), posição de ligas duplas, confirmação da estrutura química, cromatogramas com uma linha de base plana, pico simétrico sem interferências espectrais e limites de detecção menores (VARIAN, 1999).

A principal vantagem do uso CG/EM/EM neste trabalho foi a identificação inequívoca de alguns derivados formados nas reações de derivatização, o qual não foi possível ao utilizarmos apenas o CG/EM.

3.3 Métodos de Preparo de Amostras

Devido a complexidade da matriz, a análise cromatográfica de analitos presentes na urina requer um pré-tratamento da amostra, que abrange as etapas de extração, pré-concentração e purificação, com o objetivo de obter um extrato límpido, livre de impurezas, interferentes e aumentar a sensibilidade e seletividade analítica.

Os métodos convencionais, empregados em análises de rotina de ANFs e EFs em urina, utilizam extração líquido-líquido (ELL). A extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) são importantes e promissoras alternativas, melhorando a performance analítica e a detectabilidade.

Para análise de ANFs em urina, devido à excreção do metabólito na forma conjugada com o ácido glicurônico, é necessário uma etapa inicial de hidrólise ácida ou enzimática (KRAEMER *et al.*, 2000).

Algumas características destes métodos, segundo Ulrich (2000); Saito e Jinno (2001); Queiroz e col. (2001); Gomes (2002); Huang e Zhang (2003) e Lanças (2004) estão descritas a seguir:

3.3.1 Extração líquido-líquido (ELL)

ELL é considerada um método clássico de preparo de amostras. Nesta separação ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente extrator, da razão das fases e do número de extrações. Além disso, a escolha adequada do solvente orgânico e o ajuste de pH da amostra são necessários para assegurar uma boa recuperação do analito.

Apresenta a vantagem de ser simples e poder usar vários tipos de solventes, entretanto possui várias desvantagens, tais como, consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, várias etapas para sua execução e formação de emulsão entre as fases, uso de grandes volumes de amostras e de solventes, o que resulta na perda do analito.

3.3.2 Extração em fase sólida (SPE)

SPE é um método de preparo de amostras que consiste na separação sólido-líquido, baseado nos mecanismos de cromatografia líquida de baixa pressão que consiste no condicionamento do leito cromatográfico para reter seletivamente o analito, eliminar os interferentes e promover a concentração do mesmo para a análise. Usa sorventes (fase estacionária) contidos em uma pequena coluna aberta (cartuchos de extração) (Figura 3.5), formada de polipropileno, contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros.

Muito utilizada na indústria farmacêutica, em laboratórios clínicos, toxicológicos e de análises ambientais, a SPE apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos favorecendo, desta forma, a seletividade e especificidade, remoção de interferentes e diminuição do consumo de solventes. Entretanto, tem apresentado algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora (saturação do leito) pelos componentes da matriz; problemas em relação à etapa de adsorção e dessorção do analito aprisionado no cartucho da SPE que pode ser resolvido aumentando a quantidade do solvente e dividindo o volume em duas a três eluições ou empregando técnicas de dessorção térmica, que requer equipamento especial de elevado custo. Apresenta dificuldades na extração de analitos anfóteros e altamente polares, analitos solúveis em água. Outro problema é a falta de uniformidade dos cartuchos, mesmo sendo do mesmo tipo (ex. C_{18}), apenas com a mudança de marca do fabricante, reforçando a necessidade de validação do método.

Algumas outras desvantagens da SPE frente a ELL são o alto custo e o maior número de etapas de operação, como condicionamento, lavagem, eluição e maior tempo necessário para evaporação do solvente, pois os utilizados na SPE, muito comum metanol ou metanol + álcool isopropílico, apresentam uma pressão de vapor menor que os usados em ELL, como por exemplo clorofórmio e hexano.



Figura 3.5: Princípio da técnica SPE. Fonte: Lanças (2004).

Em geral, os procedimentos de SPE para aminas contêm 4 etapas:

1) Condicionamento:

- a) Ativação do sorvente com metanol, isopropanol ou outro solvente orgânico com polaridade intermediária para deixar os sítios ativos disponíveis e manter o sorvente úmido evitando a formação de canais.
- b) Condicionamento com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra. Normalmente usam um solvente com composição similar a matriz urina em termos de força iônica e pH, como por exemplo solução tampão usada para diluir a amostra.

2) Adição da amostra: quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes. É aconselhado diluir a amostra e adicionar tampão $\text{pH} \leq 7$.

3) Lavagem: remoção dos interferentes menos retidos no sorvente que o analito. O solvente de lavagem ideal remove todas as impurezas sem afetar no tempo de retenção e a recuperação do analito. O volume ótimo para esta etapa é normalmente 1 mL por 100 mg de sorvente.

4) Eluição do analito por troca iônica: solventes orgânicos polares podem ser usados em combinação com bases fortes pH 12. Geralmente, volumes de eluição maiores que 1 mL são necessários para aumentar a recuperação do analito, também se deve levar em conta que duas etapas de eluição com pequenos volumes são mais eficientes que apenas uma.

Os principais mecanismos em uso em SPE são partição, adsorção e troca iônica.

A partição é empregada quando o sorvente é menos polar que o solvente de eluição – fase reversa. No caso da fase reversa, quanto maior for a cadeia do radical alquila, mais apolar será a fase e, desta forma, apresentará maior potencial para reter analitos apolares. Ex. de sorvente: C18 (octadecilsilano). Ex. de analitos: fármacos e drogas de abuso em sangue e urina e agrotóxicos na água.

A adsorção é empregada quando o solvente é menos polar que o sorvente - fase normal. Ex. de sorventes: alumina ou polimetilsilano. Ex. de analitos: lipídeos em matrizes biológicas, toxinas polares em alimentos.

A troca iônica é usada para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico presentes nas soluções aquosas. Por exemplo, analitos com carga positiva como aminas são retidas por cargas negativas (SCX = *strong cation exchanger*) como ácidos carboxílico ou sulfônico, consistindo em um trocador forte de cátions (SCX) do tipo $[\text{SO}_3^-]$, aprisionado à estrutura básica da sílica.

3.3.3 Microextração em fase sólida (SPME)

SPME é uma microtécnica, em que os processos de extração, pré-concentração e derivatização dos analitos ocorrem em uma única etapa. O dispositivo básico da SPME consiste de uma fibra ótica, de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero (polidimetilsiloxano - PDMS, poliacrilato - PA ou polietilenoglicol – carbowax, entre outros) acondicionada dentro da agulha de uma microseringa (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

Baseia-se em um processo de equilíbrio entre fases. O sistema de extração consiste da fase aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição ou sorção seja atingido (QUEIROZ e LANÇAS, 2005).

A extração pode ser feita de duas maneiras: mergulhando a fibra diretamente na amostra, conforme Figura 3.6, ou através da técnica de *headspace*, na qual a

amostra é aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos na fibra, conforme Figura 3.7 (ULRICH, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2001).

Após o processo de extração, a fibra é inserida no injetor aquecido e os analitos são rapidamente desorvidos termicamente para a coluna cromatográfica; desta forma, as análises realizadas por SPME-CG não utilizam solventes orgânicos (QUEIROZ e LANÇAS, 2005).

Em SPME não ocorre extração exaustiva, mas sim, equilíbrio entre a fase aquosa e a fase orgânica estacionária. Portanto, haverá uma relação linear entre a quantidade sorvida na fase estacionária e a concentração na amostra (LANÇAS, 2004). A quantidade de substância transferida é pequena, mas suficiente para produzir um sinal analítico significativo nos detectores de massas, na ordem de nanogramas ou picogramas (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2004).

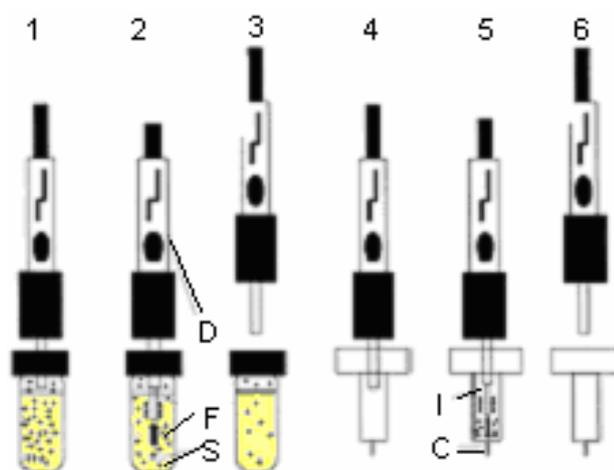


Figura 3.6: Princípio da técnica SPME: 1= introdução da seringa no vial da amostra; 2= expor a fibra para adsorção dos analitos (D= embolo da seringa; F= fibra e S=analito); 3= mover a fibra para dentro da agulha da seringa e retirá-la do vial; 4= perfurar o septo do injetor do CG/EM com a agulha da seringa; 5= expor a fibra para desorção (I= injetor, C= coluna); 6= mover a fibra para dentro da agulha da seringa e retirá-la. Fonte: Ulrich (2000).

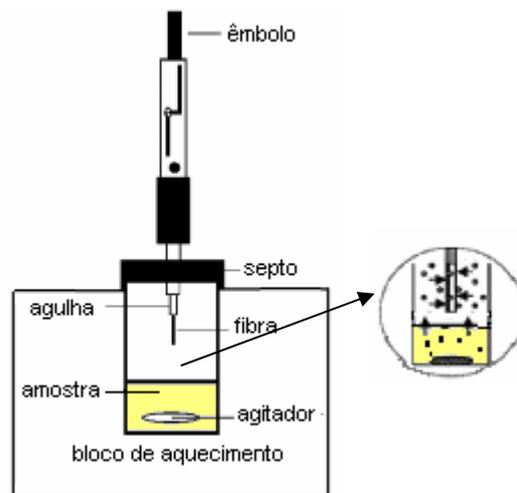


Figura 3.7: Ilustração esquemática do método SPME – *Headspace*. Adaptado de Queiroz e col. (2001).

A SPME, desenvolvida por Pawliszyn em 1990, apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos convencionais de extração, ou seja, não requer instrumentação analítica sofisticada, o processo operacional é rápido, permite automação das análises, concentração dos analitos, reutilização das fibras extratoras, simplicidade, menor número de interferentes e a possibilidade de não usar solventes tóxicos na extração, tornando-a mais segura para o operador e ao meio ambiente (QUEIROZ e LANÇAS, 2005). Em contrapartida, o analito precisa ser volátil e termicamente estável para ser desorvido e determinado por CG (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Apesar da simplicidade da técnica o número de parâmetros experimentais a serem otimizados e controlados em SPME é bastante superior aos da ELL e da SPE, como tempo e temperatura de adsorção, com ou sem agitação da amostra, tempo e temperatura de desorção, tempo de equilíbrio de partição, extração direta ou por *headspace*, seleção do tipo de fibra, pH da amostra, entre outros. Em geral, a adição de cloreto de sódio aumenta a força iônica e provoca a redução na solubilidade do analito na matriz facilitando sua extração pela fibra, ampliando a sua eficiência.

Para análise de compostos polares como os ANFs, a conversão do grupo amino polar em um análogo menos polar aumenta seu coeficiente de partição com a fibra, acentuando ou melhorando a extração do analito da amostra e assim, aumentando a sensibilidade do método (UGLAND *et al.*, 1999).

3.4 Derivatização

Derivatização é a transformação de um composto químico em outro com a finalidade de melhorar o perfil cromatográfico, aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade do analito, melhorar a especificidade, precisão e sensibilidade do método, diminuir a polaridade dos compostos e evitar a perda do analito por adsorção a coluna ou por decomposição térmica (LANÇAS, 1993).

O aumento do peso molecular resultante do procedimento de derivatização pode ser benéfico porque produz íons de massa maior, mais específicos para o analito. Em se tratando de ANFs, os íons base da anfetamina, metanfetamina e efedrina, no modo impacto de elétrons, são m/z 44, 58 e 58, respectivamente. Estes íons são de baixo peso molecular, inespecíficos e comuns a diversas aminas.

A derivatização de um analito, consiste na substituição dos hidrogênios livres ativos de grupamentos como carboxila (-COOH), hidroxila (-OH), tiol (-SH), amino (-H₂) e imino (=NH), por outros que impeçam as ligações do tipo hidrogênio, resultando em novos compostos, onde a estrutura química do analito é modificada e, conseqüentemente, o seu padrão de fragmentação (LANÇAS, 1993; SUPELCO, 2007).

Embora compostos com grupamentos amino são suficientemente voláteis para injeção direta no CG/EM, os grupos polares -NH podem adsorver na coluna cromatográfica e gerar picos não gaussianos (com cauda), sendo que concentrações muito baixas dos analitos nas amostras podem ocasionar a perda do mesmo. Métodos de derivatização podem ser empregados para reduzir a polaridade do grupo amino e melhorar a performance analítica. Também podem ser usados para separar compostos ou conferir detectabilidade aos mesmos (LANÇAS, 1993).

Um grande número de reagentes é usado para preparar derivados para cromatografia a gás. Em se tratando de compostos ANFs, as principais reações de derivatização empregadas são:

- Acetilação: consiste na conversão de compostos que contém hidrogênios ativos como os grupos polares (-NH₂, -NH, -OH, -SH,) em ésteres, tioésteres e amidas, geralmente por um ácido carboxílico ou derivado, como anidrido acético, anidrido

trifluoracético e anidrido pentafluoropropiônico. Bases como a piridina são utilizadas como catalisadores, entretanto, podem levar à formação de produtos secundários e afetar a resolução do cromatograma (LANÇAS, 1993; ENSSLIN *et al.*, 1996; SUPELCO, 2007).

- Sililação: é a introdução de um grupo silil em um composto orgânico, normalmente em substituição a um hidrogênio ativo presente nos grupos –OH, –SH e –NH. São exemplos de reagentes de sililação N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) e N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA). Derivados silil seguem ordem de reatividade, dependendo do impedimento estérico, conforme grupo funcional: OH alcoólico 1º, 2º, 3º > OH fenólico > Carboxila > amina 1º, 2º > amida (LANÇAS, 1993; ENSSLIN *et al.*, 1996; CASTILHO e SILVEIRA, 1998; SUPELCO, 2007).
- Condensação: consiste na adição dos grupamentos amina de compostos ANFs ao grupo carbonila de reagentes como acetona e ciclohexanona (CH), com formação de base de Schiff (KNAPP, 1979; EL-HAJ *et al.*, 2003).

A eficiência do procedimento de derivatização pode depender de inúmeros fatores, incluindo condições de reação como tempo e temperatura, natureza dos reagentes e dos solventes (SHAREEF *et al.*, 2006), características do meio e secagem do extrato (por evaporação com corrente de nitrogênio). Contudo, a concentração é sempre uma operação extremamente delicada, devendo ser realizada lenta e cuidadosamente, evitando-se perdas da amostra por projeções ou acúmulo nas paredes dos viais de reação (CASTILHO e SILVEIRA, 1998).

A seleção adequada do RD é um fator crítico no desenvolvimento do método e na sua validação, deve ser baseada nos grupos funcionais presentes na molécula e suas propriedades e na performance da reação de derivatização. A estrutura química e as propriedades do analito também influenciam na escolha do RD. Um excesso molar deste é aconselhado para garantir um elevado rendimento da reação, ideal entre 95 – 100% (LANÇAS, 1993).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras biológicas usadas neste projeto constituem: (a) urinas negativas, obtidas de voluntários do próprio laboratório que não fizeram uso dos analitos em questão durante o período do estudo, enriquecidas com os analitos de interesse; (b) urinas de voluntários que fizeram uso terapêutico de efedrina ou pseudoefedrina ou femproporex previamente a coleta; (c) urinas de pacientes (amostras reais) provenientes do banco de amostras do NAL/CIT/FEPPS, as quais são coletadas ocasionalmente para as análises de rotina.

O emprego das amostras de pacientes foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul PADCT: n°08/2005 de 11 de abril de 2006 (Anexo A).

4.2 Soluções-padrão

As soluções-padrão de *dl*-anfetamina e *dl*-metanfetamina foram obtidas da Radian International (Austin, EUA), na concentração de 1 mg/mL, em metanol. A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 10 µg/mL em metanol sendo estocadas a -18 °C.

Padrões de *l*-efedrina e *d*-pseudoefedrina foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH. Soluções de trabalho foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol sendo estocadas a -18 °C.

4.3 Análises de Triagem por EMIT

As análises de triagem foram realizadas pela metodologia de EMIT, com o reagente Emit[®] d.a.u. Monoclonal Amphetamine/Methamphetamine Assay; no equipamento automatizado ETS PLUS SYVA - Dade Behring, consignado ao NAL/CIT/RS, seguindo as recomendações do fabricante. Segundo NIDA (1997), o valor de corte (*cut-off*) para teste de triagem de anfetaminas é 1000 ng/mL.

4.4 Análises Confirmatórias por CG/EM

A metodologia de CG/EM utilizada foi adaptada de Centini e col. (1996); Staerk e Kulpmann (2000); Pellegrini e col. (2002); El-Haj e col. (2003); Nishida e col. (2004) e Wang (2005). Os valores de corte adotados foram os preconizados pela NIDA (1997) e WADA (2006), de 500 ng/mL para ANF e MA e 10 µg/mL para EF. Para MA, quando considerada a parcela excretada na forma de ANF, o valor de corte aplicado é de 200 ng/mL.

As amostras foram injetadas no equipamento CG 3800 Varian®, com injetor 1079 *split/splitless*, amostrador automático 8200 Varian®, e analisadas no detector de massas – massas Saturno CG/EM/EM 2000 Varian®. A coluna capilar usada foi CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (5% polidimetilsiloxano) – Varian®. O hélio (99,9999%) foi usado como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL/min. A coluna do CG foi operada inicialmente a 80 °C (2 min), rampa 50 °C/min até 250 °C (2 min), rampa de 100 °C/min até 280 °C (1 min). As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas a 220 °C e 260 °C, respectivamente. Volume de injeção 1 µL, no modo split 1:10. As análises foram processadas no modo de IE com uma energia de ionização de 70 eV para CG/EM e IQ com acetonitrila, para CG/EM/EM. O resultado foi registrado como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z).

O pico do íon molecular (IM) de uma monoamina alifática é ímpar e usualmente pouco intenso usando-se o equipamento do tipo quadrupolo da Shimadzu. No sistema *ion trap* do Saturno 2000 EM/EM utilizado para realização deste trabalho, é possível aumentar a abundância do IM de modo a torná-lo evidente, através da formação de MH^+ , por IQ. O MH^+ sofre α clivagem levando a formação dos picos base, como ilustrado na Figura 4.1 (SILVERSTEIN, 2000).

Para a análise qualitativa, inicialmente o detector de massas foi ajustado no modo *full scan* com intervalo de m/z 40 a 400 u.m.a, sendo monitorados todos os íons obtidos no analisador. Uma vez otimizada a metodologia analítica, ajustou-se o detector para o modo SIM (Selected Ion Monitoring), sendo então monitorados os íons m/z 44 (pico base), m/z 91, m/z 77 (picos chave) e m/z 136 (pico do íon molecular + H) para ANF; m/z 58 (pico base), m/z 91, m/z 77 (picos chave) e m/z

150 (pico do íon molecular + H) para MA e m/z 58 (pico base), m/z 77, m/z 107 (picos chave) e m/z 166 (pico do íon molecular + H) para EF. A Figura 4.2 mostra a formação dos principais fragmentos de massas da ANF, MA e EF, sem nenhum procedimento de derivatização.

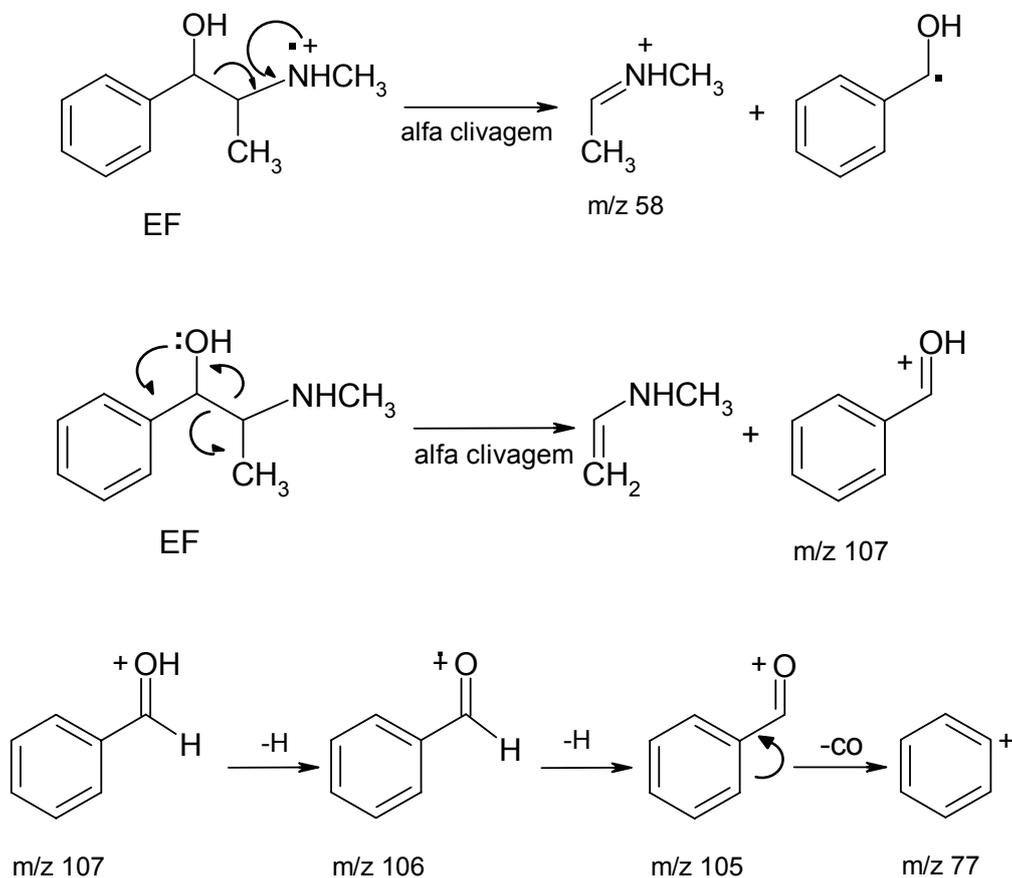


Figura 4.1: Formação dos principais íons m/z 58, 77 e 107 da EF em detalhes.

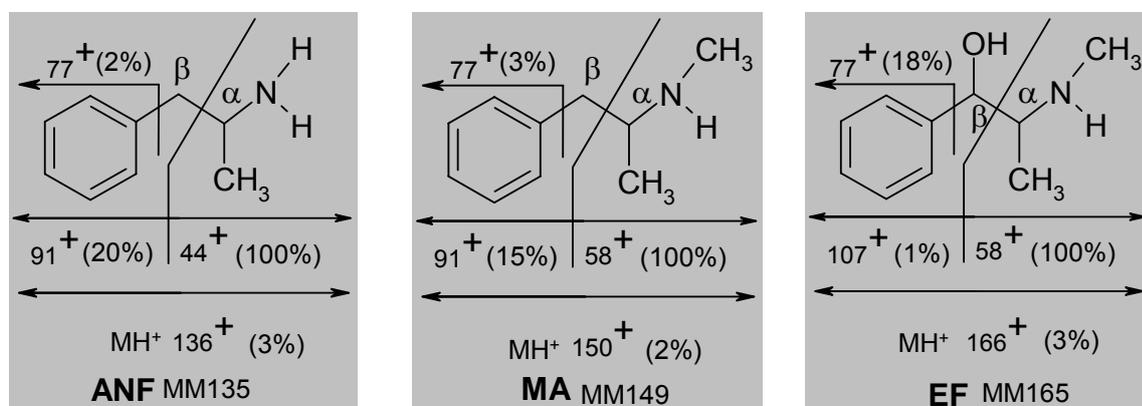


Figura 4.2: Padrão de fragmentação de massas da ANF, MA e EF com as respectivas abundâncias relativas.

4.5 Estudo dos Reagentes de Derivatização (RD)

Apesar da derivatização ser uma etapa que pode viabilizar uma análise, é também uma fonte potencial de erros se não realizada de forma adequada. Vários aspectos são importantes, como a escolha do RD e do sistema de solventes (SS) mais adequados, a determinação do tempo e da temperatura de reação e a determinação da estabilidade do derivado formado.

Devido à disponibilidade do padrão analítico e maior complexidade da molécula, a EF foi escolhida para etapas de otimização da metodologia de derivatização. As condições analíticas selecionadas foram testadas para ANF e MA.

4.5.1 Reagentes de derivatização (RD)

Os RD testados neste trabalho foram:

- Anidrido Acético (AA) - Merck Germany;
- Anidrido Acético+Piridina (AA+P) - Merck Germany;
- Anidrido Trifluoroacético (ATFA) - Sigma - Aldrich Chemical;
- Ciclohexanona (CH) - Sigma - Aldrich Chemical;
- *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) – Sigma - Aldrich Chemical;
- *N*-(*tert*-butildimetilsilil)-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) - Sigma - Aldrich Chemical.

4.5.2 Sistemas de solventes (SS)

A escolha do SS é outra etapa crítica, que reflete direto na eficiência do método, pois o SS empregado deve ser compatível com o empregado na etapa de extração. Devido ao caráter predominantemente básico dos ANFs, geralmente compreende compostos orgânicos de alta a média polaridade, em meio básico. Os SS testados foram:

- A= metanol + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2),

- B= acetato de etila + NH₄OH (98:2),
- C= clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2),
- D= metanol.

4.5.3 Procedimentos empregados nos estudos de RD e SS

Para cada SS foram preparados 6 vials com 1 mL do respectivo SS enriquecido com 20 µL de uma solução padrão de EF 1000 µg/mL em metanol, adotando-se como identificação os números romanos. Estes 6 vials foram divididos em dois grupos: um com 4 vials (I, II, III e IV) e outro com 2 vials (V e VI).

Os primeiros 4 vials foram submetidos à secura a 40 °C sob N₂. Ao extrato seco foram adicionados 50 µL do RD em 2 vials (I e II) e 100 µL do RD nos outros 2 (III e IV). Aos 2 últimos vials, sem evaporar o SS, foi adicionado 50 µL do RD no primeiro (V) e 100 µL no segundo (VI). Todos os 6 vials foram colocados em um bloco de aquecimento a 60 °C durante 60 min para derivatização, sendo que este tempo e temperatura variaram conforme o tipo de reagente utilizado e em acordo com dados da literatura. Os vials II, IV, V e VI foram levados à secura a 40 °C sob N₂ e reconstituído com 100 µL de metanol, sendo os denominados I e III mantidos intactos. Uma alíquota de 1 µL foi injetada no CG/EM. Este procedimento está sumarizado na Figura 4.3.

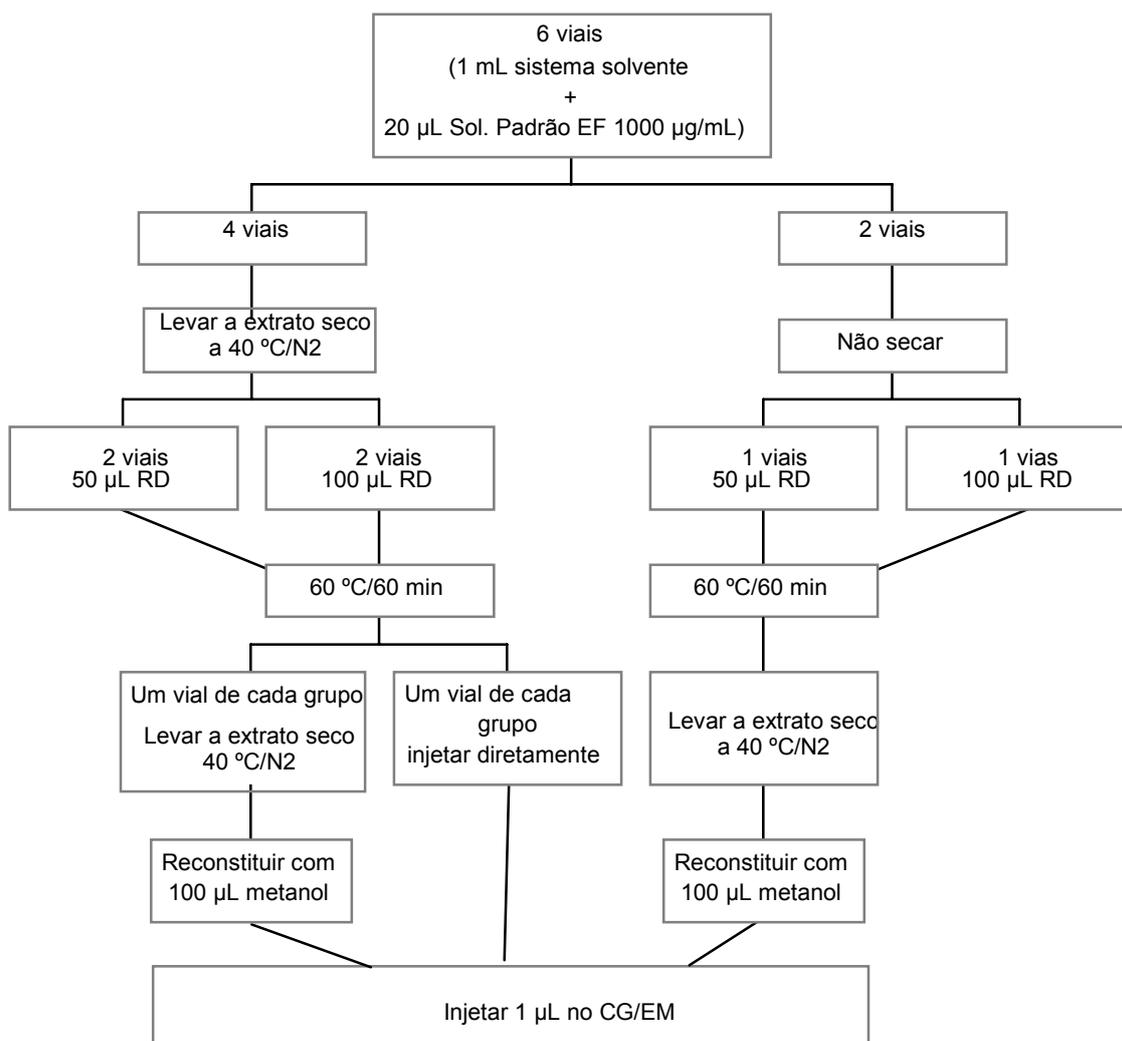


Figura 4.3: Fluxograma do procedimento de derivatização.

4.5.4 Determinação das condições de tempo e temperatura de derivatização.

Uma vez definidos o RD e o SS apropriados, procedeu-se a determinação do tempo e da temperatura de reação visando melhor performance analítica e maior recuperação dos analitos de interesse. Foram preparados 16 vials com 1 mL do SS e o RD escolhidos, e 20 µL de uma solução padrão de EF 1000 µg/mL em metanol. Foram divididos em 4 grupos, cada grupo foi submetido a uma das temperaturas de 40, 60, 80 e 100 °C e cada vial do grupo submetido a um dos tempos de 15, 30, 45 e 60 min.

4.5.5 Tempo de estabilidade do derivado formado

Após a escolha do melhor RD e SS, foi determinado o intervalo de tempo mais adequado para injeção no CG/EM após a derivatização considerando-se a

estabilidade do derivado formado. Foram testados quatro tempos de injeção distintos, sendo T0 = 1^a injeção no CG/EM logo após a derivatização, T1 = 1 h após T0, T2 = 2 h após T0 e T3 = 3 h após T0 e quatro diferentes proporções entre a EF e o RD (1:1; 1:2,5; 1:5; 1:10 ($\mu\text{g/mL}$: μL)).

4.6 Métodos de Extração

4.6.1 Extração líquido-líquido (ELL)

As amostras de urina que apresentaram resultado positivo para ANF/MA nas análises de triagem (EMIT) foram submetidas a ELL. Uma alíquota de 5 mL de urina foi adicionada de 1,5 mL de ácido clorídrico fumegante e homogeneizada por 15 min. Em seguida, foi ajustado o pH da amostra entre 9-10 com NH_4OH 30% e acrescentado 10 mL de clorofórmio:álcool isopropílico (80:20), agitação em mixer por 1 min e centrifugação a 6000 rpm por 5 min. A fase orgânica foi separada por filtração sobre sulfato de sódio anidro e evaporada sob fluxo de nitrogênio a 40 °C. O extrato foi submetido a derivatização e 1 μL foi injetado no CG/EM.

4.6.2 Extração em fase sólida (SPE)

Os procedimentos empregados para SPE foram adaptados de Huang e Zhang (2003), Forsdahl e Gmeiner (2004) e bula do kit Bond Elut Certify Varian®.

Amostras de urina, enriquecidas com uma solução padrão de EF 1000 $\mu\text{g/mL}$ em metanol na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, foram eluidas em cartuchos do tipo Bond-Elut Certify Varian® (mistura C8 e SAX 300mg, capacidade 3 mL) a 1-2 mL/min com vácuo de 5 polegadas de Hg. Foram testados diferentes procedimentos, com variações no condicionamento, pH e volumes de amostra. Para seleção da faixa de pH empregado, foram levados em consideração os valores de pKa da ANF (pKa 9,9) e EF (pKa 9,6), sendo mantido pH ácido na etapa de retenção dos analitos e pH básico para eluição (THE MERCK INDEX, 2001, MARTINDALE, 2005; MOFFAT *et al.*, 2004). Para o procedimento mais adequado, foram determinados o volume de capacidade do sorvente (volume de quebra) e a influência da força iônica através da adição de cloreto de sódio. Os procedimentos testados estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Procedimentos testados para extração de ANFs por SPE.

SPE	ETAPAS			
	CONDICIONAMENTO ^a	ADIÇÃO AMOSTRA	REMOÇÃO INTERFERENTES	ELUIÇÃO ^d
1	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 5,0 mL urina + 2,0 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 5,0 mL água purificada + vácuo 5 min	(5) 2,0 mL acetato de etila:NH ₄ OH 2%
2	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 5,0 mL urina + 2,0 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 1,0 mL Ácido Acético 1,0 M + vácuo por 5 min (5) 6,0 mL metanol	(6) 2,0 mL acetato de etila: NH ₄ OH 2%
3	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 5,0 mL urina + 2,0 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 1,0 mL Ácido Acético 1,0 M + vácuo por 5 min (5) 6,0 mL metanol	(6) 2,0 mL metanol:álcool isopropílico:NH ₄ OH (78:20:2)
4	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 2,0 mL urina (pH 6,0-7,0)	(4) 2,0 mL água purificada (5) 5,0 mL HCl 0,1 M (6) 3,0 mL metanol + vácuo por 5 min	(7) 2,0 mL acetato de etila:NH ₄ OH 2%
5	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 2,5 mL urina + 2,5 mL água purificada + 1,5 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 6,0 mL água purificada (5) 3,0 mL HCl 0,1 M + vácuo por 5 min (6) 9,0 mL metanol	(7) 2,0 mL metanol:álcool isopropílico:NH ₄ OH (78:20:2)
6	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 2,5 mL urina + 2,5 mL água purificada + 1,5 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 6,0 mL água purificada (5) 3,0 mL HCl 0,1 M + vácuo por 5 min (6) 9,0 mL metanol	(7) 2,0 mL acetato de etila:NH ₄ OH 2%
7	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 2,5 mL urina + 2,5 mL água purificada + 1,5 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 6,0 mL água purificada (5) 3,0 mL HCl 0,1 M + vácuo por 5 min (6) 9,0 mL metanol	(7) 2,0 mL metanol
8	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 2,5 mL urina + 2,5 mL água purificada + 1,5 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 6,0 mL água purificada (5) 3,0 mL HCl 0,1 M + vácuo por 5 min (6) 9,0 mL metanol	(7) 2,0 mL clorofórmio: álcool isopropílico:NH ₄ OH (78:20:2)
9	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL TFpH6 ^b	(3) 2,5 mL urina + 2,5 mL água purificada + 1,5 mL TFpH6 ^b + 0,4 g NaCl. (pH 6,0-7,0)	(4) 6,0 mL água purificada (5) 3,0 mL HCl 0,1 M + vácuo por 5 min (6) 9,0 mL metanol	(7) 2,0 mL metanol:álcool isopropílico:NH ₄ OH (78:20:2)
10	(1) 2,0 mL metanol (2) 2,0 mL HCl 0,1 M	(3) 1,0 mL urina + 1,0 mL TACpH4,8 ^c	(4) 2,0 mL HCl 0,1 M (5) 2,0 mL metanol	(6) 4,0 mL clorofórmio: álcool isopropílico:NH ₄ OH (78:20:2)
11	(1) 1,0 mL metanol (2) 1,0 mL TFpH6 ^b	(3) 2,0 mL urina + 6,0 mL TFpH6 ^b (pH 6,0-7,0)	(4) 0,5 mL metanol + vácuo por 5 min.	(5) 2,0 mL de acetato de etila:NH ₄ OH 2%
12	(1) 5,0 mL metanol (2) 2,0 mL água purificada (3) 2,0 mL TFpH6 ^b	(4) 5,0 mL urina (pH6)	(5) 2,0 mL água purificada (6) 5,0 mL HCl 0,1 M (7) 3,0 mL metanol +vácuo por 5 min	(8) 2,0 mL metanol:álcool isopropílico:NH ₄ OH (78:20:2)

^a Cartuchos Bond Elut Certifie Varian ®. Após condicionar o cartucho e antes de adicionar a amostra, não deixar a coluna secar. ^b TFpH6 = tampão fosfato pH6 0,1M. ^c TACpH4,8 = tampão acetato de sódio pH4,8. ^d volume de eluição 2x2 mL.

Considerando a presença de clorpromazina (CLP) e difenidramina na maioria das amostras positivas para ANFs na etapa de triagem (EMIT) e negativas em análises confirmatórias por CG/EM, todas amostras analisadas foram submetidas a 2 extrações por SPE. Uma das extrações seguiu o protocolo para EF, descrito anteriormente e para a detecção de CLP adotamos o procedimento descrito por Domingos (2006), onde as amostras de urina foram submetidas à extração e pré-concentração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos Bond Elut (Varian®) Certify II (mistura C8 e SAX 200 mg, capacidade 3 mL), para análise por CG/EM. As condições adotadas foram: ativação do sorvente com 2 mL de metanol; condicionamento com 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 7,0; adição da amostra (2 mL de urina) em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 7,0 (pH final entre 5,0 e 7,0) a baixo vácuo (~5 polegadas Hg e fluxo de 1 mL/min); remoção dos interferentes com 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 7,0; vácuo por 5 minutos; 2mL de hexano:acetato de etila (95:5, v/v); eluição do analito através da passagem de 2 vezes de 5 mL de clorofórmio:álcool isopropílico:NH₄OH (78:20:2, v/v/v) e eluição em baixo vácuo (~5 polegadas Hg) sob fluxo de 1 mL/min. Após a eluição, as amostras foram levadas à secura sob corrente de N₂ a 40 °C. Os eluatos foram ressuspensos em 100 µL de metanol, do qual 1 µL foi injetado no cromatógrafo.

A análise de CLP por CG/EM foi realizada em equipamento CG 3800 VARIAN® detector massa-massa, injetor 1079 *split/splitless* com amostrador automático 8200 VARIAN® (SATURNO CG/MS/MS 2000), equipado com coluna capilar CP-SIL 8CB LOW BLEED/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás de arraste usado foi hélio 99,9999% (White Martins S/A®), com fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura do forno foi programada a 80 °C/2 min, 40 °C/min até 250 °C/3 min, 40 °C/min até 280 °C/3 min. As temperaturas do injetor e da linha de transferência para o detector de massas foram programadas a 220 °C e 260 °C, respectivamente. As análises foram processadas no modo de impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV, sendo injetados 1 µL, no modo *split* (1:10).

Para a análise qualitativa, inicialmente o detector de massas foi ajustado no modo FULL-SCAN com intervalo de 40 a 600 u.m.a., sendo monitorados todos os íons obtidos no analisador. Uma vez ajustada a metodologia analítica, o detector foi

programado para o modo SIM (Selected Ion Monitoring), sendo então monitorados os íons m/z 58 (pico base), m/z 86 e 272 (picos chave) e m/z 318 (pico do íon molecular), no intuito de aumentar a sensibilidade do método.

4.6.3 Microextração em fase sólida (SPME)

Os procedimentos empregados para SPME foram adaptados de Centini e col. (1996), Uglund e col. (1999), Staerk e Kulpmann (2000) e Pericás e col. (2005).

Em um frasco de vidro com capacidade para 30,0 mL foram colocados 3,0 mL de urina e 0,6 g de NaCl e ajustado o pH entre 9-10 com NH_4OH 30%. Após, foi adicionado 20 μL CH, derivatizado a 100 °C/30 min sob agitação com barra magnética. Em seguida, a fibra de 100 μm PDMS – polidimetilsiloxano (Supelco Bellefonte, USA) foi exposta ao *headspace* por 15 min para adsorção do analito (as condições de tempo, temperatura e agitação foram mantidas) e introduzida no injetor do CG/EM, onde permaneceu por 2 min para completa dessorção. O uso de NaCl aumenta a força iônica reduzindo a solubilidade dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa. Para a pesquisa de CLP e outros possíveis interferentes procedeu-se ao mesmo método descrito acima, com a diferença que não foi adicionado o RD.

Segundo Pericás e col. (2005), o RD deve ser colocado diretamente na amostra, para posterior exposição à fibra de SPME, pois quando a fibra é exposta primeiro à amostra e após ao RD ou invertendo-se a ordem, primeiro ao RD e após à amostra, a eficiência da SPME é menor.

4.7 Validação do Método Analítico

No que diz respeito à validação de metodologias, a legislação vigente tem várias nuances e diferentes interpretações. Parte desta característica é intencional, pois permite a adaptação para cada tipo de uso pretendido. Em nível Nacional, as resoluções e recomendações do INMETRO (2003) e ANVISA (BRASIL, 2002; BRASIL, 2003a) seguem as diretrizes da ICH (1996) e do grupo EURACHEM (1998).

A escolha dos parâmetros relevantes para o desempenho do processo analítico e o desenvolvimento de protocolos próprios de validação são de

responsabilidade do analista (ERMER, 2001). Neste trabalho, seguimos o preconizado pela ANVISA para validação de métodos bioanalíticos, considerando os parâmetros linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, robustez e estabilidade (BRASIL, 2002; BRASIL, 2003a). Os resultados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico de análise de variância (ANOVA).

Cabe salientar que a revalidação do método analítico deve ser feita sempre que houver qualquer modificação do método, mudanças nas condições do equipamento para as quais foi validado ou extrapolação para outros laboratórios.

Os resultados apresentados neste trabalho foram ordenados de maneira a demonstrar a seqüência em que os experimentos foram realizados, iniciando com a escolha do reagente de derivatização e as melhores condições de reação, seguida pelos métodos de extração, aplicação da metodologia em amostras reais e finalizando com uma compilação dos resultados obtidos.

5.1 Escolha do Reagente de Derivatização (RD)

Quando compostos anfetamínicos são analisados sem derivatizar, picos não gaussianos (com cauda) e problemas de linearidade e sensibilidade são encontrados. Outro problema a ser considerado é a dificuldade de separar diastêromeros (seletividade), especialmente EF e PEF (Figura 5.1), os quais apresentam diferentes ações farmacológicas sobre o SNC e, conseqüentemente, grande importância analítica.

A derivatização de EFs é uma etapa crítica na análise (FORSDAHL e GMEINER, 2004), pois permite a resolução entre os diastêromeros EF e PEF. Para a separação cromatográfica dos enantiômeros *d*-EFs e *l*-EFs é necessário a utilização de colunas quirais ou reagentes especiais de derivatização quiral não sendo o objetivo deste trabalho. O objetivo foi buscar um procedimento de derivatização rápido, com bons rendimentos e com formação de derivados estáveis, reprodutíveis e sem produtos paralelos. Adicionalmente, foram avaliadas a viabilidade econômica e a segurança de aplicação do RD em análises de rotina.

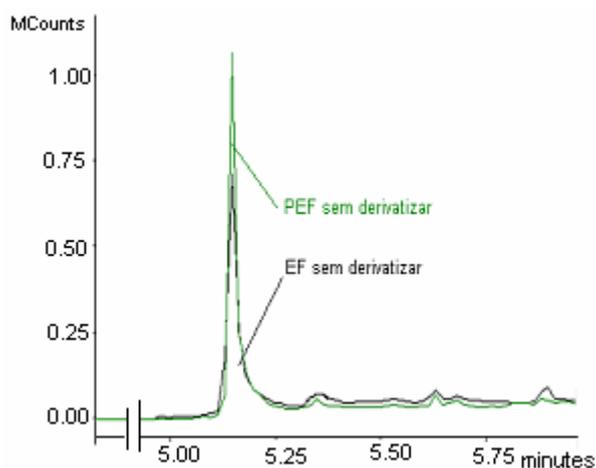


Figura 5.1: Cromatogramas sobrepostos de EF e PEF (20 µg/mL em metanol) sem derivatizar; tempo de retenção (TR) 5,13 min. Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (5% polidimetilsiloxano)–Varian®.

A formação de um único derivado é essencial para se obter maior sensibilidade e condições adequadas para quantificação. Assim, na etapa de otimização das condições de derivatização foram testados: anidrido acético (AA), anidrido acético + piridina (AA+P), anidrido trifluoracético (ATFA), *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), anidrido acético + *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (AA+MSTFA), ciclohexanona (CH) e *N*-(*tert*-butildimetilsilil)-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA).

Os RD avaliados neste trabalho também podem ser usados para a proteção de grupos reativos, como os grupos amino ou hidroxila, quando a finalidade for de seletividade por um dos grupos. Conseqüentemente, na escolha destes é essencial saber qual o grupo que se deve proteger e qual deverá estar livre para uma determinada reação específica, como no caso se uma seqüência de síntese (CAREY e SUNDBERG, 1990). Entretanto, nossa preocupação não foi com a seletividade do grupo que deveria ser protegido, mas sim com a formação de derivados estáveis, que forneçam picos gaussianos que aprimorem a linearidade e sensibilidade, e com fragmentos de massas característicos que permitam a diferenciação de diastêromos.

5.1.1 Anidrido acético (AA)

A derivatização da EF com AA (acetilação) seguiu o descrito no item 4.5.3., onde os resultados obtidos nas diferentes condições estão ilustrados na Figura 5.2 e descritos na Tabela 5.1 (Anexo B). Todas as amostras, após a derivatização, foram levadas à secura a 40 °C sob N₂ e reconstituídas com 100 µL de metanol para injetar 1 µL no CG/EM. Injeções diretas com AA não foram realizadas a fim de proteger a integridade da coluna cromatográfica do meio fortemente ácido, devido à formação de ácido acético e ao excesso do reagente de derivatização.

O tempo de retenção médio (TR) da EF acetilada foi de 6,25 min para todos os sistemas solventes (SS) e, além deste, mais dois outros picos de EF derivatizada foram observados (TR 5,97 min e 6,35 min) para os SS "A e C" e para o "D" foi observada EF não-derivatizada (TR 5,13 min).

De acordo com a Figura 5.2 o melhor SS foi o "B", onde observamos apenas um pico para EF derivatizada (TR 6,25 min) e não observamos EF sem derivatizar,

sendo os melhores resultados obtidos nas amostras VII e VIII, às quais foram acrescentados, respectivamente, 50 μ L e 100 μ L de AA diretamente no SS.

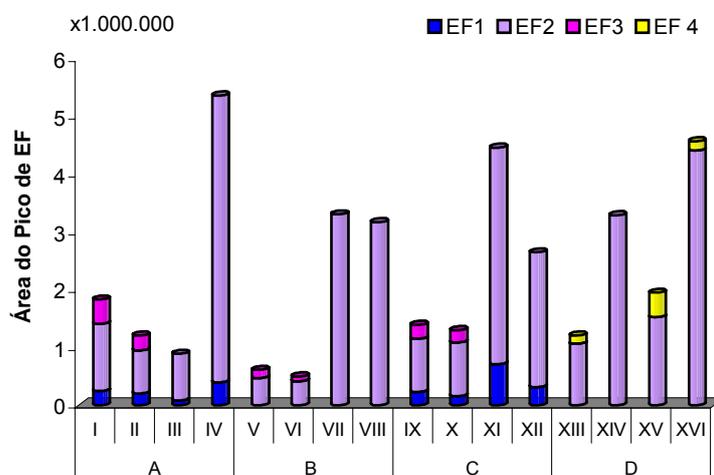


Figura 5.2: Gráfico do desempenho do AA como reagente de derivatização frente à EF. 20 μ L de uma solução de 1000 μ g/mL de EF em metanol foram adicionados a 1,0 mL dos respectivos SS: (A) metanol + álcool isopropílico + NH_4OH (78:20:2), (B) acetato de etila + NH_4OH (98:2), (C) clorofórmio + álcool isopropílico + NH_4OH (78:20:2), (D) metanol. Nas amostras de número I, III, V, VII, IX, XI, XIII e XV foram acrescentados 50 μ L de AA e nas amostras II, IV, VI, VIII, X, XII, XIV e XVI foram acrescentados 100 μ L de AA. Condições de reação 60 $^\circ\text{C}$ /60 min. (EF1) efedrina derivatizada TR 5,97 min, (EF2) efedrina derivatizada TR 6,25 min, (EF3) efedrina derivatizada TR 6,35 min, (EF4) efedrina não-derivatizada TR 5,13 min.

Os cromatogramas das amostras VII (A) e XV (B) são mostrados na Figura 5.3, onde podemos visualizar EF não-derivatizada (EF4) e EF derivatizada (EF2) na amostra B e apenas e EF derivatizada (EF2) na amostra A. As amostras preparadas utilizando o SS “C” (clorofórmio + álcool isopropílico + NH_4OH - 78:20:2) apresentaram um perfil cromatográfico mais complexo, sendo observados 3 derivados, EF1, EF2 e EF3 (Figura 5.4).

Os principais fragmentos de massas para EF acetilada no TR 6,25 min estão apresentados na Figura 5.5 e são os íons m/z 58 (pico base), decorrente da perda de 149 u.m.a. a partir do íon molecular (IM), m/z 100 (43%) indica a substituição do H do grupo amino por $-\text{COCH}_3$, m/z 77 (18%) referente ao íon benzílico, m/z 207 (IM) (<1%) e m/z 208 (MH^+) (20%).

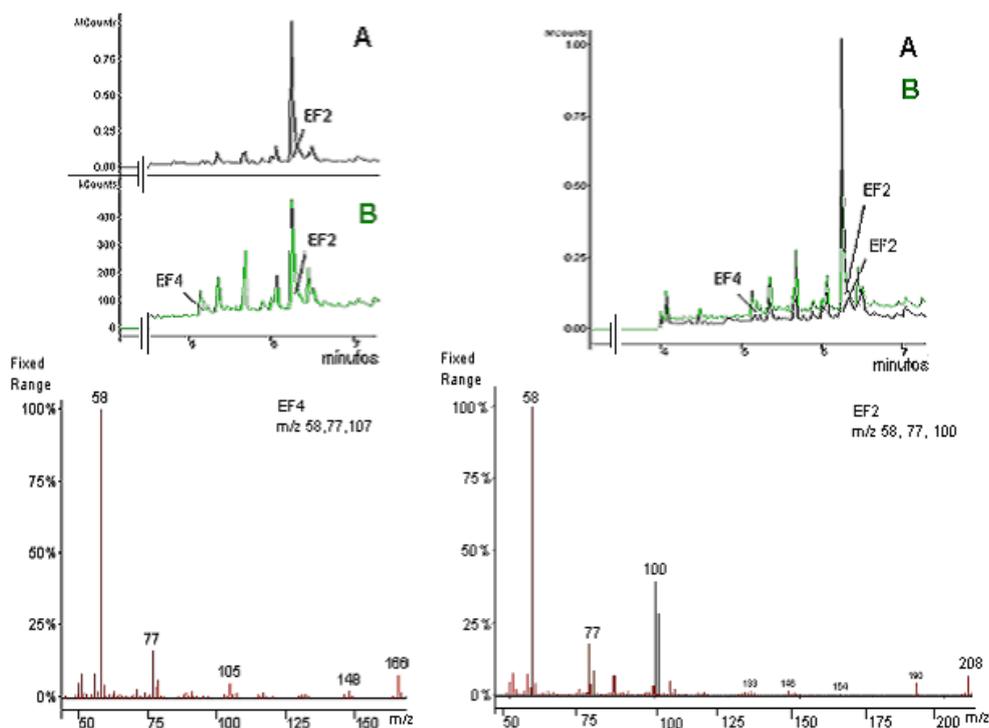


Figura 5.3: Cromatogramas das amostras VII (A) e XV (B) derivatizadas com AA; com os respectivos espectros de massas (EF2) efedrina derivatizada TR 6,25 min e (EF4) efedrina não-derivatizada TR 5,13 min.

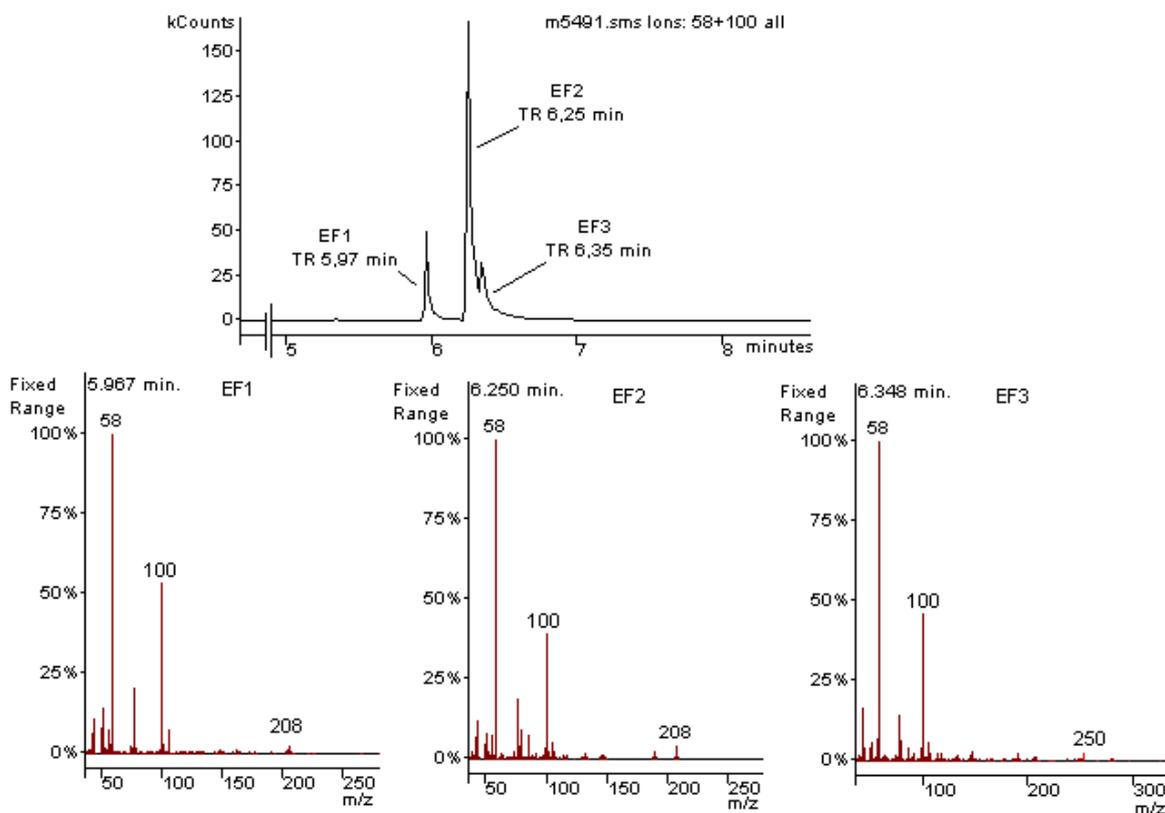


Figura 5.4: Cromatogramas das amostras IX derivatizadas com AA; com os respectivos espectros de massas das EFs derivatizadas TR 5,97 min (EF1), TR 6,25 min (EF2) e TR 6,35 min (EF3).

Ao contrário do que poderia se esperar que somente o grupo amino da EF fosse acetilado, devido a maior reatividade do grupo -NH em relação ao -OH, em nossos estudos, além de confirmamos esta acetilação, também observamos a reação com o grupo -OH, caracterizado pela presença do íon m/z 250 (MH^+), indicando que a acetilação ocorre no grupo -OH dependendo das condições de reação adotadas para a derivatização, neste caso 100 °C/60 min. Porém, os derivados N-acetil são mais estáveis que os O-acetil. Na Figura 5.5 podemos observar a formação dos derivados N-acetilefedrina, O-acetilefedrina e N-O-diacetilefedrina.

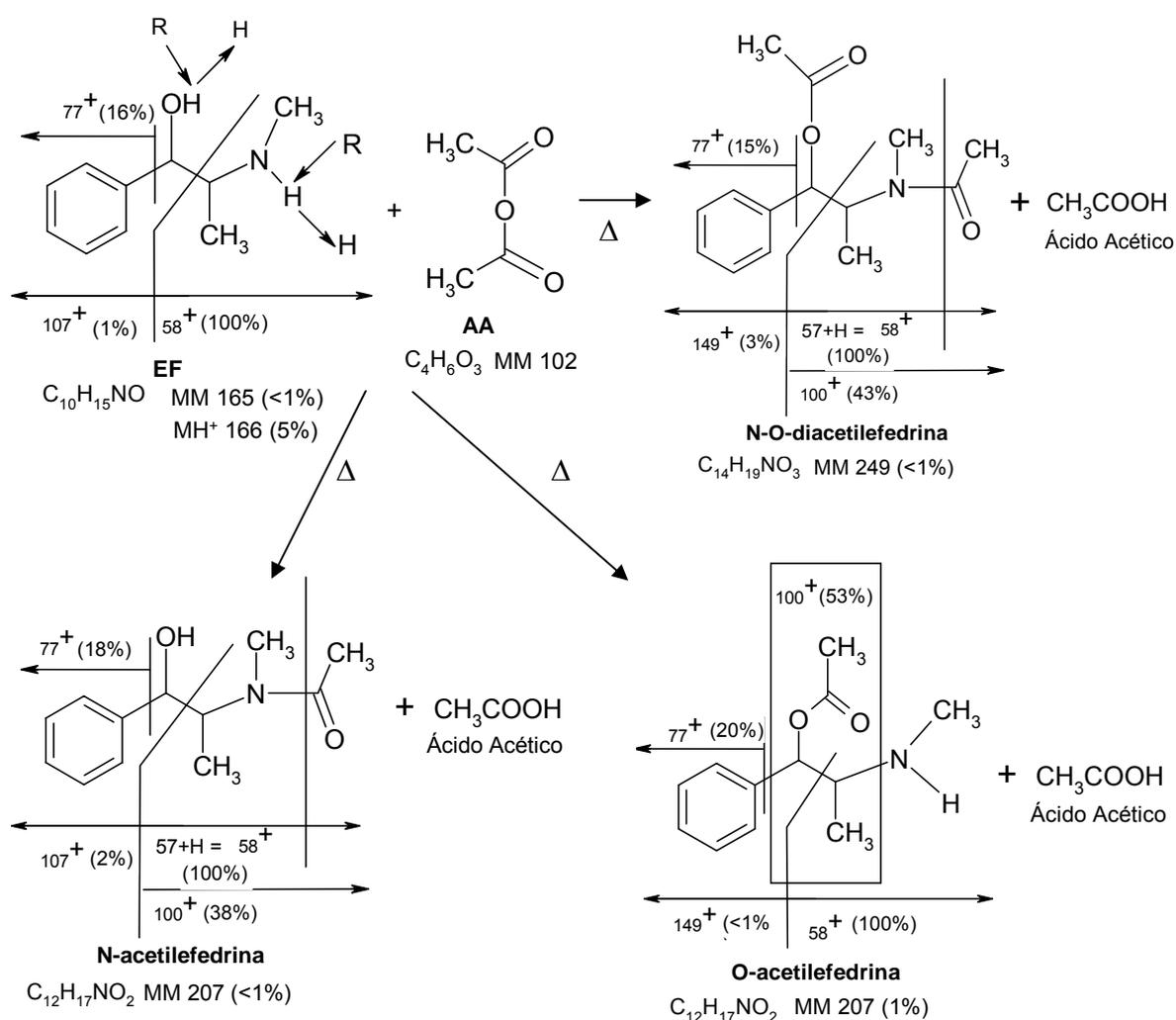


Figura 5.5: Esquema da reação de acetilação da EF com AA e os fragmentos de massas observados para EF, N-O-diacetilefedrina (EF3), N-acetilefedrina (EF2) e O-acetilefedrina (EF1) com as respectivas abundâncias relativas (%).

Os compostos EF2 (MM 207; TR 6,25 min) e EF3 (MM 249; TR 6,35 min) foram submetidos a experimentos mutiacoplados (EM^n). A partir destes íons precursores foram obtidos os íons (MH^+) m/z 208 e m/z 250, os quais foram refragmentados, gerando íons secundários m/z 190 (EM^2) para ambos os compostos e a partir destes, o íon m/z 148 (EM^3), caracterizando a formação dos derivados N-acetilefedrina (EF2; TR 6,25 min) e N-O-diacetilefedrina (EF3; TR 6,35 min). Estes dados demonstram que o grupo acetil é incorporado tanto ao grupo -NH quanto ao -OH dependendo das condições de reação, como demonstrado na Figura 5.6.

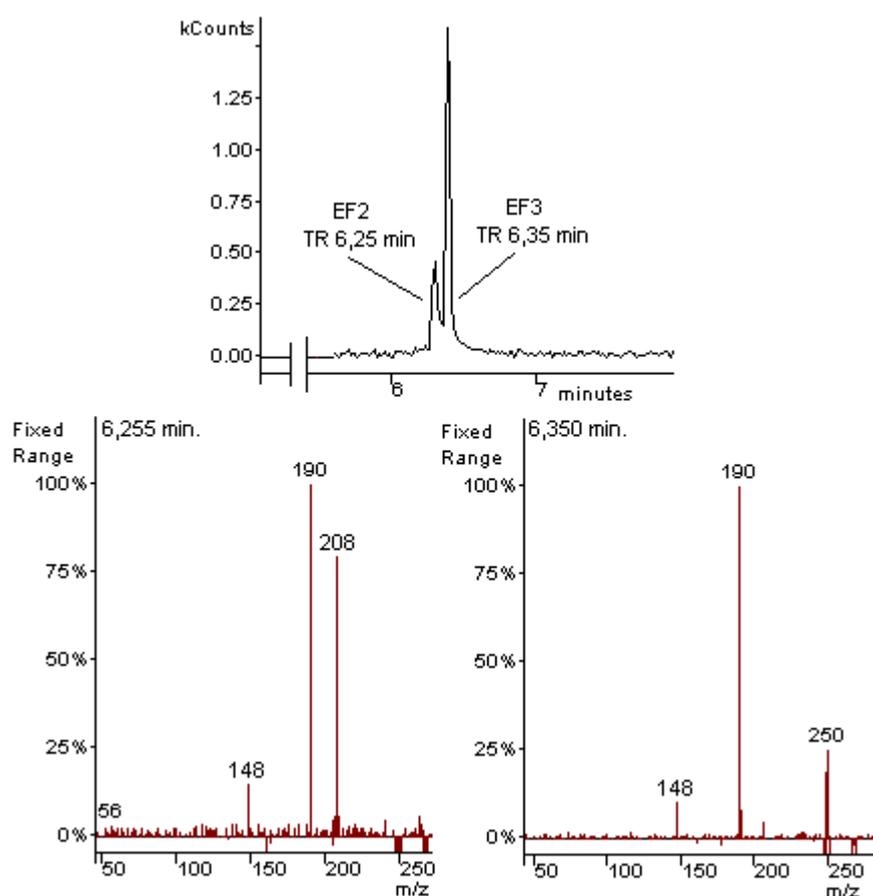


Figura 5.6: Cromatograma e espectros de massas (EM^3) das EFs derivatizadas N-acetilefedrina (EF2; TR 6,25 min) e N-O-diacetilefedrina (EF3; TR 6,35 min).

Para o composto com TR 5,97 min (EF1) não foi possível identificação precisa, devido à pequena quantidade formada ao ser submetido ao EM/EM (baixa energia de ativação), entretanto parece se tratar do derivado O-acetilefedrina (EF1). Os compostos com MM 165 (EF4; TR 5,13 min) foram caracterizados pela presença

dos íons secundários m/z 148 (EM^2). A formação destes íons e as respectivas intensidades relativas (%) a partir dos compostos EF, N-acetilefedrina, O-acetilefedrina e N-O-diacetilefedrina podem ser visualizados na Figura 5.7.

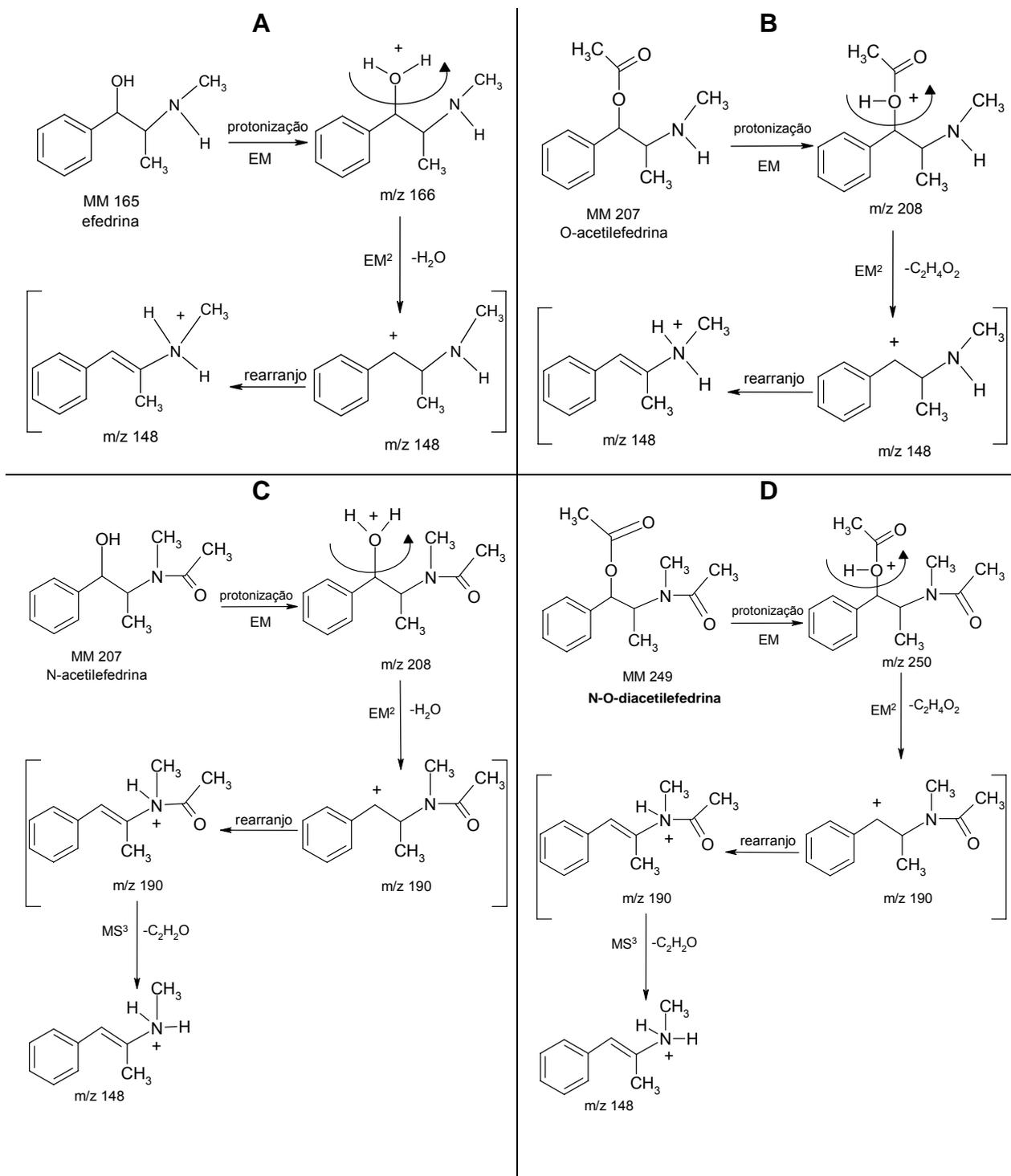


Figura 5.7: Esquemas de protonização da EF (A) adaptado de BRAZZAROLA, *et al.*, 2003, da O-acetilefedrina (B), da N-acetilefedrina (C) e da N-O-diacetilefedrina (D) com os principais fragmentos observados no EM e no EM/EM.

Os resultados claramente demonstram que o AA é um RD possível de ser usado, mas não o mais adequado, pois não forma íons característicos. Os principais íons obtidos (m/z 58 e m/z 100) são pouco específicos e facilmente encontrados em vários compostos químicos. Não foi alcançada a separação dos diastereômeros e ocorreu a formação de múltiplos picos indicando a formação de vários derivados da EF dificultando sua identificação e quantificação. Alterações nas condições de reação como: aumento da temperatura e do tempo de reação, não melhorou o perfil da derivatização. Outro fator a ser considerado é que ao se reagir AA com EF e PEF simultaneamente, não houve a separação dos picos dos diastereômeros através da análise por CG/EM (Figura 5.8).

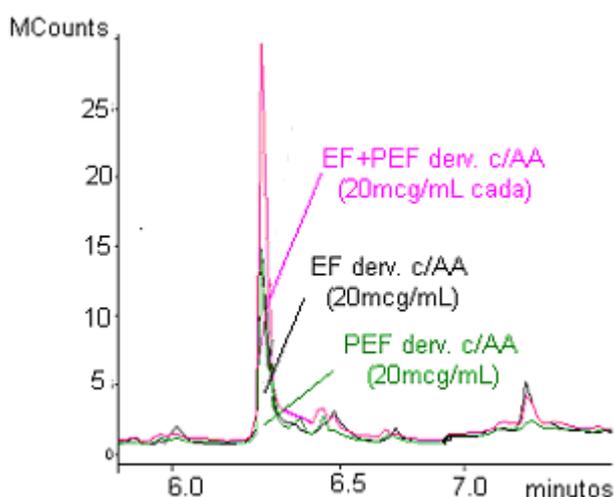


Figura 5.8: Cromatogramas sobrepostos de EF e PEF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol) e EF + PEF (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada em metanol) derivatizadas com AA (TR 6,25 min). Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (5% polidimetilsiloxano) – Varian®.

5.1.2 Anidrido acético+piridina (AA+P; 3:1, v/v)

A derivatização da EF com AA+P (acetilação em presença de um catalisador básico) seguiu o descrito no item 4.5.3, onde os resultados obtidos nas diferentes condições estão ilustrados na Figura 5.7 e descritos na Tabela 5.2 (Anexo B). Todas as amostras, após a derivatização, foram levadas à secar a 40 °C sob N_2 e reconstituídas com 100 μL de metanol para injetar 1 μL no CG/EM. As injeções diretas com AA+P não foram realizadas a fim de proteger a integridade da coluna cromatográfica, como já descrito na reação com AA (Figura 5.5).

O TR da EF acetilada foi de 6,35 min para todos os SS e, além deste, mais dois outros picos de EF derivatizada foram observados nos TR 5,97 min (EF1) e 6,25 min (EF2) para o SS “A”, para o “B” foi observado apenas um pico de EF derivatizada TR 6,25 min (EF2), para o “C” foram observados dois picos de EF derivatizada nos TR 5,97 min (EF1) e 6,25 min (EF2) e para o “D” foi observada EF derivatizada no TR 6,25 min (EF2) e EF não-derivatizada no TR 5,13 min (EF4).

De acordo com a Figura 5.9 o melhor SS foi o “D” (metanol), onde observamos apenas um pico da EF derivatizada e não observamos EF sem derivatizar nas amostras XIII e XIV obtidas sem evaporar o SS e acrescentando 50 e 100 μ L do RD. As amostras I e II não foram consideradas, pois nos cromatogramas observamos a presença de um pico no TR 4,35 min com pico base de m/z 58, não característico de EF.

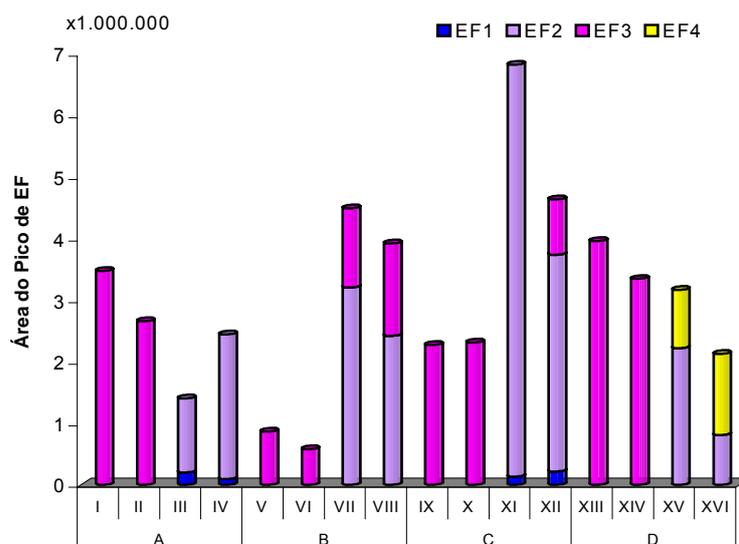


Figura 5.9: Gráfico do desempenho do AA+P como reagente de derivatização frente à EF. 20 μ L de uma solução de 1000 μ g/mL de EF em metanol foram adicionados a 1,0 mL dos respectivos SS (descritos na Figura 5.2). Nas amostras de número I,III,V,VII, IX, XI, XIII e XV foram acrescentados 50 μ L de AA+P e nas amostras II, IV, VI, VIII, X, XII, XIV e XVI foram acrescentados 100 μ L de AA+P. Condições de reação 60 °C/60 min. (EF1) efedrina derivatizada TR 5,97 min, (EF2) efedrina derivatizada TR 6,25 min, (EF3) efedrina derivatizada TR 6,35 min, (EF4) efedrina não-derivatizada TR 5,13 min.

Conforme descrito na Tabela 5.2, os principais fragmentos de massas para EF acetilada no TR 6,25 min (EF2; N-acetilefedrina) e no TR 6,35 min (EF3; N-O-diacetilefedrina) são equivalentes aos encontrados com AA (Figura 5.4), porém com abundâncias relativas diferentes.

Quando comparamos o AA+P com AA não observamos vantagens nos resultados, pois ambos os sistemas apresentaram o mesmo comportamento, com mais de um pico de EF derivatizada para os SS “A”, “B” e “C”, no SS “D” com AA+P observamos a presença de EF sem derivatizar para as amostras XV e XVI (Tabela 5.2). A análise conjunta das Figuras 5.2 e 5.9 permitem observar que para AA obtivemos uma maior formação da N-acetilefedrina (EF2; TR 6,25 min), enquanto que para AA+P uma maior formação de N-O-diacetilefedrina (EF3; TR 6,35 min), corroborando que a piridina facilita, ou promove a reação do AA com os grupamentos –OH e –NH.

5.1.3 Anidrido trifluoroacético (ATFA)

A derivatização da EF com ATFA (acetilação) seguiu o descrito no item 4.5.3, sendo que todas as amostras, após a derivatização, foram levadas à secura a 40 °C sob N₂ e reconstituídas com 100 µL de metanol para injetar 1 µL no CG/EM. As injeções diretas com ATFA não foram realizadas a fim de proteger a integridade da coluna do meio fortemente ácido.

Algumas limitações foram encontradas: os septos de teflon das tampas dos viais se desintegraram após a derivatização das amostras com ATFA sem a presença do SS. Também ocorreu a formação de um precipitado branco o qual foi insolúvel em metanol e em acetato de etila, não sendo possível a análise no CG/EM. Das poucas amostras injetadas no CG/EM, nenhuma apresentou os íons esperados m/z 154, m/z 203 ou 357 (Figura 5.10). Este procedimento foi repetido várias vezes com algumas variações, como o uso do ATFA com 50% acetato de etila (evitou o dano ao teflon) e ATFA com 1% trimetilclorosilano, mas os resultados continuaram insatisfatórios.

Tseng e col. (2006), ao usarem 100 µL de ATFA para derivatizar EFs a partir de um extrato obtido de uma ELL de urina com terbutilmetil-éter:álcool isopropílico (9:1 v/v), comentaram que quando o CG/EM foi usado para analisar EFs dois problemas ocorreram: (1) uma insatisfatória qualidade cromatográfica na análise da metilefedrina e (2) co-eluição dos diastêromeros EF e PEF e da fenilpropanolamina e catina, conseqüentemente na rotina laboratorial os autores recomendam CG/NPD

(cromatografia a gás com detector fósforo/nitrogênio) para detecção, quantificação e separação cromatográfica da EF e PEF.

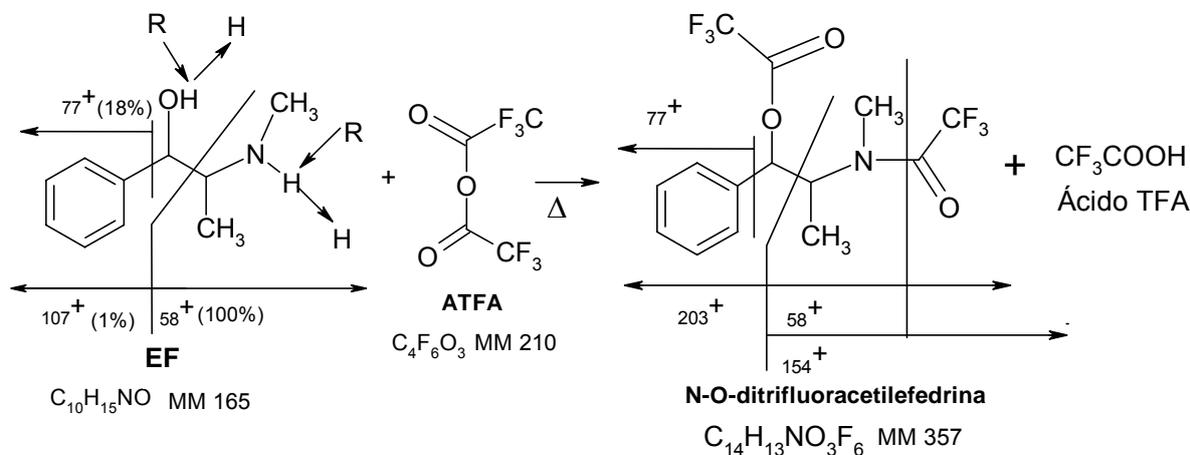


Figura 5.10: Esquema da reação de acetilação da EF com ATFA e os fragmentos de massas que deveriam ter sido observados para N-O-ditrifluoroacetilefedrina.

5.1.4 N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA)

A derivatização da EF com MSTFA (sililação) seguiu o descrito no item 4.5.3, onde os resultados obtidos nas diferentes condições estão ilustrados na Figura 5.11 e descritos na Tabela 5.3 (Anexo B). Os SS de todas as amostras foram evaporados antes da adição do MSTFA, após a derivatização, metade das amostras foram levadas à secar a 40 °C sob N_2 e reconstituídas com 100 μ L de metanol para injeção de 1 μ L no CG/EM.

De acordo com a Figura 5.11 os melhores SS foram o “A” (metanol + álcool isopropílico + NH_4OH - 78:20:2), sendo os melhores resultados obtidos nas amostras I e III, acrescentando-se 50 μ L e 100 μ L de MSTFA, e “B” (acetato de etila + NH_4OH - 98:2) na amostra VII, acrescentando-se 100 μ L de MSTFA.

O cromatograma da amostra I (injeção imediata) é demonstrado na Figura 5.12(A), com o respectivo espectro de massas do derivado O-trimetilefedrina (TR 5,10). O cromatograma da mesma amostra I, após 24 h de repouso, é demonstrado na Figura 5.12(B), com os respectivos espectros de massas dos derivados O-trimetilsililefedrina (TR 5,10) e N-O-ditrimetilsililefedrina (TR 5,55 min).

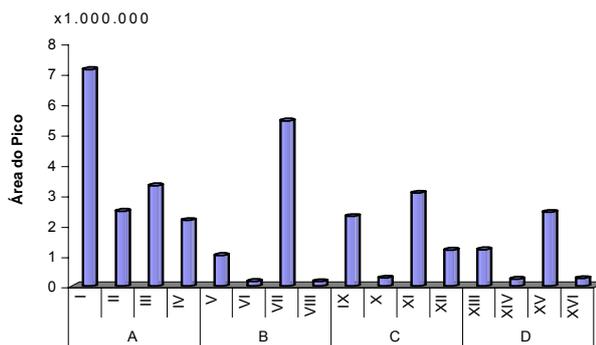


Figura 5.11: Gráfico do desempenho do MSTFA como reagente de derivatização frente à EF. 20 μ L de uma solução de 1000 μ g/mL de EF em metanol foram adicionados a 1,0 mL dos respectivos SS (descritos na Figura 5.2). Nas amostras de número I,II,V,VI, IX, X, XIII e XIV foram acrescentados 50 μ L de MSTFA e nas amostras III, IV, VII, VIII, XI, XII, XV e XVI foram acrescentados 100 μ L de MSTFA. Condições de reação 60 $^{\circ}$ C por 60 min. (EF1) O-trimetilsililefedrina TR 5,10 min.

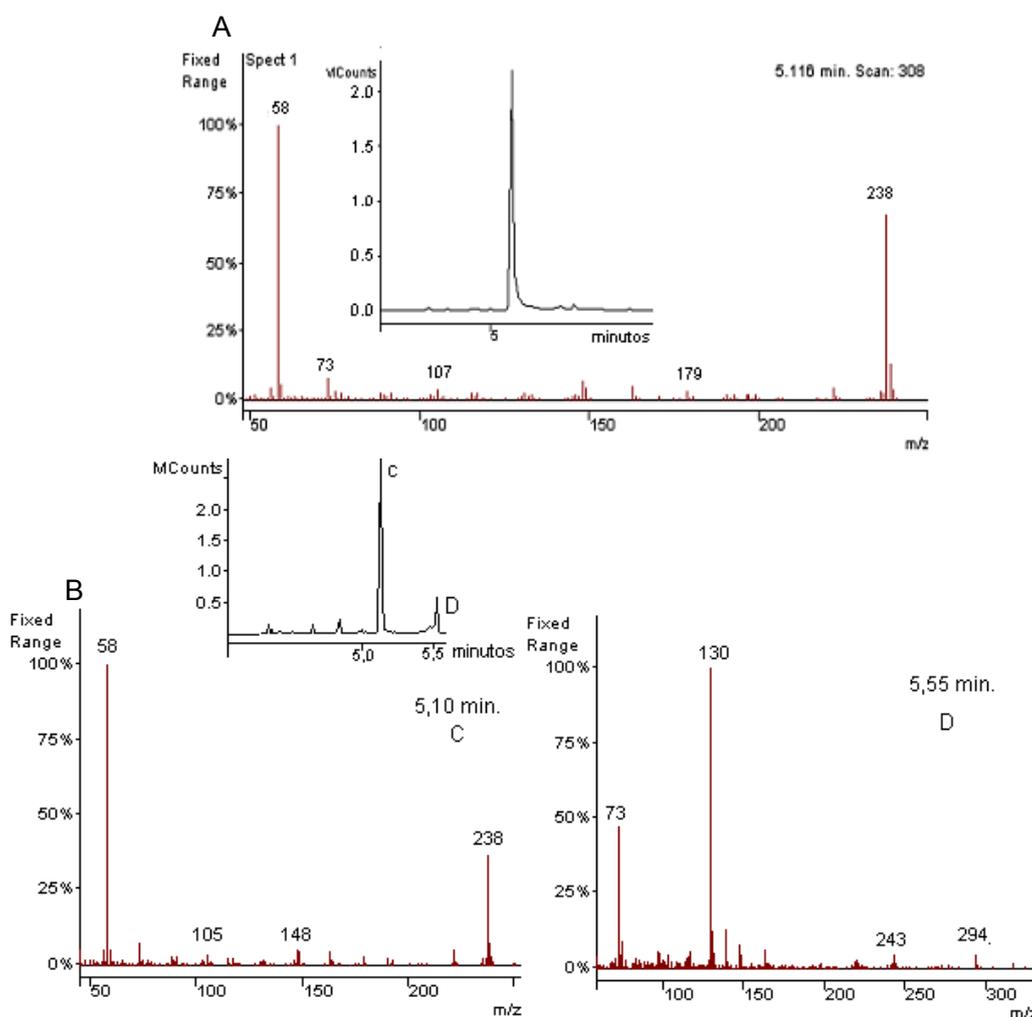


Figura 5.12: (A) Cromatograma e espectro de massas da amostra I derivatizada com MSTFA; correspondente ao derivado O-trimetilsililefedrina TR 5,10 min. (B) Cromatograma e espectro de massas da amostra I derivatizada com MSTFA e injeção após 24 h de repouso, correspondente aos derivados O-trimetilsililefedrina (C) TR 5,10 min e N-O-ditrimetilsililefedrina (D) (TR 5,55 min).

Os principais fragmentos de massas obtidos para EF derivatizada com MSTFA foram os íons m/z 58 (pico base), decorrente da perda de 179 u.m.a. a partir do IM, m/z 73 (9%); m/z 179 (3%), m/z 77 (3%) e m/z 237 (IM, 1%), também foi observado o íon m/z 238 (MH^+) (28%) (Figura 5.13).

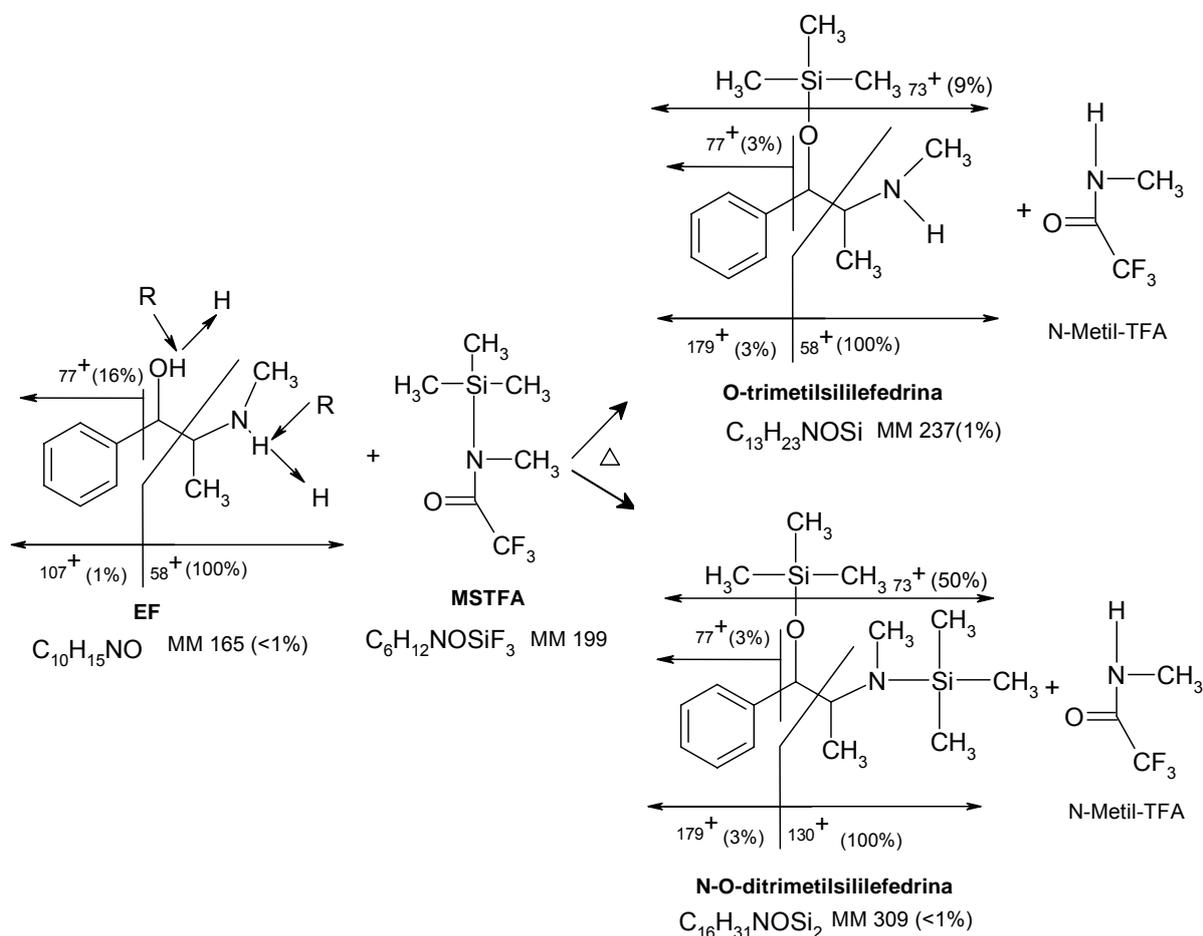


Figura 5.13: Esquema da reação de silição da EF com MSTFA e os fragmentos de massas observados para EF, O-trimetilsililefedrina e N-O-dimetilsililefedrina com as respectivas abundâncias relativas (%).

As amostras II, IV, VI, VIII, X, XII, XIV e XVI apresentaram resultados inferiores aqueles obtidos com as amostras que foram injetadas diretamente no CG/EM, após a derivatização, confirmando a perda do analito pela evaporação. Estas amostras também apresentaram diferença na abundância relativa do íon m/z 238 ($M+1$) de 3%.

Segundo Forsdahl e Gmeiner (2004) ambos os grupos amino e hidroxila sofrem silição com MSTFA. A metodologia utilizada pelos autores foi ELL com clorofórmio + álcool isopropílico + NH_4OH (80:20:2) e derivatização com 100 μL de

MSTFA a 60 °C por 30 min. Em nosso estudo repetimos a metodologia empregada (amostra XII), apenas alterando o tempo de derivatização para 60 min. Não foi observada a reação de sililação com o grupo amino, apenas com a hidroxila, formando o derivado O-trimetilsililefedrina. O fragmento de massas m/z 130 (característico da substituição do H da amina pelo grupo TMS) aparece em igual abundância (1%) em ambas EF derivatizada e não-derivatizada. Entretanto, quando a amostra foi mantida 24 h em repouso, e novamente injetada no CG/EM, observamos o pico base m/z 130 para o derivado N-O-ditrimetilsililefedrina, indicando que a sililação pode ocorrer tanto no grupamento amino quanto na hidroxila (Figura 5.13). A desvantagem desta técnica é a presença simultânea dos derivados N-O-ditrimetilsililefedrina e O-trimetilsililefedrina.

O TR da EF derivatizada com MSTFA foi de 5,10 min para todos os SS. Não se observou a presença de EF sem derivatizar (TR 5,13 min). Como os TR foram muito próximos, realizou-se co-injeção de EF derivatizada e não-derivatizada, demonstrando que o sistema cromatográfico não separa as duas efedrinas (Figura 5.14).

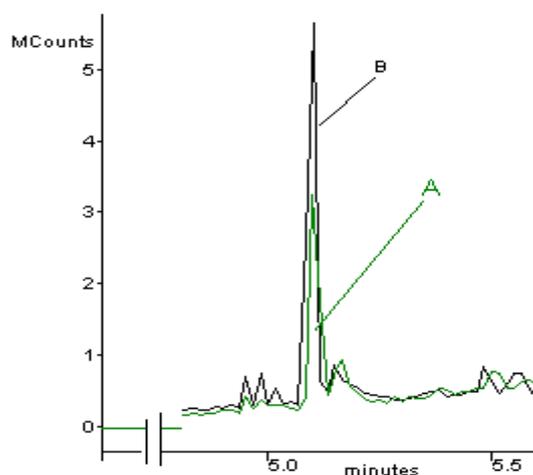


Figura 5.14: Cromatogramas sobrepostos de A = EF (20 $\mu\text{g/mL}$ em metanol) derivatizada com MSTFA e B = amostra A fortificada com EF (20 $\mu\text{g/mL}$ em metanol) sem derivatizar. Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (5% poldimetilsiloxano) – Varian®.

Ainda quando a EF e PEF foram analisadas simultaneamente, não houve a separação dos derivados O-trimetilsililefedrina e O-trimetilsililpseudoefedrina, nem dos derivados N-O-ditrimetilsililefedrina e N-O-ditrimetilsililpseudoefedrina.

Os resultados demonstram que o MSTFA seria um bom RD pois forma íons característicos como m/z 58 e m/z 238. Entretanto, dependendo das condições utilizadas podem formar múltiplos derivados de efedrina e, principalmente, pode ocorrer co-eluição do derivado O-trimetilsililefedrina com a EF sem derivatizar por CG/EM. Outra desvantagem é o alto custo e a instabilidade do reagente, e a facilidade de perda do derivado por evaporação.

5.1.5 *N*-(*tert*-butildimetilsilil)- *N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA)

A derivatização da EF com MTBSTFA (silação) seguiu o descrito no item 4.5.3. Os resultados obtidos nas diferentes condições estão ilustrados na Figura 5.15 e descritos na Tabela 5.4 (Anexo B). Os SS de todas as amostras foram evaporados antes da adição do MTBSTFA, após a derivatização, metade das amostras foram levadas à secura a 40 °C sob N₂ e reconstituídas com 100 µL de metanol. Uma alíquota de 1 µL, de todas as amostras, foi injetada no CG/EM.

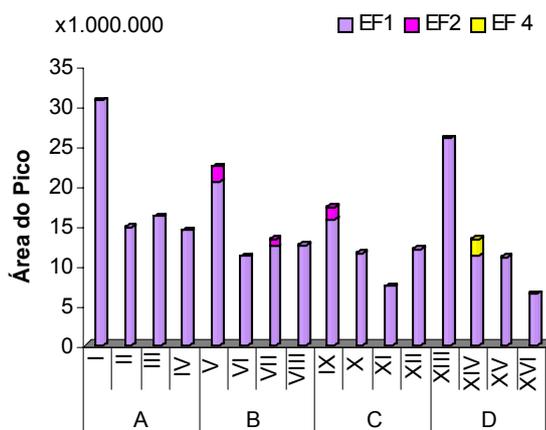


Figura 5.15: Gráfico do desempenho do MTBSTFA como reagente de derivatização frente à EF. 20 µL de uma solução de 1000 µg/mL de EF em metanol foram adicionados a 1,0 mL dos respectivos SS (descritos na Figura 5.2). Nas amostras de número I,II,V,VI, IX, X, XIII e XIV foram acrescentados 50 µL de MTBSTFA e nas amostras III, IV, VII, VIII, XI, XII, XV e XVI foram acrescentados 100 µL de MSTFA. Condições de reação 60 °C/60 min. (EF1) efedrina derivatizada TR 5,74 min, (EF2) efedrina derivatizada TR 7,33 min, (EF4) efedrina não-derivatizada TR 5,15 min.

O TR da EF derivatizada com MTBSTFA foi de 5,74 min (EF1) para todos os SS e, além deste, mais um pico de EF derivatizada foi observado no TR 7,33 (EF2) para os SS “B e C” e para o “D” foi observada EF não-derivatizada no TR 5,15 min (EF4).

O cromatograma da amostra I, derivatizada com MTBSTFA, e o respectivo espectro de massas são ilustrados na Figura 5.16.

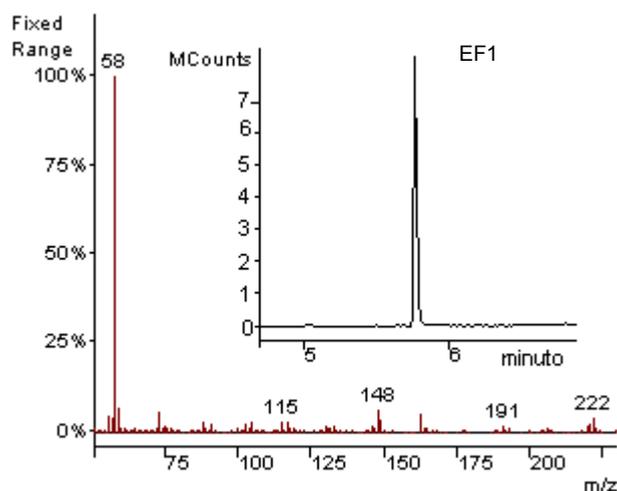


Figura 5.16: Cromatograma da amostra I derivatizada com MTBSTFA e o respectivo espectro de massas da efedrina derivatizada (EF1) TR 5,74 min.

De acordo com a Figura 5.15 o melhor SS foi o “A” (metanol + álcool isopropílico + NH_4OH (78:20:2)), onde observamos apenas um pico da EF derivatizada TR 5,74 min (EF1) e não observamos EF sem derivatizar. Os melhores resultados foram obtidos acrescentando-se 50 μL e 100 μL de MTBSTFA com injeção direta no CG/EM como podemos observar nas amostras I e III.

Os principais fragmentos de massas para EF derivatizada com MTBSTFA no TR 5,74 min (EF1) são os íons m/z 58 (pico base), decorrente da perda de 221 u.m.a. a partir do IM, m/z 77 (3%) e m/z 221 (5%). Os íons IM e MH^+ , m/z 279 e 280, respectivamente, não foram observados. Para a EF derivatizada no TR 7,33 (EF2) os principais fragmentos de massas são os íons m/z 172 (pico base), decorrente da perda de 221 u.m.a. a partir do IM, m/z 77 (3%) e m/z 221 (5%). Os íons IM e MH^+ , m/z 393 e 394 respectivamente, não foram observados (Figura 5.17).

Os compostos com MM 279 (TR 5,74 min) e MM 393 (TR 7,33 min) foram submetidos ao EM/EM e formaram íons majoritários (MH^+) m/z 280 e m/z 394. Por sua vez, estes íons foram refragmentados gerando íons secundários m/z 148 (EM^2) e m/z 393, 280 e 148 (EM^4), respectivamente caracterizando os derivados O-terbutiltrimetilsililefedrina (EF1; TR 5,74 min) e N-O-diterbutiltrimetilsililefedrina (EF2; TR 7,33 min).

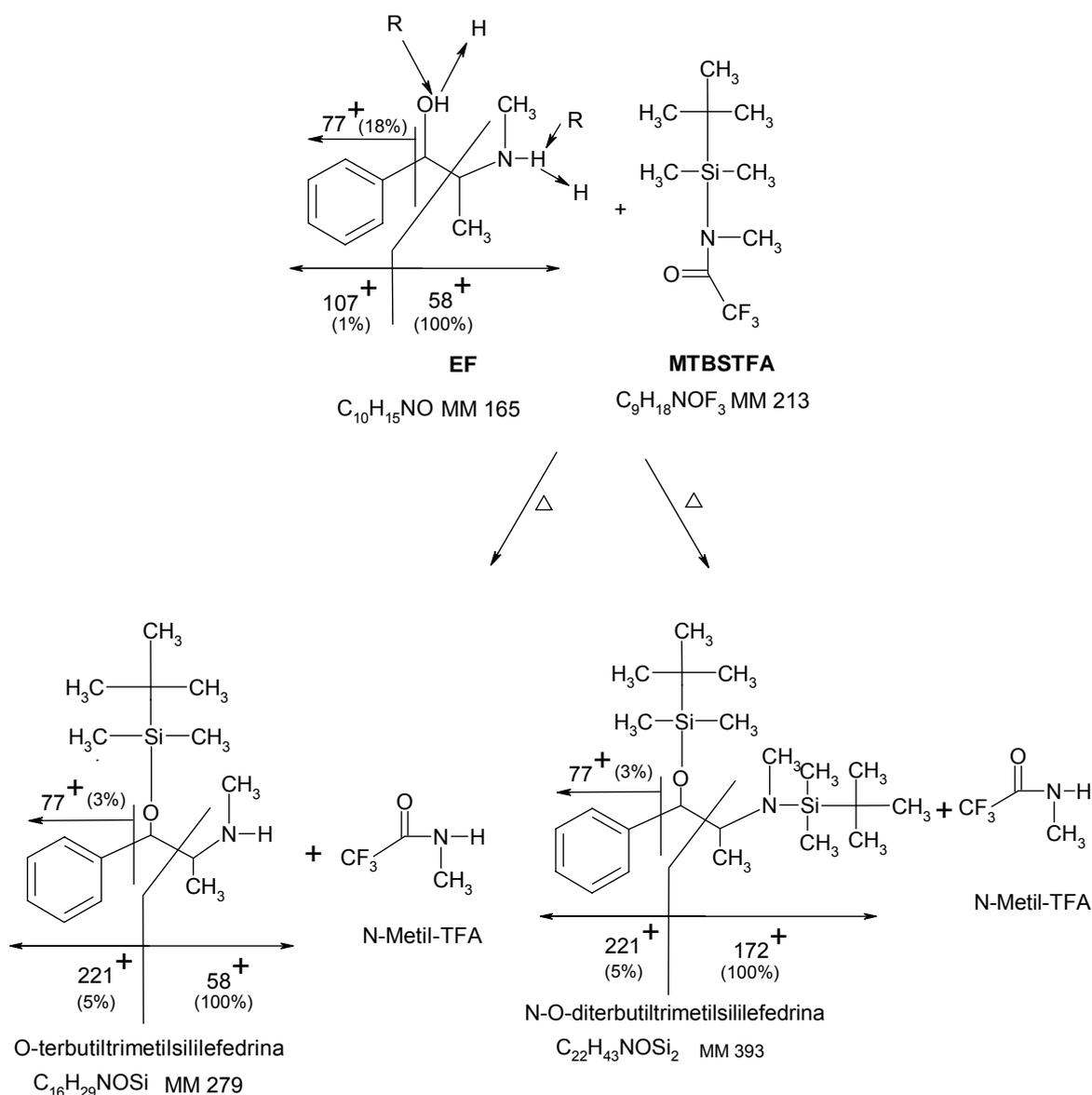


Figura 5.17: Esquema da reação de silação da EF com MTBSTFA e os fragmentos de massas observados para EF, O-terbutyltrimethylsilyl efedrina (EF1) e N-O-di-terbutyltrimethylsilyl efedrina (EF2) com as respectivas abundâncias relativas (%).

Quando a EF e PEF foram analisadas simultaneamente, houve a separação dos derivados O-terbutyltrimethylsilyl efedrina (EF1; TR 5,74 min) e O-terbutyltrimethylsilyl pseudoefedrina (TR 5,70 min), e N-O-di-terbutyltrimethylsilyl efedrina (EF2; TR 7,33 min) e N-O-di-terbutyltrimethylsilyl pseudoefedrina (TR 7,38 min), entretanto os N-O-derivados formaram picos pouco intensos e de difícil visualização no cromatograma abaixo. Como as diferenças nos TR dos derivados da EF e PEF foram muito pequenas, em torno de 0,05 min, não é adequado o uso do MTBSTFA como RD para diferenciar EF de PEF.

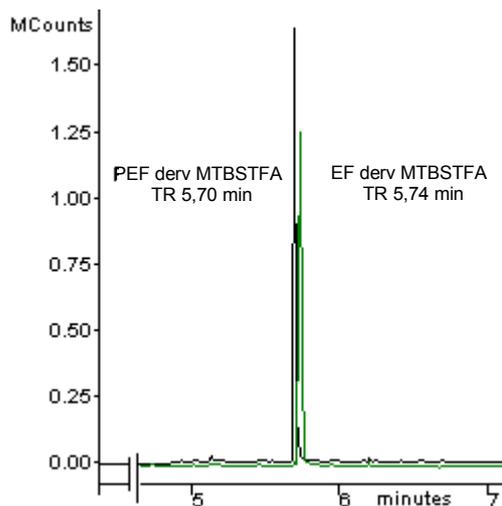


Figura 5.18: Cromatogramas sobrepostos das amostras EF derivatizada (TR 5,74 min) e PEF derivatizada (TR 5,70 min) com MTBSTFA. Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (5% polidimetilsiloxano) – Varian®.

5.1.6 Anidrido acético (AA) + *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA)

No intuito de associar especificidade e seletividade na derivatização da EF e PEF, foi testada a reação duas etapas: (1) acetilação com AA e (2) sililação com MSTFA. Para tanto, foram preparados oito vias divididos em 4 grupos iguais. Em cada grupo foi colocado 1 mL de um dos SS: A (metanol + álcool isopropílico + NH_4OH (78:20:2)), B (acetato de etila + NH_4OH (98:2)), C (clorofórmio + álcool isopropílico + NH_4OH (78:20:2)) e D (metanol). Nos vias I, III, V e VII foram adicionados 20 μ L de uma solução padrão de EF 1000 μ g/mL em metanol e nos vias II, IV, VI e VIII, 20 μ L de uma solução padrão de PEF 1000 μ g/mL em metanol. Foram adicionados 50 μ L do AA a todos os vias e colocados em bloco de aquecimento a 60 $^\circ\text{C}$ /60 min para acetilação. Após resfriamento, foram levados à secura a 40 $^\circ\text{C}$ sob N_2 , reconstituídos com 50 μ L de MSTFA e novamente submetidos 60 $^\circ\text{C}$ /60 min para sililação. Uma alíquota de 1 μ L, de todas as amostras, foi injetada no CG/EM. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 5.19 e descritos na Tabela 5.5 (Anexo B).

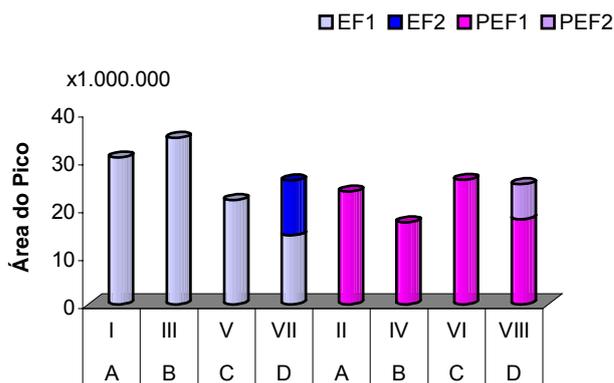


Figura 5.19: Gráfico do desempenho do AA e MSTFA como reagentes de derivatização frente à EF e PEF. 20 μ L de uma solução de 1000 μ g/mL de EF e PEF em foram adicionados a 1,0 mL dos respectivos SS (descritos na Figura 5.2). Derivatizados com 50 μ L de AA e, após com 50 μ L MSTFA. Condições de reação 60 °C/60 min. (EF1) N-acetil-N,O-ditrimetilsililefedrina TR 6,10 min, (EF2) O-trimetilsililefedrina TR 5,10 min, (PEF1) N-acetil-N,O-ditrimetilsililpseudoefedrina TR 6,15 min, (PEF2) O-trimetilsililpseudoefedrina TR 5,08 min.

De acordo com a Figura 5.19 os melhores SS foram o “B” (acetato de etila + NH_4OH - 98:2) para a EF derivatizada TR 6,10 min da amostra III e o “C” (clorofórmio + álcool isopropílico + NH_4OH - 78:20:2) para a PEF derivatizada TR 6,15 min da amostra VI.

Os TR da EF e da PEF derivatizadas foram 6,10 min (EF) e 6,15 min (PEF), respectivamente para ambos os SS. Os cromatogramas e os espectros de massas foram muito semelhantes conforme Figura 5.20, sendo encontrado apenas um derivado e não observamos EF sem derivatizar como demonstrado na Figura 5.19.

As condições de derivatização e os principais fragmentos de massas obtidos estão resumidos na Tabela 5.5. Conforme apresentado na tabela, os fragmentos de massas característicos para EF e PEF derivatizadas com AA+MSTFA são os íons m/z 352 (pico base), m/z 280 (68%); m/z 58 (45%), m/z 100 (45%), m/z 179 (4%) e m/z 351 (IM) (<1%) (Figura 5.21), reiterando a preferência do RD pela hidroxila.

O composto N-acetil-N,O-ditrimetilsililefedrina (MM 351; TR 6,10 min) foi submetidos a experimentos mutiacoplados (EM^n). A partir deste íon precursor foi obtido o íon (MH^+) m/z 352, o qual foi refragmentado, gerando íons secundários m/z 262 (EM^2) e a partir deste, os íons m/z 190 (EM^3) e m/z 148 (EM^4) (Figura 5.22).

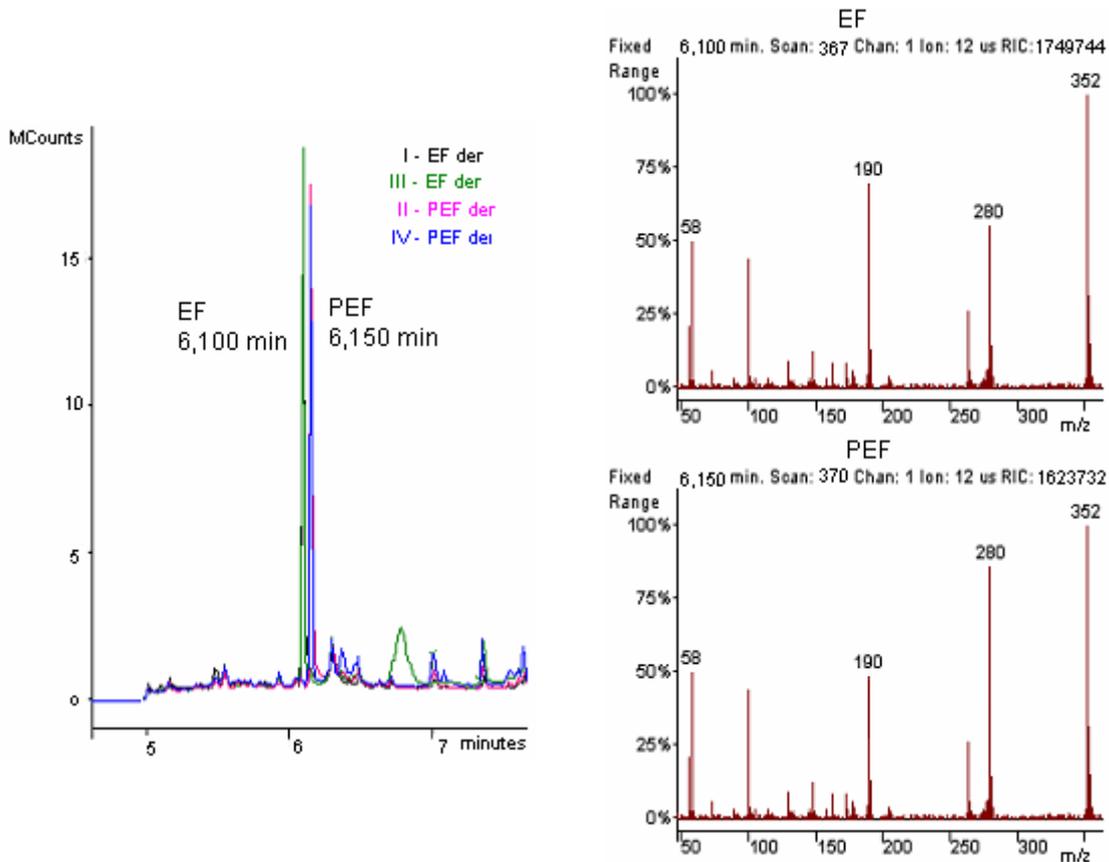


Figura 5.20: Cromatogramas sobrepostos das amostras I e III (efedrina derivatizada), II e IV (pseudoefedrina derivatizada) com AA + MSTFA; com os respectivos espectros de massas correspondentes a N-acetil-N,O-ditrimetilsililefedrina TR 6,10 min e N-acetil-N,O-ditrimetilsililpseudoefedrina TR 6,15 min.

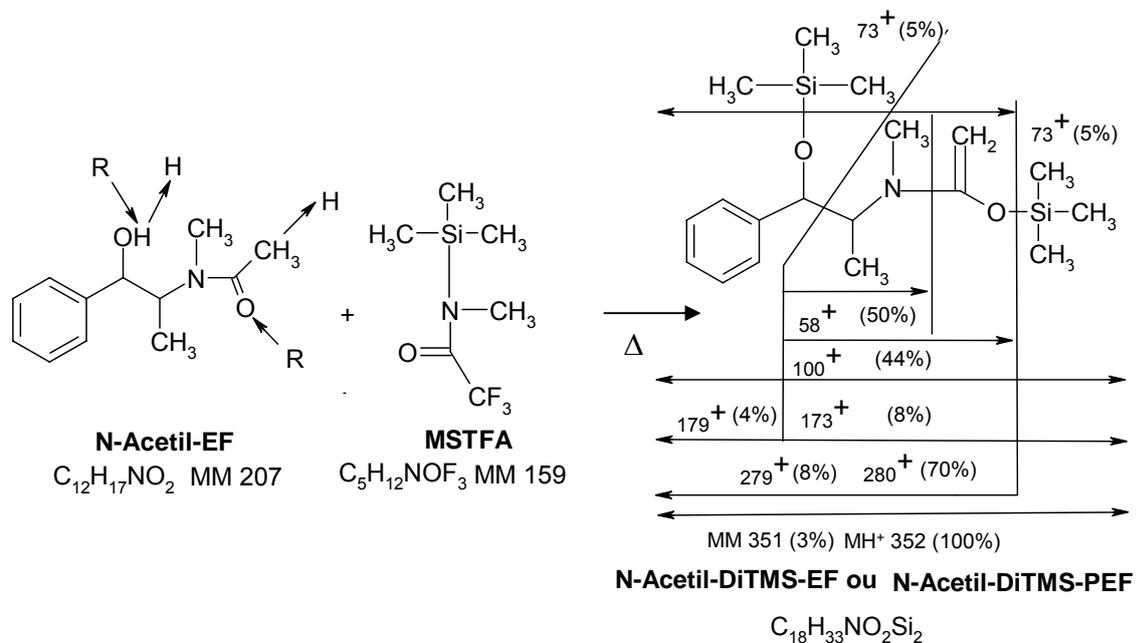


Figura 5.21: Esquema da reação de silição da N-acetilefedrina com MSTFA e os fragmentos de massas observados para N-acetil-N,O-ditrimetilsililefedrina (N-Acetil-DiTMS-EF) com as respectivas abundâncias relativas (%).

Segundo citação de Brazzarola (2003) os diastêromos EF e PEF podem ser caracterizados por CG/EM por IQ e IE, utilizando derivados N-acetil-O-trimetilsilil. Em nossos experimentos também ocorre a separação da EF e PEF, entretanto não detectamos derivados N-acetil-O-trimetilsilil, pois ocorreu uma dupla sililação na estrutura das efedrinas obtendo-se derivados N-acetil-N,O-ditrimetilsilil, fato semelhante citado por Spyridaki (2001) onde a reação da norefedrina e nor-pseudoefedrina com MSTFA/MBTFA geraram dois derivados N-trifluoracetil-O-trimetilsilil e N-trifluoracetil-N,O-ditrimetilsilil, entretanto na reação com EF e PEF apenas um derivado foi formado N-trifluoracetil-O-trimetilsilil, não observado por nós o derivado correspondente N-acetil-O-trimetilsilil, provavelmente devido ao SS e às condições de reação diferentes.

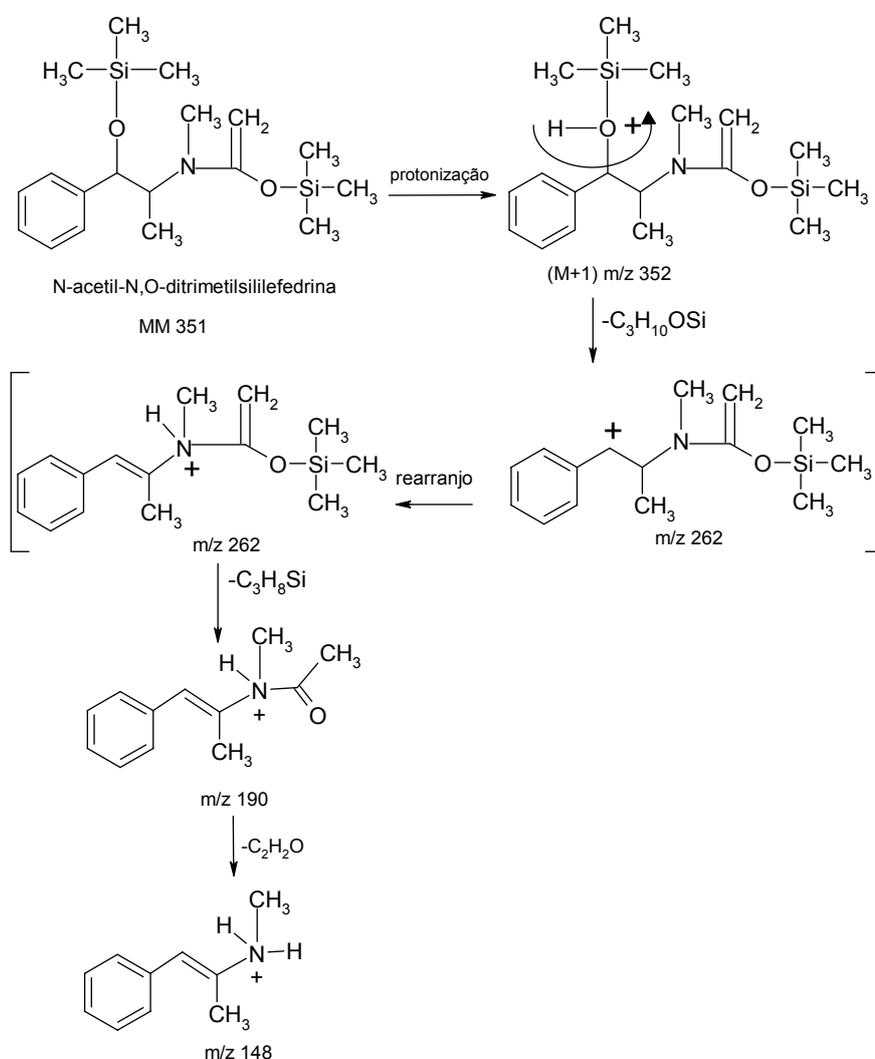


Figura 5.22: Esquema de protonização da N-acetil-N,O-ditrimetilsililefedrina com os principais fragmentos observados no EM⁴.

5.1.7 *N*-(*tert*-butildimetilsilil)- *N*-metiltrifluoroacetamida) (MTBSTFA) + *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA)

O procedimento de derivatização da EF e PEF com dois diferentes RD de sililação em ordens inversas de adição junto à amostra: (1) MSTFA + MTBSTFA; (2) MTBSTFA + MSTFA, foram avaliados, com a finalidade de tentar melhorar a resolução dos picos da EF e PEF.

Foram preparados 4 viais, I e II com 1,0 mL do SS "A" (metanol + álcool isopropílico + NH₄OH 78:20:2), em duplicata, e III e IV com 1,0 mL do SS "C" (clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH 78:20:2), em duplicata. Nos viais I e III foram adicionados 20 µL de uma solução padrão de EF 1000 µg/mL em metanol e nos viais II e IV 20 µL de uma solução padrão de PEF 1000 µg/mL em metanol, estes foram levados à secura a 40 °C sob N₂.

A quatro viais (I, II, III e IV) foram adicionados 50 µL do MSTFA, colocados em bloco de aquecimento a 60 °C/60 min, após resfriamento foram adicionados 50 µL de MTBSTFA e submetidos 100 °C/30 min, 1 µL destes foi injetado no CG/EM. A outros quatro viais (duplicatas) foram adicionados 50 µL do MTBSTFA, colocados em bloco de aquecimento a 120 °C/30 min. Após resfriamento foram adicionados 50 µL de MSTFA e submetidos 60 °C/4 h. Uma alíquota de 1 µL, de todas as amostras, foi injetada no CG/EM.

Para o primeiro procedimento os TR da EF e da PEF derivatizadas foram 5,10 e 5,08 min (derivados O-trimetilsilil) e 5,56 e 5,55 min (derivados N-O-ditrimetilsilil), respectivamente para ambos os SS. Os cromatogramas e os espectros de massas foram muito semelhantes, não sendo possível separação cromatográfica da EF e PEF, foram encontrados dois derivados e não observada EF sem derivatizar (Figura 5.23).

Para o segundo procedimento os TR da EF e da PEF derivatizadas foram 5,73 e 5,70 min (derivados O-terbutiltrimetilsilil) e 6,21 e 6,20 min (derivados N-trimetilsilil-O-terbutiltrimetilsilil), respectivamente para ambos os SS. Os cromatogramas e os espectros de massas foram muito semelhantes, não sendo possível separação cromatográfica da EF e PEF, foram encontrados dois derivados e não observada EF sem derivatizar (Figura 5.24).

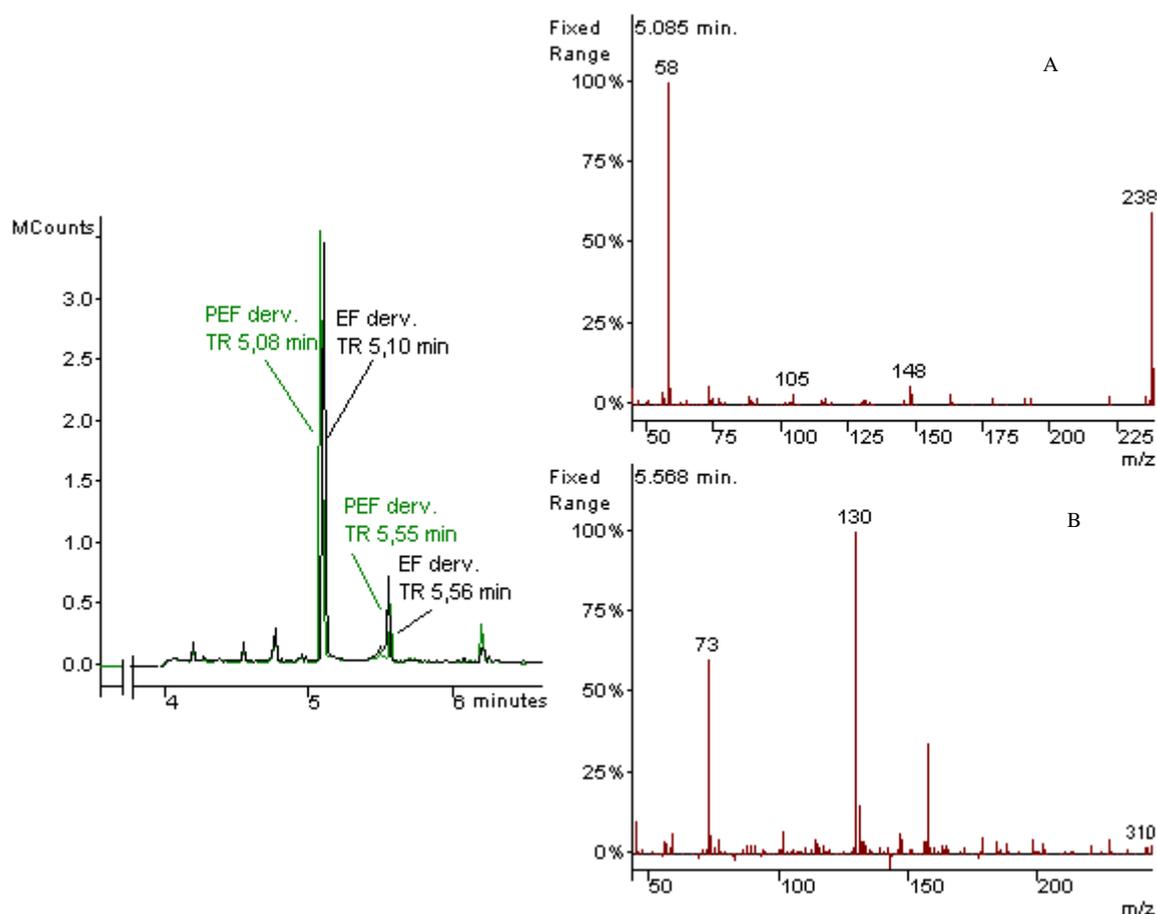


Figura 5.23: Cromatogramas sobrepostos das amostras de PEF e da EF derivatizadas com MSTFA+MTBSTFA. Derivados O-trimetilsililpseudofedrina (TR 5,08 min) e O-trimetilsililefedrina (TR 5,10 min)(A), N-O-ditrimetilsililpseudofedrina (TR 5,55 min) e N-O-ditrimetilsililefedrina (TR 5,56 min) (B). Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (5% polidimetilsiloxano) – Varian®.

Com estes resultados sugerimos que há uma competição entre os reagentes de silição pelo grupamento –NH, sendo que o MSTFA reage mais facilmente com este grupamento. Entretanto, este procedimento de derivatização não é adequado, pois forma mais de um derivado nas condições testadas e a separação de EF e PEF não é eficiente.

Os fragmentos de massas característicos de EF e PEF para os derivados O-trimetilsilil são os íons m/z 58 (pico base), m/z 179 (3%) e m/z 238 (MH^+) (20%); para o N-O-ditrimetilsilil são os íons m/z 130 (pico base), m/z 179 (3%) e m/z 310 (MH^+) (<1%); para o O-terbutiltrimetilsilil são os íons m/z 58 (pico base), m/z 221 (2%) e m/z 280 (MH^+) (<1%) e para o N-trimetilsilil-O-terbutiltrimetilsilil são os íons m/z 130 (pico base), m/z 221 (3%) e m/z 352 (MH^+) (3%).

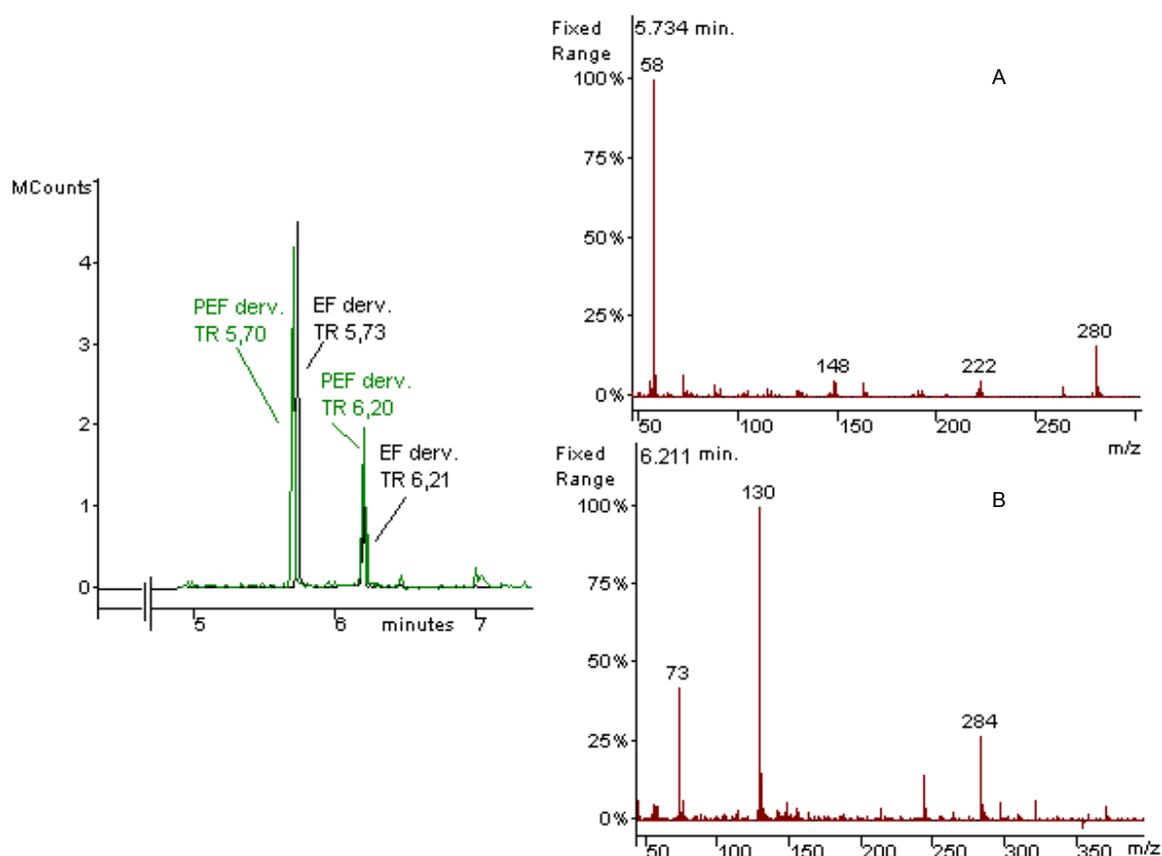


Figura 5.24: Cromatogramas sobrepostos das amostras de PEF e da EF derivatizadas com MTBSTFA+MSTFA. Derivados O-terbutiltrimetilsililpseudoefedrina (TR 5,70 min) e O-terbutiltrimetilsililefedrina (TR 5,73 min) (A), N-trimetilsilil-O-terbutiltrimetilsililpseudoefedrina (TR 6,20 min) e N-trimetilsilil-O-terbutiltrimetilsililefedrina (TR 6,21 min) (B). Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (5% polidimetilsiloxano) – Varian®.

5.1.8 Ciclohexanona (CH)

A derivatização da EF com CH (adição de carbonila) seguiu o descrito no item 4.5.3, com alteração no tempo e temperatura de derivatização para 70 °C/30 min. Os resultados obtidos nas diferentes condições estão ilustrados na Figura 5.25 e descritos na Tabela 5.6 (Anexo B).

O TR da EF derivatizada com CH foi de 6,50 min (EF1) para todos os SS, também se observou a presença de EF sem derivatizar para os SS “B e D” no TR 5,13 min (EF4).

De acordo com a Figura 5.25 o melhor SS foi o “A” (metanol + álcool isopropílico + NH₄OH - 78:20:2), onde observamos apenas um pico da EF derivatizada TR 6,50 min (EF1) e não observamos EF sem derivatizar (EF4). Os melhores resultados obtidos foram acrescentando-se 50 µL de CH, após evaporar o SS para a amostra I e 100 µL de CH adicionados diretamente no SS para a amostra VI e após a derivatização a amostra foi levada à secura sob N₂ e reconstituída com 100 µL de metanol.

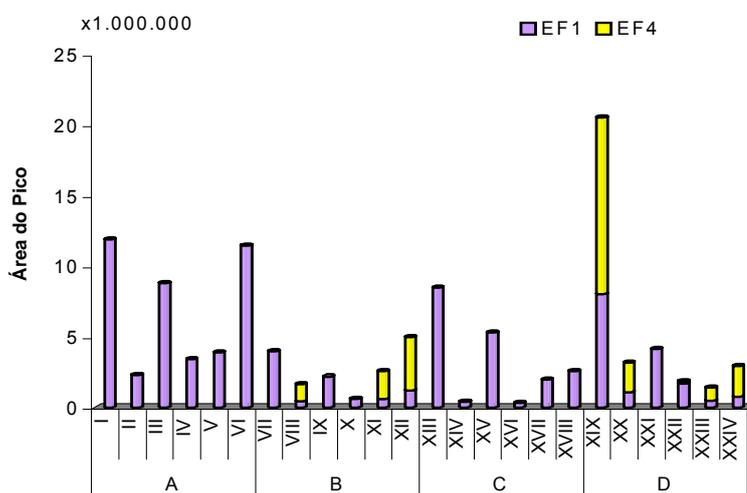


Figura 5.25: Gráfico do desempenho da CH como reagente de derivatização frente à EF. 20 µL de uma solução de 1000 µg/mL de EF em metanol foram adicionados a 1,0 mL dos respectivos SS: descritos na Figura 5.2. Nas amostras de número I,II,V,VII, VIII, XI, XIII, XIV, XVII, XIX, XX e XXIII foram acrescentados 50 µL de AA e nas amostras III, IV, VI, IX, X, XII, XV, XVI, XVIII, XXI, XXII e XXIV foram acrescentados 100 µL de AA. Condições de reação 70 °C/30 min. (EF1) efedrina derivatizada TR 6,50 min e (EF4) efedrina não-derivatizada TR 5,13 min.

O cromatograma da amostra I derivatizada com CH e o respectivo espectro de massas são ilustrados na Figura 5.26.

Os principais fragmentos de massas para EF derivatizada com CH no TR 6,50 min (EF1) são os íons m/z 202 (píca base) decorrente da perda de 43 u.m.a. a partir do IM, m/z 148 (53%), m/z 203 (18%); m/z 118 (14%) e m/z 245 (IM) (20%), também foi observado o íon m/z 246 (MH⁺) (14%) (Figura 5.27).

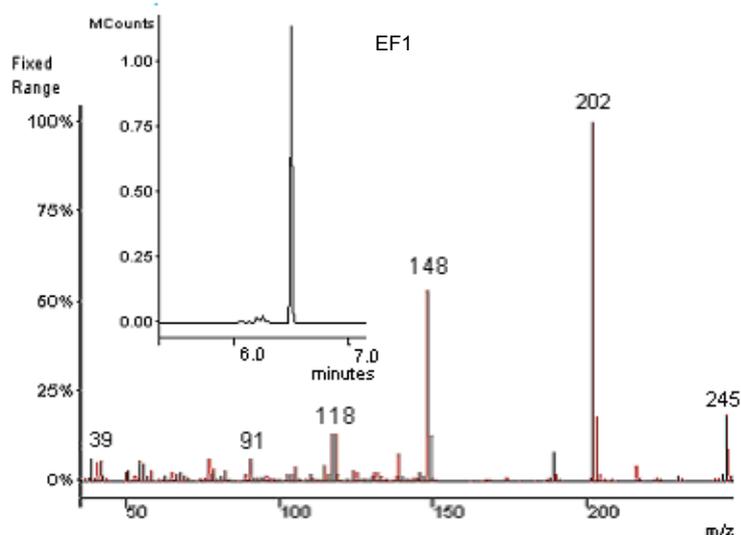


Figura 5.26: Cromatograma da amostra I derivatizada com CH e o respectivo espectro de massas da efedrina derivatizada (EF1) TR 6,50 min.

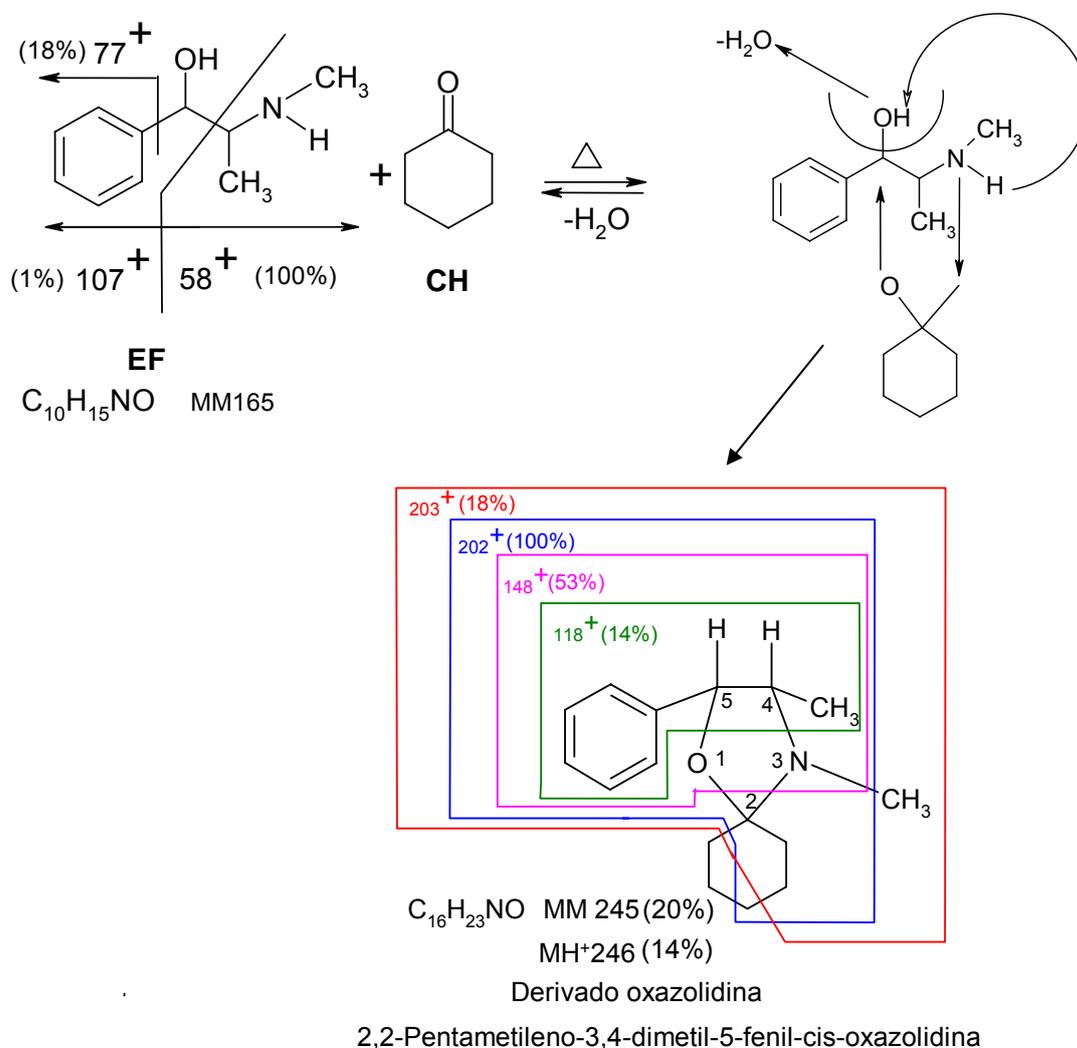


Figura 5.27: Esquema da reação de adição da EF com CH e os fragmentos de massas observados para EF e o derivado oxazolidina com as respectivas abundâncias relativas (%).

Considerando as afirmações de El-Haj (2003) uma contínua remoção da água do sistema de reação é necessária para aumentar o rendimento do produto, e é condição para altas temperaturas no injetor e na coluna do CG e que a temperatura inicial da coluna deve ser igual ou maior a 100 °C para evitar reversão de EF derivatizada em EF não-derivatizada, devido a baixas temperaturas e a presença de umidade, sendo eliminada a 100 °C.

Durante a realização deste trabalho, a coluna do CG, que inicialmente foi operada a 80 °C/2 min, passou a ser ajustada a 100 °C/2 min, onde não observamos mudanças nas amostras que apresentaram tanto a EF derivatizada (EF1) quanto a EF não-derivatizada (EF4) para o SS (A) metanol + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2), a única diferença observada foi na antecipação do TR em 0,4 min em cada TR individual (EF1, TR 6,10 min; EF4, TR 4,73 min). Estes dados estão de acordo com as condições cromatográficas usadas por Walker e col. (1989) para a detecção, no CG/EM, de oxazolidinas derivadas da reação entre EF e CH, onde a programação do forno inicia a 70 °C até 250 °C com rampa de aquecimento de 25 °C/min.

Este mesmo autor afirma, ainda, não ser necessário submeter a amostra ao aquecimento, pode-se simplesmente misturar a EF com CH e injetar direto no CG/EM sendo a temperatura do injetor e tempo de permanência no mesmo suficientes para completar a reação. Nossos estudos apontam que esta não é a melhor maneira de se proceder a derivatização, uma vez que testamos o método de El-Haj (2003) e observamos que a EF não é completamente derivatizada naquelas condições do experimento, sendo necessário no mínimo 15 min de aquecimento a altas temperaturas para completa derivatização.

A reação da CH com EFs gera derivados oxazolidinas que são formadas pela reação de adição entre β -amino álcool e aldeídos ou cetonas. A reação é reversível, sendo as oxazolidinas facilmente hidrolisadas em meio aquoso. Quando dissolvido o derivado oxazolidina em meio aquoso e pH básico ou neutro, o composto é rapidamente hidrolisado a EF e formaldeído. Contudo, estudos de RMN indicam que a hidrólise não ocorre por completo ocorrendo um equilíbrio (WALKER *et al.*, 2001).

Quando a PEF e EF foram analisadas simultaneamente, houve separação satisfatória dos derivados oxazolidinas PEF (TR 6,43 min) e EF (TR 6,51 min), como pode ser visualizado na Figura 5.28.

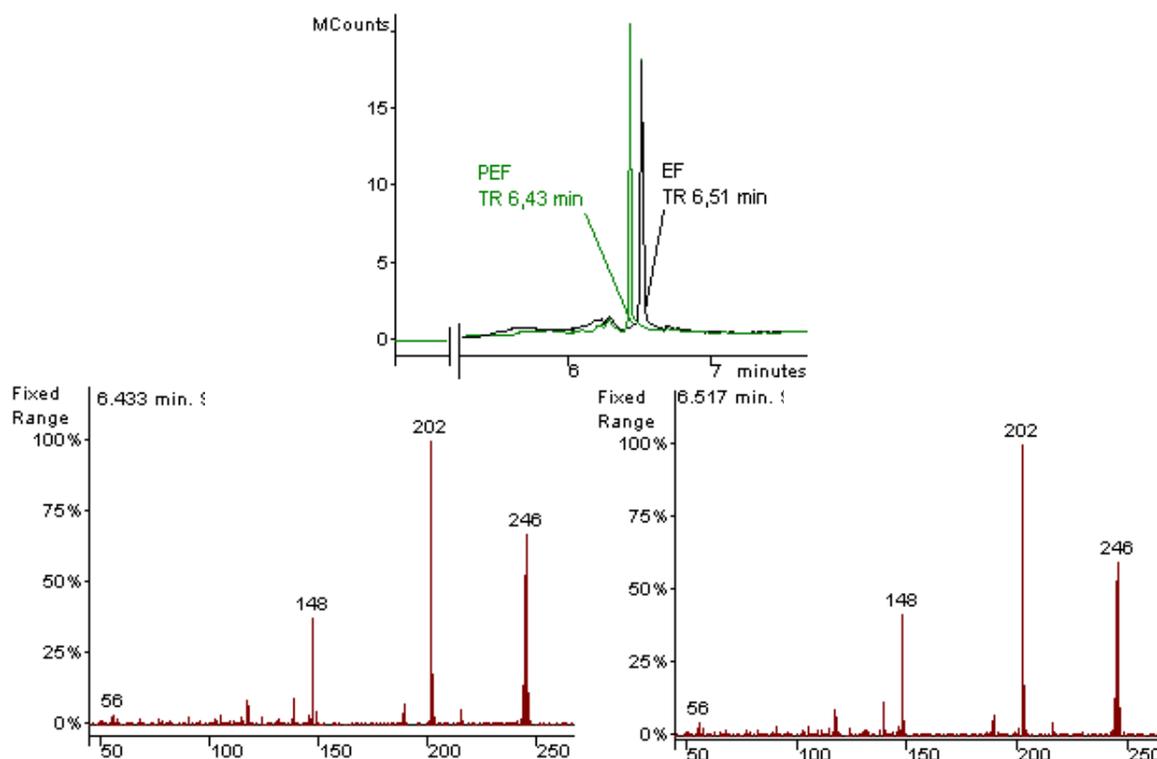


Figura 5.28: Cromatogramas sobrepostos das amostras EF derivatizada (TR 6,51 min) e PEF derivatizada (TR 6,43 min) com CH. Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (5% polidimetilsiloxano) – Varian®.

5.1.9 Desempenho dos reagentes de derivatização (RD)

O principal problema encontrado nos procedimentos de derivatização foi a formação de múltiplos derivados. Este fenômeno ocorreu com todos os RD testados (AA, AA+P, MTBSTFA, AA+MSTFA e MTBSTFA+MSTFA), exceto com MSTFA e CH. Os principais reagentes utilizados na derivatização de EF e os respectivos derivados formados estão sumarizados na Tabela 5.7.

A adição na estrutura da EF de um anel confere rigidez a molécula e aumenta as chances de detecção do íon molecular na análise por CG/EM. O uso da CH como RD apresenta algumas vantagens, destacando-se a formação de fragmentos

característicos, com massas maiores como o pico base (m/z 202) e o íon molecular (m/z 245). Além disto, os picos referentes a EF derivatizada (TR 6,50 min) e sem derivatizar (TR 5,13 min) aparecem bem separados no cromatograma. A derivatização da EF com CH permitiu a separação dos diastêromos EF e PEF (TR 6,42 min), sendo obtidos picos bem resolvidos em colunas normais de CG. Os RD de acetilação não foram capazes de separar estes diastêromos e os de sililação separaram, entretanto com baixa resolução.

Quanto aos SS empregados, após compararmos o desempenho dos RD testados (AA; AA+P; ATFA, MSTFA, MTBSTFA, AA+MSTFA, MTBSTFA+MSTFA e CH) com os SS, frente à EF, concluímos que para o AA e AA+MSTFA o melhor SS é o "B" (acetato de etila + NH_4OH - 98:2), para AA+P é o "D" (metanol), para MSTFA, MTBSTFA, MTBSTFA+MSTFA e CH é o SS "A" (metanol + álcool isopropílico + NH_4OH - 78:20:2).

Os RD de sililação (MSTFA e MTBSTFA) são considerados os mais versáteis para a derivatização de compostos orgânicos contendo átomos de hidrogênio ativos, resultando em produtos com reduzida polaridade, com aumento da volatilidade e estabilidade térmica, bem como com formação de derivados com fragmentos de massa elevados, condições necessárias para se obter maior sensibilidade e resolução nas análises de várias substâncias em mistura por CG/EM (SHAREEF *et al.* 2006). Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que uso destes reativos como RD de EFs apresenta algumas desvantagens como o alto custo e a co-eluição de EF derivatizada (TR 5,10 min) e EF não-derivatizada (TR 5,13 min), sendo a diferenciação entre ambas EFs determinada apenas pelo íon molecular. Além disto, o estabelecimento de metodologias envolvendo reações de sililação de aminas deve ser bastante cuidadoso, sobretudo no que tange as condições de reação, para se evitar a presença do analito não-derivatizado e de ambas as formas derivatizadas N-trimetilsilil e O-trimetilsilil, inviabilizando análises quantitativas (KNAPP, 1979).

A análise conjunta dos resultados nos permite definir que o melhor RD para a EF é a CH. Desta maneira concluímos que a aplicação da CH como RD para análise de ANFs por CG/EM é promissora e reúne vantagens como baixo custo,

simplicidade, rapidez, seletividade e eficácia, além de permitir a separação satisfatória de diastêmeros.

5.2 Otimização das Condições de Derivatização com CH

Considerando os resultados promissores obtidos nos testes de derivatização com CH, está foi escolhida como RD a ser aplicado na validação de procedimentos analíticos para EFs e ANF. O SS selecionado foi o “A” (metanol + álcool isopropílico + NH₄OH - 78:20:2).

Com base nestes resultados procedeu-se a otimização das condições de reação, sendo trabalhados parâmetros como tempo e temperatura de reação, tempo entre a reação e a injeção no CG/EM e o comportamento da CH com diferentes concentrações de PEF e EF. Devido à alta volatilidade das EFs, a evaporação é uma etapa crítica pois há risco de perda de amostra. Recuperações mais eficientes foram obtidas na adição do RD diretamente no SS, com posterior evaporação da amostra (60 °C/N₂) e reconstituição com metanol.

5.2.1 Tempo e temperatura

O procedimento para avaliação do tempo e temperatura para a derivatização da EF com CH seguiu o descrito no item 4.5.4. Os resultados obtidos com 100 µL de CH para o SS “A” (metanol + álcool isopropílico + NH₄OH - 78:20:2) estão ilustrados na Figura 5.29 e descritos na Tabela 5.8 (Anexo B). De acordo com o gráfico apresentado os melhores resultados foram alcançados a 100 °C/30 min.

Considerando que a derivatização pode ocorrer no injetor devido a altas temperaturas, acima 200 °C (EL-HAJ *et al.*, 2003), testamos a injeção direta no CG/EM de amostras sem o processo de aquecimento das mesmas, ou seja foi adicionado a 1,0 mL do SS “A” 20 µL de uma solução padrão de EF 1000 µg/mL. Após as amostras foram submetidas à secura a 40 °C sob N₂, reconstituídas com 100 µL de CH e 1 µL foi injetado no CG/EM. Os resultados obtidos demonstram que este procedimento não é o mais adequado, pois detectamos EF derivatizada e não-derivatizada nas amostras, ou seja a temperatura do injetor e o tempo em que

amostra e a CH ficaram em contato não foram suficientes para derivatizar os 20 µg/mL de EF, contrariando os achados de El-Haj e col. (2003).

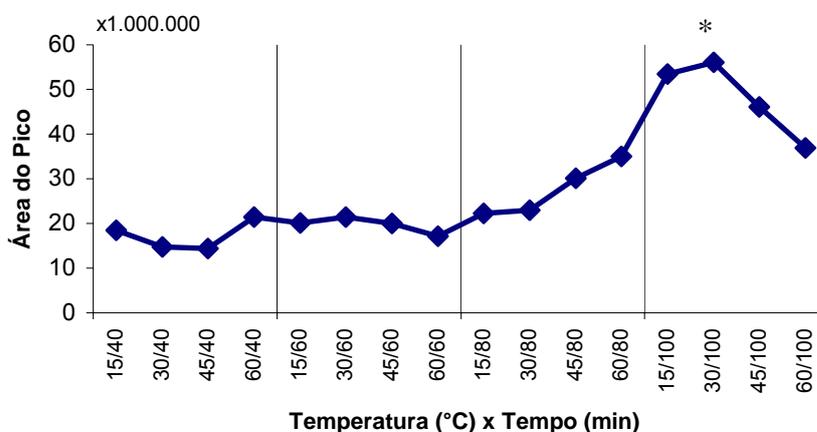


Figura 5.29 Gráfico da temperatura x tempo para EF derivatizada com CH no SS A (metanol + álcool isopropílico + NH₄OH - 78:20:2). * Diferença significativa ($p < 0,01$; ANOVA, seguida do teste de Bonferroni), para o grupo de temperatura 100 °C, dentro deste grupo nos diferentes tempos não houve diferença estatística significante, sendo adotado neste trabalho 30 min.

5.2.2 Tempos entre a reação e a injeção no CG/EM

Considerando que alguns derivados decompõem-se pela ação da luz, do calor, da umidade, entre outros fatores, não sendo possível a espera prolongada entre a sua obtenção e a análise cromatográfica, foi analisada a estabilidade das amostras de EF derivatizadas com CH frente ao tempo de espera para análise. O procedimento utilizado seguiu o descrito no item 4.5.5. Os resultados obtidos para o uso de 100 µL de CH no SS “A” (metanol + álcool isopropílico + NH₄OH - 78:20:2) descritos na Tabela 5.9 (Anexo B).

Foi observada a presença de EF sem derivatizar apenas quando usamos a proporção de 1:1 (µg/µL) de EF e CH. Para este SS o melhor tempo de injeção é de até 2 h com o uso de 50 µL de CH. Entretanto, optamos por adotar a quantidade de 100 µL de CH, pois esta apresentou menor variação entre todos os tempos, além de ser suficiente para as injeções no CG/EM, quando do uso do amostrador automático.

5.2.3 Comportamento da CH com diferentes concentrações de PEF e EF

O estudo do comportamento da CH com diferentes concentrações de PEF e EF foi realizado no intuito de avaliar possíveis inconvenientes na aplicação desta metodologia em amostras de pacientes que chegam aos laboratórios para análise, onde as concentrações são desconhecidas e variadas.

Ao testarmos a derivatização de algumas concentrações de EF e PEF frente a 100 μL de CH, observamos que em concentração acima de 60 $\mu\text{g/mL}$ de EF e 40 $\mu\text{g/mL}$ de PEF o pico base passa a ser m/z 246 (MH^+), íon correspondente ao IM (Tabela 5.10). Este fato é atribuído ao equipamento utilizado (do tipo *ion trap*), pois as mesmas amostras foram testadas em equipamento com sistema quadrupolo (Shimadzu, GC/MS CLASS 5A/QP5000) e não foi observada a inversão do pico base (Figura 5.30).

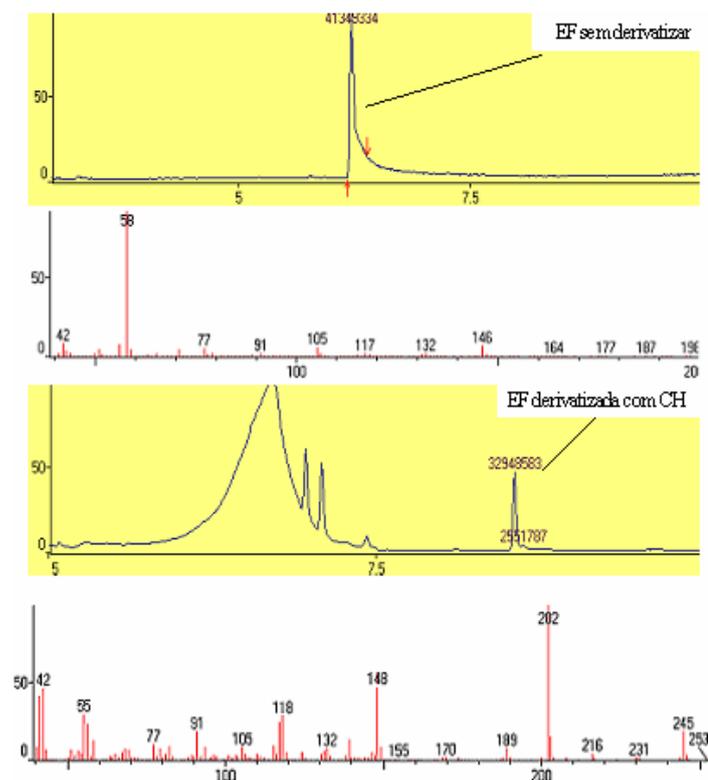


Figura 5.30: Cromatogramas de EF não-derivatizada (TR 6,22) e derivatizada com CH (TR 8,72 min) e respectivos espectros de massas, adquiridos em equipamento GC/MS CLASS 5A QP5000 Shimadzu, equipado com quadrupolo cilíndrico / IE 70 eV, operando em condições equivalentes às aquelas apresentadas no item 4.4.

A inversão do pico base, observada com altas concentrações de analito em equipamentos do tipo *ion trap* é um fenômeno conhecido e esperado, o qual dificulta

a construção de um gráfico de calibração baseado na quantificação do íon base e a identificação dos analitos baseada nos íons diagnóstico (Tabela 5.11), bem como o uso de espectrotecas de aquisição. Este fenômeno pode ser contornado através da diluição da amostra ou do emprego de equipamentos do tipo quadrupolo cilíndrico, entretanto, com perda de sensibilidade, uma vez que o limite de detecção alcançado com *ion trap* foi de 1 µg/mL e com quadrupolo cilíndrico, 10 µg/mL

5.2.4 Confirmação da identificação das substâncias

Na etapa de identificação dos analitos e/ou derivados por CG/EM, seguiu-se o preconizado pela *World Anti-Doping Agency* (WADA, 2004b), a qual estabelece os critérios de identificação para testes qualitativos de analitos por separação cromatográfica capilar cujo tempo de retenção (TR) não deve diferir mais que 1% entre o analito desconhecido em uma amostra de urina e o correspondente analito em uma amostra de referência conhecida (controle) ou do material de referência.

Ainda segundo WADA (2004b), para detecção por espectrometria de massas no modo *full scan*, todos os íons diagnósticos com abundância relativa >10% obtidos do espectro de referência de uma urina controle positivo ou do material de referência devem estar presentes no espectro do pico desconhecido. Além disso, a abundância relativa dos três íons diagnósticos não deve diferir mais que a quantidade estabelecida pela urina controle positivo ou pelo material de referência, podendo ser obtida de um único ou de vários espectros ou da integração da área dos picos. Os íons diagnóstico podem ser o IM ou fragmentos de massa de quem a presença e abundância são características do analito de interesse para a sua identificação.

Para CG/EM por impacto de elétrons a tolerância máxima permitida pela WADA para a abundância relativa dos íons diagnóstico para valores >50% (em relação ao pico base 100%) é de $\pm 10\%$ (absoluto), entre 25-50% é de $\pm 20\%$ (relativo) e para valores <25% é de $\pm 5\%$ (absoluto). No caso do modo SIM, além dos limites acima determinados para os três íons diagnósticos, a relação sinal/ruído deve ser maior que três para um (3:1). A detecção por EMⁿ segue a mesma regra do modo SIM, porém no caso de haver apenas um íon produto do íon precursor, este poderá ser suficiente para garantir a identificação do analito (WADA, 2004b).

Na Tabela 5.11 são mostrados três exemplos de amostras reais de urina, as quais foram consideradas positivas para ANF, EF e PEF.

Tabela 5.11: Comparação do tempo de retenção e da abundância relativa de três íons diagnóstico em três amostras de urina contendo ANF (anfetamina), EF (efedrina) e PEF (pseudoefedrina).

m/z	Abundância relativa (%)	Limites Máximos Permitidos (%)	TR (min)	Limites Máximos Permitidos (min)	Urina Real	
					Abundância relativa (%)	TR (min)
Controle Positivo de ANF						
44	17	12 - 22			18	
91	27	22 - 32	5,92	5,86 - 5,98	30	5,90
124	100	90 - 110			100	
Controle Positivo de EF						
118	11	6 - 16			9	
148	50	40 - 60	6,50	6,44 - 6,56	52	6,52
203	18	13 - 23			16	
Controle Positivo de PEF						
118	11	6 - 16			13	
148	50	40 - 60	6,42	6,36 - 6,48	52	6,46
203	18	13 - 23			19	

5.2.5 Extrapolação dos parâmetros analíticos para anfetamina

No intuito de avaliar a aplicação do método, as melhores condições determinadas nas etapas anteriores de trabalho (extração com SS "A" e derivatização com 100 µL de CH a 100 °C por 30 min) foram testadas com amostras de urina enriquecidas e de pacientes (amostras reais) contendo ANF.

Os resultados mostraram um comportamento semelhante entre a ANF e as EFs frente a derivatização por CH. Como ilustrado na Figura 5.31, foi observada a formação de derivado oxazolidina-ANF (TR 5,92 min), caracterizado pelos fragmentos de massas característicos, íons m/z 124 (pico base), m/z 91 (24%) e m/z 216 (MH+) (11%), demonstrando a viabilidade de aplicação da metodologia proposta, para detecção de ANF em urina.

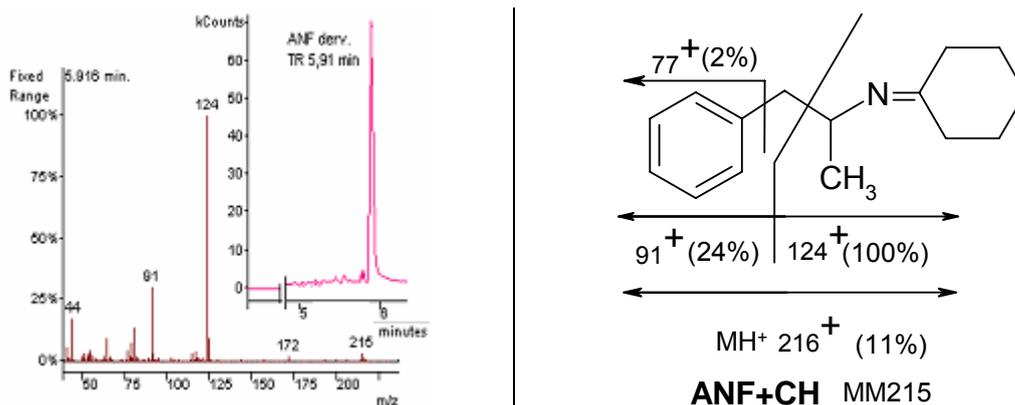


Figura 5.31: Cromatograma, espectro e fragmentos de massas observados para ANF+CH (TR 5,92 min), com as respectivas abundâncias relativas (%). Equipamento CG 3800 / Saturno 2000 EM/EM Varian®. Coluna capilar CP-SIL 8CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (5% polidimetilsiloxano) – Varian®.

5.3 Métodos de Extração

Apesar do surgimento de técnicas modernas de separação, onde se pode obter alta seletividade e sensibilidade, em termos de detecção, para um dado analito (ou classe), presente em matrizes complexas, o preparo de amostra ainda é necessário e geralmente é a etapa crítica da análise.

Para assegurar os resultados obtidos, mais de um tipo de técnica de purificação (*clean up*), extração e/ou concentração pode ser empregada para uma mesma amostra. A escolha da metodologia mais adequada deve levar em conta, entre outras características, simplicidade, rapidez, custo, presença de interferentes, taxas de recuperação, exatidão e precisão, para o(s) analito(s) de interesse.

De uma forma geral, as técnicas mais utilizadas em análises de compostos anfetamínicos e avaliadas neste trabalho, são a extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME).

5.3.1 Extração líquido-líquido (ELL)

O primeiro inconveniente da ELL é o procedimento inicial de hidrólise ácida que deve ser realizado nas amostras de urina reais para viabilizar a detecção de ANFs por CG/EM. Outro inconveniente é o uso de grandes volumes de reagentes como de HCl para hidrólise ácida, NH₄OH 30% para neutralização e ajuste de pH 9-10 e solventes da extração, geralmente solventes clorados. Ainda, o procedimento

de ELL geralmente é demorado, trabalhoso e fornece extratos impuros, inapropriados para injeção no CG/EM. Entretanto, a principal vantagem é o baixo custo e a facilidade de operação, sem a necessidade de equipamentos sofisticados e profissionais especializados. Os extratos obtidos na ELL foram submetidos a derivatização com 100 µL de CH, 100 °C/30 min e 1 µL injetado no CG/EM.

5.3.2 Extração em fase sólida (SPE)

Para permitir a comparação dos dados, a todos os eluatos dos sistemas de SPE testados foram adicionados 100 µL de CH e submetidos a derivatização 100 °C/30 min, com posterior evaporação (60 °C/N₂) e reconstituição com 100 µL de metanol, sendo 1 µL injetado no CG/EM. Os sistemas que forneceram recuperação significativa estão apresentados na Figura 5.29, sendo no eixo das abscissas o número das SPE (descritos na Tabela 4.1) e no eixo das ordenadas o valor da recuperação em porcentagem. Para o cálculo da recuperação levou-se em conta a quantidade de urina utilizada na etapa de adição da amostra (20 µg/mL), uma vez que utilizamos diferentes volumes.

Dos 12 processos de extração testados por SPE (Tabela 4.1) apenas em 7 obtivemos recuperação da EF (SPE 3, 5, 6, 7, 9, 11 e 12), nos outros 5 ou a EF não foi detectada ou o valor de recuperação ficou abaixo de 1% (SPE 1, 2, 4, 8 e 10).

Analisando-se os resultados apresentados na Figura 5.32, observamos que os melhores resultados foram obtidos com o SS "A" (metanol + álcool isopropílico + NH₄OH - 78:20:2) nas SPE 3 (92%) e SPE 5 (85%), sendo que podemos considerar estes 2 sistemas igualmente adequados. As principais diferenças entre eles são a etapa de remoção dos interferentes, onde a SPE 3 utiliza ácido acético e a SPE 5 ácido clorídrico e o volume total de solventes passado no cartucho, na etapa de remoção dos interferentes, que foi de 7 mL para SPE 3 e de 18 mL para SPE 5. Os demais SS mostraram-se ineficientes na extração da EF com recuperações inferiores a 30%.

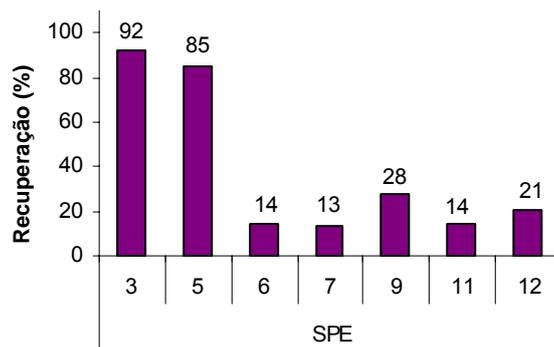


Figura 5.32: Gráfico da recuperação da EF (20 µg/mL) em urina, após vários processos de extração por SPE.

Devido aos resultados promissores obtidos nos procedimentos descritos na SPE 3 e SPE 5 e na tentativa de melhorarmos a recuperação da EF, foram observados alguns aspectos como:

- Vazão de extração: para carregar o cartucho de SPE com amostra e eluir o analito foi usado um fluxo de 1-2 mL/min, com baixo vácuo (~5 polegadas Hg), considerando que o aumento no fluxo diminuiu a recuperação da EF.
- Influência do volume do SS utilizado na eluição: foram testados 3 diferentes volumes do SS para SPE 5 1x2, 2x2 e 3x2 mL, sendo que para a primeira eluição com 2 mL do SS a recuperação da EF foi de 55%, na segunda eluição com mais 2 mL a recuperação foi de 27% e para os últimos 2 mL a recuperação foi nula (0%), portanto a melhor recuperação (cerca de 82% (55+27%)) foram alcançadas com 2x2 mL do SS.
- Influência da força iônica: o procedimento para a SPE 9 foi semelhante a SPE 5 com exceção da adição de cloreto de sódio na amostra para aumentar a força iônica. Os resultados mostraram que a adição de sal, na concentração de 16%, foi prejudicial na recuperação da EF (28% para SPE 9 e 85% para SPE 5).
- pH da amostra: foram testadas amostras de urina ajustadas para pH 4, 5, 6 e 7, sendo as melhores recuperações obtidas em pH 6 e 7 (Figura 5.33).
- Volume de quebra (breakthrough volume): o volume de quebra é determinado através do aumento do volume da amostra contendo a mesma quantidade do analito, considerando que os analitos são quantitativamente retidos até o ponto em que o próprio solvente da amostra começa a remover o analito no adsorvente (lixiviação). Em amostras biológicas, como urina, esta não consiste em uma etapa crítica, devido aos pequenos volumes aplicados (geralmente menor que 5 mL),

entretanto, a própria passagem da amostra pode prejudicar a retenção do analito, devido a complexidade da matriz. Foram testados os volumes de amostra de urina de 1; 2; 2,5 e 5 mL com concentração fixa de EF de 20 µg/amostra, sendo que não foi observada diferença significativa nas recuperações de EF com os volumes testados, sendo selecionado o volume de 5 mL como volume padrão de amostra a ser submetido a SPE.

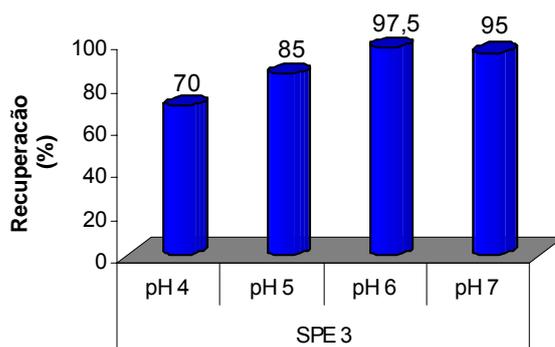


Figura 5.33: Gráfico da influência do pH da amostra na recuperação da EF (20 µg/mL) por SPE.

Os dois melhores sistemas (SPE 3 e 5) foram testados com amostras de urina reais contendo ANF. O mesmo inconveniente observado para ELL, hidrólise ácida, também ocorre na SPE. Os resultados estão de acordo com os encontrados com as EFs.

A SPE 3 foi o sistema adotado neste trabalho para as amostras de urina reais, seguindo o descrito no Tabela 4.1, adotando-se os parâmetros: fluxo de 1-2 mL/min com baixo vácuo (~5 polegadas Hg) para carregar o cartucho com amostra e eluir o analito, volume do eluente de 2x2 mL, sem adição de cloreto de sódio, pH da amostra entre 6 e 7 e volume de urina 5 mL.

5.3.3 Microextração em fase sólida (SPME)

Foi aplicada a SPME via *headspace* com injeção manual (off line) para amostras de urina reais contendo EFs e ANF. A fibra de SPME foi condicionada a 250 °C/30 min antes do primeiro uso e entre as injeções, principalmente com amostras positivas. Para a derivatização, foram usados 20 e 5 µL de CH para amostras de EFs e ANF, respectivamente. Quantidade muito menor quando comparada com a utilizada para derivatização por SPE, pois no uso da mesma

proporção (EF/CH – 1:2; µg/µL) foi prejudicial na SPME, pois o equilíbrio de partição exigido não foi alcançado satisfatoriamente, prejudicando a detecção da EF.

Os métodos de extração ELL, SPE e SPME foram aplicados em amostras de urina reais contendo PEF e ANF como podemos visualizar na Figura 5.34. Os cromatogramas da ELL possuem inúmeros interferentes e os da SPME estão mais limpos. A SPE mostrou-se mais eficiente para quantificação das amostras, pois há uma pré-concentração do analito.

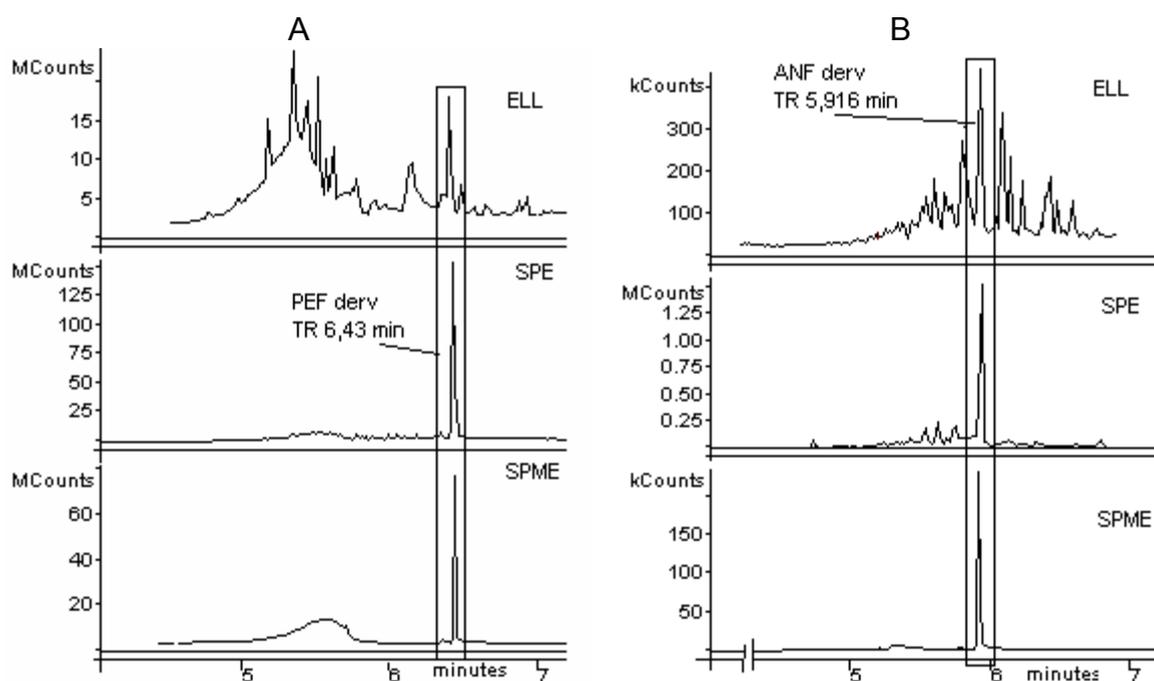


Figura 5.34: Cromatogramas de amostras de urina contendo PEF (A) e ANF (B) obtidos nos três tipos de extração ELL, SPE e SPME.

Os resultados indicaram que a SPME, sob as condições de análise testadas, foi eficiente na extração de EFs e ANF de amostras enriquecidas e amostras reais de urina. Entretanto, alguns cuidados na montagem da fibra na seringa (holder) e no manuseio desta são recomendados, como a altura da fibra, evitando a imersão na amostra (para prolongar a vida útil), a homogeneização e o aquecimento homogêneo do sistema e a inserção/remoção no injetor do CG. Entre as vantagens da SPME sobre outras técnicas de extração como ELL ou SPE, destacam-se a simplicidade, facilidade de manipulação, menor tempo de análise, favorável relação custo x benefício e a extração sem necessidade de solventes orgânicos (ambientalmente aceita), obtenção de extratos muito limpos, possibilidade de reutilização da fibra e realização de extração e derivatização em uma única etapa o

que diminui a possibilidade de perda do analito. SPME serve tanto para screening de drogas ilícitas como para testes confirmatório dos mesmos (STAERK e KULPMANN, 2000).

5.4 Validação da metodologia

O método escolhido para a quantificação das amostras foi padronização externa, com a construção de um gráfico de calibração, a partir de soluções-padrão com concentrações conhecidas. Para todas as curvas os valores obtidos para r^2 foram superiores a 0,99 e a análise de variância apresentou diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as concentrações e para a regressão linear, enquanto o desvio da linearidade não foi significativo em acordo com BRASIL (2003a) (Tabela 5.12).

Não foi adotado o método de padronização interna devido a dificuldade de obtenção de analitos deuterados, comumente relatados na literatura. Alguns candidatos a padrão interno foram testados, como timol, isobutilmetilcetona (MEC) e m-dinitrobenzeno, sendo que nenhum destes apresentou boa resposta.

Tabela 5.12: Parâmetros da validação analítica da EF e PEF.

Tempo de retenção (min)/DP/CV(%)		Parâmetros Analíticos					Recuperação (%)
		Equação da reta	r^2	Linearidade µg/mL	LQ (µg/mL)	LD (µg/mL)	
EF	SPE	$y = 1768727x - 9652747$	0,999	5 - 100	5	1	80 - 89
	SPME	$y = 85335x + 40127$	0,991	5 - 20	5	0,5	88 - 102
PEF	SPE	$y = 727424x - 11276884$	0,992	10 - 300	10	1	82 - 99
	SPME	$y = 56161x - 915756$	0,994	20 - 400	20	0,5	84 - 102

Para a SPE foram determinados os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária. Repetibilidade foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). Os resultados para EF e PEF apresentaram valores inferiores a 5% para a repetibilidade e 10% para precisão intermediária, de acordo com o preconizado pela BRASIL (2003a), indicando baixa variabilidade dos valores obtidos para cada concentração.

De uma forma geral, o problema com CG/EM na determinação de ANFs é baixa reprodutibilidade e repetibilidade. A metodologia proposta neste trabalho mostrou-se promissora, pois aspectos como mudanças de fornecedores/marcas de

materiais e reagentes, diferentes analistas ou equipamentos não comprometeram a etapa de validação do procedimento analítico, pois não promoveram alteração significativa nos resultados. Assim, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise.

As amostras de urina mostraram-se estáveis para ANF para todos os procedimentos realizados, ou seja, podem permanecer a temperatura ambiente 20-25 °C/72 h ou mantidas a temperatura de 37°C/2 horas ou armazenadas a 4 °C/30 dias ou congeladas a -18 °C/360 dias (SEBBEN *et al.*, 2007). Os dados da EF foram reportados por Jiménez e col. (2006) os quais consideram que a EF e a PEF são estáveis em urina a 4 °C por 6 meses e -20 °C por 24 meses.

5.5. Aplicação Prática do Método Proposto por SPME

Primeiramente as amostras foram submetidas ao screening toxicológico por imunoensaio enzimático homogêneo (EMIT). As amostras com resultados positivo para ANFs foram usadas neste trabalho.

Foram utilizadas 23 amostras de urina de três voluntários adultos (2 mulheres e 1 homem). Os voluntários ingeriram 400 mg de Ma-Huang (EF/PEF), 60-120 mg de PEF (Dimetapp® ou Claritin D®) e 25 mg de femproporex (ANF) em intervalos superiores a 7 dias entre cada substância. Amostras de urina foram coletadas aleatoriamente no intervalo de 2-48h após administração oral de uma única dose terapêutica.

As concentrações médias urinárias (2-8 h) encontradas para o uso de 400 mg de Ma-Huang (PEF) foram de 21,5 µg/mL, para 60 mg PEF (Dimetapp®), 162,1 µg/mL, sendo a maior concentração obtida com 6 h (284,7 µg/mL), para 120 mg de PEF (Claritin D®), 235 µg/mL, com o pico em 6 h (246,25 µg/mL). Os nossos resultados estão de acordo com Tseng *et al.* (2006), o qual descreve que EF e PEF são excretadas em até 24 h após a administração oral de uma única dose de 25 mg (EF) e 30 mg (PEF) sendo a maior quantidade excretada nas primeiras 6 h, com concentrações médias de 24,5 µg/mL para EF e 81 µg/mL para PEF. Em todas as amostras de urina dos voluntários que fizeram uso de 25 mg de femproporex (ANF), foi detectada ANF e femproporex.

Nas amostras de urina dos voluntários detectamos apenas PEF. Devido a dificuldade de amostras de urina contendo simultaneamente EF e PEF, este método foi aplicado em algumas amostras comerciais de diferentes espécies de *Ephedra*, obtendo-se boa separação cromatográfica da EF e PEF com CH, com TR distintos 6,42 min para PEF e 6,50 min para EF, com espectros de massas idênticos (Figura 5.35).

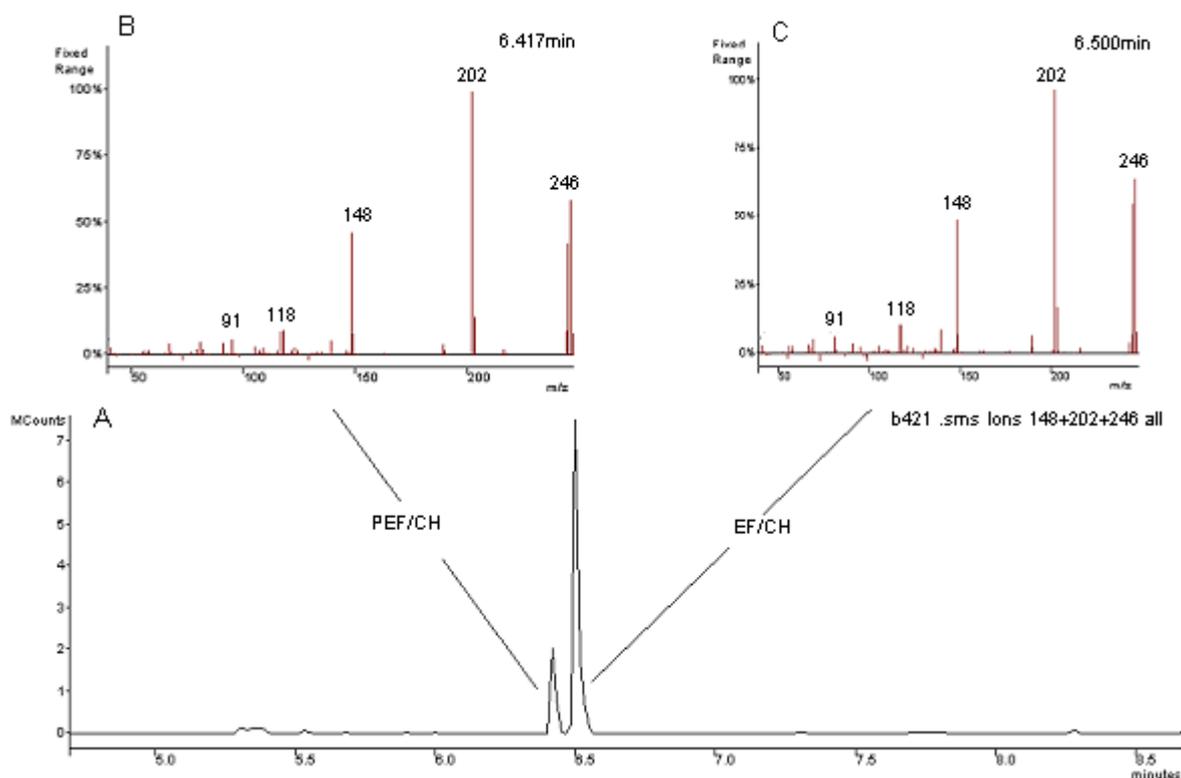


Figura 5.35: Cromatograma de uma amostra comercial de *Ephedra sinica* com PEF e EF (A) derivatizada com CH. PEF+CH TR 6,42 min e EF+CH TR 6,50 min com os respectivos espectros de massas PEF(B) e EF(C). Equipamento CG 3800 / SATURNO 2000 EM/EM VARIAN®. Coluna capilar CP-SIL 8CB LOW BLEED/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (5% polidimetilsiloxano) – VARIAN®. Fonte: BOFF, 2006.

Amostras de urina de pacientes suspeitos do uso de ANFs foram submetidas ao screening toxicológico por EMIT, vinte e oito amostras positivas foram testadas em CG/EM. Em nenhuma destas foi detectada a ANF, porém 4 amostras foram positivas para PEF, 1 para EF e PEF, 2 para amitriptilina, 1 para amitriptilina + prometazina, 1 para clorpromazina + difenidramina, 8 para clorpromazina, 3 para lidocaína e em 8 amostras não foi possível identificar os fármacos acima citados.

Quando comparamos os resultados positivos para ANFs nos testes de triagem por EMIT, 100% das amostras reais foram negativas para ANF e maioria positiva para algum dos interferentes. Estes dados devem ser criteriosamente

analisados levando-se em conta a origem das amostras. Neste caso são de pacientes internados em clínicas ou hospitais para desintoxicação química, onde são utilizados para o tratamento antipsicóticos fenotiazínicos, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, entre outros.

6. CONCLUSÃO

O emprego de métodos de derivatização para análise de compostos anfetamínicos é de extrema importância, pois permite ganho de sensibilidade e linearidade, além de prevenir perdas de ANFs voláteis, melhorar a performance cromatográfica e aumentando a especificidade dos fragmentos, gerando espectros de massas mais característicos. A escolha do reagente de derivatização é de extrema importância para diferenciarmos os diastêromos EF/PEF, pois segundo o COI apenas a EF faz parte da lista de substâncias proibidas sujeitas ao controle. Entre todos os reagentes testados a ciclohexanona (CH) foi a que apresentou melhor desempenho, pois consiste num reagente menos oneroso que os sililadores e promove maior seletividade dos diastêromos em colunas normais de CG.

Levando em consideração características como simplicidade, rapidez, custo, recuperação e ausência de interferentes, concluímos que a SPME é o método de escolha para a detecção e identificação de EFs e ANF, devido ao tempo de pré-análise ser menor, sendo este requisito de extrema importância em casos de emergência toxicológica. Entretanto, consideramos válido o uso de SPE para a quantificação, devido à possibilidade de pré-concentração do analito.

Ao extrapolar a metodologia proposta para amostras de urina de pacientes (amostras reais), contendo EF/PEF/ANF e amostras vegetais (EFs) obtivemos resultados satisfatórios e de acordo com a literatura, para metodologias empregando outros RDs, confirmando a aplicabilidade do método proposto.

De forma geral, apesar das inúmeras metodologias descritas na literatura para análise de compostos anfetamínicos, observamos a dificuldade de aplicação destas em rotina laboratorial. Além disto, a comparação dos resultados dos ensaios confirmatórios com as técnicas de triagem, torna evidente a necessidade da confirmação da presença de ANFs para evitar a liberação de resultados falsos-positivos por EMIT. Mesmo este apresentando inúmeros interferentes ainda é considerado uma metodologia adequada para *screening* toxicológico devido ao baixo custo e a possibilidade de realização de um grande número de testes em um reduzido período de tempo.

7. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR ISO/IEC17025 **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2001.

ANDRAWS, R., CHAWLA, P., BROWN, D. L. Cardiovascular effects of *Ephedra* alkaloids: a comprehensive review. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, n. 4, p. 217-225, 2005.

BOFF, B. S. Investigação da presença de efedrina em *Ephedra tweediana* e em *E. triandra* (Ephedraceae) coletadas em Porto Alegre/RS, 2006. 19 f. Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

Bond Elut Certify. Sample preparation products. Harbor: Varian. (Bula de kit).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 560 de 2 de abril de 2002. Determina a publicação do guia para realização dos estudos de estabilidade, através de revogação da RE-nº 485 publicada no D.O.U. 20 mar. 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 abr. 2002.

_____. _____. _____. Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, através de revogação da RE-nº 475 publicada no D.O.U. 19 mar. 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003a.

_____. _____. _____. Resolução RDC nº 18 de 28 de janeiro de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 jan. 2003b. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showact.php?id=1363&word=medicamentos>>. Acesso em: 25 ago. 2005.

_____. _____. _____. Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Levantamento de Laboratórios Analíticos de Toxicologia Forense. Março, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/pesquisa_toxicologia_forense.pdf> Acesso em: 16 maio 2006.

BRAZZAROLA, F.; TUBARO, M.; BRAVO, P.; ZANDA, M.; VOLONTERIO, A.; TRALDI, P. The mass spectrometric behaviour of fluorinated ephedrine under different protonating conditions. **II Farmaco**, v. 58, p. 69-77, 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA 1999. London: The Stationery Office, 1999. 2 v.

CANTWELL, B.; McBRIDGE, A. J. Self detoxification by amphetamine dependent patients: a pilot study. **Drug Alcohol Dependence**, v. 49, p. 157-163, 1998.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Advanced organic chemistry. Part B: reactions and synthesis. 3. ed. New York: Plenum Press, 1990. 2v. 800p.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A. **I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país – 2001**. São Paulo: CEBRID, 2002. 380p.

CASTILHO, M. C.; SILVEIRA, M. I. N. Técnicas de derivatização química para cromatografia em fase gasosa: I – Sililação. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. XLVIII, n. 2, 1998.

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

CHASIN, A. A. M.; SILVA, E. S. Estimulantes do sistema nervoso central. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p. 239-257.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J. V.; MOSS, M. S.; WIDDOP, B. eds. CLARKE'S analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 2v. 1935p.

DIAS, M. B.; TUYAMA, A. C. G.; ANDRADE FILHO, A. Simpaticomiméticos. In: ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, p. 313-316, 2001.

DOMINGOS, V. B. Verificação da relação entre a presença de clorpromazina e seus produtos de biotransformação, com resultados indicativos para compostos anfetamínicos por EMIT, através de análises CG/EM, 2006. 20 f. Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

EL-HAJ, B. M.; AL-AMRI, A. M.; ASAN, M. H.; ALI, H. S.; KHADEM, R. K. B. The use of cyclohexanone as a “derivatizing” reagent for the Gc-MS detection of amphetamines and ephedrine in seizures and the urine. **Forensic Science International**, v. 135, p. 16-26, 2003.

EMIT, d. a u. Amphetamine/Methamphetamine Assay. Cupertino: Syva company, 2002. Bula de kit.

ENSSLIN, H. K.; KOVAR, K. A.; MAURER, H. H. Toxicological detection of the designer drug 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE, “Eve”) and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. **Journal of chromatography B: biomedical applications**, v. 683, p. 189-197, 1996.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 24, p. 755-767, 2001.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. United Kingdom: EURACHEM, 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2005.

FORSDAHL, G.; GMEINER, G. Investigation of the silylation of ephedrine using N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide. **Journal of Chromatography B**, v. 811, p. 201-208, 2004.

FOSTER, S.; TYLER, V. E. Tyler's Honest Herbal. **A sensible guide to use of herbs and related remedies**. New York, Haworth Herbal Press, 1999.

FUCHS, F.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica: fundamentos de terapêutica racional**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1074p.

GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. N.; FONSECA, A. M.; CARLINI, E. E. V **Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras: 2004**. São Paulo: CEBRID, 2005. 398p.

GANZERA, M.; LANSER, C.; STUPPNER, H. Simultaneous determination of *Ephedra cínica* and *Citrus aurantium* var. *amara* alkaloids by ion-pair chromatography. **Talanta**, v. 66, p. 889-894, 2005.

GOMES, F. Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido supercrítico (EFS). 2002. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química Pós-Graduação, UFRGS, Porto Alegre.

GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10th. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 2148p.

HINO, Y.; OJANPERA, I.; RASANEN, I.; VUORI, E. Performance of immunoassays in screening for opiates, cannabinoids and amphetamines in post-mortem blood. **Forensic Science International**, v. 131, p. 148-155, 2003.

HUANG, Z.; ZHANG, S. Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urina samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry after immunoassay screening. **Journal of Chromatography B**, v. 792, p. 241-247, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH: of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B. ICH Steering Committee, 1996.

INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD – INCB. **Report of the International Narcotics Control Board for 2006**. Disponível em: http://www.incb.org/incb/en/annual_report_2006.html. Acesso em: 13 jul. 2007.

INMETRO – Comissão Técnica de Laboratórios de Ensaio-Química (CTLE-05). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008**, Brasília, DF: INMETRO, 2003. 35p.

JIMÉNEZ, C.; TORRE, R. de la; VENTURA, M.; SEGURA, J.; VENTURA, R. Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 843, p. 84-93, 2006.

KARCH, S. B. (Ed) **Drug abuse handbook**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 1138p.

KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. (ed) **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 1111p.

KNAPP, D.R. **Handbook of analytical derivatization reactions**. New York: John Wiley & Sons, 1979. 741p.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois S.A, 1982. 783p.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. de. **Dicionário Terapêutico Guanabara: edição 2004/2005**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KRAEMER, T.; THEIS, G. A.; WEBER, A. A.; MAURER, H. H. Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic fenproporex in human urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay. **Journal of Chromatography B**, v. 738, p. 107-118, 2000.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240p.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96p.

LARINI, L.; CARVALHO, D. Estimulantes centrais. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Monele, 1993. p. 251-256.

LIEBERMAN, H. R. The effects of ginseng, ephedrine and caffeine on cognitive performance, mood and energy. **Nutrition Reviews**, v. 59, n° 4, p. 91-102, 2001.

LU, N. T.; TAYLOR, B. G. Drug screening and confirmation by GC-MS: comparison of EMIT II and online KIMS against 10 drugs between US and England laboratories. **Forensic Science International**, v. 157, p. 106-116, 2005.

MARTINDALE: the complete drug reference. 34th ed. London: Pharmaceutical Press, 2005. 2756p.

MELGAR, R.; KELLY, R. C. A novel GC/MS derivatization method for amphetamines. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 17, p. 399-402, 1993.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE - NIDA. **The validity of self-reported drug use: improving the accuracy of survey estimates**. Rochville: NIDA, 1997. 508p. (NIDA Research Monograph, 167).

NISHIDA, M.; NAMERA, A.; YASHIKI, M.; KIMURA, K. Miniaturized sample preparation method for determination of amphetamines in urine. **Forensic Science International**, v. 143, p. 163-167, 2004.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 474p.

OLSON, K. R. (Ed.) **Poisoning & Drug Overdose**. 4th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004. 718p.

PELLEGRINI, M.; ROSATI, F.; PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; ROMOLO, F. S.; LOPEZ, A. Rapid screening method for determination of ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 769, p. 243-251, 2002.

PERICÁS, C. C.; FALCÓ, P. C.; HERNÁNDEZ, R. H. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the enantiomeric determination of amphetamines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 333, p. 328-335, 2005.

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

QUEIROZ, M. E.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n° 5, p. 880-886, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.

SAITO, Y.; JINNO, K. The use of fibrous polymer materials in capillary electrochromatography (review). **Chromatography**, v. 22, n° 3, 2001.

SEBBEN, V. C.; SEBBEN, I.; CATTANEO, R.; HOFFMEISTER, C.; LIMBERGER, R. P. Estabilidade dos metabólitos da cocaína, maconha e anfetaminas em urina por EMIT. **Química Hoje**, n° 07, p. 9-11, 2007

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374p.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. ver. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. 1102p.

SHAREEF, A.; ANGOVE, M. J.; WELLS, J. D. Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-N-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinyestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 121-128, 2006.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica 1**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. 777p.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; GRIFFITHS, J. C.; BURDOCK, G. A. Safety of ephedra: lessons learned. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 97-110, 2004.

SPYRIDAKI, M. H.; KIOUSI, P.; VONAPARTI, A.; VALAVANI, P.; ZONARAS, V.; ZAHARIOU, M.; SIANOS, E.; TSOUPRAS, G.; GEORGAKOPOULOS, C. Doping

control analysis in human urine by liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry for the Olympic Games Athens 2004: determination of corticosteroids and quantification of ephedrines, salbutamol and morphine. **Analytica Chimica Acta**, v.573-574, p. 242-249, 2006.

STAERK, U.; KÜLPMANN, W. R. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 399-411, 2000.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Derivatization and solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, n° 8, p. 553-561, 2004.

SULZER, D.; SONNERS, M. S.; POULSEN, N. W.; GALLI, A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. **Progress in Neurobiology**, v. 75, p. 406-433, 2005.

SUPELCO. Bulletin 909A: guide to derivatization reagents for GC. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects14600/4537.pd7>>. Acesso em: 11 jul. 2007.

TAGLIARI, B. Suplementos contendo efedrina: segurança, eficácia e toxicidade, 2003. 30 f. Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

TSENG, Y. L.; SHIEH, M. H.; KUO, F. H. Metabolites of ephedrines in human urine after administration of a single therapeutic dose. **Forensic Science International**, v. 157, p. 149-155, 2006.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories Division of Merck & CO. 2001. 1818p.

TYLER, V. E. The honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies. **Pharmaceutical Products Press**, New York, NY, p. 119–120, 1993.

TYLER, V. E.; ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Williams & Wilkins, USA, 1996.

UGLAND, H. G.; KROGH, M.; RASMUSSEN, K. E. Automated determination of “Ecstasy” and amphetamines in urine by SPME and capillary gas chromatography after propylchloroformate derivatisation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 463-475, 1999.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 902, p. 167-194, 2000.

UNITED NATIONS. **Amphetamine, methamphetamine and their ring-substituted analogues in seized materials**. New York: Vienna International Centre, 2006. ISBN 92-1-148208-9.

USP 27. **The United States Pharmacopeia; NF22: the national formulary**. 27th ed. Rockville: United States. Pharmacopeial Convention, 2004. 3013p.

UTRILLA, P. Aspectos farmacológicos de las anfetaminas. **Ars Pharmaceutica**, v. 41:1, p. 67-77, 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n° 4, p. 523-530, 2000.

VARIAN. Saturn 2000 GC/MS and GC/MS/MS USA, 1999. Catálogo do fabricante.

VIANA, L. R. Prevalência e fatores associados ao consumo de drogas entre estudantes do ensino médio de escolas da rede estadual em bairros de classe média de Porto Alegre, 2006. 42 f. Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia, Faculdade de Farmácia UFRGS, Porto Alegre.

WALKER, R. B.; HUANG, M.; LESZCZYNSKI, J. An investigation of isomeric differences in hydrolytic rates of oxazolidines using computational methods. **Theochem**, v. 549, p. 137-146, 2001.

WALKER, R. B.; Mass spectra of some oxazolidines formed by reaction of ephedrine and pseudoephedrine with aliphatic ketones. **Organic Mass Spectrometry**, v. 24, p. 345-346, 1989.

WANG, S. M.; WANG, T. C.; GIANG, Y. S. Simultaneous determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers by simultaneous liquid-liquid extraction and diastereomeric derivatization followed by gas chromatographic-isotope dilution mass spectrometric. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 131-143, 2005.

WANG, S. M. Enantiomeric determination of amphetamines: exploring a novel one-step solid-phase microextraction – based approach. **Journal of Chromatography B**, v. 825, p. 79-87, 2005.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY - WADA. **International standard for laboratories**, 2004a. Disponível em: <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/lab_aug_04.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2007.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY - WADA. **WADA Technical document: TD2003IDCR – Identification criteria for qualitative assays incorporating chromatography and mass spectrometry**, 2004b. Disponível em: <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/criteria_1_2.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2007.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY - WADA. **The 2007 prohibited list: international standard**, 2006. Disponível em: <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2007_list_En.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2007.

YONAMINE, M. A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais, 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, USP, São Paulo.

AVALIAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

2º PARECER DO PROJETO nº09/2005 – CEP-FEPPS/RS **PADCT: nº08/2005**

TÍTULO DO PROJETO:

ANFETAMINAS SINTÉTICAS E NATURAIS: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

NOME DO PESQUISADOR PRINCIPAL:

Viviane Cristina Sebben

PARECER	
<input checked="" type="checkbox"/>	APROVADO
<input type="checkbox"/>	APROVADO COM RECOMENDAÇÕES
<input type="checkbox"/>	COM PENDÊNCIAS
<input type="checkbox"/>	NÃO APROVADO

PARECER DO COMITÊ

O Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS/RS deliberou em reunião do dia 14/12/2005, Ata nº 18/2005, que o presente projeto está adequado ética e metodologicamente de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Res.196/96/CNS) e portanto, aprovado este CEP.

Esclarecemos ainda, que por se tratar de projeto do Grupo I, o mesmo está sendo encaminhado para apreciação da CONEP e o início de sua execução está na dependência do parecer da mesma.

Porto Alegre, 15 de dezembro de 2005.



Selir Maria Stralotto
Coordenadora CEP-FEPPS/RS

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde/FEPPS
Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS
Av. Ipiranga, 5400 – Bairro Jardim Botânico – Porto Alegre/RS
Fones diretos: (51) 32884020/32884096
e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

Tabela 5.1: Resultados do desempenho AA como RD frente à EF.

Viais*	SS (1,0 mL)		AA (μ L) **	TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)							
	Extrato seco 40 °C c/N ₂	Não secar				77	100	101	107	149	208	250	
I	A		50	6,00	241923	100%	20%	50%	3%	0%	0%	1%	0%
				6,28	1167886	100%	19%	38%	28%	2%	0%	3%	0%
				6,40	416747	100%	13%	42%	13%	2%	9%	1%	3%
II	A		100	5,97	204730	100%	21%	52%	3%	1%	0%	0%	0%
				6,25	743665	100%	20%	38%	29%	3%	0%	3%	0%
				6,35	253838	100%	16%	41%	16%	3%	1%	1%	2%
III	A	50	5,97	79283	100%	20%	56%	1%	1%	1%	1%	0%	
			6,27	809446	100%	20%	35%	26%	2%	1%	3%	0%	
IV	A	100	5,97	397962	100%	19%	52%	4%	0%	0%	0%	0%	
			6,25	4956329	100%	14%	42%	29%	2%	1%	17%	0%	
V	B	50	6,25	465871	100%	20%	38%	28%	2%	1%	3%	0%	
			6,35	144723	100%	17%	39%	16%	1%	3%	0%	2%	
VI	B	100	6,25	409133	100%	20%	38%	27%	2%	1%	2%	0%	
			6,35	87541	100%	16%	44%	16%	2%	1%	2%	1%	
VII		B	50	6,25	3299833	100%	16%	39%	30%	2%	1%	8%	0%
VIII		B	100	6,25	3167944	100%	18%	39%	29%	2%	1%	7%	0%
IX	C	50	5,97	230794	100%	20%	53%	3%	0%	0%	0%	0%	
			6,25	916983	100%	19%	39%	29%	2%	0%	4%	0%	
			6,35	238971	100%	14%	47%	12%	2%	1%	1%	3%	
X	C	100	5,97	151387	100%	21%	53%	3%	0%	0%	0%	0%	
			6,25	932912	100%	20%	37%	28%	2%	1%	4%	0%	
			6,35	214836	100%	13%	46%	12%	2%	3%	0%	2%	
XI	C	50	5,97	708603	100%	20%	57%	3%	0%	0%	0%	0%	
			6,25	3743896	100%	18%	41%	30%	2%	1%	6%	0%	
XII	C	100	5,97	312357	100%	19%	52%	3%	0%	0%	0%	0%	
			6,25	2332144	100%	18%	38%	29%	2%	1%	6%	0%	
XIII	D	50	5,15	141528	100%	25%	1%	0%	2%	0%	x	0%	
			6,25	1061582	100%	19%	37%	28%	2%	1%	3%	0%	
XIV	D		100	6,25	3287352	100%	17%	39%	28%	3%	0%	8%	0%
XV	D	50	5,13	423075	100%	18%	0%	0%	1%	0%	x	0%	
			6,27	1522553	100%	20%	36%	28%	2%	1%	9%	0%	
XVI	D	100	5,13	164254	100%	16%	0%	1%	2%	0%	x	0%	
			6,25	4403288	100%	17%	39%	28%	3%	0%	3%	0%	

LEGENDA: (*) Uso de EF 20 μ g/mL; (**) derivatização a 60 °C/60 min; após os viais foram levados à secar a 40 °C sob N₂ e reconstituído com 100 μ L de metanol; (A) metanol+álcool isopropílico+NH₄OH (78:20:2); (B) acetato de etila+NH₄OH (98:2); (C) clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2); (D) metanol; (x) fragmento de massas não encontrado.

Tabela 5.2: Resultados do desempenho AA+P como RD frente à EF.

Viais*	SS (1,0 mL)		AA+P (μ L) **	TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)							
	Extrato seco 40 °C c/N ₂	Não secar				58	77	100	101	107	149	208	250
I	A		50	6,40	3471505	100%	7%	49%	4%	2%	1%	0%	0%
II	A		100	6,37	2652570	100%	7%	48%	3%	2%	1%	0%	0%
III		A	50	5,97	199112	100%	19%	51%	4%	1%	51%	x	x
				6,25	1195910	100%	20%	35%	25%	2%	1%	3%	x
IV		A	100	5,97	90256	100%	14%	50%	0%	-2%	2%	x	x
				6,25	2350441	100%	20%	35%	25%	2%	0%	3%	x
V	B		50	6,35	855626	100%	8%	49%	4%	2%	1%	0%	0%
VI	B		100	6,35	571944	100%	8%	47%	3%	2%	3%	0%	0%
VII		B	50	6,25	3198655	100%	18%	39%	28%	2%	0%	6%	x
				6,35	1283827	100%	11%	45%	9%	2%	1%	1%	1%
VIII		B	100	6,25	2412598	100%	17%	37%	28%	2%	0%	4%	x
				6,35	1501193	100%	9%	49%	6%	2%	1%	1%	0%
IX	C		50	6,35	2264908	100%	8%	49%	3%	2%	1%	0%	1%
X	C		100	6,35	2305058	100%	7%	48%	3%	2%	3%	0%	1%
XI		C	50	5,97	129417	100%	20%	51%	4%	0%	0%	x	x
				6,25	6691787	100%	18%	35%	26%	2%	7%	10%	x
XII		C	100	5,97	215707	100%	21%	50%	2%	0%	0%	x	x
				6,25	3513938	100%	17%	37%	28%	2%	1%	7%	x
				6,35	905027	100%	17%	37%	10%	2%	2%	1%	0%
XIII	D		50	6,35	3951770	100%	7%	51%	3%	2%	2%	0%	1%
XIV	D		100	6,35	3342020	100%	6%	50%	3%	2%	1%	0%	1%
XV		D	50	5,13	945835	100%	18%	x	x	1%	0%	x	x
				6,25	2216871	100%	21%	34%	24%	2%	72%	4%	x
XVI		D	100	5,14	1321119	100%	18%	x	x	1%	0%	x	x
				6,27	801501	100%	20%	37%	28%	2%	1%	2%	x

LEGENDA: (*) Uso de EF 20 μ g/mL; (**) derivatização a 60 °C/60 min; após os viais foram levados à secar a 40 °C sob N₂ e reconstituído com 100 μ L de metanol; (A) metanol+álcool isopropílico+NH₄OH (78:20:2); (B) acetato de etila+NH₄OH (98:2); (C) clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2); (D) metanol; (x) fragmento de massas não encontrado.

Tabela 5.3: Resultados do desempenho MSTFA como RD frente à EF.

Viais *	MSTFA (μL) **	Injeção no CG/EM 1 (μL)		TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)						
		Direta (sem evaporar o SS)	Evaporar o SS a 40 °C c/N ₂ reconstituir c/ 100 μL de metanol			58	73	77	130	179	237	238
I	50	A		5,12	17030636	100%	8%	2%	1%	3%	2%	67%
II	50		A	5,10	2465719	100%	9%	3%	1%	2%	0%	8%
III	100	A		5,12	3307726	100%	9%	3%	1%	3%	1%	19%
IV	100		A	5,10	2168734	100%	10%	3%	1%	2%	0%	5%
V	50	B		5,10	1009989	100%	10%	3%	1%	2%	0%	9%
VI	50		B	5,10	153004	100%	9%	3%	1%	2%	0%	2%
VII	100	B		5,12	5441156	100%	9%	3%	1%	2%	1%	18%
VIII	100		B	5,12	148427	100%	9%	3%	1%	2%	0%	1%
IX	50	C		5,10	2299997	100%	9%	3%	1%	3%	1%	44%
X	50		C	5,10	267610	100%	10%	3%	1%	2%	0%	4%
XI	100	C		5,10	3067817	100%	8%	3%	1%	2%	1%	29%
XII	100		C	5,10	1186893	100%	12%	3%	1%	2%	0%	4%
XIII	50	D		5,12	1202040	100%	9%	3%	1%	2%	0%	12%
XIV	50		D	5,11	227454	100%	10%	7%	1%	1%	0%	1%
XV	100	D		5,10	2433031	100%	8%	2%	1%	3%	1%	26%
XVI	100		D	5,11	252262	100%	9%	7%	1%	1%	0%	1%

LEGENDA: (*) Uso de EF 20μg/mL + 1,0 mL dos sistemas de solventes (A) metanol+álcool isopropílico+NH₄OH (78:20:2); (B) acetato de etila+NH₄OH (98:2); (C) clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2); (D) metanol. (**) derivatização a 60 °C/60 min.

Tabela 5.4: Resultados do desempenho MTBSTFA como RD frente à EF.

Viáis *	MTBSTFA (μL) **	Injeção no CG/EM 1 (μL)		TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)					
		Direta (sem evaporar o SS)	Evaporar o SS a 40 °C c/N ₂ reconstituir c/ 100 μL de metanol			58	73	107	172	221	222
I	50	A		5,77	30629604	100%	5%	0%	0%	2%	4%
II	50		A	5,73	14738447	100%	8%	1%	0%	1%	6%
III	100	A		5,73	16088667	100%	8%	1%	0%	2%	4%
IV	100		A	5,75	14370807	100%	9%	11%	0%	1%	5%
V	50	B		5,75	20505004	100%	7%	1%	x	3%	4%
				7,33	1819399	2%	42%	3%	100%	3%	0%
VI	50		B	5,75	11137506	100%	8%	0%	x	2%	4%
VII	100	B		5,75	12374596	100%	7%	0%	x	2%	5%
				7,33	861374	6%	13%	0%	100%	x	x
VIII	100		B	5,75	12535035	100%	9%	4%	x	2%	5%
IX	50	C		5,75	15755828	100%	5%	1%	x	2%	4%
				7,33	1478930	2%	31%	0%	100%	1%	1%
X	50		C	5,73	11533065	100%	7%	1%	x	1%	4%
XI	100	C		5,73	7373988	100%	12%	1%	x	3%	6%
XII	100		C	5,75	11995105	100%	7%	8%	x	2%	5%
XIII	50	D		5,73	25874536	100%	5%	0%	x	2%	3%
XIV	50		D	5,15	2110260	100%	4%	2%	1%	x	x
				5,73	11171176	100%	7%	0%	x	1%	5%
XV	100	D		5,73	11010440	100%	7%	0%	x	2%	6%
XVI	100		D	5,73	6459079	100%	9%	0%	x	1%	6%

LEGENDA: (*) Uso de EF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 1,0 mL dos sistemas de solventes (A) metanol+álcool isopropílico+NH₄OH (78:20:2); (B) acetato de etila+NH₄OH (98:2); (C) clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2); (D) metanol; (**) derivatização a 60 °C/60 min; (x) fragmento de massas não encontrado.

Tabela 5.5: Resultados do desempenho do AA+MSTFA como RD frente à EF.

Viais *	SS (1,0 mL) (**)	TR (min)	Area do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)									
				58	73	100	190	237	238	279	280	351	352
I	A	6,10	30617188	50%	6%	44%	69%	x	x	8%	55%	3%	100%
II	A	6,15	23509152	38%	5%	34%	31%	x	x	7%	77%	3%	100%
III	B	6,12	34690580	100%	7%	70%	79%	x	x	8%	63%	3%	83%
IV	B	6,13	17096782	100%	12%	70%	35%	x	x	7%	83%	3%	85%
V	C	6,10	21761520	53%	5%	46%	71%	x	x	8%	62%	3%	100%
VI	C	6,15	25973948	48%	5%	43%	39%	x	x	7%	81%	4%	100%
VII	D	5,10	11432267	100%	7%	1%	0%	1%	40%	0%	0%	0%	0%
		6,08	14360352	100%	19%	59%	26%	x	x	2%	19%	0%	20%
VIII	D	5,08	7262596	100%	7%	1%	0%	1%	15%	0%	0%	0%	0%
		6,13	17758834	100%	20%	55%	15%	x	x	2%	26%	1%	21%

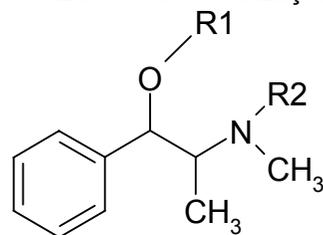
LEGENDA: (*) Uso de EF 20µg/mL nos viais I, III, V e VII; e de PEF 20µg/mL nos viais II, IV, VI e VIII; (A) metanol+álcool isopropílico+NH₄OH (78:20:2); (B) acetato de etila+NH₄OH (98:2); (C) clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2); (D) metanol; (x) fragmento de massas não encontrado; (**) 50 µL AA (derivatização a 60 °C/60 min), após levar à secura 40 °C/N₂; adicionar 50 µL MSTFA (derivatização a 60 °C/60 min).

Tabela 5.6: Resultados do desempenho CH como RD frente à EF.

Viáis*	SS (1,0 mL)		CH (μ L) **	Injeção no CG/EM 1(μ L)		TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)							
	Secar 40°C c/N ₂	Não secar		Direta	Após evaporar a CH***			58	77	118	148	202	203	245	246
I	A		50	x		6,50	11908762	3%	5%	12%	52%	100%	17%	27%	20%
II	A		50		x	6,50	2312213	3%	7%	15%	56%	100%	18%	16%	5%
III	A		100	x		6,50	8826237	3%	6%	14%	54%	100%	18%	20%	12%
IV	A		100		x	6,50	3412247	3%	7%	14%	54%	100%	17%	18%	6%
V		A	50		x	6,50	3903807	3%	5%	13%	53%	100%	18%	23%	14%
VI		A	100		x	6,50	11465206	2%	3%	11%	48%	100%	17%	31%	27%
VII	B		50	x		6,50	3981137	3%	6%	13%	52%	100%	17%	20%	12%
VIII	B		50		x	5,13	1219237	100%	16%	x	x	x	x	x	x
						6,50	457673	3%	6%	14%	52%	100%	16%	16%	4%
IX	B		100	x		6,50	2206944	3%	6%	14%	54%	100%	18%	18%	7%
X	B		100		x	6,50	604539	3%	8%	16%	56%	100%	19%	15%	3%
XI		B	50		x	5,13	1961380	100%	17%	x	x	x	x	x	x
						6,50	640961	3%	7%	14%	54%	100%	18%	17%	5%
XII		B	100		x	5,13	3755072	100%	16%	x	x	x	x	x	x
						6,50	1236817	3%	6%	14%	54%	100%	19%	18%	7%
XIII	C		50	x		6,50	8488962	3%	5%	13%	51%	100%	17%	23%	14%
XIV	C		50		x	6,50	431149	2%	7%	14%	52%	100%	17%	15%	4%
XV	C		100	x		6,50	5306703	3%	6%	14%	53%	100%	17%	20%	10%
XVI	C		100		x	6,50	331023	2%	6%	14%	51%	100%	17%	19%	9%
XVII		C	50		x	6,50	1979949	3%	7%	15%	57%	100%	18%	19%	8%
XVIII		C	100		x	6,50	2573496	3%	6%	13%	53%	100%	17%	20%	8%
XIX	D		50	x		5,17	12475813	100%	9%	x	x	x	x	x	x
						6,50	8043578	2%	4%	12%	51%	100%	18%	28%	23%
XX	D		50		x	5,15	2083836	100%	22%	x	x	x	x	x	x
						6,50	1119397	3%	7%	14%	52%	100%	18%	18%	7%
XXI	D		100	x		6,50	4138848	3%	6%	13%	53%	100%	17%	21%	11%
XXII	D		100		x	6,26	141960	100%	23%	x	x	x	x	x	x
						6,50	1724874	3%	6%	14%	52%	100%	18%	17%	7%
XXIII		D	50		x	5,13	946969	100%	16%	x	x	x	x	x	x
						6,50	481307	3%	6%	15%	55%	100%	17%	16%	5%
XXIV		D	100		x	5,13	2179620	100%	15%	x	x	x	x	x	x
						6,50	766484	4%	8%	15%	57%	100%	18%	17%	5%

LEGENDA: (*) Uso de EF 20 μ g/mL; (**) derivatização à 70 °C/30 min; (A) metanol+álcool isopropílico+NH₄OH (78:20:2); (B) acetato de etila+NH₄OH (98:2); (C) clorofórmio + álcool isopropílico + NH₄OH (78:20:2); (D) metanol; (***) evaporar a CH à 40°C c/N₂, reconstituir c/100 μ L de metanol.

Tabela 5.7: Principais reagentes utilizados na derivatização de EF e os respectivos derivados formados.



Estrutura química dos derivados de EF.

Reagentes	Grupo substituinte		Derivado formado	TR (min)	Observações
	R1	R2			
Anidrido Acético ou Anidrido Acético + Piridina	- COCH ₃	- H	O-acetilefedrina	5,97	Derivados N-acetil são mais estáveis que os O-acetil e N-O-acetil. Presença de múltiplos derivados e de EF sem derivatizar. A reação com AA na presença de piridina facilita uma maior formação de derivados N-O-acetil.
	- H	- COCH ₃	N-acetilefedrina	6,25	
- COCH ₃	- COCH ₃	N-O-diacetilefedrina	6,35		
Anidrido Trifluoracético	- COCF ₃	- COCF ₃	Não detectado		Cromatograma muito sujo, difícil de visualizar os picos.
Anidrido Acético + MSTFA	- Si(CH ₃) ₃	- H	O-trimetilsililefedrina	5,10	Formação de múltiplos derivados. Elevado custo. Derivado sensível à umidade.
	- Si(CH ₃) ₃	- COCH ₂ Si(CH ₃) ₃	N-acetil-N,O-ditrimetilsililefedrina	6,10	
MSTFA	- Si(CH ₃) ₃	- Si(CH ₃) ₃	N-O-Ditrimetilsililefedrina	5,55	Derivado sensível à umidade. Elevado custo. Os derivados O-TMS são mais estáveis que os N-TMS
	- Si(CH ₃) ₃	- H	O-Trimetilsililefedrina	5,10	
MTBSTFA	- Si(CH ₃) ₂ C(CH ₃) ₃	- Si(CH ₃) ₂ C(CH ₃) ₃	N-O-diterbutiltrimetilsililefedrina	7,33	
	- Si(CH ₃) ₂ C(CH ₃) ₃	- H	O-terbutiltrimetilsililefedrina	5,74	
Ciclohexanona		- C ₆ H ₁₀	2,2-Pentametileno-3,4-dimetil-5-fenil-cis-oxazolidina	6,50	Baixo custo. Excelente rendimento. Forma apenas um derivado.

Tabela 5.8: Resultados do desempenho CH em diferentes tempos e temperaturas no SS "A".

Viais *	Temperatura (°C)				Tempo (min)				TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)					
	40	60	80	100	15	30	45	60			118	148	202	203	245	246
I	x				x				6,53	18421816	8%	45%	100%	18%	38%	43%
II	x					x			6,52	14783386	10%	50%	100%	17%	40%	35%
III	x						x		6,5	14359622	10%	50%	100%	18%	37%	35%
IV	x							x	6,5	21393499	9%	50%	100%	18%	35%	38%
V		x				x			6,53	20115342	9%	48%	100%	18%	42%	46%
VI		x					x		6,5	21408665	8%	47%	100%	18%	42%	43%
VII		x						x	6,5	19985086	10%	50%	100%	18%	38%	43%
VIII		x						x	6,5	17153541	10%	49%	100%	18%	36%	36%
IX			x				x		6,53	22269725	9%	49%	100%	18%	42%	49%
X			x					x	6,5	23001246	8%	47%	100%	17%	40%	49%
XI			x					x	6,5	30073127	8%	46%	100%	16%	43%	50%
XII			x						6,5	34962248	8%	44%	100%	18%	48%	54%
XIII				x			x		6,53	53393825	6%	44%	100%	18%	50%	61%
XIV				x				x	6,5	56018619	5%	40%	100%	19%	50%	63%
XV				x				x	6,5	46046005	5%	41%	100%	17%	52%	57%
XVI				x					6,5	36959356	5%	40%	100%	17%	52%	57%

LEGENDA: (*) Uso de EF 20µg/mL + 1,0 mL do SS "A" (metanol+álcool isopropílico+NH₄OH - 78:20:2) + 100 µL de CH. Após derivatização as amostras foram levadas à secura 40 °C/N₂, reconstituir c/100 µL de metanol.

Tabela 5.9: Resultados para diferentes tempos de injeção da EF derivatizada com CH no SS "A".

Viais	EF* (μL)	CH (μL)	Tempo	TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)							
						58	77	118	148	202	203	245	246
I	20	50	T0	6,55	14191408	2%	1%	6%	38%	100%	20%	88%	99%
II	20	100	T0	6,50	3319917	2%	4%	11%	50%	100%	19%	37%	34%
III	20	200	T0	6,50	2847998	2%	4%	11%	50%	100%	18%	36%	30%
IV	50	50	T0	5,15	22006590	100%	5%						
				6,52	28149818	1%	0%	2%	16%	54%	18%	23%	100%
V	20	50	T1	6,53	12536922	2%	1%	6%	40%	100%	22%	81%	91%
VI	20	100	T1	6,50	3232669	2%	3%	11%	49%	100%	19%	40%	35%
VII	20	200	T1	6,50	2489904	2%	4%	11%	51%	100%	17%	33%	29%
VIII	50	50	T1	5,13	23615258	100%	4%						
				6,50	24717232	0%	0%	2%	14%	55%	22%	24%	100%
IX	20	50	T2	6,53	15822774	1%	0%	3%	28%	79%	20%	75%	100%
X	20	100	T2	6,50	5042887	2%	2%	8%	44%	100%	18%	43%	47%
XI	20	200	T2	6,50	2629159	3%	4%	11%	52%	100%	17%	34%	29%
XII	50	50	T2	5,15	21392498	100%	5%						
				6,50	23948282	1%	0%	2%	19%	63%	15%	25%	100%
XIII	20	50	T3	6,10	31104552	2%	1%	5%	37%	99%	22%	76%	100%
XIV	20	100	T3	6,08	13725770	2%	2%	8%	44%	100%	18%	47%	50%
XV	20	200	T3	5,08	6337487	3%	4%	11%	51%	100%	18%	34%	31%
XVI	50	50	T3	4,69	181611716	100%	5%						
				5,08	72672216	1%	0%	3%	22%	69%	23%	25%	100%

LEGENDA: (*) Solução de EF de 1000μg/mL em metanol + 1,0 mL SS "A" (metanol+álcool isopropílico+NH₄OH - 78:20:2). Após derivatização as amostras foram levadas à secura 40 °C/N₂, reconstituir c/100μL de metanol. T0= 0h, T1= 1h, T2= 2h, T3= 3h

Tabela 5.10: Comportamento da CH com diferentes concentrações de PEF e EF

Viais (*)	Pseudo efedrina μg/mL	Efedrina μg/mL	TR (min)	Área do Pico	Fragmentos de Massas Monitorados (m/z) e Abundâncias Relativas (%)					
					118	148	202	203	245	246
I	10		6,452	2888386	12%	48%	100%	18%	29%	25%
		10	6,516	9442415	14%	56%	100%	17%	19%	13%
II	20		6,418	4740629	10%	41%	100%	19%	38%	42%
		20	6,551	22071462	6%	41%	100%	17%	51%	65%
III	40		6,433	16446125	5%	22%	72%	20%	30%	100%
		40	6,503	58152132	3%	32%	100%	19%	70%	98%
IV	60		6,433	28231268	3%	13%	53%	18%	24%	100%
		60	6,510	10452665	2%	23%	93%	20%	66%	100%

LEGENDA: (*) Solução de PEF e EF de 1000μg/mL em metanol + 1,0 mL SS "A" (metanol+álcool isopropílico+NH₄OH - 78:20:2) + 100 μL de CH. Após derivatização as amostras foram levadas à secura 40 °C/N₂, reconstituir c/100 μL de metanol.