

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudos sobre o psicoativo *N,N*-dimetiltriptamina
(DMT) em *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret e em
bebidas consumidas em contexto religioso**

Alain Gaujac

Salvador-Ba
2013

ALAIN GAUJAC

**Estudos sobre o psicoativo *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) em
Mimosa tenuiflora (Willd.) Poiret e em bebidas consumidas
em contexto religioso**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Bahia, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Química

Orientador

Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade

Universidade Federal da Bahia

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia / CIEnAm

Coorientadores

Prof. Dr. Sandro Navickiene

Universidade Federal de Sergipe

Dr. Simon-Dieter Brandt

Liverpool John Moores University

Salvador

Abril / 2013

Sistema de Bibliotecas/IQ - UFBA

Gaujac, Alain.

Estudos sobre o psicoativo *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) em *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret e em bebidas consumidas em contexto religioso / Alain Gaujac. - 2013.
183 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade.

Coorientadores: Prof. Dr. Sandro Navickiene
Dr. Simon-Dieter Brandt

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

1. Alcaloides indólicos. 2. Ayahuasca. 3. Vinho da Jurema. 4. *Mimosa tenuiflora* (jurema - preta). I. Andrade, Jailson Bittencourt de. II. Navickiene, Sandro. III. Brandt, Simon-Dieter. IV. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. V. Título.

CDD - 641.22

CDU -543.645.3:663.2

Ao meu filho Yannick

“...Árvore da vida
Árvore querida
Perdão pelo coração
Que eu desenhei em você
Com o nome do meu amor”

Agradecimentos

A todos que contribuíram na realização deste estudo, especialmente, aos Professores Dr. Jailson Bittencourt de Andrade, Dr. Sandro Navickiene e Dr. Simon-Dieter Brandt, que não mediram esforços para a boa condução de todo o projeto.

À Professora Denise Gaujac, mãe querida, pela revisão gramatical do texto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo aporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
3. Justificativas	7
4. Fundamentação teórica	9
4.1. <i>N,N</i> -dimetiltriptamina e derivados β -carbolínicos: sinergia e psicoatividade oral	9
4.2. Bebidas psicoativas para fins rituais: ayahuasca e vinho da jurema	13
4.3. Espécies vegetais utilizadas no preparo do vinho da jurema	17
4.3.a. <i>Mimosa</i> spp.	17
4.4. Espécies vegetais utilizadas no preparo da ayahuasca	19
4.4.a. <i>Psychotria</i> spp.	19
4.4.b. <i>Banisteriopsis</i> spp.	19
4.5. Espécies vegetais também utilizadas como fontes de DMT e β -carbólinas	23
4.5.a. <i>Phalaris</i> spp.	23
4.5.b. <i>Peganum harmala</i> (Linnaeus)	23
4.6. Metodologias de preparo de amostras e a Química Analítica Verde	25
4.7. Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)	27
4.8. Microextração em fase sólida (SPME)	28
5. Revisão bibliográfica	31
5.1. Os primeiros estudos	31
5.2. Estudos recentes envolvendo a determinação de triptaminas e β -carbólinas na ayahuasca e em matrizes vegetais	34
5.2.a. Técnicas de preparo de amostras	34
5.2.b. Metodologias de separação e quantificação	36
6. Materiais e métodos	46
6.1. Preparo e caracterização de padrão analítico de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina obtido a partir das cascas de <i>M. tenuiflora</i>	46
6.1.a. Materiais	46
6.1.b. Reagentes	46
6.1.c. Padrões e soluções	47
6.1.d. Coleta e preparação do material vegetal	47
6.1.e. Ressonância magnética nuclear	47
6.1.f. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	48
6.1.g. Inserção direta da amostra no espectrômetro de massas	49
6.1.h. Infravermelho e medidas dos pontos de fusão	49
6.1.i. Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta	49
6.2. Estudos iniciais sobre as propriedades polimórficas de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina por calorimetria diferencial de varredura e difração de Raios X	50
6.2.a. Equipamentos e métodos	50
6.2.b. Reagentes	51
6.2.c. Preparo de amostras	51
6.3. Determinação do teor de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina nas cascas de <i>M. tenuiflora</i> por MSPD/GC-MS	52
6.3.a. Materiais	52

6.3.b. Reagentes	52
6.3.c. Padrões e soluções	53
6.3.d. Coleta e preparo das amostras vegetais	53
6.3.e. Condições de operação do sistema GC-MS	54
6.3.f. Metodologia MSPD	55
6.4. Determinação do teor de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina em bebidas rituais por SPME/GC-MS	55
6.4.a. Materiais	55
6.4.b. Reagentes	56
6.4.c. Padrões, amostras reais e soluções	56
6.4.d. Condições de operação do sistema GC-IT-MS	57
6.4.f. Metodologia SPME	58
7. Resultados e discussão	59
7.1. Preparo e caracterização de padrão analítico de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina	59
7.1.a. Extração e purificação de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina obtido a partir das cascas de <i>M. tenuiflora</i>	59
7.1.b. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	66
7.1.c. Inserção direta da amostra no espectrômetro de massas	66
7.1.d. Análises por ressonância magnética nuclear	67
7.1.e. Espectroscopia no infravermelho	72
7.1.f. Medidas de ponto de fusão em tubos capilares	72
7.1.g. Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta	74
7.2. Estudos iniciais sobre as propriedades polimórficas de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina por calorimetria diferencial de varredura e difração de Raios X	76
7.2.a. Análise termoanalítica por calorimetria diferencial de varredura	76
7.2.b. Difração de Raios X	85
7.3. Determinação do teor de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina nas cascas de <i>M. tenuiflora</i> por MSPD/GC-MS	94
7.3.a. Otimização do procedimento MSPD	94
7.3.b. Linearidade	98
7.3.c. Recuperação	99
7.3.d. Precisão	99
7.3.e. Exatidão do método	101
7.3.f. Limites de detecção e quantificação	101
7.3.g. Aplicação do método	101
7.4. Determinação do teor de <i>N,N</i> -dimetiltriptamina em bebidas rituais por SPME/GC-MS	105
7.4.a. Otimização da metodologia SPME	105
7.4.b. Linearidade	112
7.4.c. Exatidão do método	113
7.4.d. Precisão	113
7.4.e. Limites de detecção e quantificação	114
7.4.f. Robustez	114
7.4.g. Estimativa do teor de DMT em amostras de vinho da jurema	116
7.4.h. Aplicação do método	117
8. Conclusões	119
9. Perspectivas	122
10. Considerações finais	123
11. Referências bibliográficas	127
Anexos	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de Xochipilli, o deus asteca das plantas inebriantes	1
Figura 2. Estruturas moleculares da serotonina, DMT e LSD-25	3
Figura 3. Estruturas gerais para os derivados da triptamina e da β -carbolina	10
Figura 4. Morfologia da <i>M. tenuiflora</i>	18
Figura 5. Morfologia da <i>P. viridis</i>	21
Figura 6. Morfologia da <i>B. caapi</i>	22
Figura 7. Morfologia da <i>P. harmala</i>	24
Figura 8. Estrutura sugerida para a ‘yuremamina’	140
Figura 9. Variação da concentração de DMT nas folhas de <i>P. Viridis</i>	141
Figura 10. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD da análise de <i>P. harmala</i>	142
Figura 11. Fotografia das frações branca e amarela (<i>N,N</i> -dimetiltriptamina) isoladas das cascas de <i>M. tenuiflora</i>	61
Figura 12. Cromatograma da análise do DMT isolado da <i>M. tenuiflora</i>	62
Figura 13. Fotos do processo de isolamento do DMT obtido a partir da <i>M. tenuiflora</i>	63
Figura 14. Fotos do processo de purificação do DMT obtido a partir da <i>M. tenuiflora</i>	64
Figura 15. Microfotografias dos cristais presentes na fração branca isolada da <i>M. tenuiflora</i>	65
Figura 16. Espectros de massas	66
Figura 17. Mecanismo de fragmentação do íon m/z 130	67
Figura 18. Estrutura molecular do DMT	68
Figura 19. Deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^1H	69
Figura 20. Deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C	70
Figura 21. Espectro de infravermelho para o DMT	71
Figura 22. Curvas de absorção para a triptamina e para o DMT	74
Figura 23. Curvas analíticas obtidas por espectrofotometria de absorção molecular	75
Figura 24. Espectros por DSC de amostras da fração branca, amostras W1 e W2	83
Figura 25. Espectros por DSC de amostras da fração amarela, amostras Y1 e Y2	84
Figura 26. Espectros obtidos em análises por difração de Raios X das amostras W1 (a) e W2 (b)	90
Figura 27. Espectros obtidos em análises por difração de Raios X das amostras Y1 (a) e Y2 (b)	91
Figura 28. Espectros obtidos em análises por difração de Raios X de amostras Y1, submetidas a diferentes tratamentos físicos	92
Figura 29. Espectros obtidos em análises por DSC de amostras Y1, à taxa de $100\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, submetidas a diferentes tratamentos físicos	93
Figura 30. Gráfico de Pareto obtido na otimização da metodologia MSPD	97
Figura 31. Dispersão da matriz em fase sólida	97
Figura 32. Cromatogramas gerados pela análise de cascas do tronco de <i>A. colubrina</i> e <i>M. tenuiflora</i> pelo método MSPD/GC-MS	98
Figura 33. Curva analítica para a determinação de DMT em cascas de <i>M. tenuiflora</i>	99
Figura 34. Cromatogramas para a determinação de DMT nas cascas da <i>M. tenuiflora</i>	103
Figura 35. Gráfico de Pareto para avaliação da significância dos fatores para a técnica SPME	107
Figura 36. Superfície de resposta gerada para a avaliação da região crítica para o método	109
Figura 37. Gráfico de probabilidade normal para o modelo quadrático	109
Figura 38. Histograma dos resíduos para o modelo quadrático	110
Figura 39. Valores previstos <i>versus</i> valores observados	110
Figura 40. Área do pico cromatográfico do DMT em função do tempo de extração	112
Figura 41. Curva analítica para a determinação de DMT nas bebidas	113
Figura 42. Gráfico de Pareto para o teste de robustez	116
Figura 43. Cromatogramas obtidos na análise de amostras reais de ayahuasca e vinho da jurema	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos para a determinação de β -carbolinas em <i>B. caapi</i> e <i>P. harmala</i>	43
Tabela 2. Métodos para a determinação de triptaminas em <i>M. tenuiflora</i> e <i>P. aquatica</i>	44
Tabela 3. Métodos para a determinação de triptaminas e β -carbolinas em amostras de ayahuasca	45
Tabela 4. Variação sazonal das concentrações de triptofano, triptamina, serotonina e DMT, em cascas de <i>M. tenuiflora</i>	140
Tabela 5. Concentrações, em mg g ⁻¹ , de β -carbolinas em diferentes partes de <i>P. harmala</i>	142
Tabela 6. Mínimos e máximos dos níveis de DMT, THH, harmalina e harmina	143
Tabela 7. Dados de RMN de ¹³ C para as frações amarela e branca	68
Tabela 8. Pontos de fusão reportados na literatura para o DMT	73
Tabela 9. Dados de DSC obtidos para a amostra W1 (n =3)	81
Tabela 10. Dados de DSC obtidos para a amostra W2 (n =3)	81
Tabela 11. Dados de DSC obtidos para a amostra Y1 (n =1)	82
Tabela 12. Dados de DSC obtidos para a amostra Y2 (n =1)	82
Tabela 13. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra W1	87
Tabela 14. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra W2	87
Tabela 15. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra Y1	88
Tabela 16. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra Y2	89
Tabela 17. Fatores e níveis para o planejamento fatorial fracionário	94
Tabela 18. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2 ⁶⁻³	95
Tabela 19. Recuperações (R) e precisões para o método MSPD/GC-MS	100
Tabela 20. Níveis de concentração de DMT nas cascas de <i>M. tenuiflora</i>	104
Tabela 21. Fatores e domínios de estudo para o planejamento fatorial 2 ³	105
Tabela 22. Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³	106
Tabela 23. Fatores e domínios de estudo para o planejamento composto central	107
Tabela 24. Matriz do planejamento composto central	108
Tabela 25. Fatores e domínios de estudo para o planejamento fatorial completo 2 ³	115
Tabela 26. Matriz do planejamento fatorial completo para análise da robustez do método	115
Tabela 27. Concentrações de DMT em amostras de vinho da jurema preparadas sob diferentes condições	117
Tabela 28. Níveis de DMT em amostras reais de ayahuasca (A) e vinho da jurema (J), obtidas de grupos religiosos brasileiros	118

LISTA DE ABREVIATURAS

MTHC – 2-Metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina
5-MeO-DMT – 5-Metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina
5-OH-DMT – 5-Hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina (bufotenina)
CE – *Capillary electrophoresis* (eletroforese capilar)
CV – Coeficiente de variação
DAD – *Diode array detector* (detector por arranjo de diodos)
DMT – *N,N*-Dimetiltriptamina
DSC – *Differential scanning calorimetry* (calorimetria diferencial de varredura)
DVB – Divinilbenzeno
ESI – *Electrospray ionization* (ionização por *electrospray*)
GC – *Gas chromatography* (cromatografia gasosa)
HPLC – *High performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)
HS – *Headspace* ou fase gasosa em equilíbrio com amostra líquida
iMAO – Inibidores da enzima monoamina oxidase
IT – *Ion trap* (armadilha de íons)
IR – Espectroscopia na região do infravermelho
LD – Limite de detecção
LLE – *Liquid-liquid extraction* (extração líquido-líquido)
LQ – Limite de quantificação
LSD – Dietilamida do ácido lisérgico
MAO – Enzima monoamina oxidase
MS – *Mass spectrometry* (espectrometria de massas)
MSPD – *Matrix solid phase dispersion* (dispersão da matriz em fase sólida)
NPD – *Nitrogen-phosphorus detector* (detector nitrogênio-fósforo)
NMT – *N*-Metiltriptamina
PA – Poliacrilato
PDMS – Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
pH – Potencial hidrogeniônico
RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono
SIM – *Single ion monitoring* (Monitoramento de íon selecionado)
SNC – Sistema nervoso central
SPE – *Solid-phase extraction* (extração em fase sólida)
SPME – *Solid-phase microextraction* (microextração em fase sólida)
Tg – Temperatura de transição vítrea
THH – Tetrahidroharmina
UV – Radiação ultravioleta

RESUMO

N,N-dimetiltriptamina ou DMT é um alcaloide indólico com acentuada ação psicoativa, presente em bebidas vegetais de origem indígena, como o vinho da jurema e a ayahuasca. Esses preparos vegetais são consumidos em rituais religiosos sincréticos criados no Brasil no início do século 20, hoje dispersos e em contínua expansão por todo o mundo. As bebidas são também utilizadas como droga de abuso, no contexto recreativo, principalmente, graças à fácil disponibilidade das fontes vegetais utilizadas nos seus preparos, oferecida pelo comércio virtual. Neste trabalho, foi proposto um estudo de caracterização do DMT, isolado e purificado a partir das cascas da *M. tenuiflora* (jurema-preta), envolvendo metodologias instrumentais de análise como ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e ^{13}C), espectroscopia na região do infravermelho (IR) e espectrometria de massas (MS). O nível de pureza do padrão foi determinado por absorção no ultravioleta (UV), utilizando um padrão de triptamina. Na execução dos trabalhos iniciais, percebeu-se a possibilidade de existência de polimorfismo para o DMT, fato comprovado através de técnicas de análise calorimétrica (DSC) e difração de Raios X. A partir do padrão analítico desenvolvido, foram propostos dois métodos para a determinação de DMT em matrizes vegetais e nas bebidas utilizadas, como sacramento, em rituais religiosos de origem brasileira, ambos otimizados por meio de técnicas multivariadas. O método MSPD/GC-MS desenvolvido para a quantificação de DMT nas cascas de *M. tenuiflora* foi devidamente validado, apresentando excelentes figuras de mérito. Apresentou boa linearidade ($r = 0,9962$) e repetibilidade ($\text{CV} < 7,4\%$), com limite de detecção de $0,12 \text{ mg g}^{-1}$. Foram analisadas 24 amostras de cascas, nas quais se verificou a presença de DMT, em níveis de concentração entre $1,26$ e $9,35 \text{ mg g}^{-1}$. O segundo método, descreve os procedimentos para a determinação de DMT nas bebidas rituais, por HS-SPME/GC-MS. Foi realizado amplo estudo de validação. Boa precisão ($\text{CV} < 8,6\%$) e excelente exatidão, com recuperações entre 71 – 109% . Os limites de detecção e quantificação foram $0,78$ e $9,5 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, além de boa linearidade ($1,56$ – 300 mg L^{-1} , $r^2 = 0,9975$). A análise do efeito na resposta analítica, causado por pequenas variações nos parâmetros otimizados, revelou excelente robustez. O método validado foi aplicado na análise de amostras reais de ayahuasca (7) e vinho da jurema (5). Todas as amostras foram diluídas para análise. Verificou-se grande variabilidade entre as concentrações de DMT nas bebidas. Nas amostras de vinho da jurema, os níveis de DMT estiveram entre $0,1$ e $1,81 \text{ g L}^{-1}$. Nas amostras de ayahuasca, concentrações entre $0,17$ e $1,14 \text{ g L}^{-1}$. A análise de outras cinco amostras de vinho da jurema, preparadas em laboratório por diferentes procedimentos, e diluídas para os ensaios, revelou que o aquecimento não tem grande significância na quantidade de DMT extraído da planta, sendo mais importantes o baixo pH do líquido extrativo e a presença de etanol.

Palavras-chave: *N,N*-Dimetiltriptamina, ayahuasca, vinho da jurema, *Mimosa tenuiflora*, SPME, MSPD, GC-MS.

ABSTRACT

N,N-dimethyltryptamine (DMT) is a potent psychoactive found in beverages consumed in religion rituals and neo-shamanic practices over the world. Two of these religions, named “Santo Daime” and “União do Vegetal (UDV)”, are represented in countries including Australia, the USA and several European nations. In some of them, there have been legal disputes concerning the legalization of ayahuasca consumption during religious rituals, a beverage rich in DMT. It is a substance banned in most countries, which makes its acquisition difficult. In Brazil, is a controlled drug, enforced by the Brazilian National Health Surveillance Agency (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*). Nevertheless, in this country, even children and pregnant women are legally authorized to consume ayahuasca in a religious context. The present study describes a simple and fast method to obtain *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) from inner barks of *Mimosa tenuiflora* for the purpose of using it as a chromatographic analytical standard. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), single and tandem stage mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR) and melting point measurements were performed for the structural characterization of *N,N*-dimethyltryptamine. The results obtained were in agreement with previous literature reports. The purity of the compound (>95%) was determined using ultraviolet (UV) absorption spectrometry with a tryptamine analytical standard. Observations suggest that DMT may exist in two or more polymorphic forms. A combination of experimental techniques, in this case X-ray diffraction and differential scanning calorimetry (DSC), was done and proved that, in fact, DMT presents at least two polymorphic forms. A new simple and low-cost method based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) has been optimized for the determination of *N,N*-dimethyltryptamine in *M. tenuiflora* inner bark. The experimental variables that affect the MSPD method, such as the amounts of solid-phase and herbal sample, solvent nature, eluate volume and NaOH concentration were optimized using an experimental design. The method showed good linearity ($r = 0.9962$) and repeatability ($\text{RSD} < 7.4\%$) for DMT compound, with detection limit of 0.12 mg g^{-1} . The proposed method was used to analyze 24 samples obtained locally. The results showed that concentrations of the target compound in *M. tenuiflora* barks, ranged from 1.26 to 9.35 mg g^{-1} for these samples. Also, a novel analytical approach combining solid-phase microextraction in headspace mode (HS-SPME) / gas chromatography ion trap mass spectrometry (GC-IT-MS) was developed for the detection and quantification *N,N*-dimethyltryptamine in ayahuasca and vinho da jurema real samples. The method was performed with a polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fiber in headspace mode (70 min at $60 \text{ }^\circ\text{C}$) which resulted in good precision ($\text{RSD} < 8.6\%$) and accuracy values (71–109%). Detection and quantification limits obtained for DMT were 0.78 and 9.5 mg L^{-1} , respectively and good linearity ($1.56\text{--}300 \text{ mg L}^{-1}$, $r^2 = 0.9975$) was also observed. In addition, the proposed method showed good robustness and allowed for the minimization of sample manipulation. Five jurema beverage samples were prepared in the laboratory in order to study the impact of temperature, pH and ethanol on the ability to extract DMT into solution. The developed method was then applied to the analysis of twelve real ayahuasca and vinho da jurema samples, obtained from Brazilian religious groups, which revealed DMT concentration levels between 0.10 and 1.81 g L^{-1} . All liquid samples were diluted by a factor of 10 or 25.

Keywords: *N,N*-Dimethyltryptamine, ayahuasca, vinho da jurema, *Mimosa tenuiflora*, SPME, MSPD, GC-MS.

1. Introdução

Há muito se tem conhecimento sobre os estados alterados de consciência provocados pelo consumo de plantas psicoativas e suas combinações. O uso desses vegetais nas sociedades pré-colombianas, na maior parte das vezes, por meio de bebidas, fumos e rapés, esteve frequentemente associado a rituais místico-religiosos, assim como na preparação para a guerra (Figura 1). A colonização das Américas colocou o explorador europeu em contato com vários psicoativos vegetais, como o tabaco (*Nicotiana sp.*), a coca (*Erythroxylum coca*), o peyote (*Lophophora williamsi*), o maracujá ou fruto da paixão (*Passiflora sp.*), o guaraná (*Paulinia cupana*) e o yopo (*Anadenanthera peregrina*) [Schultes *et al.*, 2001; Montenegro, 2006; Ogalde *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009].



Figura 1. Representação de Xochipilli, o deus asteca das plantas inebriantes (Ilustração do *Florentine Codex*, século 16).

Quatro séculos após a disseminação global do tabaco, o consumo da bebida vegetal amazônica ayahuasca, também de origem indígena, atualmente, ganha adeptos por todo o mundo devido à expansão de igrejas sincréticas, criadas no Brasil a partir de meados do século 20 [Riba *et al.*, 2001]. Duas dessas religiões, o Santo Daime e a União do Vegetal (UDV), possuem representações desde a Austrália aos EUA, passando por várias nações da Europa. Em alguns desses países, disputas judiciais foram geradas,

visando à legalização do consumo da ayahuasca [Rios & Rumrill, 2008; Bullis, 2008; Tupper, 2008; Laquelle & Martins, 2008; Labate & Feeney, 2012].

Em paralelo, começa a tornar-se comum o “turismo da ayahuasca” nos países equatoriais Sul Americanos, cortados pela Amazônia [Rios & Rumrill, 2008; Holman, 2011]. O uso indiscriminado da bebida também tem se intensificado, em grande parte, devido à facilidade de compra de matrizes vegetais psicoativas, oferecida pelo comércio viabilizado pela Internet [Schifano *et al.*, 2006; Dalgarno, 2008].

Ainda há o consumo de análogos da ayahuasca (*anahuasca*), normalmente, bebidas que contêm os mesmos princípios ativos presentes na bebida amazônica, porém produzidas com diferentes vegetais. Uma variante denominada *pharmahuasca*, combina a ingestão de cápsulas contendo quantidades conhecidas das mesmas substâncias psicoativas sólidas, em elevado nível de pureza. O análogo mais importante da ayahuasca é o vinho da jurema, bebida originalmente produzida e consumida pelos indígenas nordestinos, e do mesmo modo, em manifestações religiosas afro-brasileiras e, em outras, com forte influência cultural indígena, como o Catimbó [Grünewald, 2005; Ott, 2009; Leite, 2009]. Por outro lado, o seu uso contemporâneo não tradicional em rituais neoxamanistas, amplia-se rapidamente em todo o mundo. O vinho da jurema, ou *ajucá*, vem ganhando popularidade inclusive entre adeptos das religiões ayahuasqueiras, com a criação de novas ramificações religiosas, como o Umbandaime, em cujos rituais consome-se ayahuasca, ou o vinho da jurema.

Ambos os preparos vegetais contêm o potente psicoativo *N,N*-dimetiltriptamina (DMT), alcaloide indólico simples da classe química das triptaminas [Ott, 2009; Schripsema *et al.*, 2007]. Com estrutura muito próxima à serotonina (Figura 2) e a outros neurotransmissores, vários estudos indicam a presença desse composto, em níveis traço, no organismo humano [Barker *et al.*, 2012]. Em 1972, as enzimas responsáveis pela conversão de triptamina em DMT foram detectadas no cérebro de homens sadios [Saavedra & Axelrod, 1972].

O DMT é considerado um agonista da serotonina, ou seja, uma substância que apresenta afinidade pelos receptores serotoninérgicos e tem a capacidade de estimular a atividade fisiológica nos receptores celulares, simulando o efeito desse neurotransmissor [Smith *et al.*, 1998]. Em níveis endógenos, segundo Jacob & Presti (2005), atuaria como um ansiolítico natural. Na verdade, não há consenso no meio científico sobre a atuação do DMT endógeno no organismo humano, bem como não se sabe ao certo onde seja produzido. Strassman (2001) propôs que o DMT seja sintetizado pela glândula pineal, produzido em maiores quantidades, em momentos específicos da existência humana.

Por outro lado, em maiores níveis de concentração, o DMT é capaz de provocar distorções de percepção da realidade, com padrões característicos ao consumo de outros alucinógenos como o LSD-25 ou dietilamida do ácido lisérgico, triptamina sintética de estrutura mais complexa, desenvolvida pelo químico suíço Albert Hofmann, em 1938 (Figura 2). Os efeitos psicoativos do LSD foram descobertos ao acaso, quando Hofmann foi intoxicado por absorção cutânea, no ano de 1943, enquanto trabalhava na síntese de LSD-25 para novos testes farmacológicos [Hofmann, 1980].

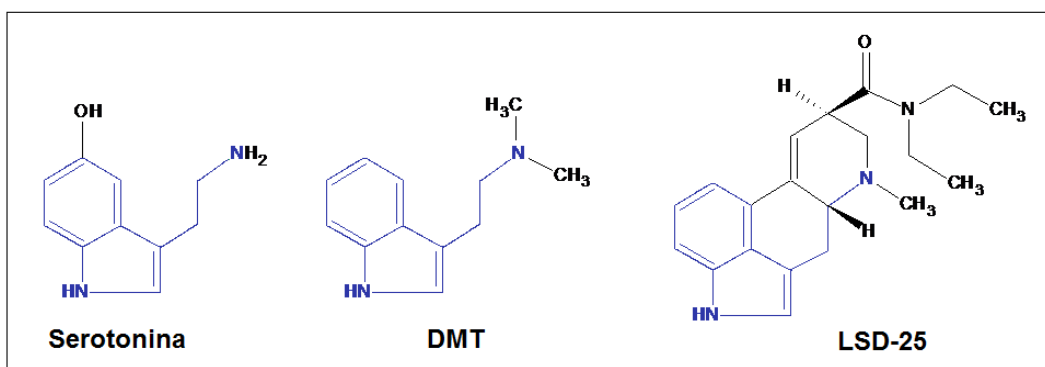


Figura 2. Estruturas moleculares da serotonina, DMT e LSD-25.

Até o presente, os métodos analíticos desenvolvidos para quantificar o DMT nas bebidas e em matrizes vegetais, na sua maioria envolvendo cromatografia gasosa, empregam metodologias de preparo de amostras que demandam a maior parte do tempo total de análise, empregam grandes volumes de solventes orgânicos caros e nocivos, com interferência humana excessiva e que costumam apresentar perdas consideráveis do analito, como a clássica extração líquido-líquido (LLE). Além disso, verifica-se ausência de testes de validação para alguns dos métodos propostos, o que acarreta dúvidas sobre a qualidade dos dados gerados.

Há duas importantes técnicas alternativas de preparo de amostras. A primeira, voltada notadamente para matrizes líquidas aquosas, como a ayahuasca e o vinho da jurema, é a microextração em fase sólida (SPME), metodologia que não utiliza solventes orgânicos, envolve a extração e concentração do analito na fase extratora em uma única etapa, além de demandar pequena quantidade de amostra por análise. Para amostras sólidas, como matrizes vegetais, destaca-se a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) por envolver pequenas quantidades de solventes, além da economia de tempo e material. As duas técnicas apresentam excelentes figuras de mérito, além de serem altamente seletivas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver métodos analíticos em conformidade com os preceitos da Química Analítica Verde para a determinação de *N,N*-dimetiltriptamina em cascas da *M. tenuiflora*, na ayahuasca e no vinho da jurema.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver método para extração e purificação de *N,N*-dimetiltriptamina das cascas internas de caule e raiz da *M. tenuiflora*, visando ao seu uso como padrão analítico;
- Estabelecer as condições cromatográficas necessárias à separação dos compostos presentes nas matrizes vegetais e bebidas;
- Obter as condições experimentais ideais para o preparo de amostras de cascas de *M. tenuiflora*, por MSPD, visando à determinação de DMT em sistema GC-MS;
- Obter as condições experimentais ideais para o preparo de amostras reais de ayahuasca e vinho da jurema, por SPME, visando à determinação de DMT em sistema GC-IT-MS;
- Validar os métodos otimizados;

- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras de cascas de *M. tenuiflora* coletadas em diversos pontos do Estado de Sergipe, com variações com relação ao regime pluviométrico;
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras reais de ayahuasca e vinho da jurema, provenientes de centros religiosos brasileiros;
- Verificar a influência de alguns fatores sobre a concentração de DMT em amostras de vinho da jurema preparada no laboratório, com cascas de *M. tenuiflora*;
- Executar estudo cristalográfico do composto *N,N*-dimetilriptamina extraído das cascas da *M. tenuiflora*, por difração de Raios X sobre pó e por calorimetria diferencial de varredura (DSC).

3. Justificativas

A legislação brasileira, amparada no direito constitucional à liberdade de culto, permite o consumo da ayahuasca, no contexto religioso, mesmo por crianças e mulheres em gestação [CONAD, 2004], uma vez que exista o consentimento dos pais (Anexo A). Em sua Resolução 01/2010, publicada no DOU em 26 de janeiro de 2010, o CONAD estabelece as normas para o consumo da ayahuasca. Entre algumas recomendações, a proibição do comércio envolvendo a bebida.

O mesmo Estado que defende a liberdade de culto e permite o consumo ritual da ayahuasca, no mesmo texto de Lei, salienta a urgência por estudos científicos abrangendo as áreas de farmacologia, bioquímica, clínica, psicologia, antropologia e sociologia [CONAD, 2010]. No entanto, em sentido oposto, dificulta a aquisição de padrão analítico de *N,N*-dimetiltryptamina, através da execução de uma política equivocada de controle ao uso de psicoativos, constituindo assim um grave entrave à execução de pesquisas envolvendo esse composto.

Os níveis de concentração de DMT e β -carbolicinas, nas bebidas, podem ter grande variação entre preparos de uma mesma igreja, como já observado em trabalhos anteriores [Callaway, 2005]. Além disso, não se deve desconsiderar o grande potencial existente para aplicações terapêuticas de alguns dos compostos presentes nessas matrizes [Strassman, 1995; Metzner, 1998; McKenna, 2004; Schripsema *et al.*, 2007; Gable, 2007; Gomes *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010, Bogenschutz & Pommy, 2012].

Ocasionalmente, uma forma extremamente concentrada de ayahuasca também é consumida em alguns centros religiosos, denominada "mel de ayahuasca". Estudos

detalhados sobre a identidade e níveis de concentração dos psicoativos, encontrados nessas preparações, são requeridos, especialmente, nos casos onde há o uso concomitante com outros aditivos, lícitos e ilícitos, como *Cannabis* spp. [MacRae, 1998; 2006], sementes de *Peganum harmala*, álcool e tabaco, sem nenhum controle ou critérios de segurança. Alguns casos de intoxicações foram reportados na literatura especializada [Warren, 2004; Brush, 2004; Sklerov *et al.*, 2005; Callaway *et al.*, 2006].

A maior parte dos trabalhos já publicados, visando à determinação de DMT em vegetais e na ayahuasca, não trazem estudos completos de validação dos métodos ou empregam técnicas de preparo de amostras que envolvem várias etapas, com manipulação excessiva, sendo também agressivas ao meio ambiente. Estudos de caracterização química, além do desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de triptaminas e β -carbolinas em matrizes vegetais e nas bebidas rituais, são fundamentais no momento em que se verifica o aumento do consumo mundial, seja por motivações religiosas ou com fins recreativos.

Frente à demanda por métodos com pouca interferência humana e uso reduzido de solventes orgânicos, esse estudo visa ao desenvolvimento e à validação de procedimentos analíticos para a determinação de *N,N*-dimetiltriptamina em bebidas rituais e na *M. tenuiflora*, em consonância com os princípios da Química Analítica Verde. Também propõe um método para a extração desse composto a partir de matéria vegetal, com o objetivo de utilizá-lo como padrão analítico.

4. Fundamentação teórica

4.1. *N,N*-dimetiltriptamina e derivados β -carbolínicos: sinergia e psicoatividade oral

Os derivados da triptamina e da β -carbolina (Figura 3) são alcaloides indólicos simples, presentes em uma grande diversidade de formas de vida, tendo como precursores o triptofano e o harmano, respectivamente. Entre as triptaminas, a psilocibina é encontrada em cogumelos *Psilocybe* spp., a melatonina e a serotonina são importantes neurotransmissores humanos. 5-Metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) e 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina (5-OH-DMT), ou bufotenina, ocorrem em plantas, em secreções do sapo *Bufo alvarius*, assim como no corpo humano [Shulgin & Shulgin, 1997; Rättsch, 2005, Barker, 2012].

As mais importantes β -carbolinas (harmina, harmalina e tetrahydroharmina) são metabólitos secundários em espécies de algumas famílias botânicas, principalmente em Malpighiaceae. Estão presentes em níveis traço no corpo humano, onde desempenham importantes funções no sistema nervoso central (SNC) [Bringmann *et al.*, 1991; Rättsch, 2005].

N,N-Dimetiltriptamina, ou DMT, é o mais importante representante da classe de triptaminas psicoativas. Sintetizado em 1931 por Manske, seu efeito alucinógeno foi comprovado em 1956 por Szára [Metzner, 2006]. É encontrado em uma grande variedade de plantas e, em níveis traço, no organismo humano [Stafford, 1992; Rättsch, 2005, Barker *et al.*, 2012]. Estudos anteriores indicaram a presença de DMT no sangue

humano, com concentrações entre 51 pg mL⁻¹ e 55 ng mL⁻¹, sendo excretado pela urina na ordem de 0,02 a 42,98 mg por dia. Análises de fluido cerebrospinal revelaram a presença de DMT na taxa de 0,02 a 100 ng mL⁻¹ [Barker *et al.*, 2012].

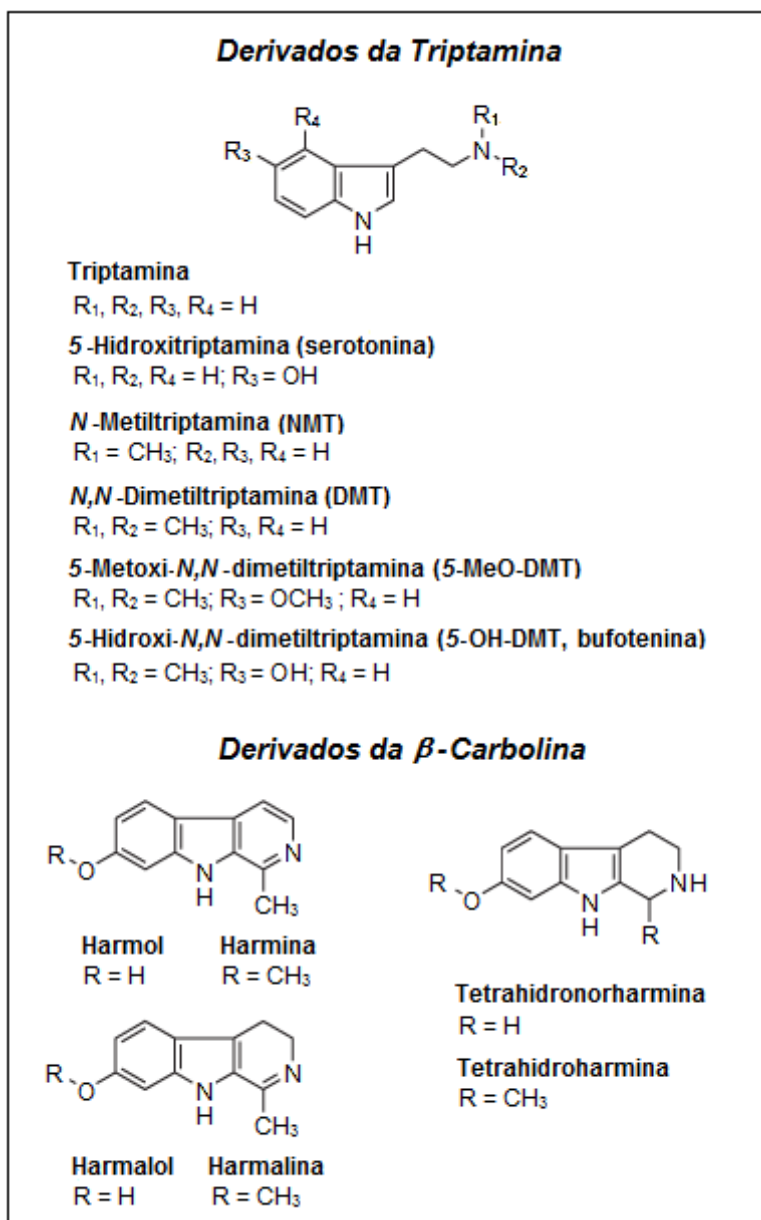


Figura 3. Estruturas gerais para os derivados da triptamina e da β-carbolina.

Nos primeiros estudos sobre a presença do DMT no corpo humano, diversos trabalhos correlacionaram os sintomas de esquizofrenia e psicose, aos níveis anormalmente altos de DMT no sangue e na urina de pacientes com estas patologias [Osmond & Smythies, 1952]. Foi sugerido que o DMT biossintetizado, em níveis fora da normalidade, poderia ser o responsável pela manifestação de alguns sintomas psicóticos [Jacob & Presti, 2005]. Ciprian-Ollivier & Cetkovish-Bakmas (1997), após a conclusão dos seus trabalhos na década de 1980, afirmaram que há uma significativa correlação entre o crescimento da concentração de DMT na urina e o agravamento dos sintomas psicóticos.

Em trabalhos recentes, essa hipótese foi descartada por Jacob & Presti (2005). Segundo eles, o DMT endógeno interage com receptores específicos no cérebro, produzindo um estado de relaxamento mental capaz de minimizar os sintomas da psicose. O aumento dos níveis de DMT no cérebro, durante uma forte situação de estresse, caracterizá-lo-ia como um ansiolítico endógeno [Jacob & Presti, 2005].

Strassman (2001) afirmou que o DMT é produzido em maior quantidade pela glândula pineal em momentos específicos da nossa existência, como nas experiências vividas por pacientes que se restabeleceram do estado de coma, após situações sob a iminência de morte. Nos primeiros cinco anos da década de 1990, o estudo envolveu a administração endovenosa de quase 400 doses de DMT, em 60 voluntários sadios e com histórico de uso de outras drogas alucinógenas, em sessões com acompanhamento clínico e psicológico.

O DMT e algumas triptaminas apresentam psicoatividade apenas quando administrados via endovenosa, intramuscular, subcutânea ou pelas vias aéreas [Shulgin & Carter, 1980; Shulgin & Shulgin, 1997]. Quando são consumidas via oral, a enzima monoamina oxidase (MAO) associa-se a essas moléculas impedindo que passem para a

circulação sanguínea e alcancem o SNC. Assim, a MAO controla os níveis de concentração de alguns neurotransmissores, sendo capaz de metabolizar triptaminas, como a melatonina, serotonina e o DMT [Yritia *et al.*, 2002].

Os derivados da β -carbolina encontrados no cipó jagube, com o qual se prepara a ayahuasca, apresentam a mesma ação no organismo humano do grupo de fármacos denominados inibidores da monoamina oxidase (iMAO) [Rätsch, 2005], empregados na psiquiatria para o tratamento de casos de depressão. Esses bloqueiam a ação da enzima monoamina oxidase, estimulando o crescimento dos níveis de serotonina endógena [Cordioli, 2005].

Ao serem ingeridas, as β -carbolinas impedem a desativação de amins biogênicas, ainda no aparelho digestivo. Desse modo, com a ingestão da ayahuasca, o efeito de inibição da MAO permite que o DMT vença a barreira gastrointestinal e passe para a circulação sanguínea, gerando assim perturbações diretas no SNC [Metzner, 2006].

Por outro lado, esses alcaloides também impedem que a MAO destrua o excesso de serotonina endógena. Assim, a concentração dessa substância no intestino pode alcançar níveis que provoquem náuseas, vômitos e diarreia [Rang *et al.*, 2003]. O grande desconforto gastrointestinal, frequente após as administrações de ayahuasca, pode ser causado pelo excesso de serotonina no sistema digestivo. Ainda, a concentração de DMT na ayahuasca pode alcançar alguns miligramas por mililitro de bebida. Portanto, com a ingestão de 100 mL de ayahuasca, dose média consumida em cultos religiosos, pode-se, instantaneamente, inserir cerca de 100 mg de DMT no organismo.

Os iMAO são contraindicados em diversos quadros patológicos, incluindo alguns dos mais comuns entre os brasileiros, como a hipertensão arterial. Também

exigem uma controlada dieta com alimentos livres de certas substâncias, como a tirosina e o triptofano [Cordioli, 2005]. Para os que fazem tratamento médico com inibidores irreversíveis da MAO, há sérias restrições aos alimentos ricos em tiramina – vagens, fígado, vinho tinto, cervejas, bananas, carnes vermelhas, queijos envelhecidos, mortadelas e salames devem ser evitados [Gardner & Bell, 1999].

No caso da ayahuasca, os iMAO presentes têm ação reversível, e assim sendo, as restrições alimentares são mais amenas. Nesse caso, o excesso de tiramina poderia apenas diminuir o efeito de inibição das β -carbolinas sobre a MAO, decorrente do acúmulo, no organismo, do neurotransmissor norepinefrina (noradrenalina). Outra consequência possível seria o aumento pontual da pressão arterial, visto que a noradrenalina é um hipertensor endógeno, com níveis também controlados pela enzima monoamina oxidase [Gardner & Bell, 1999].

4.2. Bebidas psicoativas para fins rituais: ayahuasca e vinho da jurema

Ayahuasca (*aya*: homem morto ou espírito; *huasca*: cipó), palavra do dialeto quíchua, ainda falado em algumas regiões da América do Sul, representa uma bebida de origem amazônica, preparada a partir da decocção de dois vegetais - as folhas da chacrona (*Psychotria viridis*) e seções de caule do cipó jagube (*Banisteriopsis caapi*). O alcaloide *N,N*-dimetiltriptamina encontra-se na chacrona. Três inibidores enzimáticos, harmina, harmalina e tetrahydroharmina são os responsáveis pela psicoatividade oral do DMT e encontram-se no cipó [Stafford, 1992].

A composição química da ayahuasca pode variar entre as tribos indígenas devido ao emprego de diferentes espécies vegetais, porém os mesmos princípios psicoativos, em maior ou menor quantidade, estão presentes em todos os preparos

[Schultes & Hofmann, 1980; Schultes *et al.*, 2001; Rätsch, 2005]. É conhecida por diversos nomes indígenas como *yajé*, *natema*, *caapi*, tendo sido pela primeira vez descrita por Villavicencio em 1858. Sete anos antes, o explorador inglês Richard Spruce teve contato com os índios Tukanoan, no Rio Uaupés (Amazônia brasileira), porém seu relato sobre o uso de uma liana de nome *caapi*, só publicados em 1908, identificava o vegetal como *Banisteria caapi* [Schultes & Hofmann, 1980].

A *ayahuasca* também é consumida durante cultos de religiões criadas na Amazônia brasileira, estado do Acre, no século 20, estando hoje presente em todos os continentes. Em alguns países, como a França, o consumo da bebida ainda é estritamente proibido. Em outros, há disputas judiciais envolvendo o Estado e representações religiosas, como a União do Vegetal (UDV) e o Santo Daime [Tupper, 2008; Labate & Feeney, 2012].

No Brasil, com a expansão do Santo Daime e da União do Vegetal para além das fronteiras da Amazônia, durante a década de 1970, muita polêmica foi criada em relação ao consumo da ayahuasca. Após várias interpretações do estado brasileiro sobre o tema, desde 2004 há uma resolução do CONAD (nº4/2004), que legitima o consumo da ayahuasca, no contexto religioso, mesmo por mulheres grávidas e menores de idade, uma vez que haja pleno consentimento e consenso dos pais [Labate & Feeney, 2012].

O governo estadual do Acre publicou a Resolução Conjunta nº 004 de 20 de dezembro de 2010, na qual dispõe sobre a autorização para extração, coleta e transporte do cipó *Banisteriopsis* spp. e das folhas do arbusto *Psychotria viridis* por organizações religiosas no estado do Acre, para o preparo da ayahuasca [CEMACT/CFE, 2010]. Note-se que, apesar do governo brasileiro apenas legitimar a produção e consumo da ayahuasca a partir do cipó *B. caapi* [CONAD, 2010], a Resolução estadual citada abrange toda e qualquer espécie do gênero *Banisteriopsis*.

Algumas espécies da subfamília botânica Mimosaceae são conhecidas popularmente no nordeste brasileiro como "jurema" (do tupi *yurema*, espinheiro succulento), sendo consideradas as maiores fontes vegetais de *N,N*-dimetiltriptamina. São árvores de porte médio, utilizadas por vários grupos indígenas nordestinos, como os Kariri-Xocó, na margem esquerda do rio São Francisco, na divisa entre os estados de Sergipe e Alagoas. Durante o *toré*, dança ritual que representa a maior força de resistência e expressão da cultura indígena nordestina, os índios bebem o *ayuca* ou ajucá. Muito provavelmente, devido à semelhança visual com o vinho ordinário, é conhecido no Brasil, desde os primeiros relatos, como vinho da jurema. A bebida pode ser feita com as cascas do tronco e da raiz da *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta), *Mimosa ophthalmocentra* (jurema-vermelha) ou da *Mimosa verrucosa* (jurema-branca ou jurema-mansa, de acordo com os índios Kariri-Xocó) [Mota, 2007; Batista *et al.*, 1999].

O vinho da jurema contém o mesmo DMT presente na ayahuasca e seu preparo varia bastante entre as tribos indígenas com relação às partes adicionadas de outros vegetais. A mistura vegetal é necessária para acentuar a ação psicoativa do DMT, já que a *Mimosa* spp. não possui inibidores da MAO. Ao menos, não há relato científico que comprove essa ocorrência. Por outro lado, também não há nenhum estudo sobre a psicoatividade oral do vinho da jurema. Há registros do uso de grandes quantidades de tabaco, seja entre os indígenas, ou em cultos religiosos afro-brasileiros [Mota, 2005]. Por outro lado, sabe-se que na fumaça do tabaco há compostos com propriedades iMAO [Herraiz & Chaparro, 2005; Amsterdam *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2007].

Entre os indígenas também é comum o consumo concomitante de *Passiflora* spp., enquanto que nas religiões afro-brasileiras, além do tabaco, há o uso frequente de destilados de cana-de-açúcar (cachaça) e muitos outros aditivos na preparação da bebida [Grünewald, 2005; Mota, 2007]. Também há diversos trabalhos publicados que

apontam a presença de iMAO em espécies de *Passiflora* [Rätsch, 2005]. Recentemente, para se atingir a psicoatividade oral do vinho da jurema têm sido utilizadas sementes de *Peganum harmala* que apresentam comprovada eficiência na inibição da monoamina oxidase [Kartal *et al.*, 2003; Herraiz *et al.*, 2010].

A tradição do culto à jurema foi, provavelmente, transmitida aos escravos africanos que, na fuga em direção aos quilombos, encontravam abrigo em tribos indígenas do nordeste brasileiro. Assim, há muito o vinho da jurema é utilizado em religiões afro-brasileiras, como a Umbanda, e em outras práticas religiosas sincréticas, como o Catimbó, na Paraíba. Ao contrário da *ayahuasca*, os aditivos utilizados no preparo do vinho da jurema são mantidos em segredo, tanto pelos remanescentes indígenas como pelos afrodescendentes.

No Brasil, há relatos oficiais de prisões e julgamentos de índios por consumirem a bebida [Grünwald, 2005]. O consumo do vinho da jurema, praticamente, extinguiu-se sob o efeito devastador da colonização cristã portuguesa, sobre os indígenas que habitavam a região nordeste do Brasil. No entanto, desde o final do século 20, experimenta um grande renascimento, tendo o seu principal uso como análogo da *ayahuasca* [Ott, 2009].

4.3. Espécies vegetais utilizadas no preparo do vinho da jurema

4.3.a. *Mimosa* spp.

No Brasil, várias espécies do gênero *Mimosa* (Leguminosae) são conhecidas por 'jurema'. Algumas como *M. tenuiflora*, *M. ophthalmocentra*, *M. verrucosa* e *M. scabrella* contêm quantidades consideráveis de triptaminas psicoativas, especialmente nas suas cascas [Schultes *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2008; da Mota, 2007; Rättsch, 2005; Moraes *et al.*, 1990; Batista, 1997]. No Brasil, a *M. tenuiflora* (Willd.) Poiret [*syn. M. hostilis* (Mart.) Benth] (Figura 4) é conhecida como jurema-preta, sendo usada como o principal ingrediente do vinho da jurema.

Nativa de regiões de baixo índice pluviométrico e sujeitas a secas periódicas, essa planta é encontrada em abundância no nordeste do Brasil, sul do México, no norte da Venezuela e da Colômbia, bem como em Honduras e El Salvador. Em seu *habitat* natural, atinge de 2,5 – 5 m de altura e, prontamente, coloniza terrenos degradados, desenvolvendo-se rapidamente e sendo capaz de gerar novos brotos após o corte [Queiroz, 2009].

No México, onde é conhecida como *tepescohuite* [Meckes-Lozoya *et al.*, 1990], não há relatos da sua utilização como um produto psicotrópico. Nesse país, suas cascas secas e moídas são muito utilizadas para a cura de feridas e no tratamento de queimaduras, uma vez que promove rápida cicatrização da pele [Rivera-Arce *et al.*, 2007]. O vinho da jurema, feito a partir da casca interna da *M. tenuiflora* e sementes de *Peganum harmala*, contém os mesmos princípios ativos encontrados na ayahuasca, DMT e iMAO [Ott, 2009]. O uso ilícito da *M. tenuiflora* é, atualmente, objeto de atenção da Polícia Federal [Leite, 2009].



Figura 4. Morfologia da *M. tenuiflora* (Ilustração de J.B. Clark). *M. hostilis* é sinonímia para *M. tenuiflora*.

4.4. Espécies vegetais utilizadas no preparo da ayahuasca

4.4.a. *Psychotria* spp.

Psychotria spp. são arbustos ou árvores de pequeno porte, pertencentes à família Rubiaceae, da qual também faz parte o café [Schultes *et al.*, 2001]. Algumas espécies do gênero *Psychotria* são utilizadas por índios amazônicos como aditivos na preparação da ayahuasca: *P. viridis*, *P. carthaginensis*, *P. Psychotriaefolia* e *P. poeppigiana*. Em seu *habitat*, *P. viridis* (Figura 5) é um arbusto que atinge uma altura máxima de 2 - 3 m [Schultes *et al.*, 2001], sendo popularmente conhecido como “chacrona”, “chacruna” ou “rainha”.

Nativa da Amazônia, a *P. viridis* tem sido cultivada para suprir a demanda por suas folhas, empregadas no preparo da ayahuasca. Há cultivares no Havaí, na Califórnia [Rätsch, 2005] e em várias regiões no Brasil, mesmo na Amazônia, onde a planta tornou-se rara em algumas localidades. Suas folhas são colhidas no início da manhã, ou no final da tarde, para o feitiço da ayahuasca. A primeira descrição da existência de DMT nas folhas da *P. viridis* foi feita em trabalho publicado em 1970, assim como o primeiro relato dessa presença em uma Rubiaceae [Schultes & Hofmann, 1980]. As folhas contêm de 0,1 a 0,6% de DMT com traços de *N*-metiltriptamina (MMT) e 2-metil-tetrahydro- β -carbolina (MTHC) [Rätsch, 2005].

4.4.b. *Banisteriopsis* spp.

Algumas espécies do gênero *Banisteriopsis*, incluindo *B. argentea*, *B. inebrians*, *B. caapi* e *B. muricata* são utilizados no preparo da ayahuasca e de outras bebidas psicoativas, uma vez que contêm iMAO necessário para garantir a psicoatividade oral do DMT [Agurrell *et al.*, 1968a; 1968b]. A espécie *B. caapi* (Figura 6) é um cipó

amazônico gigante da família Malpighiaceae que apresenta folhas de formato oval e pontiagudo na extremidade, sendo a espécie mais utilizada para esse fim [Schultes & Hofmann, 1980; Rättsch, 2005].

A planta inteira contém alcaloides do tipo derivados β -carbolínicos, sendo mais usado o caule do cipó para o preparo da bebida. As quantidades de alcaloides em todo o vegetal podem variar de 0,11 a 1,95%. A harmina, harmalina e tetrahydroharmina são os alcaloides majoritários. Os níveis de harmina, com forte ação inibitória sobre a enzima monoamina oxidase, correspondem de 40 a 96% da fração total de alcaloides na planta. Há análises de amostras de *B. caapi* em que a harmalina não foi detectada [Rättsch, 2005]. Do mesmo modo que a *P. viridis*, a *B. caapi* é também cultivada no Brasil por alguns grupos religiosos.

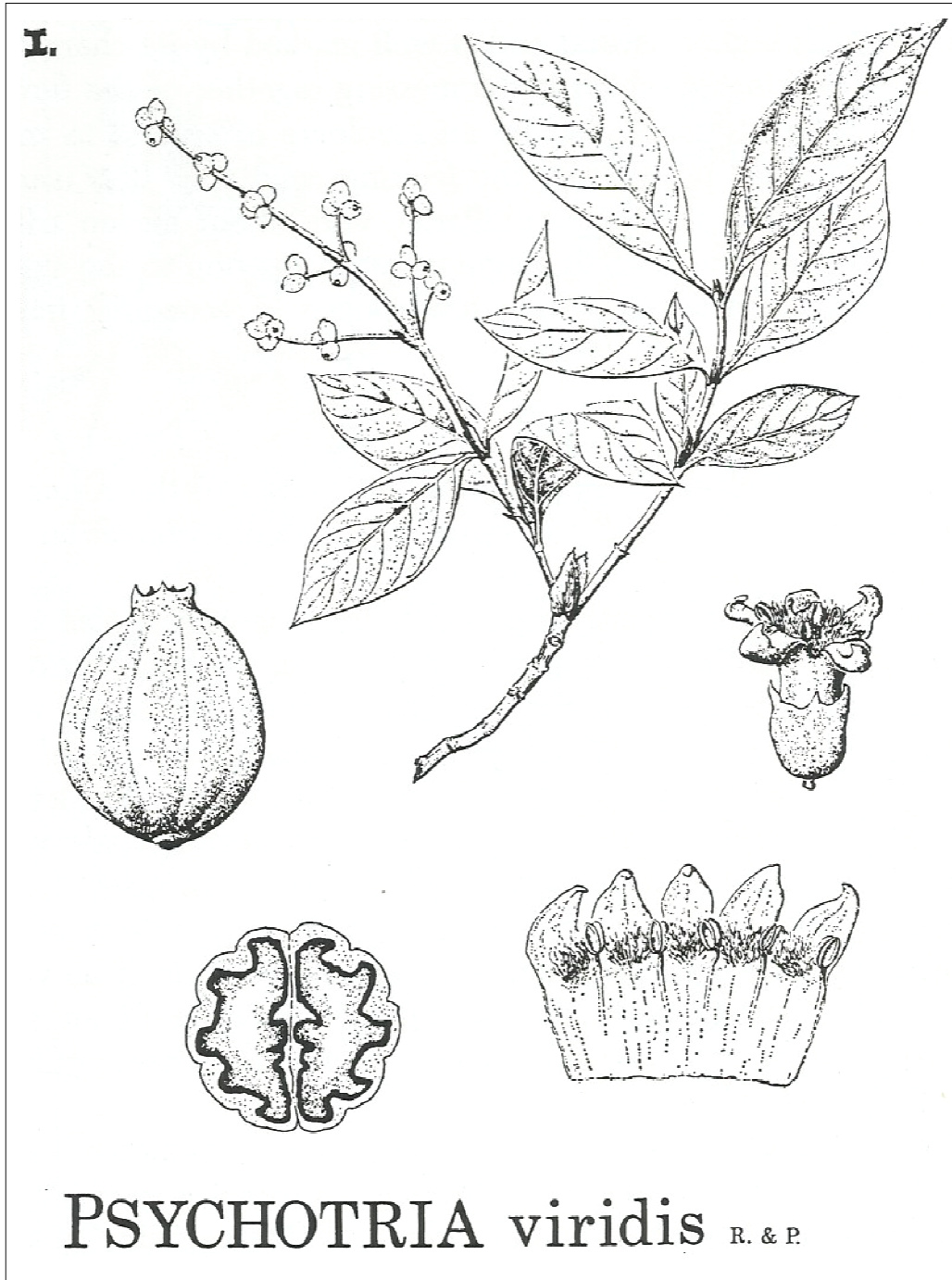


Figura 5. Morfologia da *P. viridis* (Ilustração de I. Brady).

BANISTERIOPSIS *Caapi*

(*Spruce ex Griseb.*) Morton

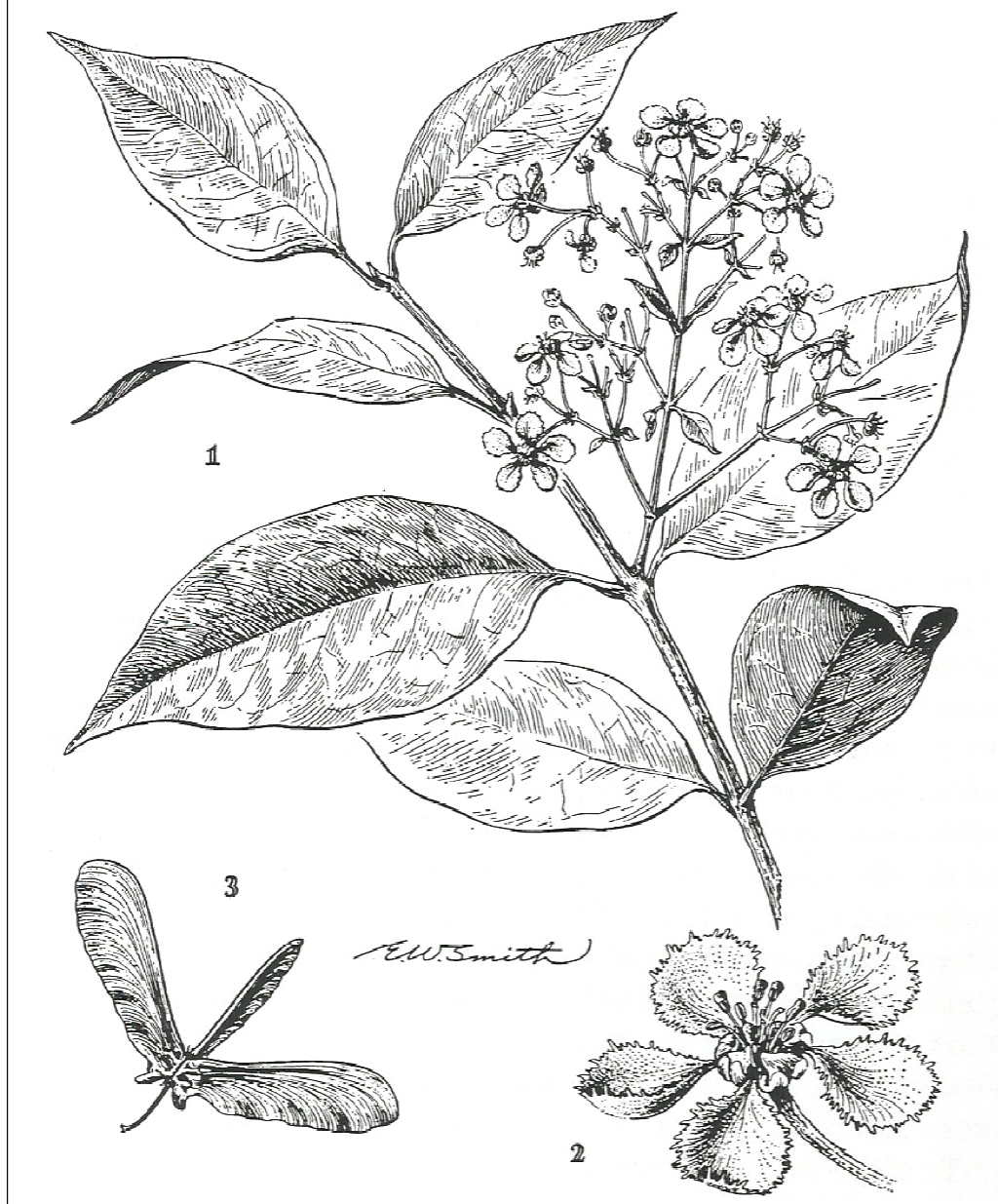


Figura 6. Morfologia da *B. caapi* (Ilustração de E.W. Smith).

4.5. Espécies vegetais também utilizadas como fontes de DMT e β -carbolinas

4.5.a. *Phalaris* spp.

A presença de triptaminas em *Phalaris* spp. foi inicialmente relatada em estudos fitoquímicos para fins agrícolas. Algumas espécies, como *P. arundinacea* (capim-amarelo), *P. canariensis* e *P. aquatica*, são encontradas em todo o mundo. A *P. aquatica* é uma gramínea originária da região mediterrânea, frequente em campos alagados e nas margens dos rios, sendo considerada uma planta tóxica para os ruminantes.

Há diversos registros na literatura de casos envolvendo intoxicações, algumas vezes fatais, de animais com *Phalaris* spp., em países como Austrália, Brasil, África do Sul, Argentina e Estados Unidos [Bourke & Carrigan, 1992; Anderton *et al.*, 1994; Souza & Irigoyen, 1999; Skerritt *et al.*, 2000]. Dentro desse gênero, a *P. aquatica* contém os maiores níveis de *N,N*-dimetiltriptamina e também é rica em outras triptaminas, como o 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) e NMT [Zhou *et al.*, 2006]. Tem sido crescentemente empregada no preparo de bebidas análogas à ayahuasca [Ott, 2009].

4.5.b. *Peganum harmala* (Linnaeus)

A arruda da síria ou *P. harmala* (Figura 7) é um arbusto nativo das regiões secas do Mar Mediterrâneo, Norte da África, Oriente Médio, Índia e Mongólia [Schultes & Hofmann, 1980, Herraiz *et al.*, 2010]. No norte da África suas sementes são utilizadas como incenso ritual ainda nos dias atuais. É uma planta usada pela medicina popular oriental, há milênios, sendo aplicada para fins ginecológicos, além de apresentar comprovada ação vermífida. Tem sido cada vez mais empregada na América do Norte e

na Europa, na produção de bebidas análogas à ayahuasca, preparados vegetais que também contêm DMT e β -carbolinas [Ott, 2009; Herraiz *et al.*, 2010]. 3 a 4 g das sementes são suficientes para causar a inibição da monoamina oxidase. As sementes contêm 2 a 6% de alcaloides, sendo os majoritários, harmina e harmalina [Rätsch, 2005].

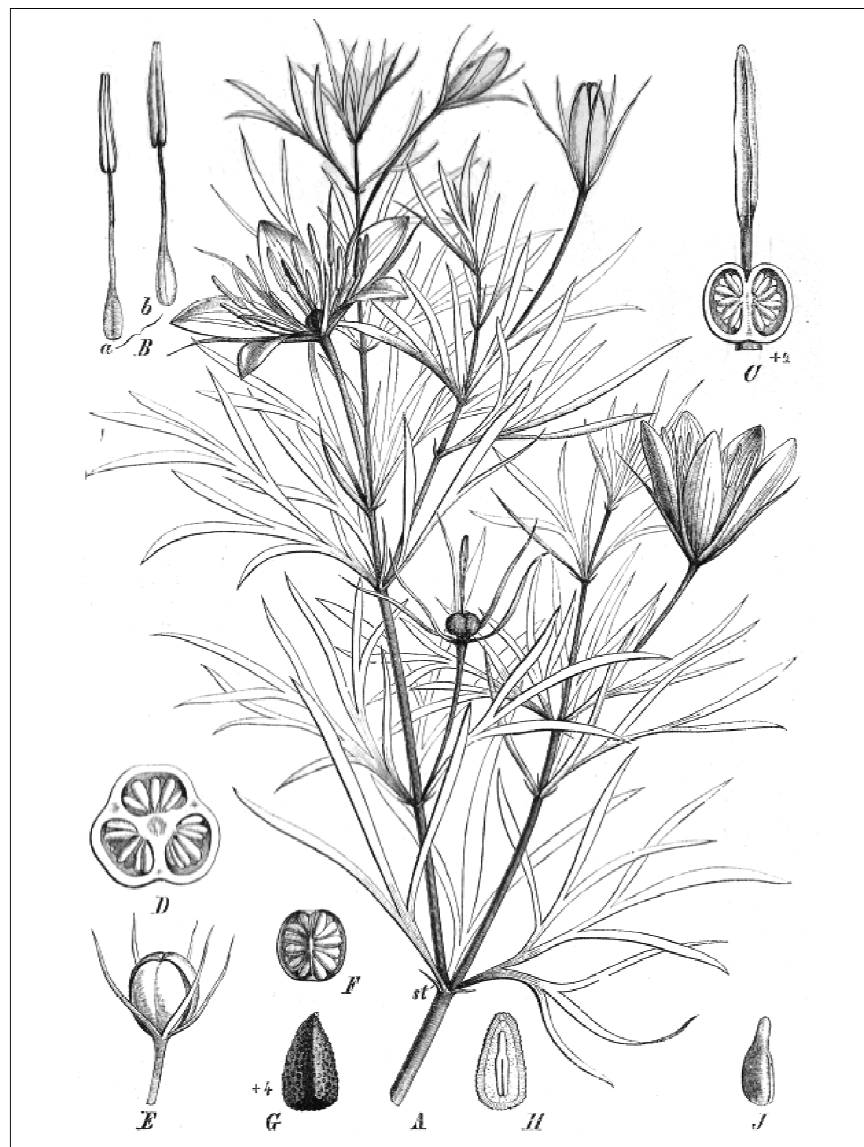


Figura 7. Morfologia da *P. harmala* (Ilustração do século 19).

4.6. Metodologias de preparo de amostras e a Química Analítica Verde

Com o crescimento do interesse da sociedade pelas questões ambientais, notadamente no início da década de 1990, aumentou também a demanda por análises ambientais voltadas à quantificação de espécies químicas nocivas ao meio ambiente, nas mais diversas matrizes. A comunidade científica deparou-se então com um paradoxo: em certas situações, os descartes produzidos na análise eram mais agressivos, ao meio ambiente ou à saúde do analista, do que os próprios analitos investigados [Armenta *et al.*, 2008].

Um grande esforço se iniciou em direção à solução dessa questão, com pesquisas voltadas aos processos em fluxo, ao tratamento dos dejetos e à busca, sempre que possível, por reagentes e solventes menos agressivos ao meio ambiente. Laboratórios iniciaram a coleta e armazenamento de descartes, evitando o lançamento desses no meio natural. Contudo, essa ação se mostrou de difícil gerência, frente à grande e crescente quantidade de material estocado [Garrigues *et al.*, 2010; Melchert *et al.*, 2012; Galuszka *et al.*, 2012].

Os estudos voltaram-se para a miniaturização dos sistemas analíticos, com o aperfeiçoamento dos métodos instrumentais, especialmente a partir dos anos 70, com excelentes metodologias de separação, como a cromatografia gasosa em colunas capilares e a cromatografia líquida de alta eficiência, além de metodologias de detecção, como a espectrometria de massas e técnicas espectrofotométricas [Tobiszewski *et al.*, 2009; Welch *et al.*, 2010]. No entanto, as técnicas de preparo de amostras não acompanharam, com a mesma velocidade, a evolução das técnicas de separação e detecção. Apesar das melhores figuras de mérito alcançadas pelos métodos analíticos, ainda se continuava a utilizar enormes quantidades de solventes orgânicos de alto grau de pureza, nocivos e caros, na etapa de preparação de amostras. Dentro de todo o

processo analítico, ainda permaneciam como responsáveis pela maior geração de poluentes e descartes [Tobiszewski & Namiesnik, 2012].

No sentido de diminuir o uso de solventes orgânicos, em concordância com o documento assinado por vários países no final da década de 80, *The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer* (www.unep.org), métodos clássicos de preparo de amostras, como a extração líquido-líquido e extração Soxhlet, foram progressivamente substituídos por outros menos dependentes do emprego de solventes [Pawliszyn, 2003].

As pesquisas dirigiram-se à miniaturização também dos processos de preparo de amostras, a utilização de materiais adsorventes e a alteração das propriedades físicas do próprio solvente com o propósito de facilitar a extração. Nos últimos tempos, vem sendo dada grande ênfase à automação dos processos extrativos, acoplados aos sistemas de separação e quantificação. Em outra vertente, os trabalhos concentram-se na pesquisa de dispositivos que permitem a coleta dos analitos no próprio meio natural [Pawliszyn, 2003; Farré *et al.*, 2010].

As técnicas modernas de preparação de amostras caracterizam-se por envolver poucas etapas, na situação ideal, executadas em modo automático, com pouca ou nenhuma interferência humana. Apresentam uso restrito de solventes e são, normalmente, concluídas em curto período de tempo, em oposição às metodologias tradicionais [Ramos, 2012]. Duas dessas técnicas apresentam destaque pelo grande número de aplicações e excelentes figuras de mérito: a microextração em fase sólida (SPME, *solid-phase microextraction*) e a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, *matrix solid phase dispersion*).

4.7. Dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)

A metodologia MSPD foi originalmente criada para o preparo de amostras biológicas sólidas, viscosas e semissólidas, sendo desenvolvida por Barker, no final dos anos 80, com o intuito de superar os obstáculos relacionados ao trabalho com amostras semissólidas, quando se utilizava a técnica de extração em fase sólida ou SPE (*solid-phase extraction*) [Barker *et al.*, 1989; Barker, 2000].

A execução da técnica consiste na maceração de uma pequena quantidade de amostra (0,25 - 0,5 g) junto com um material abrasivo denominado suporte. A mistura macerada, amostra e suporte, é utilizada como recheio de uma coluna e pode ser eluída, sequencialmente, com solventes apropriados, a depender da polaridade do analito de interesse e da necessidade de eliminação de interferentes [Barker, 2000].

As principais vantagens dessa metodologia referem-se a sua simples execução, flexibilidade, versatilidade, especificidade, baixo custo e rapidez de execução. Além disso, há também baixo consumo de amostra e a possibilidade de, em uma única etapa, realizar a extração do analito e o *clean-up* da amostra [Capriotti *et al.*, 2012]. Tem sido largamente empregada na análise de alimentos, de materiais vegetais e de tecidos animais para a determinação de drogas, poluentes, herbicidas e pesticidas, dentre outros analitos [Barker, 2007]. A MSPD, na sua versão mais frequente, utiliza um suporte sólido coberto com uma fase quimicamente ligada como, por exemplo, o C-8 ou C-18. O suporte sólido funciona como um abrasivo que facilita a fragmentação estrutural da amostra e, quando se utiliza uma fase lipofílica como C-18, age também como solvente, ajudando na ruptura das membranas celulares e liberação dos analitos [Kristenson *et al.*, 2006].

Há diversas aplicações que não utilizam suportes com fases quimicamente ligadas. Nesses casos, são empregados suportes à base de silicatos, como sílica gel,

Florisil, sílica derivatizada e areia. Em outras aplicações, pôde-se observar sucesso na utilização de fibras de carvão ativado, materiais poliméricos e alumina [Barker, 2007]. Nos últimos anos, a maior inovação da técnica tem sido o emprego de suportes com grande seletividade como polímeros molecularmente impressos (MIPs) e nanotubos de carbono [Capriotti *et al.*, 2012].

A escolha do solvente de eluição para uma aplicação específica esta relacionada à sua polaridade, sendo um dos fatores que definem a seletividade da metodologia MSPD. Sequências de eluição com diferentes solventes são utilizadas quando se deseja, por exemplo, a eliminação de um interferente. As colunas MSPD permitem o isolamento de analitos com diferentes polaridades ou de uma classe química de compostos, com a eluição de um único solvente, ou de solventes com diferentes polaridades [Barker, 2007].

4.8. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida é uma técnica baseada em equilíbrio termodinâmico, desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores no fim dos anos 80. Envolve a captura dos analitos em uma fibra capilar de sílica fundida quimicamente modificada e pode ser empregada em matrizes líquidas, em meios gasosos ou sólidos. A fase extrativa é composta por filme líquido polimérico de um material de elevada massa molar ou de um sólido poroso com grande superfície de adsorção. Uma vez introduzida no septo do recipiente contendo a amostra, durante certo período de tempo, a fibra de sílica é exposta ao meio onde ocorrerá a extração dos analitos [Belardi & Pawliszyn, 1989; Arthur & Pawliszyn, 1990]. Depois de decorrido o tempo necessário ao estabelecimento do equilíbrio entre as fases, a fibra é recolhida para o interior de uma agulha e introduzida em um sistema cromatográfico, ficando exposta por certo período

de tempo para a dessorção dos analitos. Na cromatografia a gás, com a fibra exposta à alta temperatura do sistema de injeção, os analitos são termicamente dessorvidos e introduzidos na coluna pelo fluxo do gás de arraste. Nas aplicações para cromatografia líquida, a fibra é exposta ao fluxo da fase móvel, ocorrendo o arraste dos analitos de interesse pelo solvente [Pawliszyn, 2003].

A instrumentação da técnica SPME é, originalmente, uma adaptação das microseringas utilizadas para injeção das amostras nos cromatógrafos a gás [Arthur & Pawliszyn, 1990]. Na sua configuração mais comumente utilizada, o dispositivo comercial consiste de uma fibra de sílica fundida com dimensões capilares, da ordem de poucos micrometros de diâmetro. Esta se encontra inserida em uma agulha que tem a finalidade de protegê-la quando não em uso, bem como de perfurar o septo, momentos antes da exposição da fibra à amostra, ou na etapa de dessorção dos analitos no cromatógrafo. A fibra é, na maior parte das aplicações, recoberta com uma microcamada de um filme líquido polimérico altamente seletivo, como polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) ou divinilbenzeno (DVB).

Essa metodologia traz melhoras significativas no tempo envolvido na preparação das amostras, com apenas uma etapa envolvida em todo o processo. A SPME é uma técnica simples, rápida, de baixo custo por análise e com dispositivo automático comercial disponível. Há um grande número de aplicações dessa metodologia em análise química, bioanálise, alimentos e ciências do meio ambiente, além de um número crescente de publicações na química forense, na área farmacêutica e em estudos médicos [Bojko *et al.*, 2012].

Basicamente, há dois modos pelos quais a extração pode ser conduzida em SPME: o modo direto, no qual a fibra é exposta diretamente na matriz líquida ou gasosa, e o modo *headspace*, no qual a fibra entra em contato com o vapor em

equilíbrio com a amostra, líquida ou sólida. Em todos os modos de extração, salvo algumas situações particulares, é necessário certo grau de agitação da matriz, com o intuito de facilitar a passagem dos analitos da amostra para a fibra coletora [Kataoka *et al.*, 2000]. Isso minimiza problemas de saturação na interface fibra / amostra e diminui o tempo necessário ao alcance do equilíbrio, especificamente, para o modo direto. No modo *headspace*, a agitação apenas facilita a saída de compostos menos voláteis.

Emprega-se o modo *headspace* quando a amostra poderia causar danos irreversíveis ao recobrimento da fibra, como um meio extremamente ácido ou alcalino, ou ainda, a presença de substâncias de elevada massa molar, como proteínas. Porém, esse modo de execução está restrito apenas a compostos voláteis e alguns semivoláteis. Quando a matriz se apresenta bastante “suja” e contém analitos com pouca volatilidade, o que inviabilizaria a SPME pelos modos direto e *headspace*, se utiliza uma fibra protegida por uma membrana de proteção, que tem por principal função evitar danos ao dispositivo.

O material empregado na confecção dessa membrana pode ajudar na seletividade da extração. A cinética do processo é menor do que na extração direta, porém pode ser aumentada utilizando-se membranas de espessura reduzida e maior temperatura de extração [Pawliszyn, 1997]. Adaptações no dispositivo básico foram realizadas em aplicações específicas, como nas análises clínicas, coleta de amostras ambientais em campo, automatização para sistemas de cromatografia líquida e gasosa, além de amostragem *in vivo* [Bojko *et al.*, 2012]. Para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi desenvolvida uma técnica denominada *in-tube* SPME, na qual um tubo capilar de sílica fundida é recoberto internamente com o material polimérico adsorvente [Lord & Pawliszyn, 2000].

5. Revisão bibliográfica

5.1. Os primeiros estudos

As primeiras descrições de métodos para a determinação de triptaminas e β -carbolinas, presentes em matrizes vegetais e na ayahuasca, datam do final da primeira metade do século 20. A maioria deles foi baseada em extração líquido-líquido (LLE) e a separação, geralmente, foi realizada por técnicas envolvendo colunas cromatográficas e recristalização [Perrot & Hamet, 1927; Lewin, 1928; Elger, 1928; Wolfes & Rumpf, 1928; Lima, 1946; Hochstein & Paradies, 1957; Pachter *et al.*, 1959].

Desde o final da década de 1960, o uso de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tornou-se uma abordagem analítica mais proeminente nesse tipo de determinação [Aguirell *et al.*, 1968a, 1968b; der Marderosian *et al.*, 1970; Rivier & Lindgren, 1972].

O cientista brasileiro Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima, no início da década de 1940, estudou a composição química do vinho da Jurema, bem como sua preparação. Foi o primeiro a isolar o DMT da casca de jurema preta. Suas observações, publicadas em 1946, também fornecem um relato detalhado da cerimônia de preparação do vinho da jurema por índios da tribo Pancaru, no estado de Pernambuco [Lima, 1946].

Nesse trabalho, descreveu o isolamento da fração alcaloide da casca da raiz de *M. hostilis*, que recebeu a denominação "Nigerina", com teor de 0,31% da matéria vegetal seca. Anos mais tarde, confirmou-se que a "Nigerina" tratava-se do próprio

DMT, após a análise de cascas da mesma espécie, por Pachter e colaboradores. Essas amostras foram enviadas à Inglaterra por Lima, nas quais foi verificada a presença de 0,57% de DMT na planta seca [Pachter *et al.*, 1959]. Meckes-Lozoya *et al.* (1990) identificaram serotonina e DMT em amostras de casca da raiz *M. tenuiflora* usando GC-MS. Batista *et al.* isolaram a fração alcaloide da *M. ophthalmocentra* (jurema-vermelha) e relataram a presença de DMT (1,6%) e *N*-metiltriptamina (NMT) (0,0012%) [Batista *et al.*, 1999].

Em se tratando da ayahuasca e das plantas utilizadas na sua preparação, os primeiros métodos analíticos publicados remontam ao final dos anos 60. A primeira descrição de análise da chacrona foi fornecida por Pinkley, um ex-aluno de Schultes, em 1969 [Pinkley, 1969]. Rivier & Lindgren realizaram a primeira grande investigação analítica da ayahuasca, publicada em 1972. Os autores divulgaram os resultados dos seus trabalhos, realizados na região do alto Rio Purus, perto da fronteira entre o Peru e Brasil, nos quais relatam o uso da ayahuasca por índios Sharanahua e Culina, constando a descrição do procedimento de análise química dos vegetais utilizados na sua preparação. Utilizaram extração líquido-líquido (LLE) e separação em cromatografia gasosa, seguida por análise em espectrometria de massas (GC-MS).

As amostras de folhas de chacrona (*P. viridis*) mostraram um teor DMT igual a 0,34%, em matéria seca. A mesma substância foi também encontrada, em níveis mais elevados de concentração, 0,66%, nas folhas de *P. carthaginensis*. Nessas matrizes, também foram detectadas as presenças de NMT e 2-metil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina (MTHC). Amostras de matéria seca de caules, galhos, folhas e raízes de *B. caapi* variaram de 0,05 a 1,90% de alcaloides, com a maioria sendo representada por harmina, seguida por tetrahydroharmina, harmalina e harmol [Rivier & Lindgren, 1972].

Em 1984, amostras de ayahuasca providas do Peru foram analisadas, usando cromatografia bidimensional de camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e GC-MS [McKenna *et al.*, 1984]. A maioria dos alcaloides, obtidos a partir de cinco amostras de ayahuasca, foram quantificados por HPLC com níveis médios de DMT (0,6 mg mL⁻¹), harmina (4,67 mg mL⁻¹), tetrahydroharmina (1,60 mg mL⁻¹) e a harmalina (0,41 mg mL⁻¹).

As mesmas amostras foram liofilizadas e submetidas à análise por HPLC. Os valores relatados foram de 6,4 mg g⁻¹, para o DMT; 23,8 mg g⁻¹, para harmina; 11,1 mg g⁻¹, para tetrahydroharmina e 5,1 mg g⁻¹, para a harmalina. Seis amostras de *B. caapi* também foram avaliadas quantitativamente por HPLC revelando as concentrações de harmina (0,57 a 6,35 mg g⁻¹), tetrahydroharmina (0,25 a 3,8 mg g⁻¹), harmalina (0,5 a 3,8 mg g⁻¹), harmol (0,01 a 1,2 mg g⁻¹) e harmalol (traços a 0,35 mg g⁻¹).

Análises conduzidas por GC-MS também confirmaram a presença de DMT (1,0 a 1,6 mg g⁻¹) em folhas de chacrona [McKenna *et al.*, 1984]. Nos últimos anos, cresceu o uso de métodos HPLC-UV para a separação e detecção desses analitos, presentes em matrizes vegetais e nas bebidas psicoativas [Kartal *et al.*, 2003; Nicasio *et al.*, 2005; Vepsäläinen *et al.*, 2005; Hemmateenejad *et al.*, 2006; Monsef-Esfahani *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Herraiz *et al.*, 2010].

5.2. Estudos recentes envolvendo a determinação de triptaminas e β -carbolinas na ayahuasca e em matrizes vegetais

5.2.a. Técnicas de preparo de amostras

A maioria dos métodos, descritos para a determinação das triptaminas e β -carbolinas em matrizes vegetais e na ayahuasca (Tabelas 1, 2 e 3), empregam técnicas de preparação de amostras que requerem grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos e demandam grande tempo da análise. Para as matrizes vegetais, maceração com um solvente adequado, LLE e uso de extrator de Soxhlet de fluxo contínuo foram os procedimentos mais frequentes [Kartal *et al.*, 2003; Vepsäläinen *et al.*, 2005; Nicasio *et al.*, 2005; Callaway *et al.*, 2005; Hemmateenejad *et al.*, 2006; Monsef-Esfahani *et al.*, 2008; Herraiz *et al.*, 2010].

Callaway *et al.* (2005) relatou a quantificação de β -carbolinas e DMT nas folhas da *P. viridis* (chacrona) e em seções de caule da *B. caapi*, obtidos pela sonicação de 100 mg de amostra, durante 10 minutos, em um volume mínimo de metanol (2 mL). A mistura foi mantida em repouso por 24 h, em seguida, sendo centrifugada antes da diluição em uma pequena alíquota do sobrenadante, usando a própria fase móvel. Não foram apresentadas figuras de mérito para o método proposto.

Zhou *et al.* (2006) descreveram a extração das triptaminas usando 0,2 g de matriz de planta seca (*P. aquatica*) macerada em 10 mL de HCl (1%), com agitação periódica. Após 3 - 4 dias, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante passado através de uma coluna de extração de fase sólida (SPE). Analitos retidos na coluna foram eluídos com 2 mL de uma mistura alcoólica alcalina contendo NH_4OH . Não há relatos sobre testes de recuperação.

Wang *et al.* (2010) usando várias partes da *B. caapi*, incluindo folhas, caules, grandes galhos e cascas, empregou extração em água quente, seguida de separação em sistema HPLC. Dados de validação do método não foram fornecidos para esse procedimento. Para a análise de sementes de *P. harmala*, foi relatada a maceração em metanol e posterior extração de β -carbolinas, por LLE, com clorofórmio [Kartal *et al.*, 2003; Hemmateenejad *et al.*, 2006; Monsef-Esfahani *et al.*, 2008].

Pulpati *et al.* (2008) sugeriram uma extração em metanol (3×50 mL) de sementes de *P. harmala* (1 g), sob condição de refluxo (1 h). Herraiz *et al.* (2010) descreveram a maceração de 0,2 - 0,5 g de *P. harmala* (folhas, secções do caule, flores, raízes, frutas e sementes) em 20 mL de uma mistura 1:1, contendo HClO_4 , $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, e metanol. Após centrifugação, foi realizada análise por HPLC, diluindo-se o líquido sobrenadante.

Os procedimentos necessários para preparar amostras de ayahuasca para a análise em GC, normalmente, empregam maior uso da interferência humana e são mais lentos do que aqueles empregados para análises por HPLC, como a extração líquido-líquido (LLE). Isto se deve, em grande parte, à incompatibilidade apresentada pelas colunas capilares com a água presente nestas matrizes. No entanto, pôde-se também notar a aplicação de extração em fase sólida (SPE) em método descrito por Pires *et al.*, empregando cromatografia gasosa.

Cartuchos C18 foram utilizados para a determinação dos alcaloides presentes na ayahuasca, por GC, usando detector nitrogênio-fósforo (NPD). A extração em fase sólida (SPE) foi empregada nessa aplicação, com manipulação mínima de amostra e utilização reduzida de solventes orgânicos. As recuperações foram superiores a 68% para as medidas em triplicata, em concentrações de 0,3, 1,5 e $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ [Pires *et al.*, 2009].

Callaway (2005) empregou LLE para o preparo de amostras de ayahuasca para a determinação de DMT. No mesmo trabalho, diluiu os extratos de ayahuasca na fase móvel, seguido por análise por HPLC, na determinação de β -carbolinas. Moura *et al.* prepararam extratos utilizando LLE, tendo hexano como solvente, para a quantificação de DMT por qRMN. Uma recuperação média de 70% foi obtida nos experimentos, utilizando três diferentes níveis de fortificação [Moura *et al.*, 2010].

Gambelunghe *et al.* reportaram uma análise por GC-MS de uma amostra de ayahuasca apreendida na Itália. Nesse caso em particular, hidróxido de sódio e um padrão interno (difenilhidramina) foram adicionados a 5 mL ayahuasca, seguido por extração em éter etílico e centrifugação. Dados de validação do método não foram relatados [Gambelunghe *et al.*, 2008].

McIlhenny *et al.* prepararam amostras de ayahuasca com partes de espécimes de *P. viridis* e *B. caapi*, coletadas de cultivos em South Kona, Havaí, utilizando clones originários do Peru [McIlhenny *et al.*, 2009]. Secções de caule de *B. caapi* foram macerados e fervidos lentamente, juntamente com folhas de *P. viridis*, durante 10 h, em 11 litros de água bidestilada. 100 mL de cada preparação foram diluídos e, em seguida, alíquotas dessas amostras analisadas por HPLC, com detecção por espectrometria de massas no modo tandem (MS/MS).

5.2.b. Metodologias de separação e quantificação

Kartal e colaboradores (2003) realizaram testes de validação completa para a determinação de harmol, harmalol, harmina e harmalina em sementes de *P. Harmala*, utilizando sistema HPLC-UV. Vários parâmetros cromatográficos também foram avaliados, incluindo fator de capacidade e resolução. Harmol, harmina e harmalina

foram determinados em amostras de *Semen Pegani* em concentrações de 1,0%, 0,4% e 0,6%, respectivamente.

Vepsäläinen *et al.* (2005) utilizando-se das técnicas HPLC-UV e RMN, anunciaram a presença de um novo composto indólico na casca de *M. tenuiflora* (Anexo B, Figura 8). Sugeriu-se que o aquecimento e variações no pH poderiam causar impacto na estabilidade dessa molécula. O fitoindol foi denominado *yuremamine*. Testes sobre o efeito iMAO desse alcaloide nunca foram realizados, porém essa hipótese também foi levantada pelos autores. Nicasio *et al.* (2005) usaram HPLC de fase reversa, com detecção UV em 280 nm, para a determinação do DMT, triptofano, triptamina e serotonina nas cascas, folhas e flores de *M. tenuiflora*, coletadas durante o inverno e o verão, para verificar a variação de concentração desses analitos na planta, sob diferentes condições climáticas (Anexo B, Tabela 4).

Callaway *et al.* (2005) utilizaram um método HPLC com uma coluna não polar e detecção por fluorescência, descrito no seu trabalho anterior [Callaway *et al.*, 1996], para a determinação de β -carbolinas e DMT em partes de *B. caapi* e nas folhas de *P. viridis*, respectivamente. As concentrações, obtidas a partir da análise de material vegetal seco de *B. caapi*, foram 0,31 - 8,43 mg g⁻¹ (harmina), 0,03 - 0,83 mg g⁻¹ (harmalina) e 0,05 - 2,94 mg g⁻¹ (tetrahydroharmina).

Em folhas secas de *P. viridis*, a concentração máxima de DMT medida foi 17,75 mg g⁻¹. Flutuações nas concentrações foram relatadas, com níveis mais elevados detectados durante o dia (com picos às 06 h e 18 h) (Anexo C, Figura 9). Uma vez que os níveis de DMT tendem a reduzir ao anoitecer, foi sugerido que o DMT poderia ser produzido nas folhas para auxiliar a absorção da radiação solar.

Hemmateenejad *et al.* (2006) aplicaram procedimentos estatísticos multivariados para aperfeiçoar um método HPLC, com detecção por UV a 330 nm, para a determinação de harmina, harmano, harmalol e harmalina em sementes de *P. harmala*. As condições cromatográficas, incluindo a coluna e a fase móvel, foram semelhantes aos descritos anteriormente por Kartal *et al.* (2003). Em testes de validação do método, obteve-se boa precisão (CV = 4,6%), excelente linearidade ($r^2 > 0,999$) e limites de detecção e quantificação na ordem de 3,1 - 10,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 9,3 - 31,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Em sementes de plantas provindas do Irã, as concentrações de harmina, harmano, harmalina e harmalol foram 1,84%, 0,16%, 3,90% e 0,25%, nessa ordem.

Outros excelentes resultados de validação foram obtidos por Monsefi-Esfarani *et al.* (2008), usando uma adaptação do método com mudanças de pH da fase móvel. As curvas de calibração foram lineares ($r^2 > 0,998$) no intervalo de concentrações de 0,5 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficientes de variação do método entre 0,6% e 10,2%, para todos os analitos, indicando boa precisão. Limites de detecção foram inferiores a 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LQ igual a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pulpati *et al.* (2008) relataram um método baseado em cromatografia em camada delgada com alto desempenho (HPTLC), para a quantificação de harmina, harmalina, vasicina e vasicinona a partir de sementes de *P. harmala*.

Esses compostos foram detectados por um método densitométrico e, nas sementes desse vegetal, foram encontrados 0,44% (w/w) de harmina e 0,096% (w/w) de harmalina, com adequadas figuras de mérito. Herraiz *et al.* (2010) determinaram harmol, harmalol, harmina, harmalina e tetrahidroharmina em extratos preparados com diferentes partes de *P. harmala* (Anexo D, Tabela 5). A quantificação dos derivados β -carbólicos foi realizada, empregando HPLC em fase reversa, com detecção UV-DAD (Anexo D, Figura 10).

Wang *et al.* (2010) obtiveram extratos aquosos padronizados de *B. caapi*, preparados com diferentes partes da planta, incluindo folhas, caules, cascas do caule e ramos inteiros, coletados em diferentes localizações nas ilhas havaianas de Oahu e Hilo, em épocas distintas do ano. Determinações de tetrahidronorharmina (THNH), harmol, tetrahydroharmina, harmalina e harmina foram realizadas utilizando cromatografia líquida, acoplada a um detector de arranjo de diodos. Os resultados dos testes de validação não foram relatados.

Zhou *et al.* (2006) desenvolveram um método para quantificar triptaminas e uma β -carbolina em *P. aquatica*, usando cromatografia líquida de alto desempenho em camada fina (HPTLC), com confirmação por HPLC-MS. Boa linearidade foi obtida, com um coeficiente de correlação acima de 0,991 para hordenina, metiltiramina, gramina e 5-MeO-DMT. O método forneceu boa especificidade para os analitos de interesse, bem como repetibilidade adequada, com coeficiente de variação inferior a 5%, em média, para as análises em duplicata.

Nos métodos para quantificação de triptaminas e β -carbolicas na ayahuasca, se destacam a cromatografia gasosa (GC) acoplada a detectores nitrogênio-fósforo (NPD) ou a espectrômetros de massas (MS) (Callaway, 2005; Pires *et al.*, 2008; Gambelunghé *et al.*, 2008). Foi também descrito um método que emprega a ressonância magnética nuclear (Moura *et al.*, 2010) para a quantificação do DMT. Alguns dos métodos propostos nessas publicações são deficientes em relação aos testes de validação, fundamentais à confiabilidade dos dados apurados.

Callaway (2005) apresentou a compilação de resultados de um número significativo de amostras de ayahuasca com relação ao nível de concentração de *N,N*-dimetiltriptamina, tetrahydroharmina, harmina e harmalina. As decocções foram

preparadas no Brasil, em igrejas dos três principais grupos religiosos (Santo Daime, União do Vegetal e Barquinha), além de preparos de ayahuasca da tribo indígena equatoriana Shuar. Para as β -carbolinas, foi empregado o método descrito por Callaway *et al.* (1996), com separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e detecção por fluorescência, utilizando-se uma coluna com fase apolar. Por outro lado, o DMT foi determinado por GC-NPD. Os dados obtidos mostraram grande variabilidade nos níveis de concentração dos analitos nas amostras analisadas, embora não constem na publicação os dados de validação do método. Os níveis de DMT nas bebidas variaram de zero a $14,15 \text{ mg mL}^{-1}$ (Anexo E, Tabela 6).

Um método baseado em eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida a laser, acoplado à espectrometria de massas, (CE-LIF-ESI-MS) foi desenvolvido por Huhn *et al.* (2005). A combinação dos sistemas de detecção foi particularmente útil por permitir a obtenção de picos bem definidos, além de dados sobre a estrutura dos compostos, com base em ESI-MS-MS. A análise de uma amostra diluída de ayahuasca revelou a presença de DMT, harmalina, harmina e THH, porém sem dados de quantificação. Também não foi apresentado estudo de validação.

Pires *et al.* (2009) estabeleceram o primeiro método analítico desenvolvido e validado que, simultaneamente, é capaz de determinar, além de *N,N*-dimetiltryptamina, as β -carbolinas (harmina, harmalina e tetrahydroharmina) em amostras reais de ayahuasca por GC-NPD. As curvas de calibração para todos os analitos apresentaram excelente linearidade, na faixa de $0,02\text{-}4,0 \text{ mg mL}^{-1}$, com r^2 variando de 0,9941 a 0,9971. A exatidão também foi positivamente avaliada, entre 94,0 a 105,4%. Os limites de detecção (LD) e inferior de quantificação (LIQ) também foram avaliados. Precisoes intradia e interdias com CV inferiores a 9,7%.

Testes de estabilidade foram realizados por meio da resposta obtida na análise de amostras, em água fortificada e de ayahuasca, após 24 horas em temperatura ambiente, com perdas inferiores a 10%. Analitos também apresentaram boa estabilidade após 8 h no carrossel do sistema de injeção. Oito amostras reais de ayahuasca foram analisadas encontrando-se DMT na faixa de concentrações de 0,42 a 0,73 mg mL⁻¹, harmina entre 0,37 e 0,83 mg mL⁻¹, harmalina, 0,64 a 1,72 mg mL⁻¹ e tetrahydroharmina entre 0,21 e 0,67 mg mL⁻¹. Apesar de originárias do mesmo grupo religioso em Araçoiaba da Serra, Brasil, os níveis de concentração nas bebidas variaram entre as amostras, provavelmente, devido a diferentes quantidades e proporções das plantas em cada preparo, assim como, nas quantidades de alcaloides existentes em diferentes espécimes dos vegetais em estudo.

McIlhenny et al. (2009) desenvolveram um procedimento analítico para a determinação de triptaminas e β -carbolinas em amostras de ayahuasca preparadas em laboratório, com análises das amostras por cromatografia líquida (HPLC) acoplada à espectrometria de massas, utilizando o modo tandem (MS/MS). Um bom estudo de validação do método foi conduzido, evidenciando sua boa adequação. A análise de três amostras reais revelou, como componentes majoritários, o DMT (0,12-3,19 mg mL⁻¹), harmina (0,91-16,14 mg mL⁻¹), harmalina (0,05-1,55 mg mL⁻¹) e tetrahydroharmina (1,22-11,90 mg mL⁻¹).

Gambelunghe *et al.* (2008) encontraram níveis de 24,6 mg / 100 mL para DMT e 34 mg / 100 mL, para a harmina, em uma amostra real de ayahuasca apreendida na Itália. Não foram fornecidos os dados de validação. Moura et al. (2010) desenvolveram um estudo que teve como finalidade a aplicação da ressonância magnética nuclear (RMN) na detecção e quantificação de *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) na ayahuasca. Amostras de água fortificadas, apenas com DMT, foram submetidas ao método

otimizado. Os testes de validação do método demonstraram excelentes figuras de mérito.

Extratos preparados a partir de folhas da *Psychotria viridis* e oito amostras reais de ayahuasca foram analisados pelo método otimizado, porém os dados obtidos não foram disponibilizados nesta publicação. Como principais vantagens do método por RMN, sobre os cromatográficos, destacam-se o curto período de análise de cada amostra (30 s), a análise ser realizada de modo não destrutivo, além da possibilidade de gerar dados referentes à estrutura molecular do analito. Por outro lado, o método foi desenvolvido sem a presença de β -carbolinas nas amostras aquosas fortificadas. Assim, seria válido verificar se, na análise de amostras reais por RMN, tais compostos poderiam interferir na determinação do DMT.

Tabela 1. Métodos para a determinação de β -carbolinas em *B. caapi* e *P. harmala*.

	<i>B. caapi</i>				<i>P. harmala</i>		
Referência	Callaway <i>et al.</i> (2005)	Wang <i>et al.</i> (2010)	Kartal <i>et al.</i> (2003)	Hemmateenejad <i>et al.</i> (2006)	Monsef-Esfahani <i>et al.</i> (2008)	Pulpati <i>et al.</i> (2008)	Herraiz <i>et al.</i> (2010)
Material analisado	Caule	Folhas, caule, galhos e cascas	Sementes de <i>P. harmala</i>	Sementes	Sementes	Sementes	Folhas, seções do caule, flores, raízes, frutos e sementes
Analitos de interesse	Harmina, harmalina e THH	THNH, harmol, THH, harmalina, harmina e compostos de outras classes químicas	Harmol, harmalol, harmina e harmalina	Harmina, harmano, harmalol e harmalina	Harmol, harmalol, harmina e harmalina	Harmina e harmalina e compostos de outras classes químicas	Harmol, harmalol, harmina, harmalina e THH
Método de preparo de amostras	Sonicação em metanol e redissolução do resíduo na fase móvel	Maceração em água quente	Maceração em metanol e extração por LLE com clorofórmio	Maceração em metanol e extração por LLE com clorofórmio	Maceração em metanol e extração por LLE com clorofórmio	Refluxo em metanol (1 h)	Maceração em solução ácida de HClO ₄ e metanol (1:1)
Técnica de separação / detecção	HPLC e detecção por fluorescência	HPLC-DAD	HPLC-UV a 330 nm	HPLC-UV a 330 nm	HPLC-UV a 330 nm	HPTLC-UV a 366 nm (densitometer-TLC scanner)	HPLC-DAD
Figuras de mérito	–	Faixa linear: 1,0–500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (para THNH e THH); 0,2–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (para harmol, harmalina & harmina)	$r^2 > 0,999$; LD < 10,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; LQ < 31,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; CV < 4,609%	Faixa linear: 1,0–10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 94 < R ² < 107%; CV < 5%	Faixa linear: 0,5–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $r^2 > 0,998$; LD < 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; LQ = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,6 < CV < 10,2%	Faixa linear: 4–24 ng/spot (para harmina); 8–24 ng/spot (para harmalina); $r^2 > 0,993$; LD = 2 ng; LQ = 4 ng; 97,7 < R < 98,4%; Precisão: CV < 1,53%; Repetibilidade: CV < 1,62%	–
Nível de concentração*	Harmina: 0,31 – 8,43 mg g^{-1} (0,031 – 0,843%); Harmalina: 0,03 – 0,83 mg g^{-1} (0,003 – 0,083%); THH: 0,05 – 2,94 mg g^{-1} (0,005 – 0,294%)	Harmina: 10^{-3} – 0,672%; Harmalina: 10^{-4} – 0,058%; THH: 0,004–0,34%; THNH: 0 – 0,014%; Harmol: $4 \cdot 10^{-4}$ – 0,019%	Harmol: 1,094%; Harmina: 0,476%; Harmalina: 0,611%	Harmina: 1,84%; Harmano: 0,18%; Harmalina: 3,90%; Harmalol: 0,25%	(em sementes secas) Harmina: 0,465 g/100 g (0,465%); Harmalina: 0,355 g/100 g (0,355%)	Harmina: 0,44% (w/w); Harmalina: 0,096% (w/w)	(em sementes) Harmalol: 6 mg g^{-1} (0,6%); Harmol: 0,03 mg g^{-1} (0,003%); Harmalina: 56 mg g^{-1} (5,6%); Harmina: 43 mg g^{-1} (4,3%); THH: 1,1 mg g^{-1} (0,11%)

*Nível de concentração com base em matéria vegetal seca

**Recuperação (R)

Tabela 2. Métodos para a determinação de triptaminas em *M. tenuiflora* e *P. aquatica*.

	<i>M. tenuiflora</i>		<i>P. viridis</i>		<i>P. aquatica</i>
Referência	Nicasio <i>et al.</i> (2005)	Vepsäläinen <i>et al.</i> (2005)	Callaway <i>et al.</i> (2005)		Zhou <i>et al.</i> (2006)
Material analisado	Cascas internas, sementes, folhas e flores. Culturas <i>in vitro</i> (plântulas e calos)	Cascas internas da raiz	Folhas		Planta inteira
Analitos de interesse	DMT, triptamina, serotonina	DMT e yuremamina	DMT		DMT, 5-MeO- DMT, gramina, hordenina, bufotenina e triptamina
Método de preparo de amostras	Refluxo em Soxhlet com solução de clorofórmio / NH ₃ (27%) (49:1)	Maceração em metanol e redissolução na fase móvel	Maceração em metanol (67%) + acetonitrila (11%) + 0.1 mol/L acetato de amônio (22%)		Maceração em HCl (1%), centrifugação e extração em fase sólida (SPE)
Técnica de separação / detecção	HPLC-UV a 280 nm	HPLC-DAD RMN (¹³ C- e ¹ H NMR)	HPLC e detecção por fluorescência		HP TLC e HPLC- MS
Figuras de mérito	Faixa linear: 2 – 40 µg mL ⁻¹	–	–		Faixa linear: 120 – 3840 ng/spot; r ² > 0,991; Precisão intra-dia: CV < 5%
Nível de concentração*	(em cascas) DMT: 0,11 – 0,35%; Triptamina: 0,0022 – 0,0071%; (em flores) DMT: 0,03%; Triptamina: 0,0075%; (em folhas) DMT: 0,01 – 0,09%; Serotonina: 0,009%; (em culturas) Para todos os analitos: < 0,08%	–	DMT: 0 – 17,75 mg g ⁻¹ (0 – 1,775%)		DMT: 66,3 – 177 mg kg ⁻¹ (0,00663 – 0,0177%); 5-MeO-DMT: 176 mg kg ⁻¹ (0,0176%)

*Nível de concentração com base em matéria vegetal seca

**Recuperação (R)

Tabela 3. Métodos para a determinação de triptaminas e β -carbolinas em ayahuasca.

Ayahuasca						
Referência	Callaway (2005)	Huhn <i>et al.</i> (2005)	Pires <i>et al.</i> ((2009)	Gambelunghe <i>et al.</i> (2008)	McIlhenny <i>et al.</i> (2009)	Moura <i>et al.</i> (2010)
Material analisado	Amostras reais de ayahuasca	Amostras reais de ayahuasca	Amostras reais de ayahuasca	Amostras reais de ayahuasca	Extratos preparados no laboratório a partir de folhas de <i>P. viridis</i> e o cipó <i>B. caapi</i>	Extratos preparados a partir de folhas de <i>P. viridis</i> . Amostras reais de ayahuasca
Analitos de interesse	DMT, harmina, harmalina e THH	DMT, norharmano, harmano, harmina, harmalina, harmol e THH	DMT, harmina, harmalina e THH	DMT, harmina e harmalina	DMT, NMT, harmol, harmalol, harmina, harmalina e THH	DMT
Método de preparo de amostras	Para DMT: LLE; Para β -carbolinas: diluição do extrato na fase móvel	Amostras de ayahuasca foram diluídas em tampão	Extração em fase sólida (SPE)	Extração com éter etílico e centrifugação	Diluição das amostras na fase móvel	Extração líquido-líquido (LLE)
Técnica de separação / detecção	DMT: GC-NPD; β -carbolinas: HPLC-FL	CE -LIF-ESI-MS	GC-NPD	GC-MS	HPLC-MS/MS	qRMN
Figuras de mérito	-	-	Faixa linear: 0,02 – 4,0 mg mL ⁻¹ ; 0,9941 < r ² < 0,9971; LD= 0,01 mg mL ⁻¹ ; LIQ= 0,02 mg mL ⁻¹ ; 1,3% < CV < 9,7%	-	Faixa linear: 5 – 100 ng mL ⁻¹ e 5 – 100 μ g mL ⁻¹ ; r ² > 0,9965; LD< 0,0079 ppm; LQ< 0,24 ppm	Faixa linear: 25 – 1000 mg L ⁻¹ ; r ² = 0,999; LD = LIQ= 12,5 mg L ⁻¹ ; R= 70%; CV< 5,1%
Nível de concentração*	DMT: 0 – 14,15 mg mL ⁻¹ ; THH: 0,48 – 23,80 mg mL ⁻¹ ; Harmalina: 0 – 0,90 mg mL ⁻¹ ; Harmina: 0,45 – 22,85 mg mL ⁻¹	-	DMT: 0,42 – 0,73 mg mL ⁻¹ ; Harmina: 0,37 – 0,83 mg mL ⁻¹ ; Harmalina: 0,64 – 1,72 mg mL ⁻¹ ; THH: 0,21 – 0,67 mg mL ⁻¹	DMT: 24 mg / 100 mL; Harmalina: 6 mg / 100 mL; Harmina: 34 mg / 100 mL	DMT: 0,12 – 3,19 mg mL ⁻¹ ; NMT: 0,0052 – 0,0313 mg mL ⁻¹ ; Harmalol: 0,0026 – 0,0310 mg mL ⁻¹ ; Harmol: 0,0009 – 0,0633 mg mL ⁻¹ ; Harmina: 0,91 – 16,1 mg mL ⁻¹ ; Harmalina: 0,054 – 1,55 mg mL ⁻¹ ; THH: 1,22 – 11,90 mg mL ⁻¹	-

*Recuperação (R)

6. Materiais e métodos

6.1. Preparo e caracterização de padrão analítico de *N,N*-dimetiltriptamina obtido a partir das cascas de *M. tenuiflora*

6.1.a. Materiais

Balão volumétrico (5, 10, 100 e 500 mL), funil de separação, balão de destilação (50, 100 e 200 mL), vidros de relógio, copo *Beaker* (50, 100, 250 e 500 mL), espátulas, proveta (50, 100 e 500 mL), balança analítica Sartorius BL2105, bastão de vidro, garras, suportes, agitador magnético Fisher Scientific e barras de agitação cobertas com teflon, pipetas Pasteur, pipeta volumétrica de 3 mL, *vial* com tampa de rosca e septo de silicone/teflon (5, 6,5 e 9 mL).

6.1.b. Reagentes

Solvente n-hexano foi adquirido da Tedia (Fairfield, OH, EUA). Hidróxido de sódio de grau analítico, carbonato de sódio e sulfato de sódio anidro foram fornecidos por Mallinckrodt Baker (Paris, KY, EUA). Ácido clorídrico (HCl, 37%) foi obtido a partir da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Florisil, alumina, Os produtos químicos foram utilizados sem purificação adicional.

6.1.c. Padrões e soluções

Padrão certificado de triptamina (98% de pureza) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Somerset, NJ, EUA). Clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi adquirido a partir de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EUA).

6.1.d. Coleta e preparação do material vegetal

Cascas internas de caule e raiz de *M. tenuiflora* foram coletadas em uma reserva localizada no Campus de São Cristóvão do Instituto Federal de Sergipe, entre abril e maio de 2010. Exsicata do material foi depositada no herbário da Universidade Federal de Sergipe sob o registro ASE18817. As amostras de cascas foram desidratadas a 40 ° C, até massa constante. Em seguida, pulverizadas utilizando um moinho de facas (modelo MA048, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil).

6.1.e. Ressonância magnética nuclear

Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) foram registrados a 200 MHz, usando soluções em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos foram referenciados ao pico de solvente residual, ou a tetrametilsilano (TMS), como referência externa. Os dados foram apresentados em termos do desvio químico (δ , em ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J , em Hz) e intensidade integrada.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram registrados a 50 MHz, utilizando soluções em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos foram encaminhados para o pico de solvente (CDCl_3). A multiplicidade de um determinado sinal foi indicada como s (singlete), d (duplete), t (triplete), ou m

(multiplete). Os espectros de RMN foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker Avance Spectrospin DPX-200 (Fällanden, Suíça).

6.1.f. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Análises GC-MS/MS foram realizadas com um cromatógrafo Varian 3800 (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas Varian320-MS QqQ. As amostras foram introduzidas, na coluna, por meio de um injetor *split/splitless* (Varian modelo 1177), usando amostrador automático (Varian modelo 1084). Foi utilizada uma coluna capilar Varian Factor Four VF-5ms (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, espessura de filme 0,25 µm).

O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização por elétrons (EI), a 70 eV. O *software* que controlava o sistema continha uma biblioteca EI-MS. O espectrômetro de massas foi calibrado com perfluorotributilamina (PFTBA). Após o processo de ionização, os íons foram passados através de um guia de íons *hexapole* para os analisadores de massas (40 - 500 m/z). O hélio (99,9999% de pureza), a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹, foi utilizado como gás de arraste e argônio (pureza de 99,999%) foi utilizado como gás de colisão a uma pressão de 1,5 mTorr.

A aquisição de dados foi realizada com o *software* da estação de trabalho Varian. A temperatura do injetor foi de 250 °C. O programa do forno iniciou com uma temperatura de 60 °C, durante três minutos, seguido de uma rampa até 200 °C a 8 °C min⁻¹, mais uma rampa até 280 °C a 10 °C min⁻¹, permanecendo a 280 °C por 10 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado no modo *selected reaction monitoring* (SRM), e as temperaturas da linha de transferência, do *manifold* e da fonte de ionização foram fixadas em 300, 40 e 250 °C, respectivamente. A análise foi realizada com um

filament/multiplier delay de 4,0 minutos, de modo a evitar danos ao instrumento. A tensão do multiplicador de elétrons foi fixada em 1000 V, valor obtido no processo de autoajuste, e o tempo de varredura foi de 0,6 segundos. O tempo total de execução da corrida foi igual a 32,5 minutos.

6.1.g. Inserção direta da amostra no espectrômetro de massas

Para a inserção direta da amostra no espectrômetro acoplado ao sistema GC/MS-QP2010 (Shimadzu, Quioto, Japão), foi utilizado um acessório DI-2010 Shimadzu. A temperatura foi ajustada para 340 °C.

6.1.h. Infravermelho e medidas dos pontos de fusão

Os espectros de infravermelho foram registrados com um espectrômetro Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), no intervalo de 4000 - 400 cm^{-1} , utilizando paletas convencionais de KBr. Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares abertos, usando o equipamento Mel-Temp II (Laboratory Devices Inc., Menlo Park, CA, EUA).

6.1.i. Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta

Um espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) foi utilizado para medidas em triplicata, a 290 nm, de dez soluções padrão de triptamina, com concentrações na faixa de 0,2 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a fim de gerar uma curva analítica. O teor de DMT foi determinado usando soluções de concentrações 6,25, 12,5, 25,0, e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As medidas foram realizadas em comprimento de onda igual a 275 nm.

6.2. Estudos iniciais sobre as propriedades polimórficas de *N,N*-dimetiltriptamina por calorimetria diferencial de varredura e difração de Raios X

6.2.a. Equipamentos e métodos

Para as análises por calorimetria diferencial de varredura, foi utilizado um equipamento DSC 8000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) com acessório de refrigeração Intracooler 2. Os dados foram gerenciados pelo *software* Perkin Elmer Pyris versão 10.1.0.0429. As amostras de DMT para os ensaios foram pesadas entre 2 - 4 mg, em pequenos recipientes de alumínio frisado. As temperaturas da amostra e do forno do instrumento foram calibradas com padrões de índio (PF= 156,60 °C) e zinco (PF= 419.47 °C) com alto grau de pureza, para cada taxa de varredura de temperatura. As entalpias de transição foram calibradas tendo como referência o índio com calor de fusão $\Delta H_f = 28,45 \text{ J g}^{-1}$.

Nas análises por DSC, a programação básica de temperatura do forno iniciou a 25°C, sendo o sistema resfriado de 25,0 °C a - 40,0 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 min. Aquecimento de - 40,0 °C até 70,0 °C, na taxa de 10,0 °C min⁻¹, permanecendo por 2 min. Resfriamento de 70,0 °C até - 40,0 °C, na taxa de 50,0 °C min⁻¹, permanecendo a -40,0 °C por 2 min. Aquecimento de - 40,0 °C a 70,0 °C, na taxa de 10,0 °C min⁻¹. Frações de DMT, amarela e branca, obtidas a partir de *M. tenuiflora*, além das mesmas frações obtidas por DMT previamente sintetizado por procedimento descrito na literatura [Brandt et al., 2010], foram analisadas pelos 5 diferentes métodos, nos quais as taxas de aquecimento variaram nos níveis de 2, 10, 20, 50 e 100 °C min⁻¹. Nitrogênio foi utilizado como gás de purga, com um fluxo de 40 mL min⁻¹.

As medições de difração de Raios X foram feitas em um Miniflex P-XRD (Rigaku, Tóquio, Japão) com um acessório de resfriamento Thermal Exchange e tubo

de Raios X provido de ânodo de cobre. O gerenciamento dos dados coletados foi conduzido pelo *software* Rigaku Medida Standard para Windows versão 3.1. A calibração foi feita utilizando uma placa de sílica padrão. Os cristais de DMT foram prensados num suporte de amostras, e analisados entre 3 e 60 graus 2 teta, com um tamanho de passo de 0,01 e velocidade de varredura contínua de 0,02 graus 2 teta.

6.2.b. Reagentes

N,N-dimetiltriptamina foi obtido por extração do alcaloide das cascas internas da *M. tenuiflora*. Além disso, foram utilizadas amostras de DMT obtidas por síntese orgânica, através de método descrito na literatura [Brandt *et al.*, 2010]. As amostras de DMT puro foram obtidas por recristalização do alcaloide bruto em hexano, na forma de base livre. O DMT bruto foi dissolvido em hexano, a 40 °C, para se obter uma concentração aproximada de 30 g L⁻¹. Após arrefecimento até a temperatura ambiente, as soluções foram armazenadas a - 5 °C, durante dois dias. Com a formação dos cristais, a solução mãe foi depois removida por filtração. O DMT puro foi seco, suavemente, sob corrente de nitrogênio, e armazenadas a 4 °C, até à análise. Todos os outros reagentes de grau analítico foram obtidos da Aldrich (Dorset, UK).

6.2.c. Preparo de amostras

Para a produção das amostras de DMT branco e amarelo, empregadas nas análises por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e difração de Raios X, a base livre foi dissolvida à temperatura ambiente, utilizando o volume mínimo de hexano ou acetonitrila apenas necessário à dissolução, obtendo-se soluções saturadas, a 25 °C. Em seguida, o solvente de cada solução foi evaporado, à temperatura ambiente, sob uma corrente suave de nitrogênio, produzindo as amostras W1, W2, Y1 e Y2.

As amostras W1 e W2 eram constituídas, predominantemente, de cristais brancos obtidos por cristalização a partir de hexano, ao passo que as amostras de DMT amarelo, Y1 e Y2, foram obtidos após cristalização em acetonitrila. Por outro lado, as amostras W1 e Y1 foram cristalizadas a partir de DMT obtido por síntese orgânica, enquanto que as amostras W2 e Y2 correspondem ao DMT isolado a partir das cascas de *M. tenuiflora*.

6.3. Determinação do teor de *N,N*-dimetiltriptamina nas cascas de *M. tenuiflora* por MSPD/GC-MS

6.3.a. Materiais

Balão volumétrico (1, 5, 10, 100 e 500 mL), balão de destilação (50, 100 e 200 mL), vidros de relógio, copo Beaker (50, 100, 250 e 500 mL), almofariz, espátulas, proveta (50, 100 e 500 mL), balança analítica Sartorius BL2105, bastão de vidro, garras, suportes, pipeta volumétrica, pipeta graduada, micropipetas, câmara de vácuo, bomba de vácuo e rotoevaporador.

6.3.b. Reagentes

Solventes n-hexano e éter de petróleo foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). Sulfato de sódio anidro, Florisil (80 – 100 mesh) e alumina foram fornecidos por Mallinckrodt Baker (Paris, KY, EUA). Hidróxido de sódio P.A. foi obtido da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Os produtos químicos foram utilizados sem purificação adicional.

6.3.c. Padrões e soluções

Foram preparadas três soluções estoque, em acetonitrila, a 20, 25 e 30 mg mL⁻¹, dissolvendo, respectivamente, 40, 50 e 60 mg de DMT em 2 mL do solvente. Essas soluções foram, sucessivamente, diluídas até próximo ao nível de 10⁻² mg mL⁻¹. As soluções foram armazenadas a 4 °C, no escuro, e mantiveram-se estáveis durante um período de um mês.

Os extratos processados por MSPD, utilizados para a verificação da faixa linear de trabalho, foram preparados com faixa de concentração entre 0,02 a 30 mg g⁻¹, a partir da fortificação das cascas do caule da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Betran, com as soluções de trabalho descritas.

Para os testes de recuperação, 0,5 g de amostra homogeneizada de *A. colubrina* foi enriquecida antes do processo de determinação, por adição de soluções padrão de DMT, a fim de obter nas cascas secas do material, concentrações iguais a 1,25; 2,0; 8,0 e 16,0 mg g⁻¹ (n = 8 repetições). Essas amostras fortificadas foram deixadas em repouso, durante cerca de 24 h, com a finalidade de permitir a absorção de DMT na amostra e, principalmente, evaporação total do solvente.

6.3.d. Coleta e preparo das amostras vegetais

As cascas do caule e raiz de *M. tenuiflora* foram coletadas em duas localidades no litoral, nos municípios de Aracaju e São Cristóvão (Área A) e três regiões semiáridas, nos municípios de Simão Dias, Pinhão e Canindé de São Francisco (Área B), todos localizados no Estado de Sergipe, região Nordeste do Brasil, entre agosto e setembro de 2010.

Exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE18817). As amostras foram moídas em moinho de facas (modelo MA048, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), peneirado e seco a 38 °C, até se verificar massa constante.

6.3.e. Condições de operação do sistema GC-MS

Um sistema constituído por um espectrômetro de massas QP-2010 Plus acoplado a um cromatógrafo a gás 2010 GC (Shimadzu, Quioto, Japão), dispondo de um amostrador automático AOC 20i Shimadzu e de injetor *split/splitless*, foi utilizado para a identificação e quantificação de DMT. Foi empregada uma coluna capilar de sílica RTX-5MS (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme), fornecida pela Restek (Bellefonte, PA, EUA), utilizando hélio (pureza 99.995%) como gás transportador a uma velocidade de fluxo de 1,2 mL min⁻¹.

A programação do forno iniciou à temperatura de 60 °C (3,0 min), em seguida, na taxa de 8 °C min⁻¹ até 200 °C, finalizando em 280 °C (4 min), na taxa de 10 °C min⁻¹. O *solvent delay* foi de 5 min. A porta de injetor foi mantida a 250 °C, e o volume de 1 µL da amostra foi injetado no modo *splitless* (50 s). Os dados foram processados por meio do *software* Shimadzu GC Solution.

O tempo total de corrida foi de 27 min, e o tempo de equilíbrio foi de 2 min. O eluente da coluna foi transferido através de uma interface de linha aquecida a 280 °C, até a fonte de ionização de elétrons (70 eV), também mantida a 280 °C. A análise foi realizada por monitoramento seletivo de íons (SIM). Os íons monitorados no estudo foram *m/z* 58 e 188.

6.3.f. Metodologia MSPD

Cascas secas e moídas de material vegetal (0,5 g) foram colocadas em um almofariz de porcelana (50 mL), além de 0,5 g de Florisil e 0,5 mL de NaOH, 0,1 mol L⁻¹. A amostra foi suavemente homogeneizada com um pistilo, por 3 min. A mistura resultante foi introduzida em uma coluna de polipropileno (100 mm × 20 mm), previamente preenchida na sua base com 0,1 g de lã de vidro e 0,5 g de Na₂SO₄ anidro, para eliminar a umidade do extrato. Com a outra extremidade do pistilo de porcelana, foi exercida uma suave compressão sobre a superfície da amostra, a fim de melhor compactar o material homogeneizado.

A eluição lenta foi realizada sob vácuo, com 30 mL de n-hexano. O eluente foi recolhido em um balão de fundo redondo e concentrou-se o extrato utilizando rotoevaporador (40 °C), sendo após, reduzido com um suave corrente de nitrogênio, para o volume de 1 mL. Alíquotas de 1 µL desses extratos foram analisadas por GC-MS.

6.4. Determinação do teor de *N,N*-dimetiltriptamina em bebidas rituais por SPME/GC-MS

6.4.a. Materiais

Balão volumétrico (5, 10, 100 e 500 mL), copo Beaker (50, 100 e 250 mL), espátulas, proveta (50, 100 e 500 mL), balança analítica Sartorius BL2105, bastão de vidro, garras, suportes, agitador magnético com aquecimento e barras de agitação de 10 mm recobertas com teflon, cilindro de alumínio para aquecimento uniforme das amostras, pipetas Pasteur, pipetas volumétricas, vial com tampa de rosca e septo de silicone/teflon (9 mL).

Um dispositivo manual (*holder*) para microextração em fase sólida (SPME) e fibras revestidas com polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), com 65 μm de espessura do filme, foram adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Antes da utilização, a fibra foi condicionada de acordo com as recomendações do fabricante. Um agitador magnético (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) foi utilizado para homogeneizar as amostras das bebidas. *Software* STATISTICA[®] 6.0 da StatSoft (EUA).

6.4.b. Reagentes

Metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset, UK). Hidróxido de sódio de grau analítico foi fornecido por Merck (Darmstadt, Alemanha). Os produtos químicos foram utilizados como recebidos, sem purificação adicional.

6.4.c. Padrões, amostras reais e soluções

N,N-dimetiltriptamina ($95,8 \pm 0,6\%$) foi isolado a partir de cascas de *M. tenuiflora*, utilizando método anteriormente descrito. O total de 12 amostras de vinho da jurema e ayahuasca foram obtidas a partir de grupos religiosos. Para a otimização da técnica SPME, uma solução a 100 mg L^{-1} de DMT foi preparada por adição de 50 μL solução estoque de DMT (10 g L^{-1} , em metanol) a 5 mL de solução de NaOH, $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 11). Para a análise da faixa linear do método e outros ensaios de validação, soluções padrão foram preparadas de forma semelhante, por fortificação, usando a solução estoque a 10 g L^{-1} , levando a padrões de concentração entre 0,78 e 400 mg L^{-1} .

As amostras reais para análise foram preparadas por diluição das bebidas (ayahuasca ou vinho jurema) por um fator de 10 ou 25, utilizando uma solução aquosa de NaOH, a $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. O volume final foi de 5 mL. A fim de mimetizar as soluções

utilizadas na validação do método, cinquenta microlitros de metanol foram adicionados aos 5 mL das amostras diluídas e o pH foi corrigido para 11, pela adição de pequenos cristais de hidróxido de sódio.

6.4.d. Condições de operação do sistema GC-IT-MS

As análises por GC-MS foram realizadas utilizando um Varian 450-GC (Walnut Creek, CA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas *ion trap* (IT) Varian 200-MS. O injetor 1177 foi operado no modo *splitless* por 60 s, a 250 °C. Um *liner* específico para a técnica SPME (0,75 × 2,75 × 105 mm) foi utilizado para a introdução da amostra. O sistema foi operado pela estação de trabalho Saturn GC / MS, versão 6.9. A separação foi efetuada numa coluna Supelco (Bellefonte, PA, EUA) SLB-5ms capilar (30 m × 0,25 mm de diâmetro interno, espessura de filme 0,25 µm).

Gás hélio (pureza de 99,995%) foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura do forno do cromatógrafo foi programada a partir de 50 °C (mantido durante 3,5 minutos) até 280 °C, a 20 °C min⁻¹, permanecendo nessa temperatura por 10 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (EI). As temperaturas do *manifold*, *ion trap*, da fonte de íons e da linha de transferência foram mantidas a 80, 220, 300 e 300 °C, respectivamente. O hélio foi também utilizado como o gás de amortecimento (*damping*) com um fluxo de 0,8 mL min⁻¹. No modo de varredura total, estabeleceu-se a faixa de massas de *m/z* 40 – 400, a 0,6 s / scan.

A identificação do DMT nas bebidas (tempo de retenção e comparação de espectro de massas) foi verificada com o material de referência. Para fins de quantificação, o intervalo de varredura foi restrito a *m/z* 57 - 59, que reflete a abundância dominante do íon imínio *m/z* 58, no espectro de massa do DMT.

6.4.f. Metodologia SPME

Amostras de 5 mL da bebida foram diluídas por um fator de 10 ou 25, a depender do nível de concentração do DMT na bebida original (ayahuasca ou vinho da jurema), adicionadas em frasco de 9 mL e, em seguida, seladas com uma tampa contendo um septo de silicone/PTFE. Esse frasco foi inserido em um bloco de alumínio para garantir aquecimento uniforme, a 60 °C.

Cada uma das amostras foi agitada a 900 rpm durante todo o processo. Após 10 minutos, necessários para o alcance da situação de equilíbrio entre a fase líquida e o *headspace*, a agulha do dispositivo manual para SPME penetrou o septo do frasco, sendo a fibra PDMS/DVB (65 µm) exposta à fase gasosa situada acima da amostra líquida, ou fase *headspace*. O tempo de extração foi de 70 min, seguido pela remoção da fibra SPME e inserção na porta de injeção do sistema GC-MS, durante um período de 5 min, para a dessorção dos analitos e limpeza da fibra. Procedimentos estatísticos foram realizados utilizando Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

7. Resultados e discussão

7.1. Preparo e caracterização de padrão analítico de *N,N*-dimetiltriptamina

7.1.a. Extração e purificação de *N,N*-dimetiltriptamina obtido a partir das cascas de *M. tenuiflora*

Para a extração do DMT a partir da matriz vegetal, foi utilizado um procedimento tradicional LLE para o isolamento de alcaloides indólicos, [Schripsema *et al.*, 2007]. Para tanto, 60 g do pulverizado, obtido da moagem da entrecasca seca da *M. tenuiflora*, receberam a adição de 300 mL de solução aquosa de HCl, 0,1 mol L⁻¹. Após permanecer em agitação contínua por 24 h, filtrou-se a vácuo, reservando o filtrado e reprocessando, da mesma forma, o resíduo obtido por mais duas vezes.

O filtrado acumulado (aproximadamente 900 mL) foi transferido para um funil de separação de 2 L, no qual recebeu três lavagens de 50 mL cada, com hexano grau HPLC, para eliminação de material apolar (graxas), como óleos vegetais. A fase aquosa foi então alcalinizada, com a adição lenta e gradual, de solução aquosa de NaOH, 0,1 mol L⁻¹. Próximo ao valor de pH 11, iniciou-se a adição de 100 g carbonato de sódio desidratado, Na₂CO₃. A alcalinização altera a coloração da fase aquosa, antes translúcida e vermelha, passando a uma cor pardo-acinzentado.

Com pH final ajustado em 12, prosseguiu-se a extração com hexano. Os alcaloides em meio alcalino, predominam na forma de bases livres sendo, portanto, facilmente solúveis em líquidos de baixa polaridade. Assim, a fase aquosa alcalinizada foi então acomodada em funil de separação e juntada a 50 mL de hexano, grau HPLC.

A mistura foi levemente agitada, aguardando-se um pequeno intervalo de tempo para a separação das fases. A fase aquosa foi escoada e recuperada para as extrações seguintes. A solução dos alcaloides em hexano foi reservada. Após a repetição desse passo, com mais 5 lavagens de 50 mL de hexano, toda a fase orgânica foi concentrada em rotoevaporador, até a redução de 95% do volume da fase líquida.

O concentrado foi resfriado a 4°C, verificando-se a formação de cristais levemente amarelados, pesando 421,4 mg. Para a purificação do DMT, foi adotado um procedimento de recristalização em hexano. A massa total foi dissolvida em 10 mL de hexano, a 45 °C, e lentamente resfriada, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Durante a dissolução da massa bruta em hexano, percebeu-se a formação de duas fases. A menos densa, incolor, continha DMT dissolvido em hexano. A outra, um óleo amarelo mais denso do que a mistura hexano/DMT, foi separado para posterior análise.

Após 6 horas em descanso, a mistura saturada hexano/DMT foi armazenada à temperatura de -5 °C, com gradual aumento da quantidade de cristais brancos que, após secos, apresentaram massa igual a 181,0 mg.

Com efeito, a análise das frações amarela e branca dissolvidos em hexano (Figura 11), por GC-MS, geraram o mesmo pico (Figura 12), com espectro de massas característico para aquele alcaloide, revelando tratar-se de *N,N*-dimetiltriptamina. As duas frações foram então analisadas por diversas outras técnicas, comprovando a presença de DMT, com alto nível de pureza, em ambas as formas isoladas.

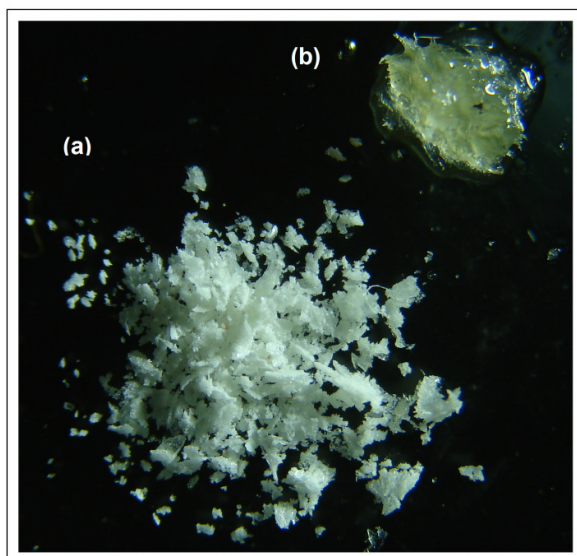


Figura 11. Fotografia das frações branca e amarela de *N,N*-dimetiltriptamina, isolado das cascas de *M. tenuiflora*. (a) Fração branca e (b) fração amarela. Foto: Alain Gaujac

Por questões práticas, a fração branca (Figura 11a) foi utilizada como padrão analítico. Devido à alta viscosidade do líquido amarelo presente na outra fração (Figura 11b), essa se apresentou pouco propícia para pesagem, uma vez que a superfície do material facilmente aderiria à microespátula. Talvez o fato se deva à presença DMT no estado líquido, dado o baixo ponto de fusão da fração amarela, ou tenha sido causado pela presença de DMT em estado amorfo misturado aos cristais.

Adicionalmente, a forma amarela apresenta maior densidade que a fração branca. Analisando a solubilidade das duas frações em solventes com diferentes polaridades, percebeu-se que a forma amarela forma-se, preferencialmente, a partir da cristalização do DMT dissolvido em acetonitrila. A forma branca é produzida pela cristalização em hexano, muito embora, obtenha-se também a fração amarela, como foi anteriormente relatado. A solubilidade do DMT em acetonitrila, ou em metanol, é maior do que em hexano. Fotos do processo de isolamento e purificação do DMT, assim como fotos dos cristais brancos feitas em microscópio podem ser verificados nas figuras 13, 14 e 15.

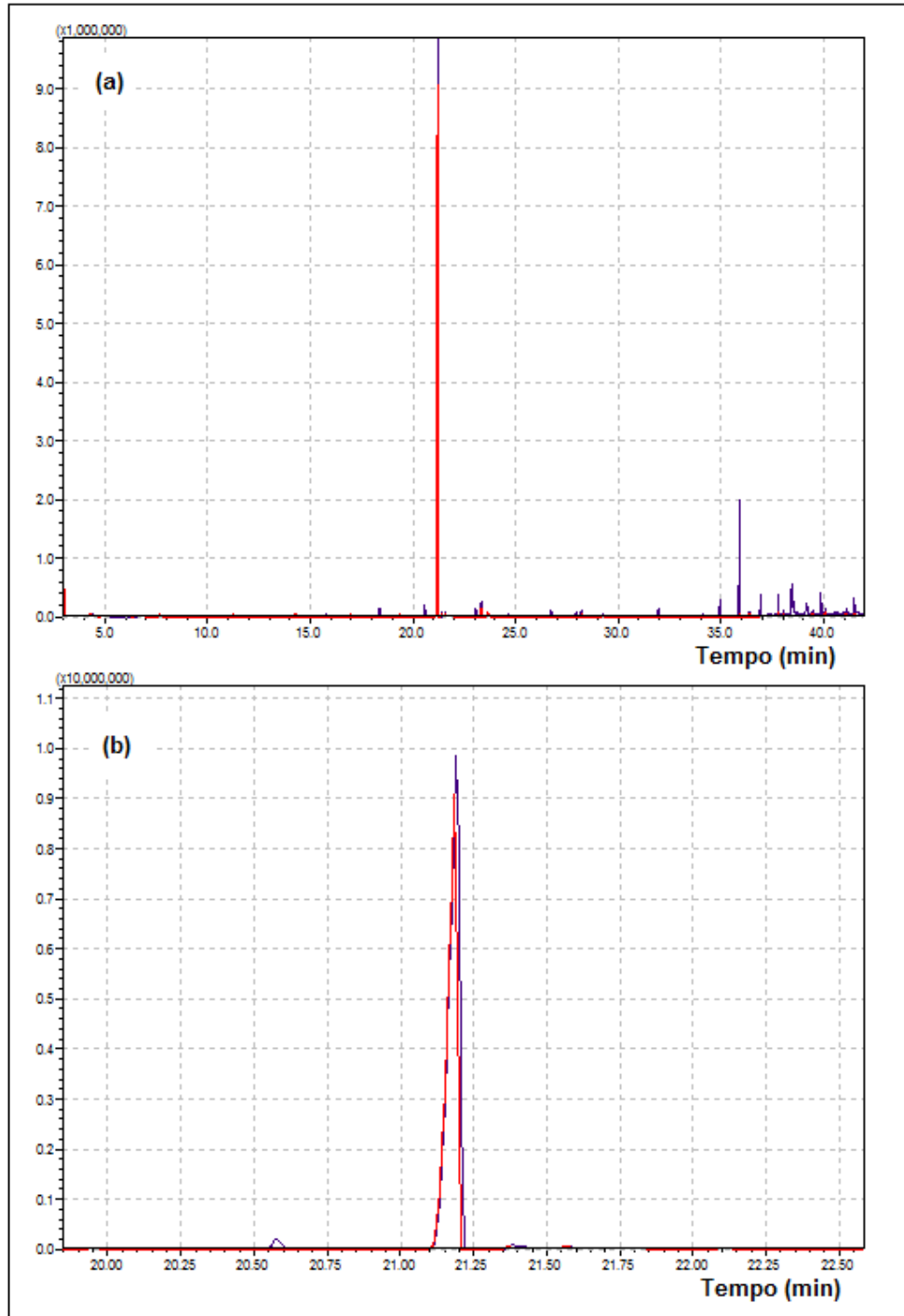


Figura 12. Cromatograma da análise do DMT isolado da *M. tenuiflora*. (a) Cromatograma de análise das frações branca (em azul) e amarela (em vermelho), por GC-MS; (b) Detalhe do pico do DMT, em 21,2 min.



Figura 13. Fotos do processo de isolamento do DMT a partir da *M. tenuiflora*. (a) Cascas da raiz de *M. tenuiflora*; (b) Cascas secas em estufa com ar circundante; (c) Cascas moídas e secas; (d) Cascas em solução ácida (pH 2); (e) Extratos aquosos de *M. tenuiflora* (vinho da jurema); (f) DMT impuro obtido pela cristalização em hexano. Nota-se a presença das frações amarela e branca. Fotos: Alain Gaujac

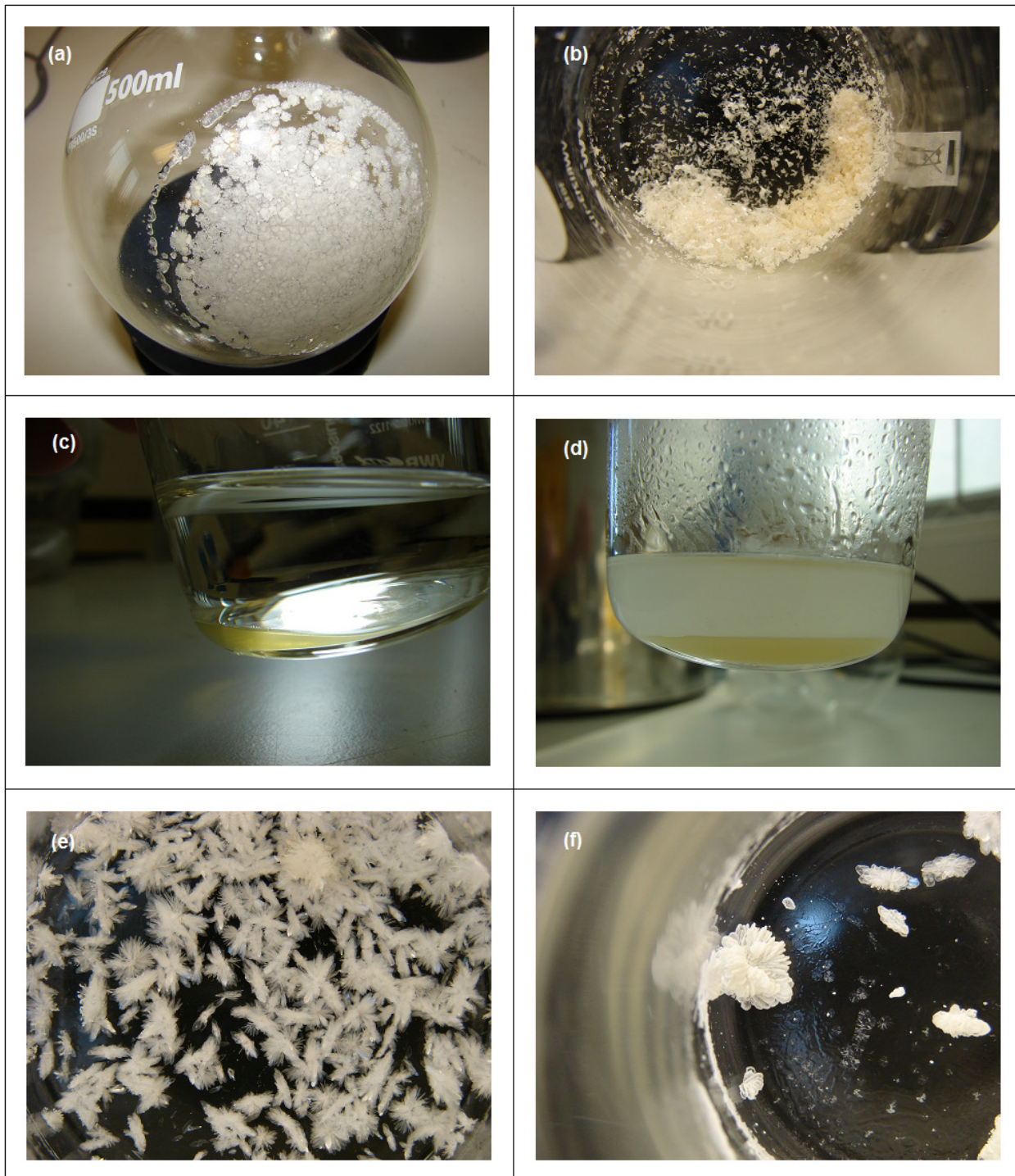


Figura 14. Fotos do processo de purificação do DMT obtido a partir da *M. tenuiflora*. (a) Cristais impuros de DMT; (b) Produtos brutos de diferentes extrações de DMT, no mesmo copo *Beaker*. Nota-se a diferença de coloração entre os cristais obtidos; (c) e (d) Processo de recrystalização do DMT em hexano. Nota-se a presença da fração amarela, mais densa e, na camada superior, a fração branca dissolvida em hexano; (e) e (f) Cristais de DMT purificados ($P > 95\%$). Fotos: Alain Gaujac

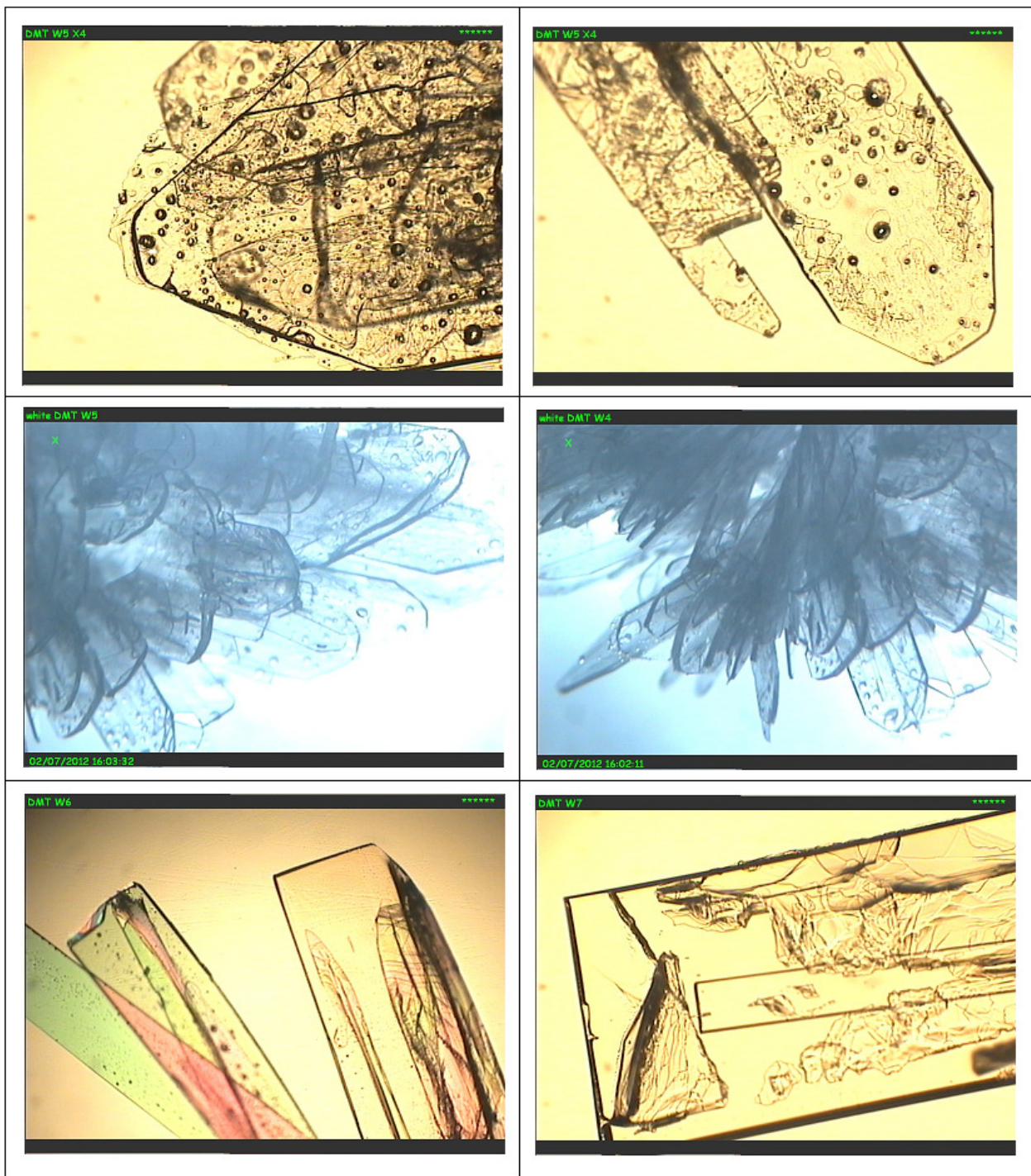


Figura 15. Microfotografias dos cristais presentes na fração branca isolada da *M. tenuiflora*.
Fotos: Nicola Dempster

7.1.b. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Uma alíquota do composto isolado foi analisada por GC- MS no modo *full scan*, e mostrou um pico característico em 21,2 min. Para confirmar a identidade do composto, o espectro do pico (Figura 16a) foi comparado com os espectros disponíveis na biblioteca Wiley (Palisade Corporation, New York, EUA). Houve 98% de semelhança entre os espectros, e o íon m/z 130 foi selecionado para a espectrometria de massas no modo *tandem*. O espectro de massas obtido para a fragmentação do íon m/z 130 pode ser visto na figura 16b e o seu mecanismo sugerido é apresentado na figura 17. Algumas destas etapas foram também descritas por Khuzhaev *et al.* (1996), em estudos envolvendo outros alcaloides indólicos.

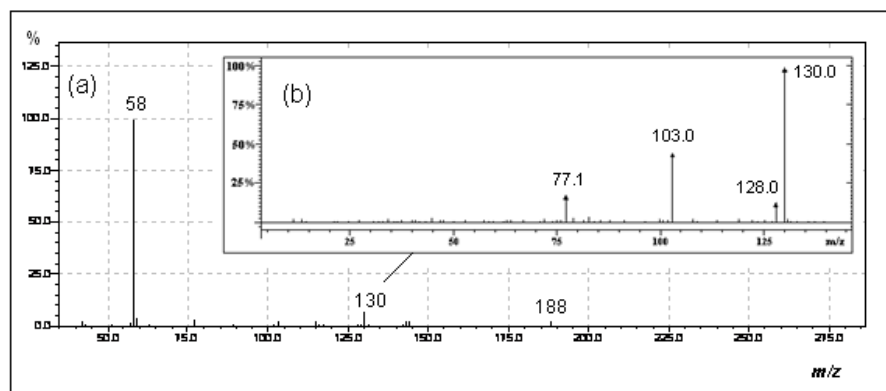


Figura 16. Espectros de massas. (a) Espectro de massas para o DMT (b) Espectro gerado pela fragmentação do íon m/z 130.

7.1.c. Inserção direta da amostra no espectrômetro de massas

A inserção direta dos cristais brancos no espectrômetro de massas resultou em um espectro com pico do íon molecular para m/z 188, e pico base m/z 58. Estes e outros picos, como o m/z 130, são os mesmos presentes no espectro fornecido pela base de dados NIST Mass Spectral, para o DMT.

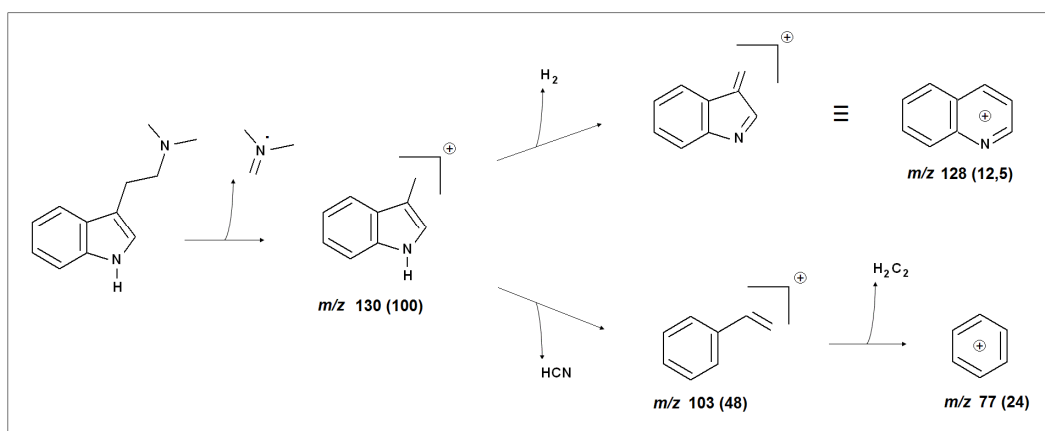


Figura 17. Mecanismo de fragmentação do íon m/z 130.

7.1.d. Análises por ressonância magnética nuclear

A estrutura molecular do DMT pode ser observada na figura 18. Os valores dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$, ppm) foram os seguintes: 2,39 [s, 6H, $N(CH_3)_2$]; 2,69 [br, t, 2H, $J \approx 7,0$; $CH_2CH_2N(CH_3)_2$]; 3,00 [br, t, 2H, $J \approx 7,0$, $CH_2N(CH_3)_2$]; 6,98 [br, s, 1H, C_H]; 7,10–7,39 [3H, m, Ph]; 7,65 [1H, d, $J = 7,5$, H_4Ph]; e 8,49 [br, s, 1H, NH], para a fração branca do DMT (Figura 19a).

Para a fração amarela (Figura 19b): 2,36 [s, 6H, $N(CH_3)_2$]; 2,66 [br, t, 2H, $J \approx 7,0$; $CH_2CH_2N(CH_3)_2$]; 2,97 [br, t, 2H, $J \approx 7,00$, $CH_2N(CH_3)_2$]; 7,01 [br, s, 1H, C_H]; 7,12–7,37 [3H, m, Ph]; 7,65 [1H, d, $J = 7,5$, H_4Ph]; e 8,48 [br, s, 1H, NH]. Esses valores estão em acordo com dados encontrados na literatura [Pires *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2010].

A tabela 7 compara os dados de RMN de ^{13}C obtidos para as frações branca e amarela do DMT isolado a partir da *M. tenuiflora*, com valores previamente descritos para esse composto [Vitale *et al.*, 2011; Brandt *et al.*, 2005; Buchanan, *et al.*, 2007, Pires *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2010]. Os espectros podem ser observados na figura 20.

Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C para as frações amarela e branca.

Carbono	Deslocamentos químicos		
	Valores de referência	Valores observados	
		Fração branca	Fração amarela
C_2	122,8 ^a	122,01	122,01
C_3	112,9 ^a	114,37	114,36
C_{3a}	127,6 ^a	127,67	127,86
C_4	118,5 ^a	118,94	118,94
C_5	118,6 ^a	119,28	119,27
C_6	121,1 ^a	121,79	121,79
C_7	111,7 ^a	111,36	111,36
C_{7a}	136,5 ^a	136,55	136,54
C_β	23,7 ^b	23,86	23,86
C_α	60,4 ^b	60,53	60,52
C_8, C_9	45,5 ^b	45,61	45,81

^a ref. [Brandt *et al.*, 2005]; ^b ref. [Vitale *et al.*, 2011]

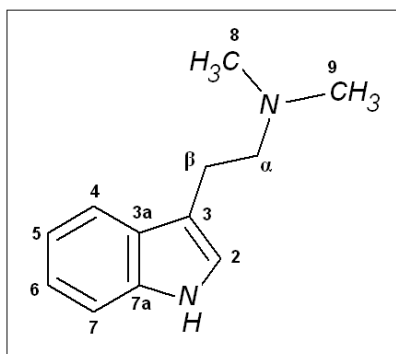


Figura 18. Estrutura molecular do DMT.

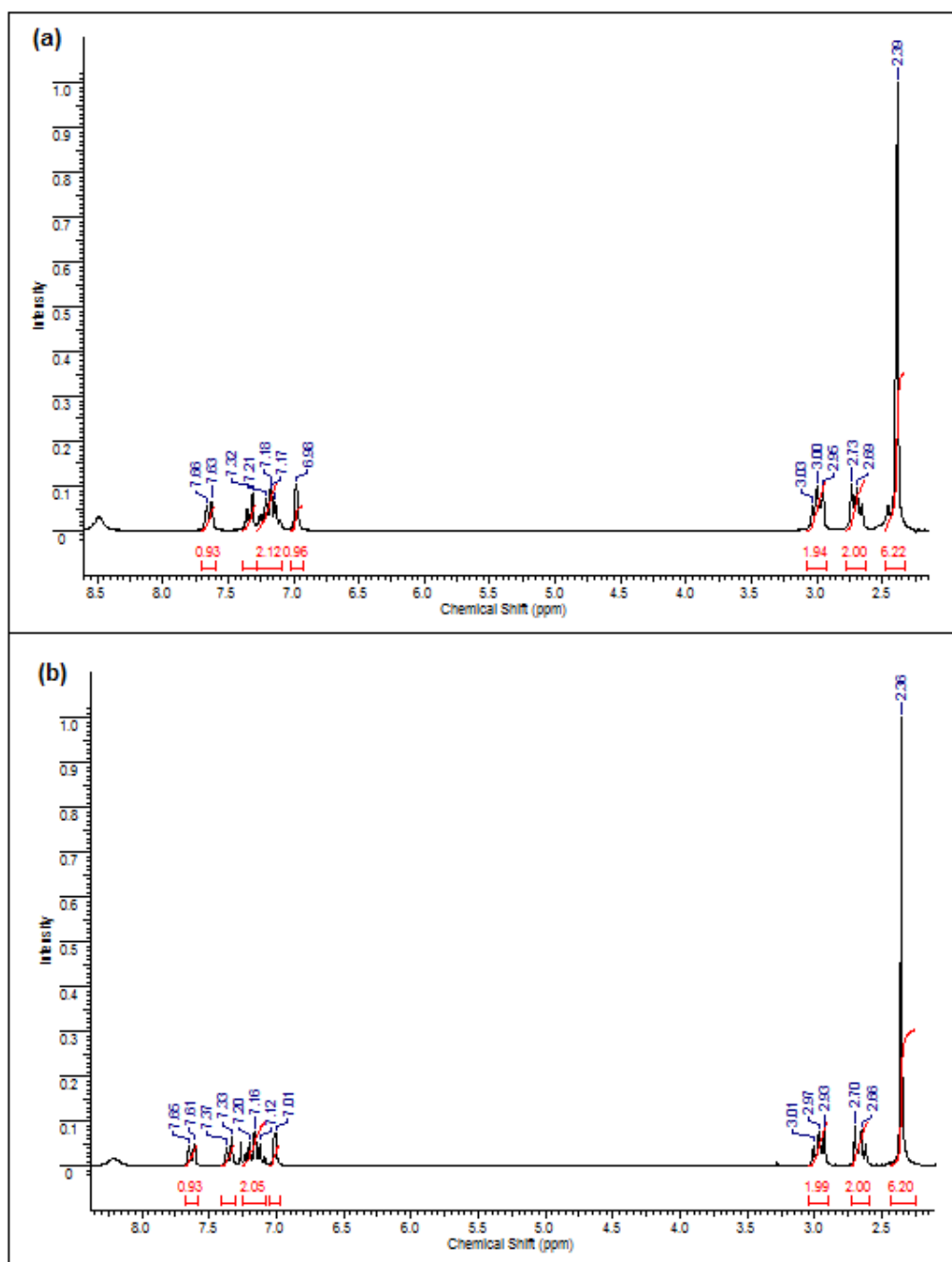


Figura 19. Deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^1H . (a) fração branca e (b) fração amarela.

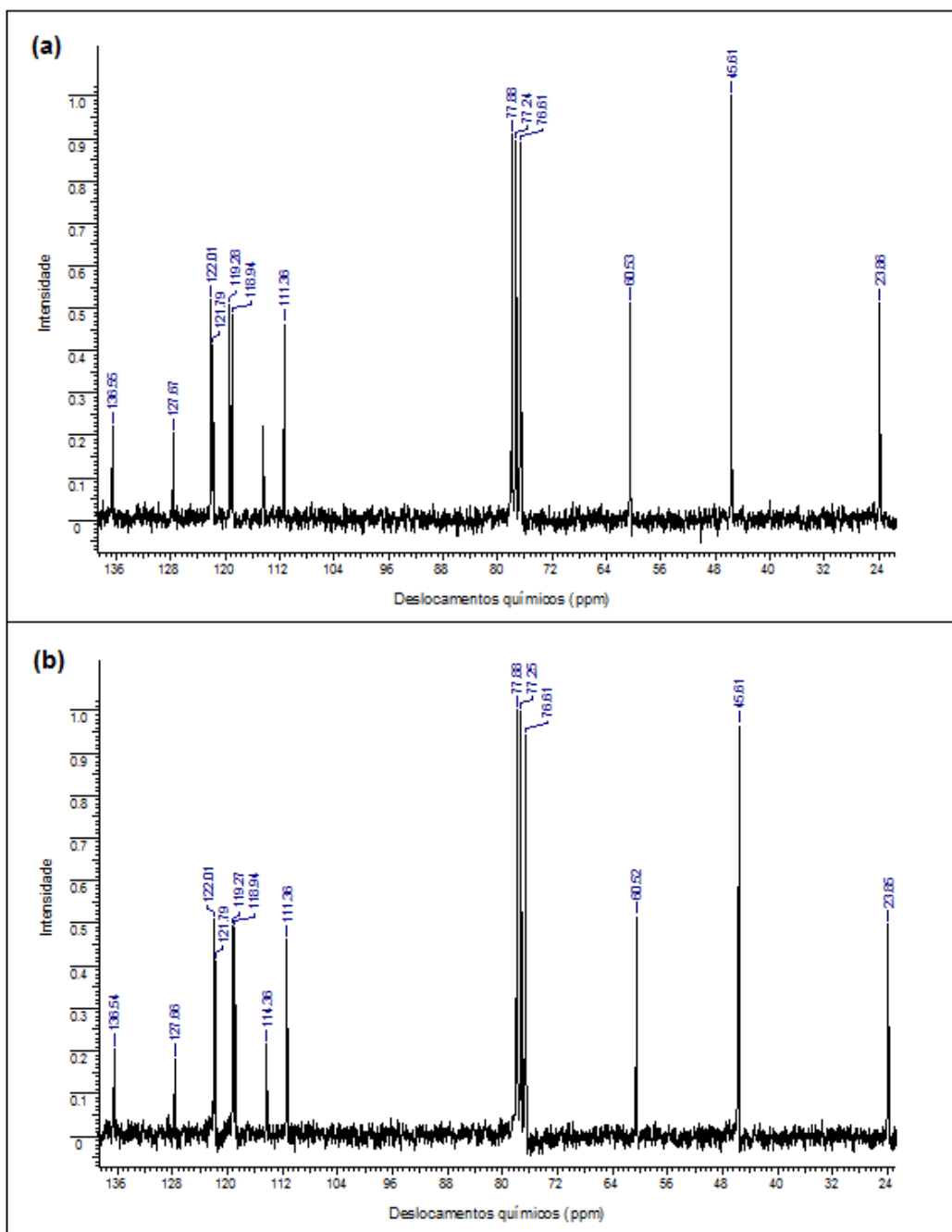


Figura 20. Deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C . (a) fração branca e (b) fração amarela.

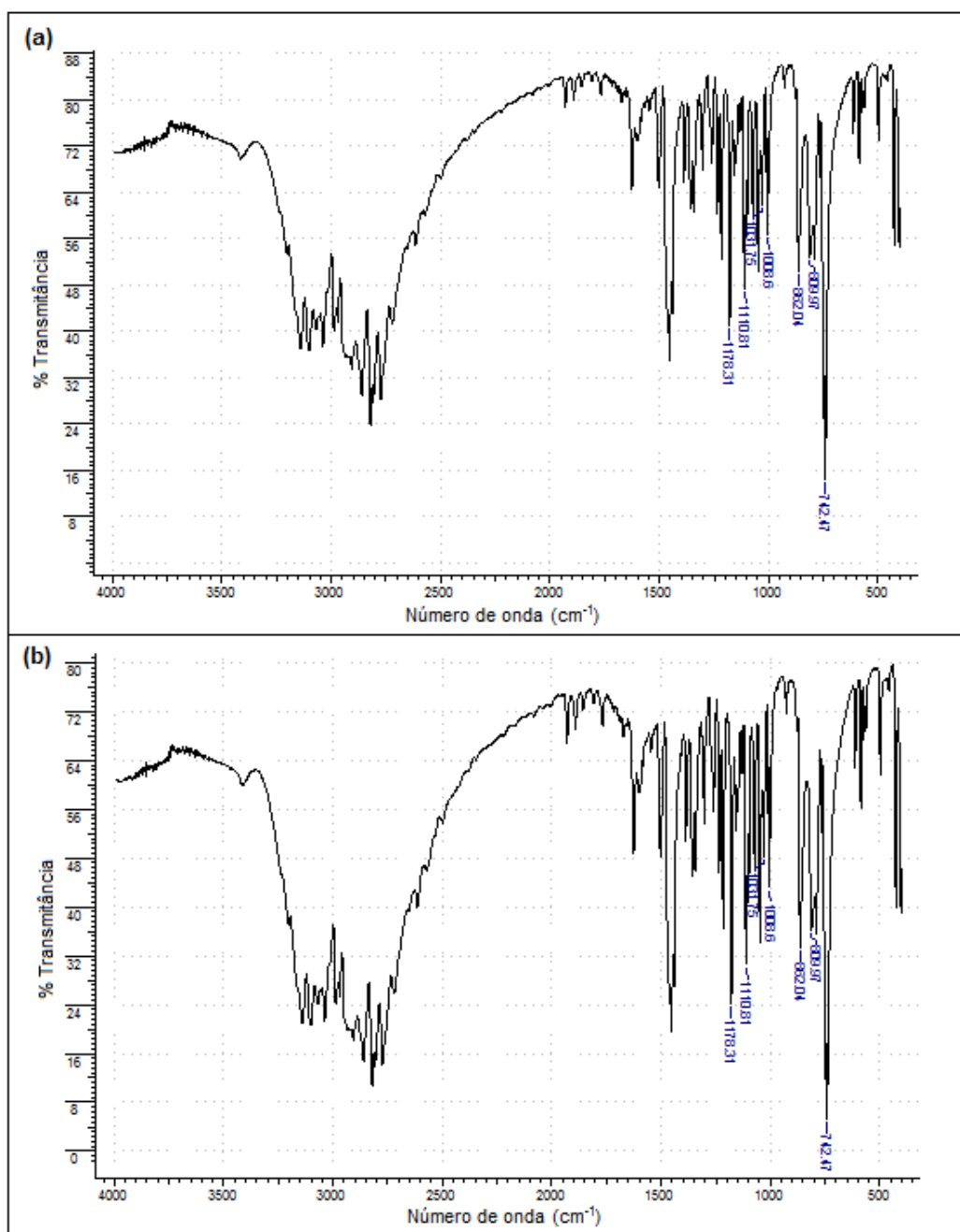


Figura 21. Espectro de infravermelho para o DMT. (a) fração branca e (b) fração amarela.

7.1.e. Espectroscopia no infravermelho

O espectro de infravermelho, obtido para ambas as frações, branca (Figura 21a) e amarela (Figura 21b), mostrou picos a 742, 809, 862, 1008, 1031, 1110, e 1178 cm^{-1} , dados que estão em excelente concordância com os valores da literatura [Shulgin & Shulgin, 1997; Laing & Siegel, 2003].

7.1.f. Medidas de ponto de fusão em tubos capilares

O ponto de fusão da fração branca, recristalizada em hexano, medido por observação do aquecimento desses cristais em tubos capilares, foi de 55,5 °C, semelhante a outros dados anteriormente reportados (53,5-57,5 ° C) [Arthur *et al.*, 1967]. Do mesmo modo, para a fração amarela, o ponto de fusão observado foi igual a 45 °C. Importante ressaltar que a literatura descreve grandes diferenças para os pontos de fusão do DMT, variando no intervalo de 38 a 73 °C (Tabela 8). Observou-se ainda que, apesar do estudo desenvolvido por Falkenberg (1972) sobre a estrutura molecular e cristalina do DMT, ainda nenhum estudo científico havia demonstrado evidências de polimorfismo cristalino para o DMT [Shulgin & Shulgin, 1997].

Tabela 8. Pontos de fusão reportados na literatura para o DMT.

Pontos de fusão (°C)	Solventes de cristalização	Comentários	Referências
38–40	–	Sólido amorfo de cor clara	Whitney <i>et al.</i> (2007)
39–44	–	Sólido branco	Grina <i>et al.</i> (1982)
44	Éter de petróleo	–	Rovelli & Vaughan (1967)
44–45	–	–	Sintas & Vitale (1967)
44,6–46,8	–	–	Hochstein & Paradies (1957)
45	Hexano	–	Julia <i>et al.</i> (1973)
45	Éter de petróleo	–	Culvenor <i>et al.</i> (1964)
45,5–46,8	Metanol	–	Meckes-Lozoya <i>et al.</i> (1990)
45,8–46,8	Xileno	Agulhas finas	Gonçalves de Lima (1946)
45–47	–	Cristais amarelados	Wisconsin Alumni Research Foundation <i>et al.</i> (2010)
45–49	–	–	Hall <i>et al.</i> (1967)
45–47	–	Cristais incolores	Häfelinger <i>et al.</i> (1999)
45–47	Hexano	Cristais incolores	Wenkert and Kryger (1978)
46	Etanol/ Éter de petróleo	Placas	Fleming & Woolias (1979)
46–47	Hexano	–	Fitzgerald & Sioumis (1965)
47	–	–	Ghosal & Mukherjee (1964)
47	–	Agulhas finas	Manske (1931)
47	–	Sólido branco	Shulgin & Shulgin (1997)
47–48	–	–	Heinzelman & Szmuszkovicz (1963)
47–49	Hexano	–	Fish <i>et al.</i> (1956)
48–49	Hexano	Prismas incolores	Ueno <i>et al.</i> (1978)
48,5–49	Éter de petróleo	Agulhas incolores	Ueno <i>et al.</i> (1978)
48–49	Ac. de etila/Éter de petróleo	–	Bodendorf & Walk (1961)
48–49	Hexano/Acetato de etila	–	Pachter <i>et al.</i> (1959)
48–49	–	–	Boit (1961)
49	Éter de petróleo	Prismas incolores	Morimoto & Matsumoto (1966)
49	Éter de petróleo	Prismas incolores	Morimoto & Oshio (1965)
49–50	–	Sólido cristalino branco	Shulgin (1976)
49–50	Éter etílico/Éter de petróleo	Agulhas incolores	Hoshino & Shimodaira (1935)
53,5–57,5	Hexano	–	Arthur <i>et al.</i> (1967)
57	Hexano	–	Poisson (1965)
57	Hexano	–	Kan-Fan <i>et al.</i> (1970)
57,5–58,5	Hexano	–	Fitzgerald & Sioumis (1965)
57–59	–	Sólido cristalino	Shulgin & Shulgin (1997)
58,2	–	Agulhas transparentes	Bergin <i>et al.</i> (1968)
64	Hexano/Ac. de etila (80:20)	Cristais brancos	Moura <i>et al.</i> (2010)
65,5	–	Prismas hexagonais incolores	Falkenberg (1972)
67	Hexano	Cristais brancos	Shulgin & Shulgin (1997)
67–68	Hexano	–	Shulgin & Shulgin (1997)
71–73	Hexano	–	Fish <i>et al.</i> (1956)

7.1.g. Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta

A fim de determinar o grau de pureza dos cristais brancos de DMT isolado das cascas da *M. tenuiflora*, partimos do princípio de que a triptamina, a 290 nm, apresenta a mesma absorvidade molar que a *N,N*-dimetiltriptamina, a 275 nm, quando esses compostos estão dissolvidos em metanol (de Moraes *et al.*, 1990).

Foram construídas curvas de absorção para a triptamina e para o DMT, no intervalo de 200 a 380 nm, empregando-se as soluções dos alcaloides em concentração de 0,0125 mg mL⁻¹. Os dados estão plotados na figura 22a. Apesar das soluções de triptamina e DMT analisadas não apresentarem, exatamente, a mesma concentração molar, pode-se perceber grande proximidade entre os valores de absorbância para o DMT, a 275 nm, e para a triptamina, em 290 nm (Figura 22b).

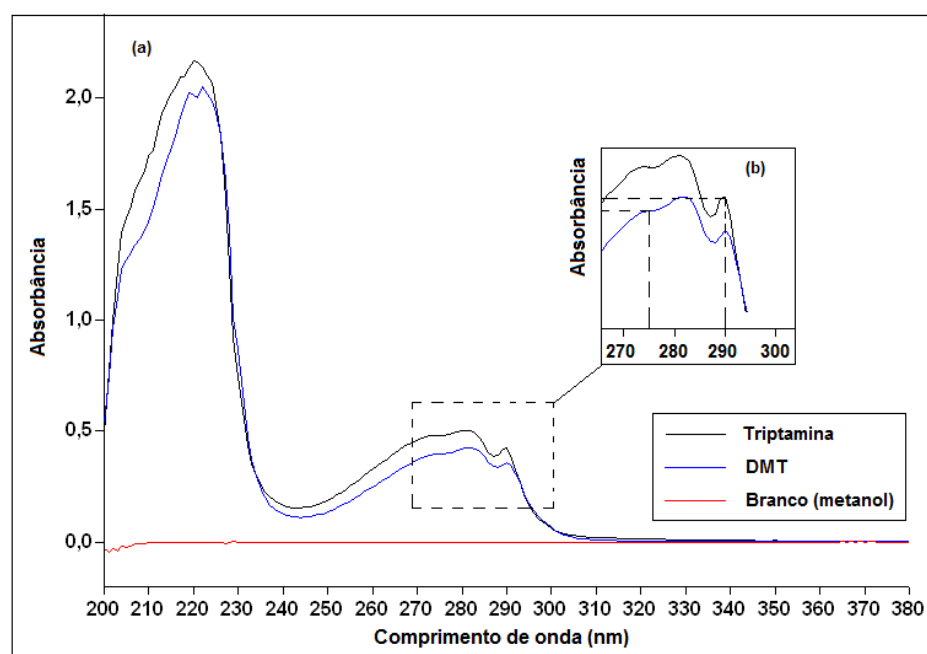


Figura 22. Curvas de absorção para a triptamina e para o DMT. (a) Espectro de absorção molecular de soluções a 0,0125 mg mL⁻¹ de triptamina (preto) e DMT (azul). (b) Detalhe da absorção na região de 270 a 300 nm.

A pequena diferença entre os valores de absorbância observados no detalhe deve-se ao fato de que, no momento da realização desse ensaio, não se conhecia, exatamente, o teor de DMT nos cristais brancos isolados. Portanto, para a solução de

DMT, a concentração de $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$ era um valor apenas estimado, porém próximo ao valor real.

Dessa forma, construiu-se uma curva de calibração para o padrão de triptamina ($y = 28,798x + 0,031$, $r = 0,9968$), a 290 nm, utilizando 11 soluções padrão desse alcaloide, e com posse desse dado, determinou-se o teor de DMT, a 275 nm, empregando a mesma curva. Os dados revelaram um teor de DMT igual a $100,19 \pm 4,91\%$ (ou seja, superior a 95%).

Isso foi confirmado pela construção de curvas analítica para o DMT, a 275 nm, utilizando-se a absorbância de oito soluções padrão de DMT, com concentrações entre $1,56 \times 10^{-3}$ e $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Uma excelente concordância foi verificada entre as equações obtidas para triptamina (Figura 23a), em 290 nm ($y = 28,798x + 0,031$, $r = 0,9968$) e para *N,N*-dimetiltriptamina, em 275 nm ($y = 29,844x + 0,015$, $r = 0,9998$) (Figura 23b).

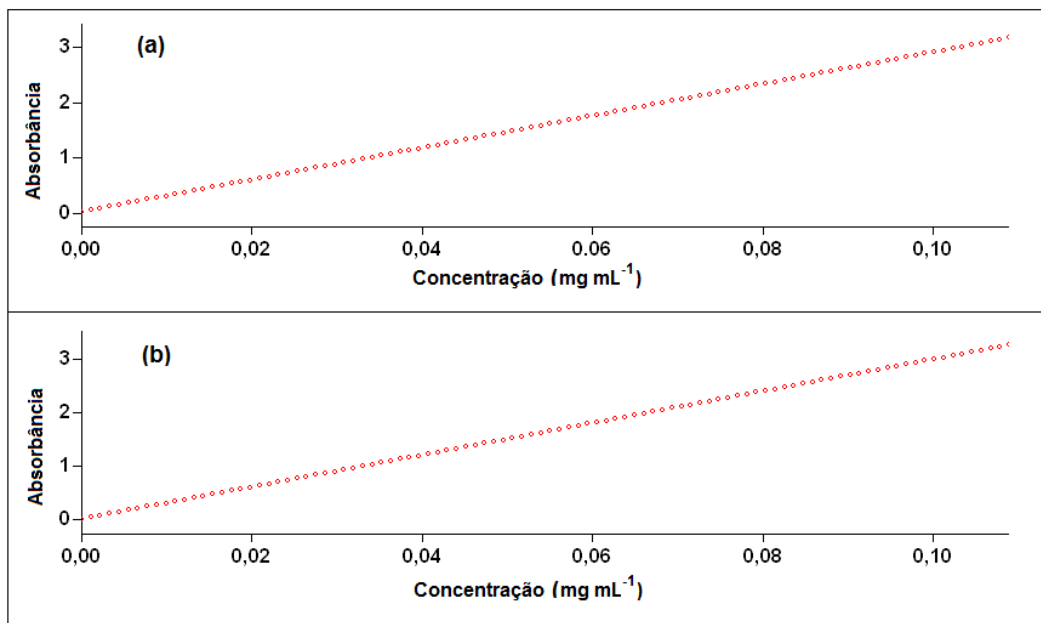


Figura 23. Curvas analíticas obtidas por espectrofotometria de absorção molecular. (a) Triptamina a 290 nm. (b) *N,N*-dimetiltriptamina, a 275 nm.

7.2. Estudos iniciais sobre as propriedades polimórficas de *N,N*-dimetiltriptamina por calorimetria diferencial de varredura e difração de Raios X

7.2.a. Análise termoanalítica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Uma vez tendo sido identificada a fração amarela como DMT de elevado nível de pureza, por GC-MS, RMN e IR (Figuras 12, 19-21), essa obtida conjuntamente com a fração branca, também constituída por DMT, com nível de pureza superior a 95% (Figura 11, 13-17), questionou-se sobre o motivo para a diferença marcante entre as propriedades físicas das duas frações. Por outro lado, havia grande divergência para os pontos de fusão reportados na literatura para o DMT (Tabela 8). Assim, atentou-se para a ocorrência de polimorfismo para este alcaloide.

A análise dos cristais presentes nas amostras W1, W2, Y1 e Y2 apresentaram dois endotermas, presentes em maior ou menor proporção, praticamente, em todas as análises. Haja vista o elevado grau de pureza do composto, maior que 95%, a presença dos endotermas nos dados gerados nas análises por DSC, inferiu uma grande possibilidade da existência de, ao menos, dois polimorfos para o DMT.

As figuras 24 e 25 mostram o efeito da variação da taxa de aquecimento, nos métodos por DSC, das amostras W1, W2, Y1 e Y2. As tabelas 9, 10, 11 e 12 fornecem os pontos de fusão e os dados termodinâmicos para as amostras W1, W2, Y1 e Y2, respectivamente. Os dois picos referentes às transições endotérmicas correspondem aos processos de fusão de duas formas polimórficas. Utilizando a classificação convencionalmente utilizada, o polimorfo de fusão mais elevado foi considerado a Forma I, enquanto que o polimorfo de fusão mais baixo foi denominado Forma II.

O emprego de maiores taxas de aquecimento nas análises por DSC permite evitar a conversão de um polimorfo em outro, durante o processo de aquecimento de uma dada amostra, o que proporciona uma varredura mais representativa do material original [Ford & Man, 2012]. As figuras 24a – 24e mostram a análise por DSC da amostra W1, obtida em hexano a partir de DMT preparado por síntese orgânica. Observando os dados da análise da amostra W1, à taxa de $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, figura 24e, pode-se constatar a presença dos dois picos endotérmicos, com temperatura de início de fusão igual a $47,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $58,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a Forma II e Forma I, respectivamente (Tabela 9).

O varrimento rápido, a $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, permitiu a fusão do polimorfo metaestável, Forma II, ainda antes de sua conversão na Forma I, tendo sido o processo isolado de qualquer recristalização. No outro extremo, considerando a menor taxa de aquecimento, $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, o aumento lento e gradual da temperatura favoreceu a conversão completa, da Forma II na Forma I. Assumindo conversão total, da Forma II para a Forma I, a $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, estimou-se a entalpia de fusão da Forma I em $91,9 \pm 2,4\text{ J g}^{-1}$.

Pode-se constatar que a análise da mesma amostra W1, à taxa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, novamente exhibe as duas endotermas, mas nesse caso, com uma exoterma posicionada entre estas, indicando que após a fusão da Forma II, ocorre um processo de recristalização que tem início antes do processo de fusão da Forma I (Figura 24c). Pode-se sugerir que parte do DMT líquido, provindo da fusão da Forma II, converta-se em cristais da Forma I. O mesmo fenômeno foi também observado nas análises das amostras W2, Y1 e Y2 (Figuras 24h, 25c e 25h).

Por outro lado, observando-se as curvas da segunda varredura, após o reaquecimento (Figuras 24a - 24e, curvas inferiores), à medida que se diminui a taxa de aquecimento, mais evidente se apresenta a exoterma de cristalização do material fundido para a Forma II, antes de sua fusão ocorrer entre 40 e $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Isso está de acordo

com a teoria termodinâmica que afirma que o polimorfo menos estável tende a cristalizar-se, preferencialmente, a partir do material fundido [Threlfall, 2003; Parmar et al., 2007]. Assumindo que a exoterma corresponda a 100% de conversão na Forma II, foi estimado o valor de $98,3 \pm 2,8 \text{ J g}^{-1}$ para a entalpia de fusão da Forma II.

Os espectros por DSC, obtidos na segunda varredura, também exibiram um processo de transição vítrea em temperaturas negativas, especialmente nas maiores taxas de aquecimento, indicando a capacidade do DMT em apresentar-se em estado amorfo. Após a primeira varredura, as amostras foram resfriadas a $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ e submetidas a mais um processo de aquecimento, utilizando a mesma taxa de aumento da temperatura. As temperaturas de transição vítrea (T_g) foram determinadas nas varreduras de reaquecimento (segunda varredura) (Tabelas 9-12).

A transição vítrea representa a transformação de um estado vítreo a um estado elastomérico [Bley *et al.*, 2009], ocorrendo na temperatura de transição vítrea, T_g . Essa transição é característica de sistemas amorfos ou semicristalinos e representa um ganho de mobilidade da fase desordenada. O material passa de um estado rígido desordenado para outro no qual suas moléculas possuem maior mobilidade e, macroscopicamente, algumas propriedades sofrem mudanças, como a capacidade calorífica e o coeficiente de expansividade térmica.

As figuras 24f a 24j mostram a análise por DSC de W2, amostra que foi cristalizada a partir de hexano, empregando o DMT extraído do material vegetal. A comparação dos scans obtidos a $100 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, para as amostras W1 e W2 (Figuras 24e e 24j) indicou que a amostra W2 continha, proporcionalmente, predomínio da Forma II. Com efeito, a $50 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, a análise da amostra indicada apresentou, quase exclusivamente, a fusão da Forma II (Figura 24i), mas a sua entalpia de fusão foi de $73,5 \pm 0,5 \text{ J g}^{-1}$, o que indicou que, ainda assim, havia alguma Forma I na amostra.

Os *scans* a 2, 10 e 20 °C min⁻¹ (Figuras 24f, 24g e 24h) confirmaram a prevalência da Forma II na amostra. Mais uma vez, também se confirmou a conversão da Forma II na Forma I, em menores taxas de aquecimento. Os valores da entalpia de fusão atestaram a maior proporção da Forma II, na amostra W2. Estimativas dos pontos de fusão das Forma I e II para W2 foram entre 42,8 a 46,9 °C, para a Forma II, e 56,1 a 58,4 °C, para a forma I (Tabela 10). Os valores não são muito diferentes aos encontrados para a amostra W1 (Tabela 9).

As curvas de reaquecimento para a amostra W2 (Figuras 24f - 24j) mostram uma tendência similar à obtida para W1, exceto pelo fato de que a cristalização exotérmica estava mais próximo da posição do pico endotérmico de fusão para a Forma II, o que indica que a recristalização na Forma II, para a amostra W2, não foi tão facilmente alcançada, como o ocorrido para a amostra W1. Isto é evidenciado pelas baixas entalpias de fusão da amostra W2, sob reaquecimento (Tabela 10), em comparação com aqueles da amostra W1 (Tabela 9). As razões para a dificuldade de recristalização na Forma II não foram compreendidas, uma vez que o aquecimento inicial deveria destruir a história térmica da amostra. Em resumo, ambas as amostras, W1 e W2, eram misturas de formas polimórficas, cujos pontos de fusão refletem aqueles reportados na literatura. Por outro lado, também justifica a discrepância entre os valores relatados por diversos pesquisadores, ao longo de oito décadas (Tabela 8).

As duas amostras adicionais de DMT, Y1 e Y2, cristalizadas a partir da acetonitrila, foram submetidas à semelhantes condições experimentais, tendo sido estudadas macroscopicamente e microscopicamente. As amostras Y1 e Y2 apresentavam cor amarela e possuíam maior densidade que as amostras W1 e W2. Além disso, aparentavam ser menos cristalinas quando observadas em microscópio.

A amostra Y1 apresentou comportamento semelhante à amostra Y2, sob as mesmas condições de análise por DSC. A figura 25e mostra preponderância da Forma II na amostra Y1, como pode ser observado para a taxa de aquecimento de $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Por outro lado, a amostra Y2, nas mesmas condições de análise, apresentava maior proporção da Forma I (Figura 25j).

Verificou-se a mesma tendência de conversão da Forma II na Forma I, à medida que era diminuída a taxa de aquecimento. Os pontos de fusão para as Formas II e I, obtidos a partir das varreduras da amostra Y1 nas taxas de aquecimento selecionadas, foram estimadas entre $44,8 - 47,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $56,4 - 58,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Tabela 11). Para Y2, as faixas de PF da Forma II e Forma I foram $43,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $47,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $55,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $58,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Tabela 12). As entalpias de fusão para a amostra Y2, obtidas na varredura inicial, foram menores que as encontradas para as outras amostras e confirmou que Y2 era a amostra com maior teor de DMT amorfo e, proporcionalmente, a que continha o nível mais elevado de Forma I do DMT.

Com relação à cor amarela das amostras Y1 e Y2, levantaram-se duas hipóteses:

i) a cor se devia à presença de impurezas, incluindo o próprio solvente de cristalização, no caso a acetonitrila. ii) o amarelo era causado pela presença de DMT amorfo misturado aos cristais dos dois polimorfos.

O efeito da taxa de aquecimento sobre os valores de T_g observados é mostrado nas Tabelas 9-12. O valor aparente da T_g , de modo geral, aumentou com o crescimento da taxa de aquecimento, fenômeno reconhecido para outros materiais vítreos [Buckton *et al.*, 2006]. Apesar disso, as semelhanças nos valores de T_g para as quatro amostras, numa mesma taxa de aquecimento, exclui a possibilidade da presença de impurezas. Os dados sugerem assim que a causa da cor amarela, em Y1 e Y2, seja devido à presença de DMT amorfo nas amostras.

Tabela 9. Dados de DSC obtidos para a amostra W1 ($n=3$).

Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Varredura inicial				Tg ($^{\circ}\text{C}$)	Segunda varredura			
	Forma II		Forma I			Forma II		Forma I	
	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})		Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})
2	44,8 \pm 0,1	10,0 \pm 3,4	58,4 \pm 0,1	91,9 \pm 2,4	- 21,8 \pm 0,9	46,5 \pm 0,1	98,3 \pm 2,8	58,6	11,1
10	46,2 \pm 0,1	26,1 \pm 1,3	57,8 \pm 0,1	86,8 \pm 1,3	- 19,2 \pm 0,4	45,6 \pm 0,1	51,8 \pm 9,9	st	st
20	46,7 \pm 0,1	23,0 \pm 2,1	58,3 \pm 0,1	85,2 \pm 21,1	- 18,5 \pm 0,4	45,9 \pm 0,1	12,1 \pm 3,6	st	st
50	46,7 \pm 0,3	42,5 \pm 4,6	57,7 \pm 0,1	57,9 \pm 7,0	- 16,7 \pm 0,1	st*	st	st	st
100	47,5	29,2	58,3	76,1	- 13,0	st	st	st	st

* st= sem transição

Tabela 10. Dados de DSC obtidos para a amostra W2 ($n=3$).

Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Varredura inicial				Tg ($^{\circ}\text{C}$)	Segunda varredura			
	Forma II		Forma I			Forma II		Forma I	
	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})		Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})
2	42,8 \pm 2,0	18,0 \pm 6,0	57,3 \pm 0,6	83,8 \pm 0,7	- 21,5	46,5 \pm 0,1	98,3 \pm 2,8	45,1	87,7
10	44,5 \pm 0,3	43,8 \pm 6,7	56,1 \pm 0,4	64,1 \pm 6,7	- 20,0 \pm 0,3	44,6 \pm 0,0	10,9 \pm 3,7	st	st
20	45,2 \pm 0,4	58,4 \pm 17,9	56,8 \pm 0,4	42,1 \pm 15,6	- 18,5 \pm 0,3	45,1 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	st	st
50	45,3 \pm 0,2	73,5 \pm 0,5	57,1 \pm 0,3	0,5 \pm 0,4	- 16,3 \pm 0,4	st*	st	st	st
100	46,9	83,4	58,4	24,9	- 12,8	st	st	st	st

* st= sem transição

Tabela 11. Dados de DSC obtidos para a amostra Y1 ($n=1$).

Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Varredura inicial					Segunda varredura			
	Forma II		Forma I		Tg ($^{\circ}\text{C}$)	Forma II		Forma I	
	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})		Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})
2	44,8	32,3	58,8	79,5	-20,8	45,6	92,1	st*	st
10	44,9	29,9	56,9	79,7	-18,8	44,9	39,6	st	st
20	45,1	32,5	57,5	69,4	-17,8	45,4	12,1	st	st
50	45,0	22,8	56,4	38,4	-16,5	st	st	st	st
100	47,2	39,3	58,8	23,6	-12,0	st	st	st	st

* st= sem transição

Tabela 12. Dados de DSC obtidos para a amostra Y2 ($n=1$).

Taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Varredura inicial					Segunda varredura			
	Forma II		Forma I		Tg ($^{\circ}\text{C}$)	Forma II		Forma I	
	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})		Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Início da fusão ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})
2	st	St	56,8	59,5	-20,6	45,0	92,7	57,1	21,7
10	43,8	15,8	56,5	69,8	-19,5	44,8	24,3	st	st
20	44,1	19,9	56,5	71,8	-17,5	45,2	2,1	st	st
50	44,3	7,1	55,6	50,4	-16,4	st	st	st	st
100	47,9	5,7	58,5	49,0	-12,4	st	st	st	st

* st= sem transição

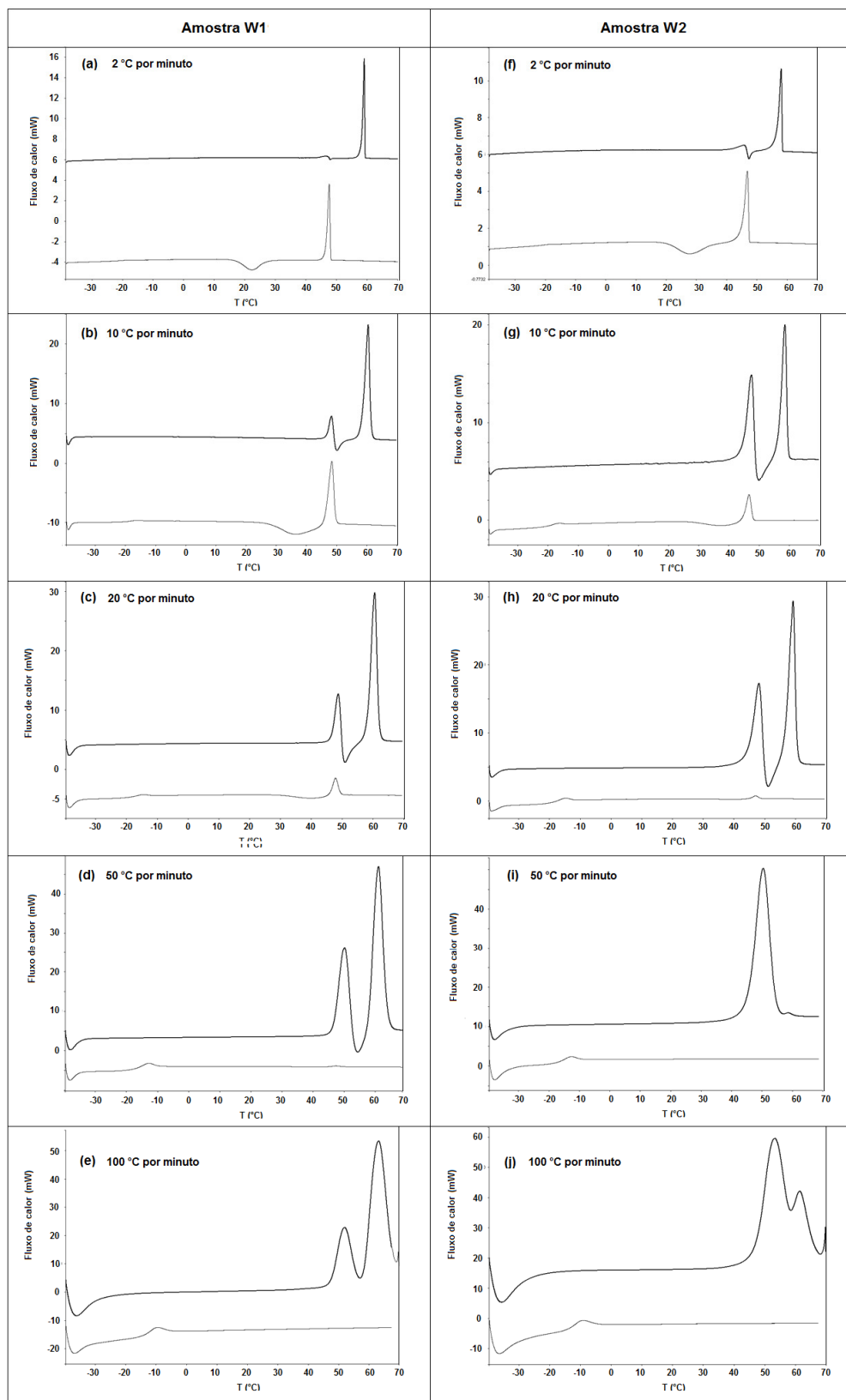


Figura 24. Espectros por DSC de amostras da fração branca, amostras W1 e W2, mostrando a varredura inicial (curva superior) e a segunda varredura (curva inferior) nas taxas de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (a), $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (b), $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (c), $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (d), $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (e), para a amostra W1. Para a amostra W2: $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (f), $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (g), $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (h), $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (i), $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (j).

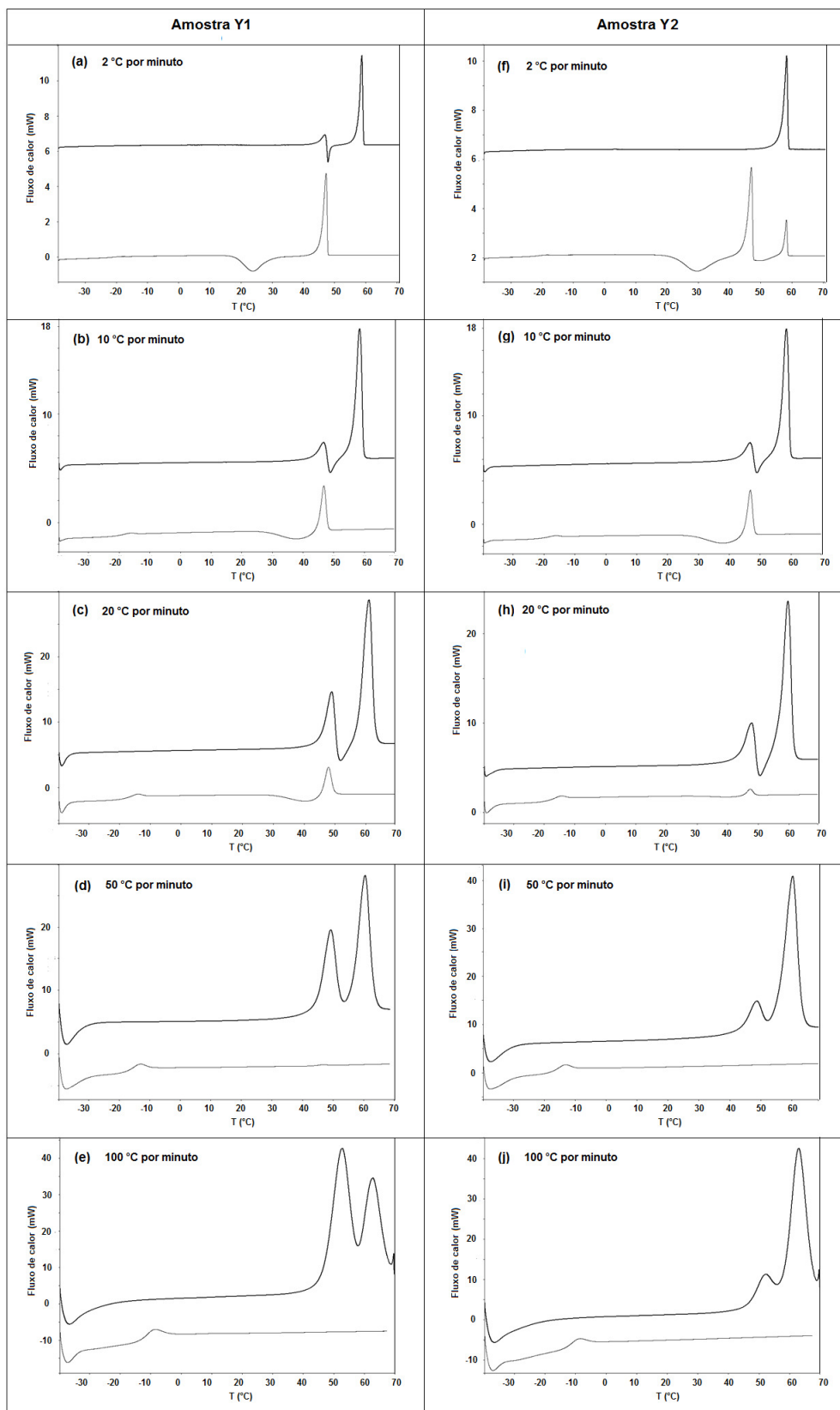


Figura 25. Espectros por DSC de amostras da fração amarela, amostras Y1 e Y2, mostrando a varredura inicial (curva superior) e a segunda varredura (curva inferior) nas taxas de 2 °C min^{-1} (a), 10 °C min^{-1} (b), 20 °C min^{-1} (c), 50 °C min^{-1} (d), 100 °C min^{-1} (e), para a amostra Y1. Para a amostra Y2: 2 °C min^{-1} (f), 10 °C min^{-1} (g), 20 °C min^{-1} (h), 50 °C min^{-1} (i), 100 °C min^{-1} (j).

7.2.b. Difração de Raios X

Ensaio por difração de Raios X foram realizados com o intuito de comprovar a existência de polimorfismo para *N,N*-dimetiltriptamina. As amostras W1, W2, Y1 e Y2 foram utilizadas sem tratamento adicional para as análises, exceto quando foram trituradas para determinar o efeito da moagem na alteração da sua natureza física. A moagem de amostras de DMT foi realizada manualmente, utilizando um almofariz de ágata e pistilo, com duas diferentes intensidades de moagem: i) leve e breve moagem e ii) moagem intensa por 60 s.

Os dados obtidos a partir da análise dos picos de difração gerados pela amostras W1, W2, Y1 e Y2 são apresentados nas tabelas 13-16, e os espectros obtidos a partir dessas análises são mostrados nas figuras 26 e 27. Todas as amostras se apresentaram como misturas dos dois polimorfos. Os dados obtidos para W2 indicaram que Forma II prevalecia nessa amostra, enquanto que Y2 apresentava a Forma I, como polimorfo predominante. Os dados gerados pela análise das frações revelaram diferentes perfis cristalográficos para as duas formas avaliadas, evidenciando assim a existência de estruturas cristalinas distintas.

A preparação das amostras para análise por XRD idealmente incluía a moagem das amostras para diminuir o tamanho das partículas e minimizar a orientação preferencial da estrutura do cristal [Jenkins & Snyder, 1996]. No entanto, devido à baixa estabilidade térmica do polimorfo de Forma II, a energia térmica introduzida durante a moagem, devido ao atrito, provocava alterações na constituição das amostras. Isso foi verificado por XRD e DSC (100 °C min⁻¹) de amostras não tratadas e outras submetidas a diferentes intensidades de moagem.

Observou-se uma diminuição do teor da forma metaestável, Forma II, em todas as quatro amostras de DMT submetidas à diferentes intensidades de tratamentos de

moagem, sendo a extensão da redução relacionada com o grau de moagem. Espectros típicos de XRD e DSC relacionados a esse fenômeno podem ser consultados nas figuras 28 e 29, respectivamente. Os dados também confirmaram a instabilidade aparente da Forma II do DMT, que se converte na Forma I, sob a ação do calor gerado no atrito.

Tabela 13. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra W1.

Pico	2theta	FWHM	d	Intensidade	I/I ₀
1 ^B	7,60	0,200	11,6223	793	70
2	9,04	0,212	9,7739	800	71
3	12,05	0,271	7,3384	402	36
4	12,86	0,259	6,8779	596	53
5	14,52	0,153	6,0951	254	23
6 ^B	15,22	0,235	5,8163	1138	100
7	17,73	0,188	4,9982	723	64
8	18,17	0,259	4,8781	1023	90
9	19,20	0,224	4,6187	690	61
10 ^B	19,57	0,200	4,5322	489	43
11	19,90	0,176	4,4578	501	44
12	20,41	0,106	4,3475	320	29
13	20,54	0,235	4,3203	349	31
14	21,44	0,200	4,1409	254	23
15	22,35	0,271	3,9744	468	42
16	22,85	0,188	3,8885	486	43
17	23,19	0,259	3,8323	295	26
18	24,56	0,118	3,6215	263	24
19	25,42	0,224	3,5009	391	35
20	26,29	0,200	3,387	250	22
21	27,30	0,247	3,2639	481	43
22	30,65	0,376	2,9144	240	22

Tabela 14. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra W2.

Pico	2theta	FWHM	d	Intensidade	I/I ₀
1 ^B	7,56	0,141	11,6837	2827	60
2	8,96	0,176	9,861	567	12
3	11,97	0,153	7,3873	1002	22
4	12,77	0,153	6,9262	981	21
5 ^B	15,17	0,153	5,8354	4737	100
6	17,68	0,106	5,0122	383	9
7	18,07	0,176	4,9049	811	18
8	18,17	0,059	4,8781	576	13
9 ^B	19,75	0,071	4,4913	311	7
10	19,83	0,118	4,4734	319	7
11	22,29	0,118	3,9849	284	6
12	22,84	0,176	3,8902	483	11
13	24,09	0,200	3,6911	407	9
14	27,22	0,071	3,2733	302	7
15	30,68	0,129	2,9116	274	6

Tabela 15. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra Y1.

Pico	2theta	FWHM	d	Intensidade	I/I₀
1 ^B	7,59	0,200	11,6376	1067	52
2	9,01	0,200	9,8064	1666	81
3	12,00	0,200	7,3689	1394	68
4	12,80	0,235	6,9100	1443	70
5	14,49	0,176	6,1077	241	12
6 ^B	15,21	0,200	5,8201	1593	77
7	16,78	0,282	5,279	258	13
8	17,69	0,212	5,0094	795	39
9	18,10	0,235	4,8968	2078	100
10 ^B	19,18	0,212	4,6235	1390	67
11 ^B	19,55	0,200	4,5368	854	42
12	19,84	0,176	4,4711	683	33
13	20,45	0,212	4,3391	453	22
14	20,62	0,200	4,3037	373	18
15	21,43	0,235	4,1429	301	15
16	21,75	0,165	4,0826	276	14
17	22,31	0,247	3,9814	698	34
18	22,84	0,224	3,8902	419	21
19	23,14	0,188	3,8404	361	18
20	23,77	0,188	3,7400	294	15
21	24,14	0,247	3,6836	649	32
22	24,57	0,200	3,6201	262	13
23	25,38	0,247	3,5063	429	21
24	26,26	0,247	3,3908	325	16
25	26,63	0,165	3,3445	219	11
26	27,26	0,224	3,2686	827	40
27	27,81	0,176	3,2052	209	11
28	28,78	0,188	3,0994	266	13
29	30,60	0,341	2,9190	248	12
30	32,65	0,165	2,7403	212	11

Tabela 16. Dados obtidos por difração de Raios X da amostra Y2.

Pico	2theta	FWHM	d	Intensidade	I/I ₀
1	9,02	0,200	9,7956	3418	32
2	12,02	0,200	7,3566	10834	100
3	12,83	0,212	6,8940	8726	81
4	13,58	0,176	6,5149	325	3
5	15,03	0,212	5,8894	2277	22
6	17,71	0,188	5,0038	920	9
7	18,11	0,224	4,8942	5178	48
8	19,84	0,224	4,4711	887	9
9	20,52	0,165	4,3245	268	3
10	21,75	0,200	4,0826	449	5
11	22,30	0,212	3,9832	659	7
12	22,79	0,200	3,8986	427	4
13	23,82	0,153	3,7323	457	5
14	24,16	0,235	3,6805	4384	41
15	25,39	0,200	3,5050	600	6
16	25,72	0,235	3,4607	262	3
17	27,27	0,224	3,2675	1265	12
18	27,78	0,235	3,2086	269	3
19	28,79	0,259	3,0983	306	3
20	30,57	0,200	2,9218	289	3
21	32,65	0,271	2,7403	262	3
22	36,68	0,341	2,4479	261	3
23	41,11	0,282	2,1938	262	3

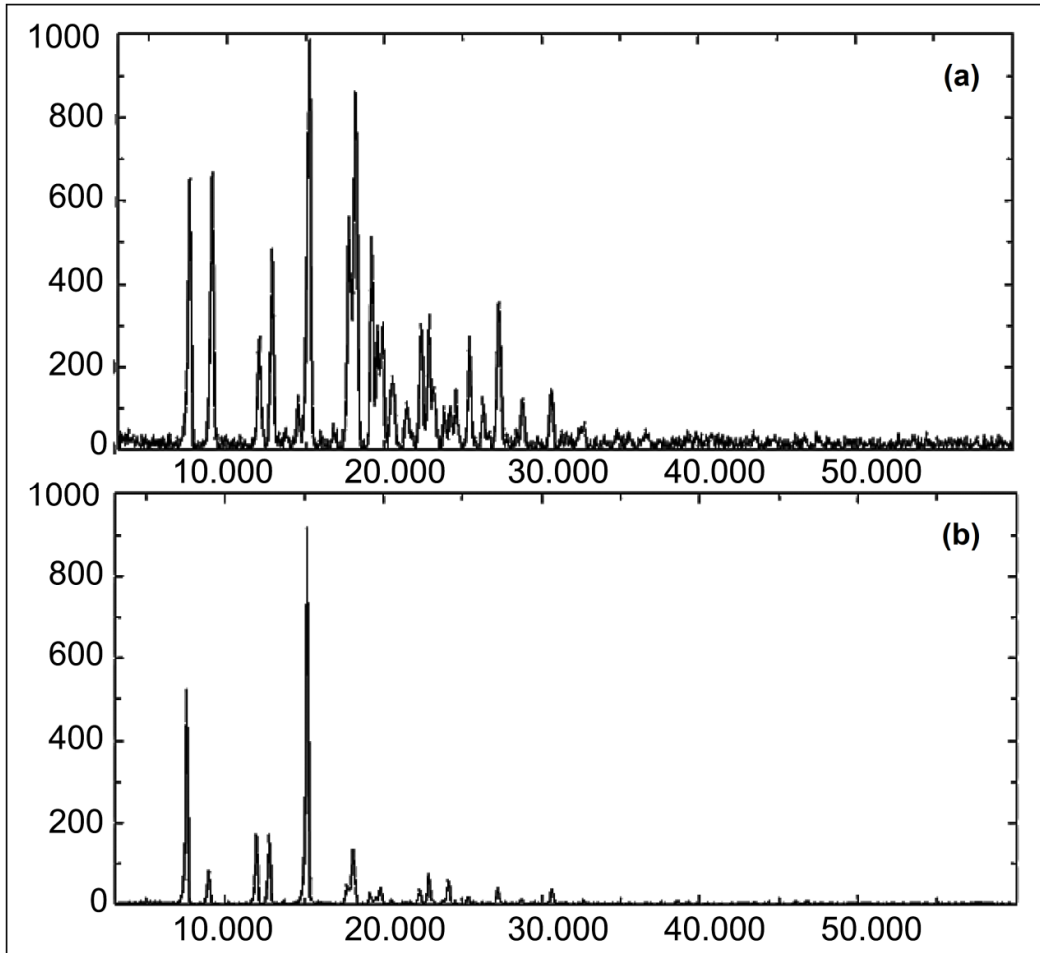


Figura 26. Espectros obtidos em análises por difração de Raios X das amostras W1 (a) e W2 (b).

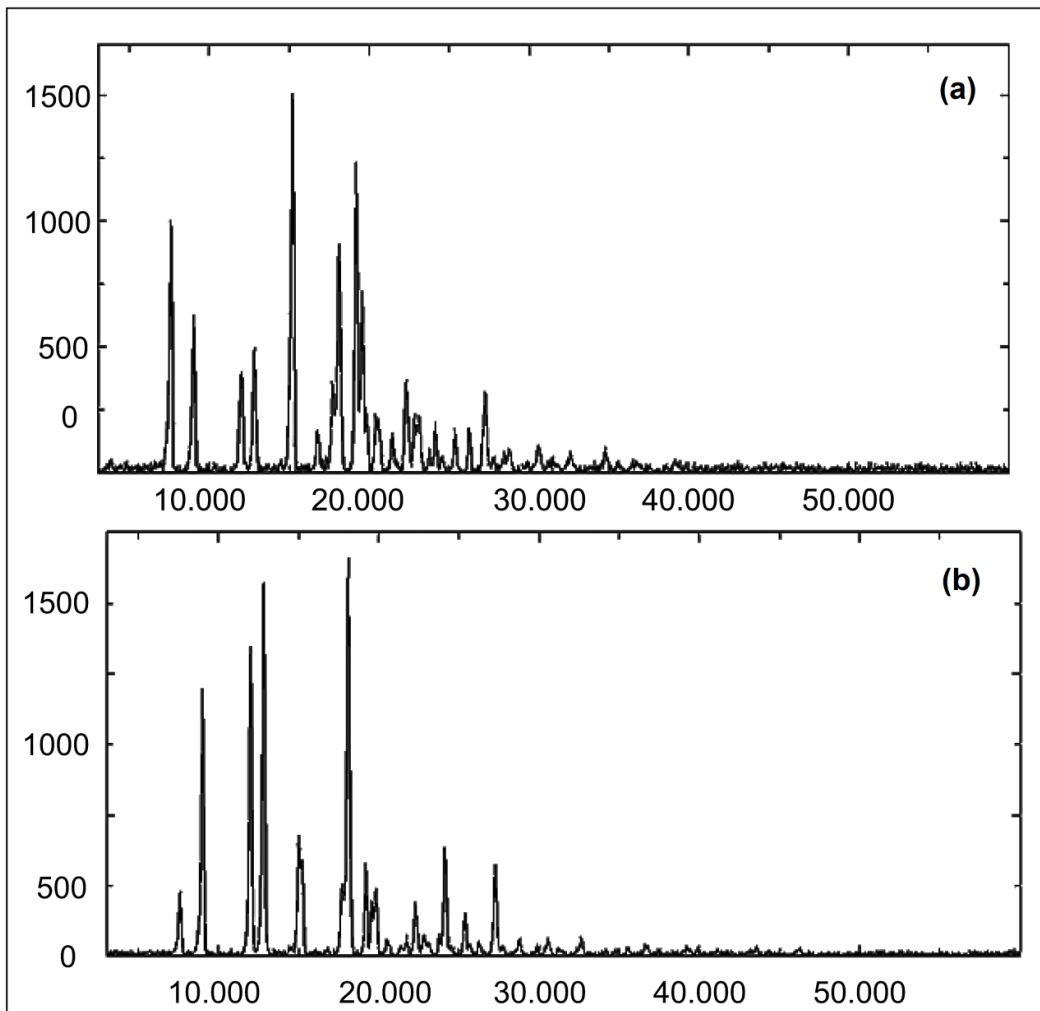


Figura 27. Espectros obtidos em análises por difração de Raios X das amostras Y1 (a) e Y2 (b).

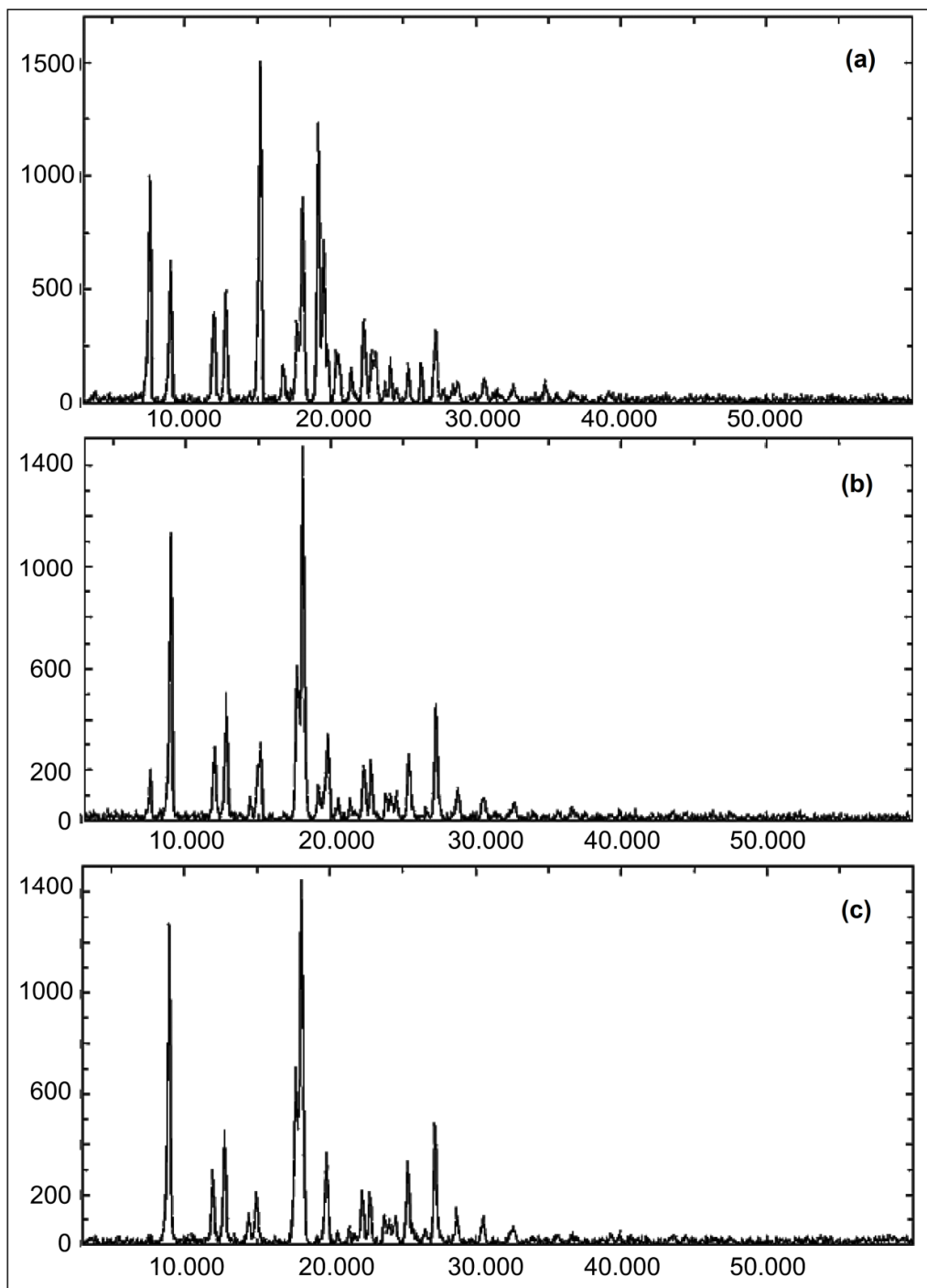


Figura 28. Espectros obtidos em análises por difração de Raios X de amostras Y1, submetidas a diferentes tratamentos físicos: (a) amostra não submetida à moagem, (b) amostra levemente moída e (c) amostra intensamente moída.

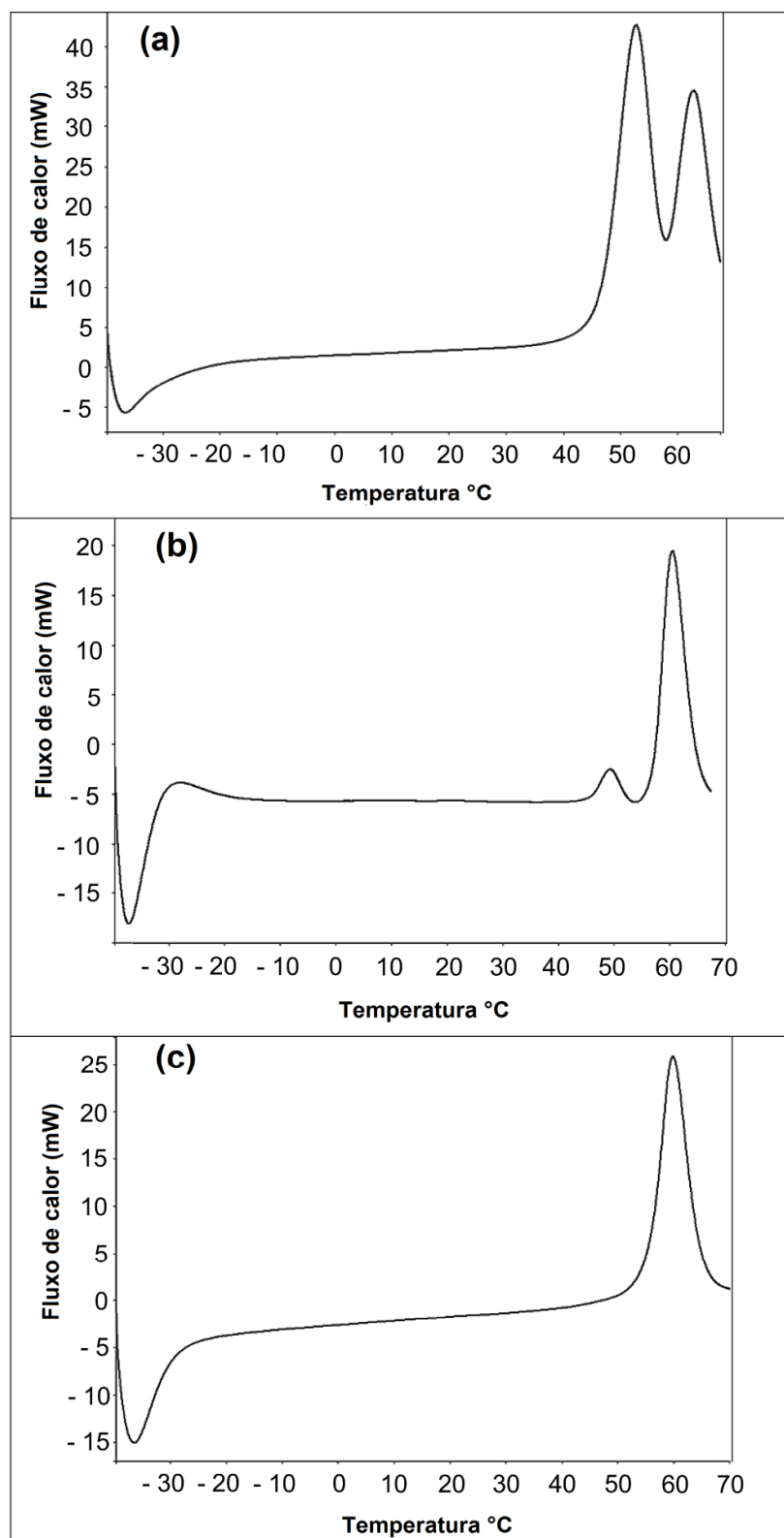


Figura 29. Espectros obtidos em análises por DSC de amostras Y1, à taxa de $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, submetidas a diferentes tratamentos físicos: (a) amostra não submetida à moagem, (b) amostra levemente moída e (c) amostra intensamente moída.

7.3. Determinação do teor de *N,N*-dimetiltriptamina nas cascas de *M. tenuiflora* por MSPD/GC-MS

7.3.a. Otimização do procedimento MSPD

Os testes iniciais com a técnica MSPD demonstraram a necessidade de alcalinizar a amostra. Como os suportes utilizados possuem pequeno caráter ácido, os alcaloides predominavam na forma de sal e não passavam para o eluente orgânico. Além disso, o pH de soluções aquosas preparadas com as cascas desse vegetal está entre 2 e 3, indicando natural caráter ácido da matriz vegetal.

Para selecionar as condições experimentais ótimas para a extração, uma estratégia de otimização multivariada foi aplicada para avaliar a influência de alguns fatores envolvidos no processo MSPD. Os testes foram então realizados de forma a selecionar os fatores e o domínio a serem considerados na abordagem experimental multivariada.

Os fatores incluídos no planejamento fatorial completo foram o tipo de suporte (S), o eluente (E), o volume de eluente (V_E), a massa do suporte (m_S), massa da amostra (m_A), além da concentração de NaOH (C_{OH^-}), cujos domínios podem ser vistos na tabela 17. Os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). Após a execução da matriz do planejamento (Tabela 18), os dados foram inseridos no *software*, gerando um gráfico de Pareto (Figura 30).

Tabela 17. Fatores e níveis para o planejamento fatorial fracionário.

Fatores	Nível baixo (-)	Nível alto (+)
(1) Eluente (E)	Éter de petróleo	n-Hexano
(2) Suporte (S)	Alumina	Florisil [®]
(3) Volume do eluente (V_E , mL)	10	30
(4) Massa do suporte (m_S , g)	0,5	2,0
(5) Massa da amostra (m_A , g)	0,5	2,0
(6) Concentração NaOH (C_{OH^-} , M)	0,01	0,1

Tabela 18. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2⁶⁻³.

Ensaio	Eluente (E)	Suporte (S)	Volume do eluente (V _E)	Massa do suporte (m _S)	Massa da amostra (m _A)	Concentração de NaOH (C _{OH-})	Área do pico cromatográfico
1	Éter de petróleo	Alumina	10	2	2	0,1	2097176
2	n-Hexano	Alumina	10	0,5	0,5	0,1	2092742
3	Éter de petróleo	Florisil	10	0,5	2	0,01	1020126
4	n-Hexano	Florisil	10	2	0,5	0,01	4384478
5	Éter de petróleo	Alumina	30	2	0,5	0,01	7063273
6	n-Hexano	Alumina	30	0,5	2	0,01	773153
7	Éter de petróleo	Florisil	30	0,5	0,5	0,1	20398231
8	n-Hexano	Florisil	30	2	2	0,1	14784595
(C)	Éter de petróleo	Alumina	20	1,5	1,5	0,055	4197555
(C)	n-Hexano	Alumina	20	1,5	1,5	0,055	5791942
(C)	Éter de petróleo	Florisil	20	1,5	1,5	0,055	4873475
(C)	n-Hexano	Florisil	20	1,5	1,5	0,055	7504360

A análise desse diagrama evidencia que são estatisticamente significativos, o volume do eluente, a concentração de OH⁻ e o suporte empregado na coluna, com melhores respostas analíticas no nível alto de cada fator, ou seja, 30 mL, 0,1 M e Florisil[®], respectivamente.

Não apresentaram efeitos significativos, dentro dos domínios em estudo, o tipo de eluente, a massa do suporte e a massa da amostra. Nesse caso, 0,5 g do suporte e 0,5 g de amostra foram selecionados como valores ótimos, uma vez que quantidades adicionais desses fatores não melhoraram os valores de recuperação.

Com base em ensaios preliminares, os suportes Florisil[®] e óxido de alumínio (alumina) foram selecionados para comparar o seu desempenho com éter de petróleo e n-hexano, como solventes de eluição. Embora se tenha obtido os mesmos resultados em termos de recuperação, cerca de 70% para os dois adsorventes, Florisil[®] e n-hexano foram escolhidos por produzirem perfis cromatográficos mais limpos e com menor linha de base.

O volume de eluente foi o fator mais significativo, considerado volumes de 10 e 30 mL, com melhores resultados (maior área do pico cromatográfico de DMT) no nível mais alto (30 mL). Além disso, a concentração de NaOH no nível mais elevado de concentração, 0,1 mol L⁻¹, gerou as melhores respostas com Florisil[®] na coluna MSPD.

Assim, a metodologia otimizada empregou 30 mL de n-hexano, eluindo 0,5 g da amostra homogeneizada com 0,5 g de Florisil[®]. Para evitar excesso de umidade no recheio da coluna, foi adicionado apenas 0,5 mL de NaOH, 0,1 M. Uma camada, contendo 0,5 g de sulfato de sódio anidro, foi depositada sobre a lã de vidro para evitar a presença de umidade no extrato (Figura 31).

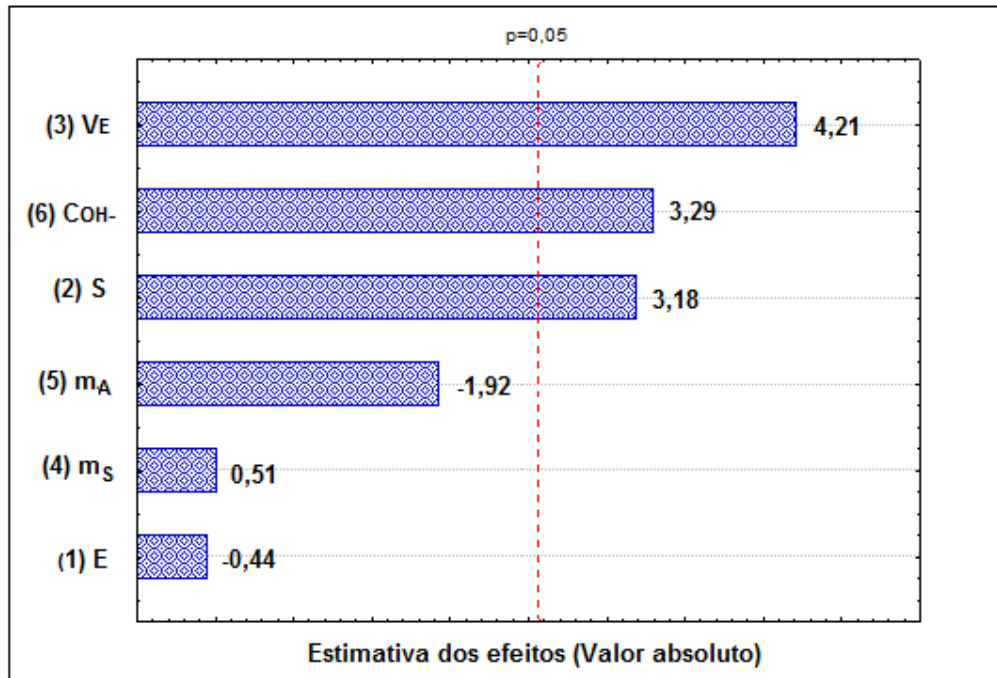


Figura 30. Gráfico de Pareto obtido na otimização da metodologia MSPD.

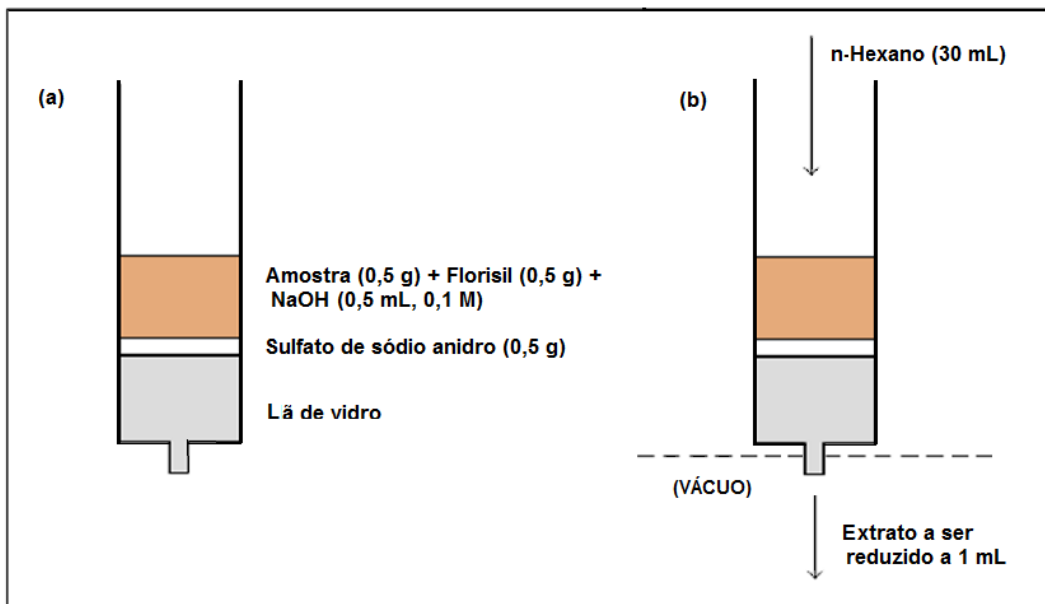


Figura 31. Dispersão da matriz em fase sólida. (a) Montagem da coluna e (b) coluna em operação.

7.3.b. Linearidade

A linearidade do método analítico é uma medida do intervalo dentro do qual a resposta do detector é linearmente proporcional à concentração do analito na solução padrão ou amostras. A partir da metodologia MSPD otimizada, foram preparados padrões de 0,2 a 30 mg g⁻¹, pela fortificação de amostras de cascas da raiz pulverizada de *A. colubrina*. Para a fortificação, foram preparadas 3 soluções de partida, em acetonitrila, a 20, 25 e 30 mg mL⁻¹, sendo diluídas, sucessivamente, até níveis próximos a 10⁻² mg mL⁻¹.

A espécie *A. colubrina* foi escolhida como branco por apresentar um perfil cromatográfico muito semelhante à *M. tenuiflora* (Figura 32). Além disso, pertencem à mesma subfamília botânica Mimosoideae, apresentando cascas internas com propriedades físicas muito próximas entre si. De acordo com estudos anteriores, alcaloides não foram detectados nas cascas internas de *A. colubrina* [Almeida et al., 2005].

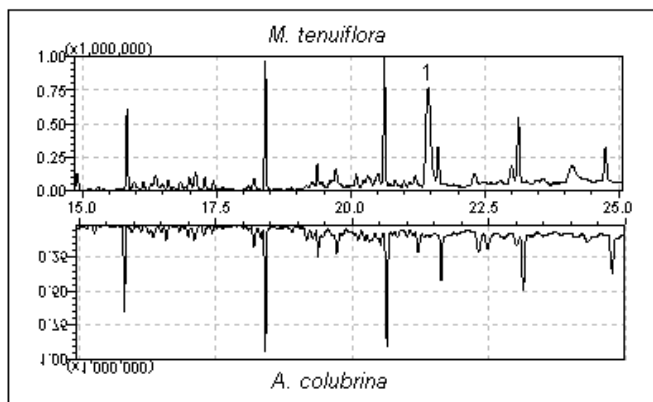


Figura 32. Cromatogramas gerados pela análise de cascas do tronco de *A. colubrina* e *M. tenuiflora* pelo método MSPD/GC-MS. 1. *N,N*-dimetilriptamina

As corridas ocorreram no modo SIM, com a seleção dos íons 58 e 188. A curva analítica obtida para o método (Figura 33), $A = 142356C - 96397$, a partir de nove pontos gerados no modo SIM, apresentou excelente linearidade, com coeficiente de

determinação (r^2) igual a 0,9962. A faixa linear da curva analítica abrangeu de 0,62 a 20,0 mg g^{-1} .

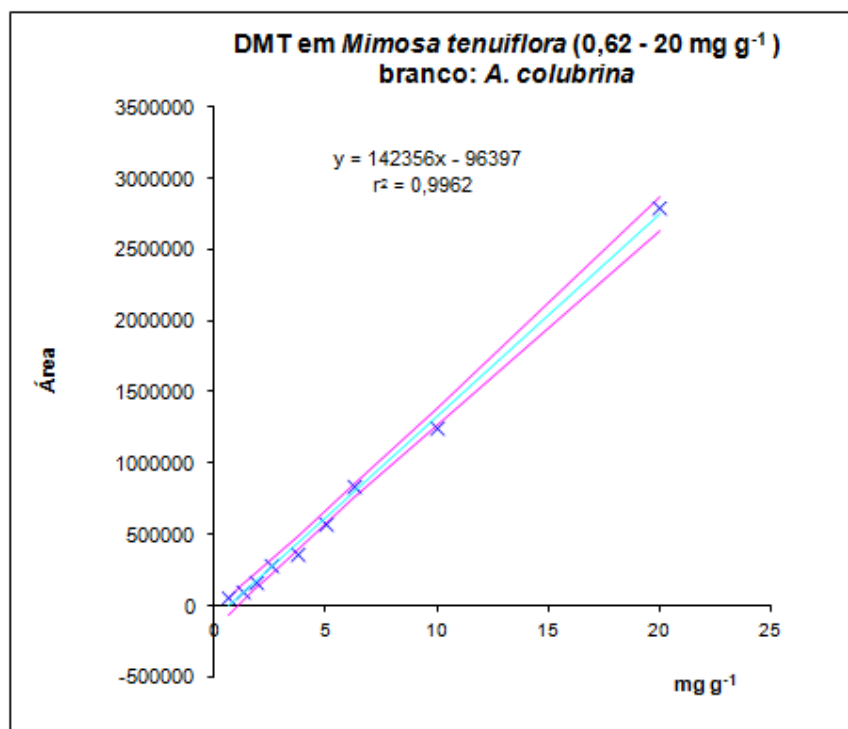


Figura 33. Curva analítica para a determinação de DMT em cascas de *M. tenuiflora*, por MSPD/GC-MS.

7.3.c. Recuperação

Para os testes de recuperação, amostras de cascas de *A. Colubrina* foram fortificadas com DMT, nos níveis de 1,25, 2,0, 8,0 e 16,0 mg g^{-1} , por adição de 0,5 mL da solução padrão de trabalho apropriada. Oito amostras em cada nível de fortificação foram preparadas por MSPD. A recuperação obtida para o DMT variou entre 81,7 - 116,2% (Tabela 19).

7.3.d. Precisão

A precisão do método foi determinada por estudos de repetibilidade intradia e precisão intermediária (interdias), e expressa pelo coeficiente de variação (CV). Valores podem ser observados na tabela 19. Os testes de precisão intradia e precisão

instrumental foram realizados pelo preparo de padrões das cascas, em 5 diferentes níveis (1,25; 3,75; 5,00; 10,0 e 15,0 mg g⁻¹).

A precisão intradia foi avaliada através de injeções sucessivas de oito amostras de cada padrão no sistema cromatográfico, o que resultou em variações abaixo de 8% para a maior parte dos níveis avaliados, evidenciando boa repetibilidade do método. Apenas no nível mais baixo (1,25 mg g⁻¹) obteve-se variação maior, CV igual a 15,9%.

A precisão instrumental avaliou a repetibilidade do equipamento através de oito injeções sucessivas do mesmo padrão. Os valores de coeficientes de variação abaixo de 3% para a maior parte dos níveis atestam excelente precisão em relação aos dados gerados pelo equipamento.

A avaliação da precisão interdias, ou precisão intermediária, foi executada por dois analistas diferentes, com intervalo de três dias entre um e outro, através do preparo de oito extratos por MSPD em cada um dos dois níveis (8,00 e 16,0 mg g⁻¹), além de mais oito extratos preparados a partir de uma amostra real de *M. tenuiflora*. Os valores mais altos para os coeficientes de variação (CV), em torno de 16%, evidenciam que há maior variabilidade nas respostas quando a técnica MSPD é executada por mais de um analista, em diferentes dias.

Tabela 19. Recuperações (R) e precisões para o método MSPD/GC-MS (N= 8).

C (mg g⁻¹)	R (%)	Precisão instrumental (CV%)	Precisão intradia (CV%)	Precisão interdias (CV%)
1,25	116,2	1,79	15,95	-
2,00	92,0	-	-	-
3,75	-	2,36	6,40	-
5,00	-	2,79	7,33	-
8,00	81,7	-	-	16,20
10,0	-	7,36	5,82	-
15,0	-	2,94	7,36	-
16,0	90,5	-	-	16,47
Amostra real	-	-	-	16,72

7.3.e. Exatidão do método

Os testes de exatidão foram realizados comparando-se os dados obtidos pelo método desenvolvido (MSPD/GC-MS), com os resultados obtidos pelo método ácido-base tradicional, no qual se emprega a técnica líquido-líquido. As concentrações de DMT nas amostras analisadas pelos dois métodos foram concordantes entre si. Para uma amostra comercial, foi obtido 8,10 mg g⁻¹ pelo tradicional método ácido-base (por LLE), e 8,24 mg g⁻¹ pelo método MSPD/GC-MS. Para a amostra 1042R, 7,02 mg g⁻¹ e 7,20 mg g⁻¹, respectivamente.

7.3.f. Limites de detecção e quantificação

Para o limite de detecção (LD) foi considerado o método da relação sinal-ruído, através do qual o limite de detecção é a concentração do analito na amostra capaz de gerar um sinal três vezes maior do que o ruído da linha de base. Com base nesse critério, o método apresentou LD igual a 0,12 mg g⁻¹. O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como sendo o menor valor de concentração dentro do limite estabelecido pela curva analítica, com recuperação e precisão aceitáveis. Assim, o nível admitido como LQ nesse estudo foi igual a 1,25 mg g⁻¹, com recuperação de 116,2%, precisão instrumental com CV igual a 1,79% e precisão intradia (repetibilidade) com CV igual a 15,95%.

7.3.g. Aplicação do método

O total de 24 amostras de cascas de caule e raiz da *M. tenuiflora* foram coletadas em diferentes localidades, e analisadas através do método MSPD/GC-MS desenvolvido. A figura 34 mostra os cromatogramas nos modo SCAN e SIM das corridas realizadas em triplicata, para a determinação de DMT nas cascas de *M. tenuiflora*. A concentração

de DMT nas amostras variou de 1,26 a 9,35 mg g⁻¹ (Tabela 20). Altos níveis de DMT foram encontrados no tecido da raiz, em comparação com a casca do caule de *M. tenuiflora*. Cascas de plantas de regiões semiáridas (Área 2) apresentaram-se mais ricas em DMT do que as amostras costeiras (Área 1).

Flores e amostras de sementes de *M. tenuiflora* foram também analisadas por este método, mas os níveis de DMT nessas partes foram inferiores ao limite de quantificação. Os resultados obtidos para as cascas de *M. tenuiflora* estão na mesma ordem de grandeza de dados divulgados em trabalho recente, envolvendo técnica de extração Soxhlet e separação por HPLC com detecção UV [Nicasio et al., 2005].

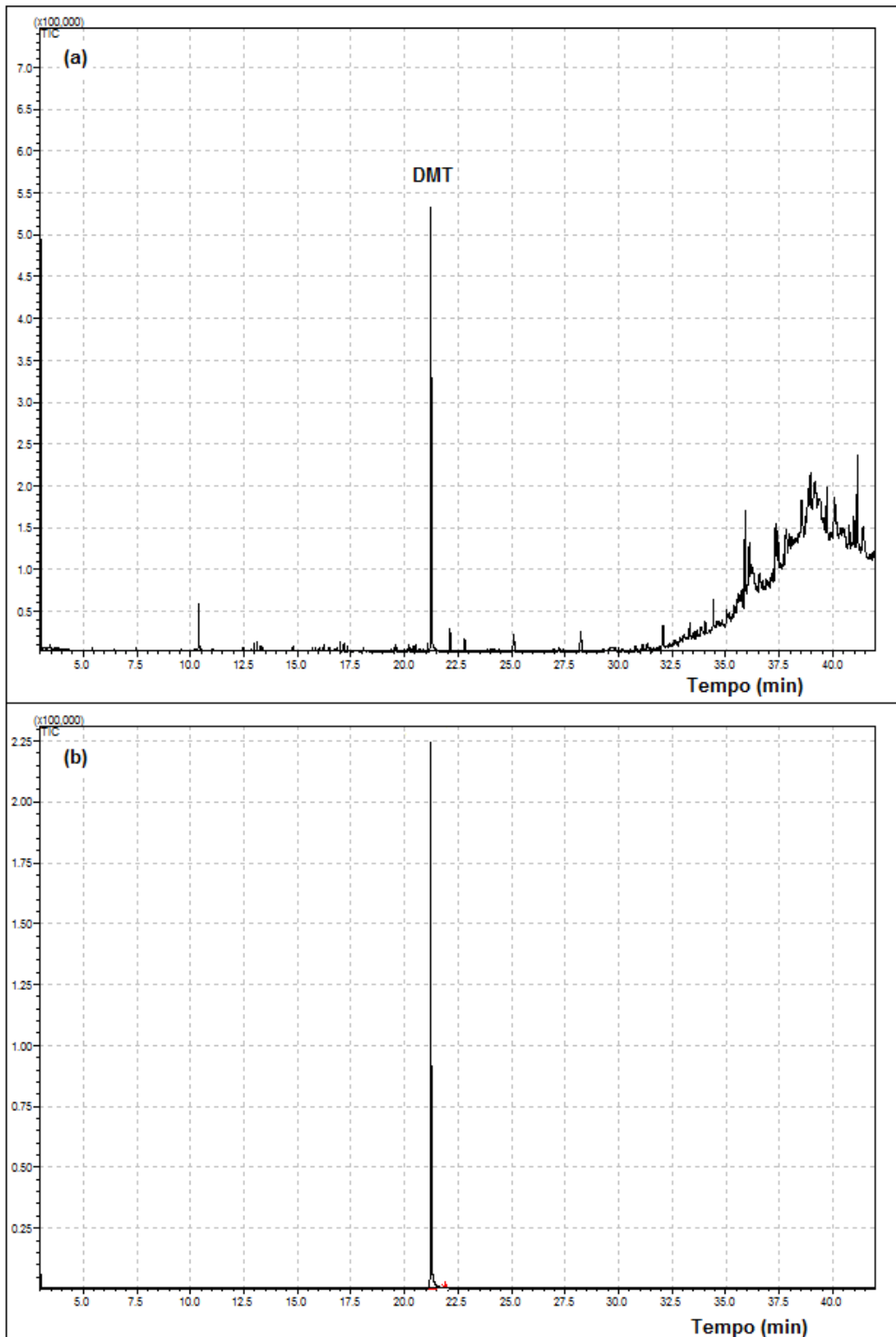


Figura 34. Cromatogramas para a determinação de DMT nas cascas de *M. tenuiflora*. Modo SCAN (a) e modo SIM (b).

Tabela 20. Níveis de concentração de DMT nas cascas de *M. tenuiflora*.

Locações	Amostras	Concentração de DMT nas cascas internas de <i>M. tenuiflora</i> (mg g ⁻¹)	
		Cascas do caule (C)	Cascas da raiz (R)
Área A (Litoral)			
Aracaju-Se lat 11,071150°S lon 37,146190°W	0945C	3,19	6,86
	1005R		
	1022C	1,35	7,20
	1042R		
São Cristóvão-Se lat 10,905978°S lon 37,188713°W	1015C	6,41	5,93
	1047R		
	0743C	3,47	6,67
	0800R		
São Cristóvão-Se lat 10,905978°S lon 37,188713°W	0810C	2,04	5,97
	0836R		
	0955C	2,16	5,29
	1002R		
São Cristóvão-Se lat 10,905978°S lon 37,188713°W	0850C	2,15	1,26
	0915R		
	0930C	4,00	6,87
	0940R		
Área B (Sertão)			
Pinhão-Se lat 10,588435°S lon 37,735462°W	1341C	7,55	-
	1408S	7,26	
Canindé de São Francisco-Se lat 9,627350°S lon 37,807383°W	1138C	4,88	-
	1220C	9,35	
	1232C	5,54	
	1246C	4,42	
Simão Dias-Se lat 10,717147°S lon 37,793817°W	1130C	1,54	2,12
	1136R (espécime centenário)		

7.4. Determinação do teor de *N,N*-dimetiltriptamina em bebidas rituais por SPME/GC-MS

7.4.a. Otimização da metodologia SPME

Inicialmente, uma amostra fortificada a 100 mg L^{-1} foi utilizada para determinar o volume disponível na fase headspace, 4 mL, para um vial de 9 mL, o tempo de dessorção (5 min) e o valor de pH (11), respectivamente, otimizadas por análise univariada. A fibra de PDMS/DVB é adequada para a análise de compostos voláteis e semivoláteis de polaridade média. Para selecionar as condições experimentais ótimas para a extração, a estratégia de otimização multivariada foi empregada para avaliar a influência dos fatores principais no processo de SPME.

Vários testes foram realizados, com o objetivo de selecionar os fatores e o domínio a ser considerado na abordagem experimental, a fim de maximizar o rendimento de DMT extraído das bebidas, ou seja, a área dos picos cromatográficos. Os fatores incluídos no planejamento fatorial 2^3 foram temperatura (T), tempo de equilíbrio (t_{EQU}) e tempo de extração (t_{EXT}). Os fatores e seus domínios podem ser observados na tabela 21.

Tabela 21. Fatores e domínios de estudo para o planejamento fatorial 2^3 .

Fatores	Nível baixo (-)	Ponto Central (C)	Nível alto (+)
Temperatura (T, °C)	40	50	60
Tempo de extração (t_{EXT} , min)	20	35	50
Tempo de equilíbrio (t_{EQU} , min)	15	20	25

A execução da matriz desse planejamento fatorial (Tabela 22) gerou um gráfico de Pareto, que representa a significância estatística de cada fator para o método em estudo, bem como, inclui uma avaliação das interações de segunda ordem, entre os

fatores, ambos representados por barras horizontais no diagrama (Figura 35). Aquelas que ultrapassam a linha pontilhada vertical, referente ao nível de confiança de 95%, correspondem a fatores significativos para o processo. Ou seja, variações nesses parâmetros, geram aumentos ou diminuições da resposta analítica (área cromatográfica). A análise do gráfico de Pareto indicou que, no âmbito do domínio estudado, os efeitos da temperatura e do tempo de extração foram estatisticamente significativos. A temperatura foi fixada no nível alto, em 60 °C, uma vez que o seu efeito (36,57) indica que aumentos desse fator geram aumentos no sinal analítico, como observado no gráfico de Pareto. O aumento do tempo de extração, no domínio em estudo, como esperado, gera ganho de sinal analítico, também representado pelo fator positivo no gráfico (27,30).

Tabela 22. Matriz do planejamento fatorial completo 2³.

Ensaio	T (°C)	t _{EXT} (min)	t _{EQU} (min)	Área do pico cromatográfico (DMT)
1	40,0	20,0	15,0	126,30
2	60,0	20,0	15,0	649,60
3	40,0	50,0	15,0	486,30
4	60,0	50,0	15,0	1624,80
5	40,0	20,0	25,0	139,30
6	60,0	20,0	25,0	763,50
7	40,0	50,0	25,0	508,30
8	60,0	50,0	25,0	1524,50
9 (C)	50,0	35,0	20,0	639,90
10 (C)	50,0	35,0	20,0	653,00
11 (C)	50,0	35,0	20,0	598,30
12 (C)	50,0	35,0	20,0	674,00

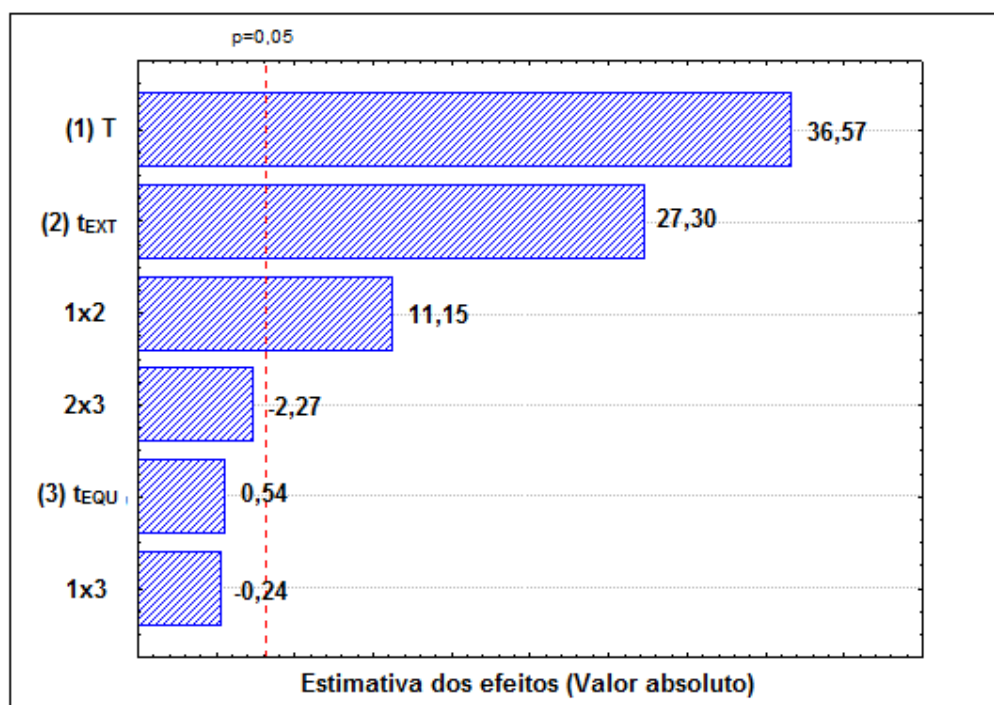


Figura 35. Gráfico de Pareto para avaliação da significância dos fatores para a técnica SPME.

Com o intuito de encontrar os valores críticos para o preparo de amostras por SPME, foi empregada uma técnica de superfície de respostas do tipo Planejamento Composto Central. Embora o fator de tempo de equilíbrio não tivesse apresentado qualquer influência significativa no domínio anterior estudado (15 - 25 min), foi decidido incluí-lo no planejamento seguinte, com um novo domínio, entre 5 e 15 min. O tempo de extração foi também avaliado no planejamento composto central, considerando intervalos de tempo entre 20 e 80 min (Tabela 23).

Tabela 23. Fatores e domínios de estudo para o planejamento composto central.

Fatores	Nível baixo (-)	Ponto Central (C)	Nível alto (+)
Tempo de extração (t _{EXT} , min)	20	50	80
Tempo de equilíbrio (t _{EQU} , min)	5	10	15

O modelo de superfície de resposta (Figura 36) gerado pela execução da matriz deste planejamento (Tabela 24) pode ser representado pela equação:

$$A = -367,57 t_{\text{EQU}}^2 - 526,57 t_{\text{EXT}}^2 - 60,69 t_{\text{EQU}} + 1935,51 t_{\text{EXT}} + 2247,37$$

A análise residual do modelo proposto demonstra que os resíduos obedecem a uma distribuição normal, como pode ser constatado nos diagramas das figuras 37 e 38. Ainda, o gráfico que correlaciona os valores previstos e os valores observados (Figura 39), denota excelente adequação do modelo à situação real.

Tabela 24. Matriz do planejamento composto central.

Ensaio	t_{EQU} (min)	t_{EXT} (min)	Área do pico cromatográfico (DMT)
1	5,0	20,0	913
2	5,0	80,0	2970
3	15,0	20,0	824
4	15,0	80,0	2485
5	2,9	50,0	1771
6	17,1	50,0	2005
7	10,0	7,6	302
8	10,0	92,4	3148
9 (C)	10,0	50,0	2343
10 (C)	10,0	50,0	2222
11(C)	10,0	50,0	2177

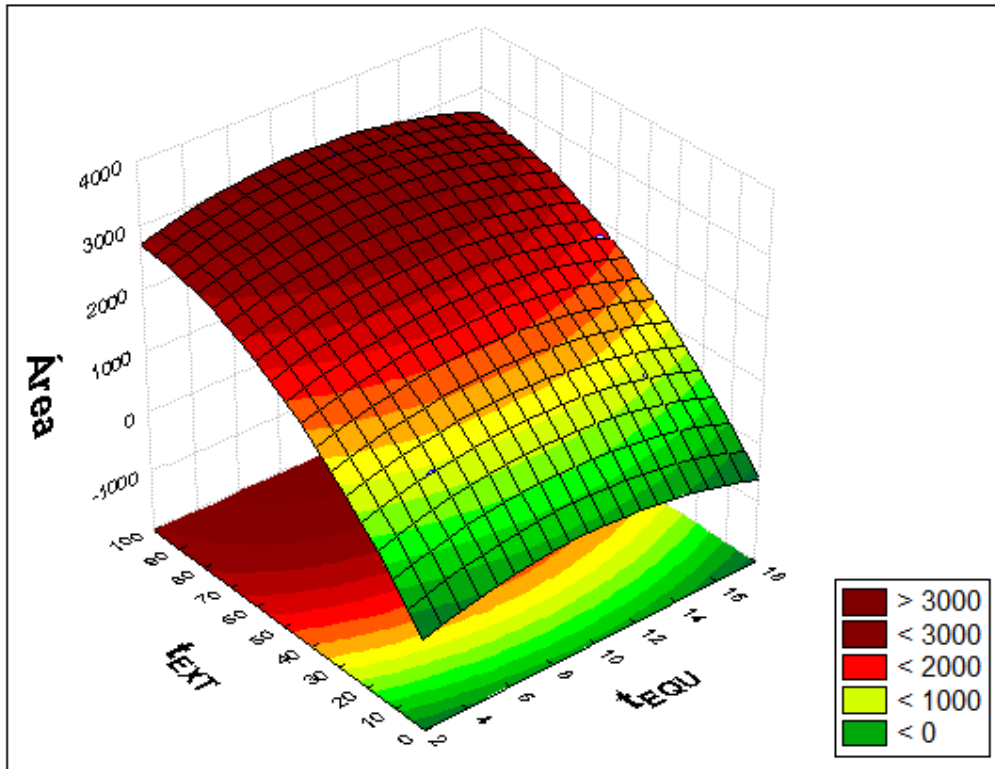


Figura 36. Superfície de resposta gerada para a avaliação da região crítica para o método.

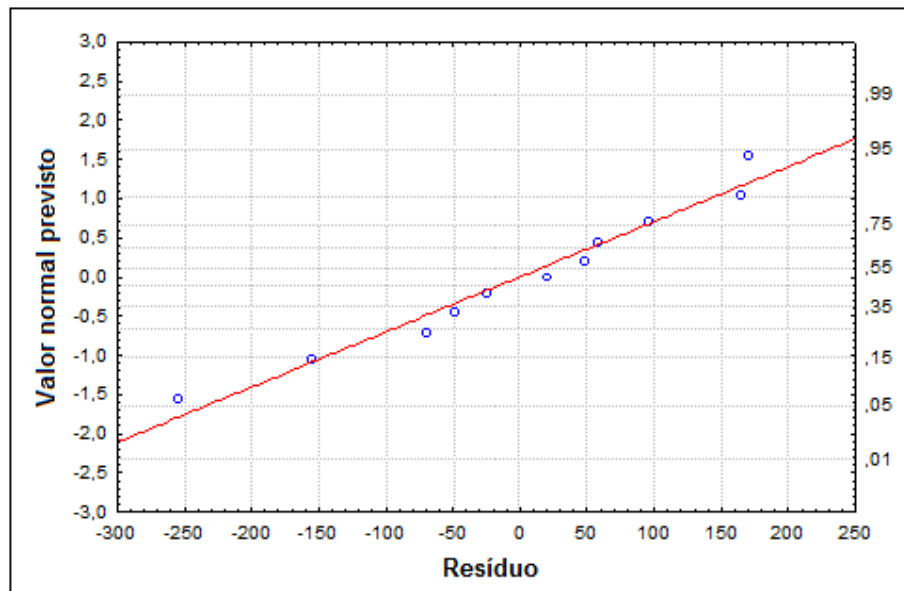


Figura 37. Gráfico de probabilidade normal para o modelo quadrático.

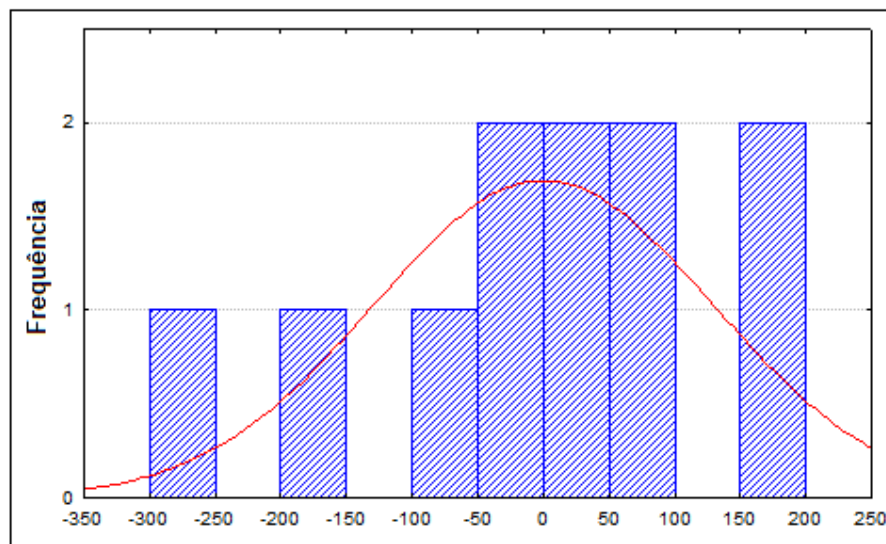


Figura 38. Histograma dos resíduos para o modelo quadrático.

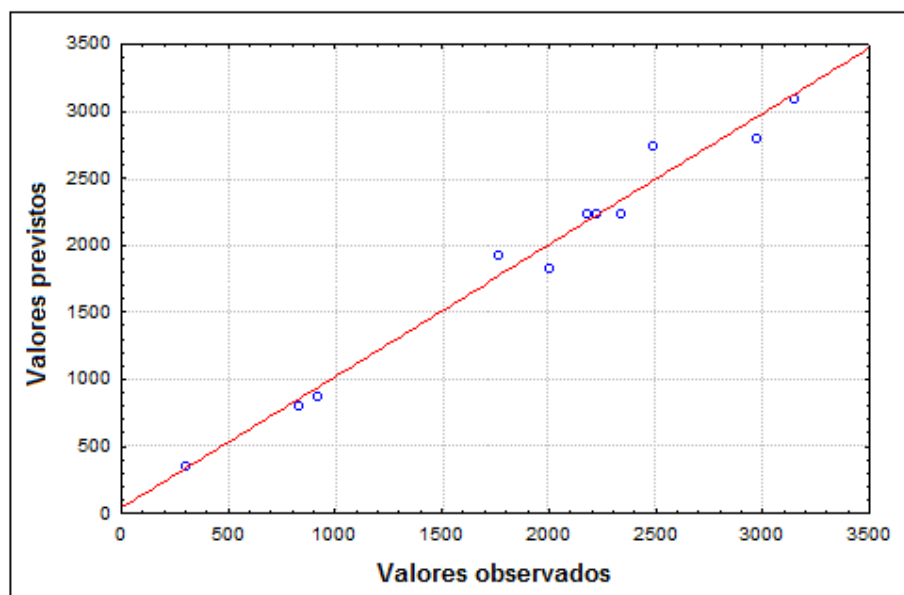


Figura 39. Valores previstos *versus* valores observados.

Os valores críticos sugeridos pelo *software* Statistica para o método foram 9,6 min, para o tempo de equilíbrio (t_{EQU}), e de 105,1 min para o tempo de extração (t_{EXT}). O fator tempo de equilíbrio não apresentou influência significativa sobre a área do pico correspondente ao DMT, mesmo no novo domínio estabelecido, entre 5 e 15 min. Aparentemente, o equilíbrio do analito entre as fases (amostra líquida e headspace)

ocorre em tempo inferior a 5 min. Assim, esse fator foi adotado com o nível do ponto central, 10 minutos. Esse tempo é suficiente para assegurar que a amostra alcance a temperatura de trabalho e para garantir, com boa robustez, o equilíbrio do analito entre as fases líquida e gasosa da amostra, a 60 °C, antes da exposição da fibra ao *headspace* da amostra.

O tempo de extração, por outro lado, apresentou grande influência sobre a resposta analítica. Contudo, consideramos inadequado o valor crítico sugerido para este fator, excessivamente alto, uma vez que testes anteriores demonstraram que o sistema atingia a situação de equilíbrio químico envolvendo a fase líquida, o *headspace* e a fase extrativa (fibra PDMS/DVB), muito antes do tempo de extração sugerido pelo *software*. Pode-se também perceber na representação da superfície para o modelo (Figura 36), que a região de máxima resposta analítica abrange tempos de extração a partir de 60 min.

Para confirmar essa hipótese, novos ensaios foram realizados variando-se apenas o tempo de extração, entre 5 - 110 min, em intervalos de 10 min. Os outros fatores já otimizados foram mantidos fixos: pH 11, tempo de equilíbrio de 10 min, tempo de desorção de 5 min e temperatura de 60 °C. A execução dessas corridas gerou o diagrama área x tempo de extração (Figura 40). Podemos constatar, pela análise desse gráfico, que após 60 min de extração, efetivamente, temos o equilíbrio estabelecido entre as fases. Para garantir boa robustez para o processo, foi adotado 70 min para o tempo em que a fibra permanece em contato com o *headspace* da amostra.

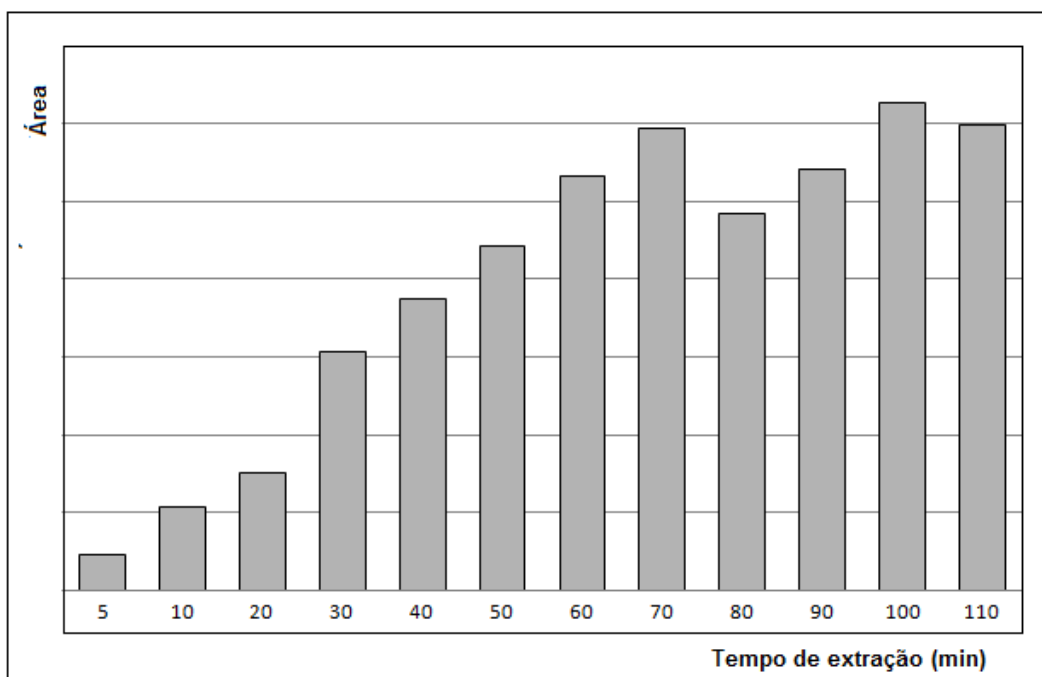


Figura 40. Área do pico cromatográfico do DMT em função do tempo de extração.

7.4.b. Linearidade

A curva analítica para o DMT (Figura 41) foi construída utilizando 12 níveis de concentração entre 1,56 e 300 mg L⁻¹, utilizando os padrões das soluções descritas no item 6.4.c, e análise em duplicata, em cada nível de concentração. Os valores de inclinação e de intercepção, juntamente com os seus desvios padrão, foram determinados através de análise de regressão linear, com curva analítica $A = 144391C + 168699$. O coeficiente de correlação (r^2) foi igual a 0,9975.

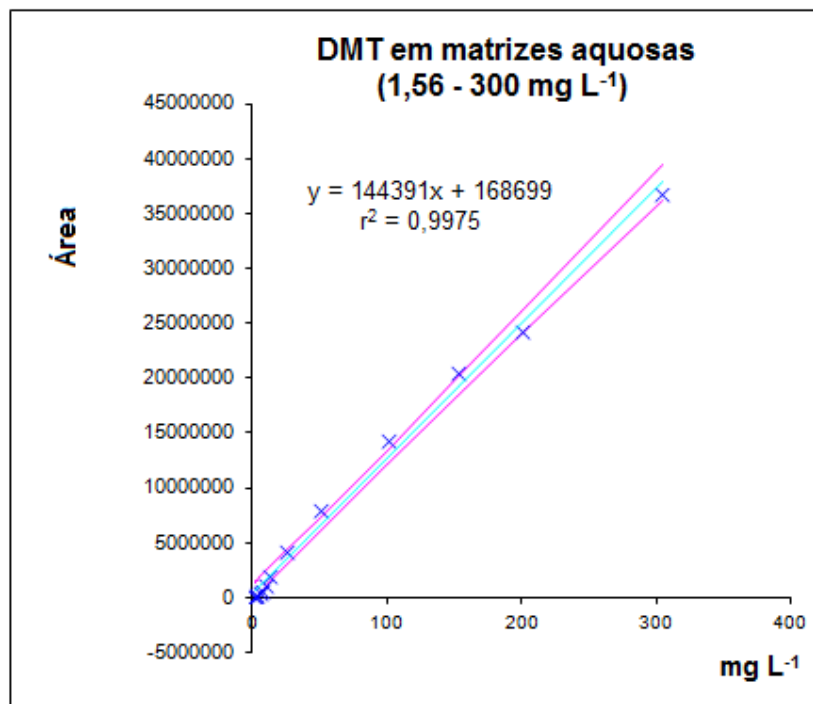


Figura 41. Curva analítica para a determinação de DMT nas bebidas, por SPME/GC-MS.

7.4.c Exatidão do método

Para determinar a exatidão do método desenvolvido, um estudo de recuperação foi realizado. Uma quantidade conhecida do padrão de DMT foi adicionado à amostra em três diferentes níveis de concentração, isto é, 9,5, 50 e 152 mg L⁻¹. Cada nível de concentração foi analisado em triplicata, utilizando sete amostras preparadas por SPME, sendo os resultados expressos como média de recuperação. Os valores de recuperação obtidos encontram-se na faixa de 71, 109 e 104%, respectivamente. O estudo indicou que o método apresenta exatidão adequada à determinação de DMT nas bebidas rituais.

7.4.d. Precisão

A precisão do método foi determinada por estudos de repetibilidade e foi expressa como coeficiente de variação (CV). A repetibilidade (intraensaio) foi medida pela comparação dos valores de desvio padrão, obtidos a partir das percentagens de

recuperação de amostras fortificadas (níveis de concentração 9,5 (8,3%), 50 (4,6%) e 152 (3,3%) mg L⁻¹), executados no mesmo dia. Cada nível de concentração foi determinado sete vezes, seguido por cálculos de coeficientes de variação. Os valores de CV foram iguais a 8,3, 4,6 e 3,3%, respectivamente aos níveis citados.

7.4.e. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) foi calculado considerando o desvio padrão do ruído analítico, um valor de sete vezes o desvio padrão do branco, e da inclinação da curva analítica, sendo igual a 0,78 mg L⁻¹. O limite de quantificação (LQ) foi determinado como a menor concentração que oferece resposta dez vezes superior a média do ruído de linha de base, utilizando-se sete amostras fortificadas com DMT. O valor de LQ para esse composto foi de 9,5 mg L⁻¹. Testes de precisão (CV = 8,3%) e recuperação (71%), nesse nível de concentração, mostraram-se aceitáveis.

7.4.f. Robustez

A robustez do método proposto foi estimada por análise da confiabilidade, com relação à pequena variação controlada de parâmetros do método otimizado. Um planejamento fatorial completo composto por 15 experimentos, envolvendo os três fatores mais propensos à flutuações, foi empregado nos seguintes domínios: tempo de extração (69,5 - 70,5 min), temperatura (59 - 61 °C) e o pH da fase aquosa (pH 10,5 - 11,5). Os pontos centrais desse planejamento correspondem aos valores críticos obtidos para esses fatores, isto é, 70 min para o tempo de extração, 60 °C para a temperatura e pH da amostra igual a 11 (Tabelas 25 e 26).

Tabela 25. Fatores e domínios de estudo para o planejamento fatorial completo 2³.

Fatores	Nível baixo (-)	Ponto Central (C)	Nível alto (+)
Tempo de extração (t _{EXT} , min)	69,5	70	70,5
Temperatura (T, °C)	59	60	61
pH	10,5	11	11,5

Tabela 26. Matriz do planejamento fatorial completo para análise da robustez do método.

Ensaio	t _{EXT} (min)	T (°C)	pH	Área do pico cromatográfico (DMT)
1	69,5	59,0	10,5	1680
2	69,5	59,0	11,5	2469
3	69,5	61,0	10,5	2637
4	69,5	61,0	11,5	2569
5	70,5	59,0	10,5	2626
6	70,5	59,0	11,5	2165
7	70,5	61,0	10,5	1818
8	70,5	61,0	11,5	2222
9(C)	70,0	60,0	11,0	2585
10(C)	70,0	60,0	11,0	1660
11(C)	70,0	60,0	11,0	1937
12(C)	70,0	60,0	11,0	2427

O gráfico de Pareto gerado pela execução da matriz desse planejamento (Figura 42) indicou que a resposta obtida permaneceu inalterada por pequenas variações nesses parâmetros do método. A análise estatística revelou que houve boa concordância entre os valores experimentais e previstos. Além disso, nenhum dos fatores estudados nesses domínios mostrou efeito significativo na eficiência do sistema.

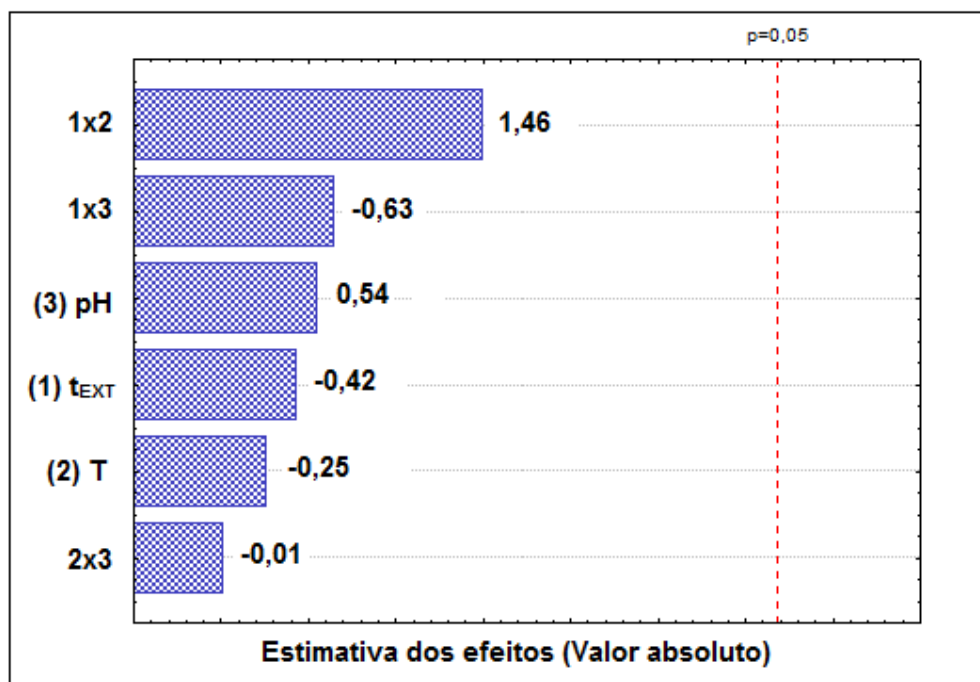


Figura 42. Gráfico de Pareto para o teste de robustez.

7.4.g. Estimativa do teor de DMT em amostras de vinho da jurema

O método de análise descrito foi utilizado para estudar a influência de alguns parâmetros envolvidos na preparação do vinho jurema, a partir das cascas da *M. tenuiflora*, com relação ao conteúdo de DMT nas bebidas. Isso incluiu uma avaliação da temperatura (temperatura ambiente *versus* 100 °C), acidez do meio extrativo e a presença de etanol durante a preparação. Assim, cinco amostras de vinho jurema foram preparadas em laboratório, utilizando 5 g de casca interna de jurema-preta (*M. tenuiflora*) em cada 100 mL de amostra, empregando o mesmo tempo de extração. As concentrações de DMT, encontradas nas amostras analisadas, podem ser observadas na tabela 27. Foi necessário diluir as amostras para efetuar as análises. Verificou-se que o simples aquecimento do sistema, durante a preparação, não conduziu a maiores níveis de DMT. No entanto, as concentrações de DMT foram maiores quando o preparo deu-se em meio ácido aquoso (pH 1), ou utilizando a mistura de água e etanol (50:50, v/v) como fase extrativa.

Tabela 27. Concentrações de DMT em amostras de vinho da jurema preparadas sob diferentes condições.

Condições de preparo da bebida	DMT (g L ⁻¹)
1 Extração em água destilada na temperatura ambiente	1,32
2 Extração em meio ácido (HCl, pH = 1) na temperatura ambiente	1,57
3 Extração em água a 100 °C	1,17
4 Extração em meio ácido (HCl, pH = 1) a 100 °C	1,79
5 Extração em mistura de água/etanol (50:50) na temperatura ambiente	1,73

7.4.h. Aplicação do método

Doze amostras de ayahuasca (A1 a A7) e de vinho da jurema (J1 a J5) foram coletadas de diferentes grupos religiosos brasileiros e analisadas em triplicata, utilizando o método SPME/GC-MS desenvolvido. Todas as amostras foram diluídas por um fator de 10 ou 25, dependendo do nível de DMT presente nas bebidas. Cromatogramas representativos são apresentados na figura 43. Altos níveis de DMT foram encontrados em ambos os tipos de amostra. A concentração de DMT em amostras de vinho jurema variou entre 0,10 e 1,81 g L⁻¹, enquanto que em amostras de ayahuasca, constatou-se a presença de DMT na faixa de 0,17 - 1,14 g L⁻¹ (Tabela 28).

Tabela 28. Níveis de DMT em amostras reais de ayahuasca (A) e vinho da jurema (J), obtidas de grupos religiosos brasileiros.

Amostras	DMT (g L ⁻¹)
A1	0,44
A2	1,14
A3	0,58
A4	0,57
A5	0,72
A6	0,29
A7	0,17
J1	1,76
J2	1,81
J3	0,73
J4	0,10
J5	0,68

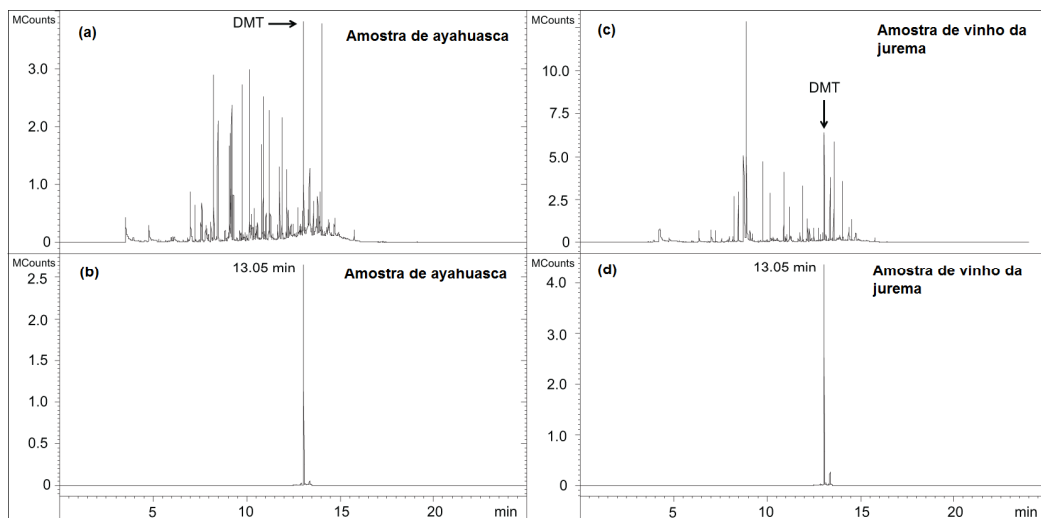


Figura 43. Cromatogramas obtidos na análise de amostras reais de ayahuasca e vinho da jurema. Modo *full scan*: (a) e (c) e, no modo SIM (m/z 58): (b) e (d).

8. Conclusões

Com o intuito de oferecer métodos analíticos que minimizem o consumo de solventes orgânicos e reagentes, para a quantificação de *N,N*-dimetiltriptamina em matrizes aquosas líquidas e em matéria vegetal, este estudo apresentou um método para a extração e purificação de DMT a partir das cascas da *M. tenuiflora*, a fim do seu uso como padrão cromatográfico, além de outros dois métodos para a determinação de DMT nas cascas do mesmo vegetal, por MSPD/GC-MS, e nas bebidas rituais, ayahuasca e vinho da jurema, por SPME/GC-MS. Por outro lado, apresentou de modo introdutório, um estudo inédito sobre o polimorfismo do composto *N,N*-dimetiltriptamina, constatado através de análises cristalográficas por difração de Raios X e DSC.

Frente à impossibilidade de aquisição de um padrão analítico comercial de DMT, inicialmente, os trabalhos voltaram-se para o isolamento desse alcaloide das cascas da *M. tenuiflora*. O método proposto para tal, mesmo utilizando a clássica extração líquido-líquido, permite a recuperação de, praticamente, todo o hexano empregado no processo de extração e purificação do DMT. Os cristais brancos assim obtidos apresentaram nível de pureza superior a 95%, constatado por técnicas espectrofotométricas de absorção molecular no UV próximo. Análises por RMN de carbono e hidrogênio, espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas comprovaram tratar-se do analito em questão. Assim, os cristais brancos de DMT, isolados das cascas internas da *M. tenuiflora*, mostraram-se apropriados para a

utilização como padrão cromatográfico, sendo aplicados nos métodos de determinação de DMT, desenvolvidos ao longo desse estudo.

Em paralelo, junto aos cristais brancos do alcaloide, percebeu-se a presença de uma fração amarela de baixo ponto de fusão que, submetido à análise por espectrometria de massas, constatou-se tratar do próprio *N,N*-dimetiltryptamina. Por meio de ensaios termoanalíticos (DSC) e de análises por difração de Raios X, foi possível comprovar a existência de duas formas polimórficas para o DMT, justificando assim a grande variabilidade para os valores de pontos de fusão, reportados na literatura para esse composto. A Forma II, metaestável, possui menor ponto de fusão e apresenta instabilidade térmica, convertendo-se nos cristais da Forma I. Os dados também confirmam a existência de DMT amorfo, junto aos cristais de DMT, principalmente na fração amarela, amostras Y1 e Y2. A coloração foi atribuída à presença de DMT amorfo nessas amostras.

O método desenvolvido para a determinação de DMT nas cascas da *M. tenuiflora* por MSPD/GC-MS mostrou-se adequado, com aceitáveis níveis de exatidão, precisão e seletividade. Além disso, apresenta baixo consumo de reagentes, utiliza pequena quantidade de amostra por análise, com mínima manipulação. O volume de hexano empregado por análise é relativamente pequeno, 30 mL, com grande economia de tempo no preparo de amostras. O solvente pôde ser facilmente recuperado na fase de concentração das amostras e devidamente reciclado.

Os níveis de DMT, encontrados nas cascas da planta, estiveram na faixa compreendida entre 1,26 e 9,35 mg g⁻¹. De modo geral, as plantas submetidas a uma maior escassez hídrica (sertão de Sergipe), apresentaram maiores níveis de DMT do que aquelas situadas em áreas de maiores índices pluviométricos (litoral de Sergipe). As

cascas da raiz tendem a apresentar maiores concentrações de DMT do que as cascas do caule.

Para a determinação de DMT, nas amostras reais de vinho da jurema e ayahuasca, foi desenvolvido e validado um método por SPME seguido de GC-MS. A metodologia SPME não utiliza solventes, sendo de simples execução e de grande seletividade. O método apresentou excelentes figuras de mérito, sendo apropriado para a determinação de DMT nessas matrizes aquosas. A análise das amostras reais de vinho da jurema revelou uma variação de até 18 vezes nos níveis de DMT nas bebidas, entre 0,10 e 1,81 g L⁻¹. Para as amostras de ayahuasca, a variabilidade foi de aproximadamente 7 vezes, com níveis entre 0,17 e 1,14 g L⁻¹.

Também, através do mesmo método, foram analisadas cinco amostras de vinho da jurema produzidas em laboratório, utilizando diferentes processos de preparação nos quais se variou a temperatura, o pH do meio extrativo e o teor de álcool. Constatou-se ganho na concentração de DMT nas bebidas, quando a extração deu-se em meio ácido (pH 2) ou quando se aumentou o teor de etanol (50%) no processo de extração. O aumento da temperatura, durante o processo de extração, pareceu não acarretar ganho na quantidade extraída de DMT do material vegetal.

9. Perspectivas

Como proposta de continuidade aos trabalhos aqui apresentados, será feito um estudo mais amplo e detalhado sobre o polimorfismo do DMT, dirigido à identificação das estruturas polimórficas apresentadas por esse composto. Por outro lado, serão desenvolvidos métodos analíticos com pouca geração de resíduos para a determinação simultânea de β -carbolinas e de DMT, nas mesmas matrizes, além de outras espécies vegetais, oferecendo ganho de tempo e redução dos custos de análise, em comparação aos métodos já descritos.

10. Considerações finais

Na Idade Média, o uso de vegetais, fungos e secreções animais, contendo compostos com acentuado efeito psicoativo, foi intensamente combatido pela Igreja Católica. Associava-se o ato às “forças do mal” e aqueles, que incentivavam essas práticas, poderiam ser executados como bruxos nas fogueiras da Inquisição. Com a descoberta do Novo Mundo, o mesmo conceito foi levado aos povos nativos das Américas que, desde tempos imemoriais, já empregavam seus próprios preparos psicoativos com o principal intuito de acessar aos seus deuses. Aqui, o poder coercitivo exercido pela Igreja também se fez presente.

A lei brasileira, acompanhando a instituição do *Controlled Substances Act*, assinado em 1971 pelos membros da Organização das Nações Unidas (ONU), considera delito penal o consumo de uma série de compostos psicoativos. Inseriu o DMT e outros como a psilocibina, psilocina, LSD-25, mescalina e canabinoides na categoria de substâncias sem fins terapêuticos, de uso não seguro e com alto potencial de abuso. Configuram na Lista F2 da Portaria n° 344/1998, ANVISA, como substâncias psicotrópicas de uso proscrito. Paradoxalmente, o Estado brasileiro contempla o consumo legal da ayahuasca, em contexto religioso, inclusive por mulheres grávidas e crianças, mesmo não havendo estudos científicos conclusivos sobre os efeitos da bebida no organismo de indivíduos com o sistema nervoso central ainda em formação.

Em uma parte dos casos, mas não na maioria, os líderes religiosos estipulam restrições em relação às quantidades oferecidas e ao número de rituais específicos para a participação de crianças. Nesses centros, no momento da admissão de um indivíduo adulto, que se propõe a seguir a religião, é feita uma entrevista na qual, entre outros

aspectos, procura-se elucidar o quadro clínico a partir do seu histórico médico, a fim de avaliar se há a possibilidade do pretense, em participar no consumo do sacramento. Sabe-se que indivíduos com certas patologias comuns, como a hipertensão, ou com distúrbios mentais, como transtorno bipolar e esquizofrenia, são severamente contraindicados à ingestão da ayahuasca.

Mesmo com os critérios adotados nos centros religiosos mais sérios, não se tem conhecimento preciso acerca das concentrações dos psicoativos nas bebidas, uma vez que esses níveis variam muito nos vegetais utilizados nesses preparos, dependendo de fatores como as características da terra, condições climáticas e das quantidades vegetais empregadas na preparação da bebida. Até mesmo o horário de coleta das plantas pode influenciar no nível de concentração de um dado composto.

O que se constata, contudo, devido à rápida expansão sem controle desses cultos, inclusive com a proliferação de novas ramificações religiosas, com novos dogmas, geralmente, em muitos centros, não há sequer uma liderança devidamente preparada para conduzir os rituais envolvendo a ayahuasca. Além da falta de critérios na administração da bebida, também não há um acompanhamento adequado, fundamental aos que se encontram sob o efeito da combinação de DMT e inibidores da MAO, e muito menos, conhecimento sobre possíveis interações com alguns medicamentos alopáticos de uso contínuo ou com alimentos ricos em tiramina.

Por outro lado, contrariando a definição imposta pela Lei, inúmeras aplicações terapêuticas vêm sendo apontadas em crescente número de pesquisas, como nos estudos para a aplicação da ibogaína e da própria ayahuasca, na recuperação de dependentes crônicos de álcool, tabaco, heroína, cocaína e suas variações. Ainda, fármacos constituídos por princípios psicoativos do gênero *Cannabis* são empregados em terapias, para os casos de esclerose múltipla e glaucoma. Também, como estimulantes

do apetite, assim como na diminuição de náuseas, comuns nos tratamentos de AIDS e câncer. Há pesquisas que comprovam a efetiva ação dos canabinoides na redução de tumores cancerígenos, em modelos animais. Testes clínicos em humanos estão em curso.

Sem esquecermos, obviamente, o sucesso obtido no intenso uso do LSD-25, da psilocibina e da mescalina em importantes estudos psicoterapêuticos, notadamente nas décadas de 1950 e 1960. Apesar do crescente número de novas publicações, reportando aplicações do LSD nessas psicoterapias, após quase duas décadas de proibições nos EUA, não há mais o interesse da indústria farmacêutica em investir em novas pesquisas. Para citar apenas um exemplo, um derivado bromado do LSD, sintético não psicoativo, apresenta eficácia comprovada no tratamento dos sintomas da enxaqueca crônica, sem graves reações adversas. No entanto, nenhum grupo farmacêutico demonstrou interesse na nova droga. A patente do LSD e dos seus derivados caducou ainda na década de 1960.

No mundo ocidental, tem-se o comércio regularizado de álcool e tabaco, responsáveis diretos por milhões de mortes anuais em todo o mundo, com enormes custos para o Estado, em gastos envolvidos com o tratamento de patologias diretamente relacionadas ao consumo desses psicoativos, como o câncer. Aquilo que é legalmente comercializado causa muito mais danos físicos e dependência, do que substâncias contidas na Lista F2, como os canabinoides e o LSD. A proibição, no caso específico da Cannabis, que mesmo apresentando mais de três milênios de uso terapêutico, foi sustentado pela divulgação massiva nos EUA, ainda no início do século 20, de falsos efeitos associados ao consumo da planta.

No Brasil, não há proibição explícita às pesquisas envolvendo a classe de psicoativos constantes na Lista F2, apenas a ressalva de que todo estudo desse tipo deve

ser submetido à aprovação da ANVISA, através da expedição de “Autorização Especial Simplificada para Estabelecimentos de Ensino e Pesquisa”. O pesquisador, interessado em desenvolver estudos envolvendo esses compostos, a fim de adquirir os padrões comerciais em laboratórios no exterior, deve providenciar uma série de documentos para compor um dossiê a ser avaliado por essa Agência. Os trâmites, claramente, parecem atuar em consonância com a política proibicionista do Estado.

Apesar de algumas dessas substâncias possuírem grande potencial para uso terapêutico, além de não apresentarem riscos à dependência química, ou não provocarem danos fisiológicos significativos, ainda assim prevalece o preconceito e transparece a ineficácia das leis que visam combater o uso de drogas proscritas. Se não são capazes de definir com critérios científicos o que é realmente nocivo, sequer conseguem impedir o consumo crescente que, por sua vez, financia o próprio crime organizado.

Por fim, pela burocracia absurda imposta à pesquisa, essas leis têm ação negativa onde menos deveriam atuar, sobre a evolução do conhecimento humano. Diante da derrota na guerra contra as drogas, com trilhões de dólares gastos, em poucas décadas, para apenas constatar o aumento do consumo e da criminalidade, a ONU, com a criação do *Global Commission on Drug Policy*, sinaliza para o final do conflito. Com a posição de alguns países na direção da descriminalização do uso de psicoativos, no século 21, começamos a nos distanciar da “Idade das Trevas”.

*“If the doors of perception were cleansed,
everything would appear to man as it is, infinite”*

William Blake (1757-1827)

11. Referências bibliográficas

Almeida, C.F.C.B.R., Silva, T.C. L., Amorim, E.L.C., Maia, M.B. S., Albuquerque, U.P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127-142, 2005.

Amsterdam, J.V., Talhout, R., Vleeming, W., Opperhuizen, A. Contribution of monoamine oxidase (MAO) inhibition to tobacco and alcohol addiction. **Life Sciences**, v. 79, p. 1969-1973, 2006.

Anderton, N., Cockrum, P.A., Walker, D.W., Edgar, J.A. **Identification of a toxin suspected of causing sudden death in livestock grazing *Phalaris* pastures**. In: Plant Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical, and Ecological Aspects (Eds. Colegate, S.M., Dorling, P.R.). CAB International, Wallingford, 1994.

Agurell, S., Holmsted. B., Lindgren, J.E. Alkaloid content of *Banisteriopsis Rusbyana*. **American Journal of Pharmacy**, v. 140, p. 148-151, 1968a.

Agurell, S., Holmsted. B, Lindgren, J.E., Schultes, R.E. Identification of two new beta-carboline alkaloids in South American hallucinogenic plants. **Biochemical Pharmacology**, v. 17, p. 2487-2488, 1968b.

Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M. Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 497-511, 2008.

Arthur C.L., Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, p. 2145-2148, 1990.

Arthur, H.R., Loo, S.N., Lamberton, J.A. N-methylated tryptamines and other constituents of *Acacia confusa* of Hong Kong. **Australian Journal of Chemistry**, v. 20, p. 811-813, 1967.

Barker, S.A., Monti, J.A., Christian, S.T. *N,N*-dimethyltryptamine: an endogenous hallucinogen. **International Review of Neurobiology**, v. 22, p. 83-110, 1981.

Barker, S.A., Long, A.R., Short, C.R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography**, v. 475, p. 353-361, 1989.

Barker, S.A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 115-127, 2000.

Barker, S.A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysics Methods**, v. 70, p. 151-162, 2007.

Barker, S.A., McIlhenny, E. H., Strassman, R. A critical review of reports of endogenous psychedelic *N,N*-dimethyltryptamines in humans: 1955-2010. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, p. 617-635, 2012.

Batista, L.M., Almeida, R.N. Central effects of the constituents of *Mimosa ophthalmocentra* Mart. Ex Benth. **Acta Farmaceutica. Bonaerense**, v. 16, p. 83-86, 1997.

Batista, L.M., Almeida, R.N., da Cunha, E.V.L., da Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M. Isolation and identification of putative hallucinogenic constituents from the roots of *Mimosa ophthalmocentra*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, p. 50-53, 1999.

Belardi, R., Pawliszyn, J. The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibres in Extraction of Organics from Water Matrix Samples, and their Rapid Transfer to Capillary Column. **Water Pollution Research Journal of Canada**, v.1, p. 179-191, 1989.

Bergin, R., Carlström, D., Falkenberg, G., Ringertz, H. Preliminary X-ray crystallographic study of some psychoactive indole bases, **Acta Crystallographica B**, v. 24, p. 882, 1968.

Bley, O., Siepmann, J., Bodmeier, R. Importance of glassy-to-rubbery state transitions in moisture-protective polymer coatings, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 146-153, 2009.

Bodendorf, K., Walk, A. Darstellung und Reduktion von Indolyl-(3)-aminomethylketonen, **Archives of Pharmacology**, v. 294, p. 484-487, 1961.

Bogenschutz, M.P., Pommy, J.M. Therapeutic mechanisms of classic hallucinogens in the treatment of addictions: from indirect evidence to testable hypotheses. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, p. 543-555, 2012.

Boit, H.G. **Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960 unter Berücksichtigung der Fortschritte seit 1950**, Akademie-Verlag, Berlin, 1961.

Bojko, B., Cudjoe, E., Gómez-Ríos, G.A., Gorynski, K., Jiang, R., Reyes-Garcés, N., Risticvic, S., Silva, E.A.S., Togunde, O., Vuckovic, D., Pawliszyn, J. SPME – Quo vadis? **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 132-151, 2012.

Brandt, S.D., Freeman, S., Fleet, I.A., McGagh, P., Alder, J.F. Analytical chemistry of synthetic routes to psychoactive tryptamines Part II. Characterisation of the Speeter and Anthony synthetic route to *N,N*-dialkylated tryptamines using GC-EI-ITMS, ESI-TQMS-MS and NMR. **The Analyst**, v. 130, p. 330–344, 2005.

Brandt, S.D., Moore, S.A., Freeman, S., Kanu, A.B. Characterisation of the synthesis of *N,N*-dimethyltryptamine by reductive amination using gas chromatography ion trap mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, p. 330-338, 2010.

Bringmann, G., Feineis, D., Friedrich, H., Hille, A. Endogenous alkaloids in man – synthesis, analytics, *in vivo* identification and medicinal importance. **Planta Medica**, v. 57, p. 73-89, 1991.

Brush, D.E., Bird, S.B., Boyer, E.W. Monoamine oxidase inhibitor poisoning resulting from Internet misinformation on illicit substances. **Journal of Toxicology-Clinical Toxicology**, v. 42, p. 191-195, 2004.

Bourke, C.A., Carrigan, M.J. Mechanisms underlying *Phalaris aquatica* "sudden death" syndrome in sheep. **Australian Veterinary Journal**, V. 69, p. 165-167, 1992.

Buchanan, M.S., Carroll, A.R., Pass, D., Quinn, R.J. NMR spectral assignments of a new chlorotryptamine alkaloid and its analogues from *Acacia confusa*. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 45, p. 359-261, 2007.

Buckton, G., Adeniyi, A.A., Saunders, M., Ambarkhane, A. HyperDSC studies of amorphous polyvinylpyrrolidone in a model wet granulation system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 61-65, 2006.

Bullis, R.K. The "Vine of the Soul" vs. the controlled substances act: implications of the hoasca case. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 40, p. 193-199, 2008.

Callaway, J.C. Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, p. 151-155, 2005.

Callaway, J.C., Raymon, L.P., Hearn, W.L., McKenna, D.J., Grob, C.S., Brito, G.S., Mash, D.C. Quantitation of *N,N*-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, p. 492-497, 1996.

Callaway, J.C., Brito, G.S., Neves, E.S. Phytochemical analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 37, p. 145-150, 2005.

Callaway, J.C., Grob, C.S., McKenna, D.J., Nichols, D. E., Shulgin, A., Tupper, K.W. A demand for clarity regarding a case report on the ingestion of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) in an ayahuasca preparation. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, p. 406-407, 2006.

Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Laganà, A., Piovesana, S., Samperi, R. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, *no prelo*, 2012.

CEMACT/CFE - Conselho Estadual de Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia/ Conselho Florestal Estadual. Resolução Conjunta n° 004 de 20 de dezembro de 2010. **Diário Oficial do Estado do Acre**, 22/12/2010.

Ciprian-Ollivier, J., Cetkovish-Bakmas, M.G. Altered consciousness states and endogenous psychoses: a common molecular pathway? **Schizophrenia Research**, v. 28, p. 257-265, 1997.

CONAD - Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas. Resolução n°5 de 4 de novembro de 2004. **Diário Oficial da União**. Imprensa Nacional. Ed. 214 de 08/11/2004.

CONAD - Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas. Resolução nº1 de 25 de janeiro de 2010. **Diário Oficial da União**. Imprensa Nacional. Ed. 17 de 26/01/2010.

Cordioli, A. V. **Psicofármacos: consulta rápida**. Artmed, Porto Alegre, 2005.

Culvenor, C.C.J., Dal Bon, R., Smith, L.W. Occurrence of indolealkylamine alkaloids in *Phalaris tuberosa* and *arundinacea*, **Australian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 1301-1304, 1964.

Dalgarno, P. Buying Ayahuasca and other entheogens online: a word of caution. **Addiction Research & Theory**, v.16, p.1-4, 2008.

Dobkin de Rios, M., Rumrill, R. **A hallucinogenic tea, laced with controversy: ayahuasca in the Amazon and the United States**. Praeger, Westport, 2008.

Elger, F. Ueber das Vorkommen von harmin in einer südamerikanischen Liane (Yagé). **Helvetica Chimica Acta**, v. 11, p. 162-166, 1928.

Falkenberg, G. The crystal and molecular structure of (*N,N*)-dimethyltryptamine, **Acta Crystallographica B**, v. 28, p. 3075-3083, 1972.

Farré, M., Pérez, S., Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., Barceló, D. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 1347-1362, 2010.

Fish, M.S., Johnson, N.M., Horning, E.C. *t*-Amine oxide rearrangements. *N,N*-Dimethyltryptamine oxide, **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p. 3668-3671, 1956.

Fitzgerald, J.S., Sioumis, A.A. Alkaloids of the Australian Leguminosae. V. The occurrence of methylated tryptamines in *Acacia maidenii* F. Muell, **Australian Journal of Chemistry**, v. 18, p. 433-434, 1965.

Fleming, I., Woolias, M. A new synthesis of indoles particularly suitable for the synthesis of tryptamines and tryptamine itself, **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 3, p. 829-837, 1979.

Ford, J.L., Mann, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 422-430, 2012.

Gable, R.S. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. **Addiction**, v. 102, p. 24-34, 2007.

Galuszka, A., Migaszewski, Z.M., Konieczka, P., Namieśnik, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61-72, 2012.

Gambelunghe, C., Aroni, K., Rossi, R., Moretti, L., Bacci, M. Identification of *N,N*-dimethyltryptamine and beta-carbolines in psychotropic ayahuasca beverage. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 1056-1059, 2008.

Gardner, J., Bell, A.H. **Overcoming anxiety, panic and depression: new ways to regain your confidence**. Career Press, Franklin Lakes, 1999.

Garrigues, S., Armenta, S., de la Guardia, M. Green strategies for decontamination of analytical wastes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 592-601, 2010.

Ghosal, S., Mukherjee, B. Alkaloids of *Desmodium pulchellum* Benth. ex Baker, **Chemical & Industry**, p. 1800, 1964.

Gomes, N.G.M., Campos, M. G., Orfão, J.M.C., Ribeiro, C.A.F. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, p. 1372-1389, 2009.

Grina, J.A., Ratcliff, M.R., Stermitz, F.R. Old and new alkaloids from *Zanthoxylum arborescens*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 2648-2651, 1982.

Grünewald, R.A. **Sujeitos da jurema e o resgate da “ciência do índio”**. in: O uso ritual das plantas de poder (Eds: B.C. Labate, S.L. Goulart) Mercado das Letras, Campinas, 2005.

Häfelinger, G., Nimtz, M., Horstmann, V., Benz, T. Trifluoroacetylation of methylated derivatives of tryptamine and serotonin by different reagents. Synthesis, spectroscopic characterizations, and separations by capillary-gas-chromatography, **Zeitschrift. Naturforschung B**, v. 54, p. 397-414, 1999.

Hall, E.S., McCapra, F., Scott, A.I. Biogenetic-type synthesis of the calycanthaceous alkaloids, **Tetrahedron**, v. 23, p. 4131-4141, 1967.

Heinzelman, R.V., Szmuszkowicz, J. Recent studies in the field of indole compounds, **Progress in Drug Research**. v. 6, p. 75-150, 1963.

Hemmateenejad, B., Abbaspour, A., Maghami, H., Miri, R., Panjehshahin, M.R. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 575, p. 290-299, 2006.

Herraiz, T., Chaparro, C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, p. 378-386, 2005.

Herraiz, T., González, D., Ancín-Azpilicueta, C., Arán, V.J., Guillén, H. beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 839-845, 2010.

Hochstein, F.A., Paradies, A.M. Alkaloids from *Banisteria caapi* and *Prestonia amazonicum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 5735-5736, 1957.

- Hofmann, A. **LSD: my problem child**. McGraw-Hill, New York, 1980.
- Holman, C. Surfing for a shaman: analyzing an ayahuasca website. **Annals of Tourism Research**, v. 38, p. 90-109, 2011.
- Hoshino, T., Shimodaira, K. Synthese des Bufotenins und über 3-Methyl-3- β -oxyäthylindolenin. Synthesen in der Indol-Gruppe. XIV, **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 520, p. 19-30, 1935.
- Jacob, M.S., Presti, D.E. Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine. **Medical Hypotheses**, v. 64, p. 930-937, 2005.
- Jenkins, R. & Snyder, R.L. **Introduction to x-ray powder diffractometry**. Wiley-Interscience, New York, 1996.
- Julia, M., Bagot, J., Siffert, O. Sur une nouvelle voie d'accès aux tryptamines, **Bulletin de la Société Chimique de France**, v. 4, p. 1424-1426, 1973.
- Kan-Fan, C., Das, B.C., Boiteau, P., Potier, P. Alcaloïdes de *Vepris ampody* (Rutacées), **Phytochemistry**, v. 9, p. 1283-1291, 1970.
- Kartal, M., Altun, M.L., Kurucu, S. HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 263-269, 2003.
- Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J. Applications of Solid-Phase Microextraction in Food Analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 35-62, 2000.
- Kristenson, E.M., Brinkman, U.A.T., Ramos, L. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 96-111, 2006.
- Khuzhaev, V.U., Abdullaev, U.A., Aripova, S.F. Alkaloids of *Arundo donax* V. Mass spectrometry of the alkaloids of *Arundo donax*, **Chemistry of Natural Compounds**, v. 32, p. 190-193, 1996.
- Labate, B.C., Feeney, K. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: implications and challenges. **International Journal of Drug Policy**, v. 23, p. 154-161, 2012.
- Laing, R., Siegel, J.A. **Hallucinogens: a Forensic Drug Handbook**. Academic Press, London, 2003.
- Laquelle, X., Martins, S. L'ayahuasca: clinique, neurobiologie et ambiguïté thérapeutique. **Annales Médico Psychologiques**, v. 166, p. 23-27, 2008.
- Leite, M.G.R. **Estudo do uso ilícito de uma planta alucinógena, *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta), da Caatinga nordestina**. Academia Nacional de Polícia, Brasília, 2009.

Lewin, L. Untersuchungen über *Banisteria caapi* Spr. (ein südamerikanisches Rauschmittel) **Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 129, p. 133-149, 1928.

Lewis, A., Miller, J.H., Lea, R.A. Monoamine oxidase and tobacco dependence. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 182-195, 2007.

de Lima, O.G. Observações sobre o “vinho da jurema” utilizado pelos índios Pancarú de Tacaratú (Pernambuco). **Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, v. 4, p. 45-80, 1946.

Lord, H., Pawliszyn, J. Evolution of Solid-Phase Microextraction Technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.

MacRae, E.J.B.N. Santo Daime and Santa Maria: the licit use of ayahuasca and the illicit use of cannabis in an Amazonian religion. **International Journal of Drug Policy**, v. 9, p. 325-338, 1998.

MacRae, E.J.B.N. The religious uses of licit and illicit psychoactive substances in a branch of the Santo Daime religion. **Fieldwork in Religion**, v. 2, p. 393-414, 2006.

Manske, R.H.F. A synthesis of the methyltryptamine and some derivatives, **The Canadian Journal of Research**, v. 5, p. 592, 1931.

der Marderosian, A.H., Kensinger, K.M., Chau, J.M., Goldstein, F.J. The use of hallucinatory principles of the psychoactive beverage of the Cashinahua tribe (Amazon basin). **Drug Dependence**, v. 5, p. 7-14, 1970.

McKenna, D.J., Towers, G.H.N., Abbott, F. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carboline constituents of ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 195-223, 1984.

McKenna, D.J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, p. 111-129, 2004.

McIlhenny, E.H., Pipkin, K.E., Standish, L.J., Wechkin, H.A., Strassman, R.J., Barker, S.A. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8960-8968, 2009.

Meckes-Lozoya, M., Lozoya, X., Marles, R.J., Soucy-Breau, C., Sen, A., Arnason, J.T. *N,N*-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* bark (tepescohuite). **Archivos de Investigacion Médica**, v. 21, p. 175-177, 1990.

Melchert, W.R., Reis, B.F., Rocha, F.R.P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8-19, 2012.

Martinez, S.T., Almeida, R., Pinto, A.C. Alucinógenos naturais: um voo da Europa medieval ao Brasil. **Quimica Nova**, v. 32, p. 2501-2507, 2009.

Metzner, R. Hallucinogenic drugs and plants in psychotherapy and shamanism. **Journal of Psychoactive Drugs**, 30, 333-341, 1998.

Metzner, R. **Sacred vine of spirits: ayahuasca**. Park Street Press, Rochester, 2006.

Monsef-Esfahani, H.R., Faramarzi, M.A., Mortezaee, V., Amini, M., Rouini, M.R. Determination of harmine and harmaline in *Peganum harmala* seeds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Applied Sciences**, v. 8, p. 1761-1765, 2008.

Montenegro, G. O uso de psicotrópicos na América Pré-Colombiana a partir de uma perspectiva religiosa. **Amerindia**, v. 2, p. 01-13, 2006.

de Moraes, E.H.F., Alvarenga, M.A., Ferreira, Z.M.G.S., Akisue, G. As bases nitrogenadas da *Mimosa scabrella* Benth. **Quimica Nova**, v. 13, p. 308-309, 1990.

Morimoto, H., Matsumoto, N. Über Alkaloide, VI. Inhaltsstoffe von *Lespedeza bicolor* var. *japonica*, II, **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 692, p. 194-199, 1966.

Morimoto, H., Oshio, H. Über Alkaloide, V. Inhaltsstoffe von *Lespedeza bicolor* var. *japonica*, I. Über Lespedamin, ein neues Alkaloid, **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 682, p. 212-218, 1965.

da Mota, C.N. **Jurema e identidades: um ensaio sobre a diáspora de uma planta**. in: O uso ritual das plantas de poder. (Eds: B.C. Labate, S.L. Goulart). Mercado das Letras, Campinas, 2005.

da Mota, C.N. **Os filhos de Jurema na floresta dos espíritos: ritual e cura entre dois grupos indígenas do nordeste brasileiro**. Edufal, Maceió, 2007.

Moura, S., Carvalho, F.G., Rodrigues de Oliveira, C.D., Pinto, E., Yonamine, M. qNMR: An applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 79-83, 2010.

Nicasio, M.P., Villarreal, M.L., Gillet, F., Bensaddek, L., Fliniaux, M.A. Variation in the accumulation levels of *N,N*-dimethyltryptamine in micro-propagated trees and in in vitro cultures of *Mimosa tenuiflora*. **Natural Product Research**, v. 19, p. 61-67, 2005.

Ogalde, J.P., Arriaza, B.T., Soto, E.C. Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, p. 467-472, 2009.

Osmond, H., Smythies, J. Schizophrenia: A new approach. **British Journal of Psychiatry**, v. 98, p. 309-315, 1952.

Ott, J. **Farmahuasca, anahuasca e jurema preta: farmacologia humana de DMT oral mais harmina**, in O uso ritual da Ayahuasca (Eds: Labate, B.C., Araújo, W. S.). Mercado das Letras, Campinas, 2009.

Pachter, I.J., Zacharias, D.E., Ribeiro, O. Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina*, and *Mimosa hostilis*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 24, p. 1285-1287, 1959.

Parmar, M.M., Khan, O., Seton, L., Ford, J.L. Polymorph selection with morphology control using solvents. **Crystal Growth & Design**, v. 7, p. 1635-1642, 2007.

Pawliszyn, J. **Solid-Phase Microextraction**. Willey-VHC, New York, 1997.

Pawliszyn, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2543-2558, 2003.

Perrot, E., Hamet, R. Le Yagé, plante sensorielle des Indiens de la région amazonienne de l'Equateur et de la Colombie. **Comptes Rendus**, v. 184, p. 1266-1268, 1927.

Pinkley, H.V. Etymology of *Psychotria* in view of a new use of the genus. **Rhodora**, v. 71, p. 535-540, 1969.

Pires, A.P.S., de Oliveira, C.D.R., Moura, S., Dörr, F.A., Silva, W.A.E., Yonamine, M. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage. **Phytochemical Analysis**, v. 20, p. 149-153, 2009.

Poisson, J. Note sur le "Natem", boisson toxique péruvienne et ses alcaloïdes, **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 23, p. 241-244, 1965.

Pulpati, H., Biradar, Y.S., Raiani, M. High-performance thin-layer chromatography densitometric method for the quantification of harmine, harmaline, vasicine, and vasicinone in *Peganum harmala*. **Journal of Aoac International**, v. 91, p. 1179-1185, 2008.

Queiroz, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana in association with Royal Botanic Gardens, Kew and Associação Plantas do Nordeste, Feira de Santana, 2009.

Ramos, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221 p. 84-98, 2012.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. e Moore, P.K. **Pharmacology**. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003

Rätsch, C. **The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and its Applications**. Park Street Press, Rochester, 2005.

Riba, J., Rodriguez-Fornells, A., Urbano, G., Morte, A., Antonijoan, R., Montero, M., Callaway, J.C., Barbanoj, M.J. Subjective effects and tolerability of the South American

psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 154, p. 85-95, 2001.

Rivera-Arce, E., Chavez-Soto, M.A., Herrera-Arellano, A., Arzate, S., Agüero, J., Ferial-Romero, I.A., Cruz-Guzman, A., Lozoya, X. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 523-528, 2007.

Rivier, L., Lindgren, J.E. "Ayahuasca," the South American hallucinogenic drink: an ethnobotanical and chemical investigation. **Economic Botany**, v. 26, p. 101-129, 1972.

Rovelli, B., Vaughan, G.N. Alkaloids of Acacia. I. N_bN_b -Dimethyltryptamine in *Acacia phlebophylla* F. Muell, **Australian Journal of Chemistry**, v. 20, p. 1299-1300, 1967.

Saavedra, J., Axelrod, J. Psychotomimetic *N*-methylated tryptamines: Formation in brain *in vivo* and *in vitro*. **Science**, v. 175, p. 1365-1366, 1972.

Schultes, R.E., Hofmann, A. **The Botany and Chemistry of Hallucinogens**. Charles C. Thomas, Springfield, 1980.

Schultes, R.E., Hofmann, A., Ratsch, C. **Plants of the Gods: their Sacred, Healing and Hallucinogenic Powers**. Healing Art Press, Rochester, 2001.

Schifano, F., Deluca, P., Baldacchino, A., Peltoniemi, T., Scherbaum, N., Torrens, M., Farre, M., Flores, I., Rossi, M., Eastwood, D., Guionnet, C., Rawaf, S., Agosti, L., Di Furia, L., Brigada, R., Majava, A., Siemann, H., Leoni, M., Tomasin, A., Rovetto, F., Ghodse, A.H. Drugs on the web; the Psychonaut 2002 EU project. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 30, p. 640-646, 2006.

Schripsema, J., Dagnino, D., Gossman, G. **Alcalóides Indólicos**, in *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, (Eds: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick). Editora da UFSC, Florianópolis, 2007.

Shulgin, A.T. Profiles of psychedelic drugs: DMT, **Journal of Psychedelic Drugs**, v. 8 p. 167-168, 1976.

Shulgin, A.T., Carter, M.F. *N,N*-diisopropyltryptamine (DIPT) and 5-methoxy-*N,N*-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT), two orally active tryptamine analogs with CNS activity. **Psychopharmacology Communications**, v. 4, p. 363-369, 1980.

Shulgin, A.T., Shulgin, A. **TIHKAL. The continuation**. Transform Press, Berkeley, 1997.

Sintas, J.A., Vitale, A.A. Synthesis of ^{131}I derivatives of indolealkylamines for brain mapping, **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 39, p. 677-684, 1997.

Skerritt, J.H., Guihot, S. L., McDonald, S.E., Culvenor, R. A. Development of immunoassays for tyramine and tryptamine toxins of *Phalaris aquatica* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 27-32, 2000.

Sklerov, J., Levine, B., Moore, K.A., King, T., Fowler, D.A fatal intoxication following the ingestion of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine in an ayahuasca preparation. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, p. 838-841, 2005.

Smith, R.L., Canton, H., Barrett, R.J., Sanders-Bush, E. Agonist properties of *N,N*-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 61, p. 323-330, 1998.

Sousa, R.S., Irigoyen, L.F. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 19, p. 116-122, 1999.

de Souza, R.S.O., Albuquerque, U.P., Monteiro, J.M., de Amorim, L.C. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 51, p. 937-947, 2008.

Stafford, P. **Psychedelics Encyclopedia**. Ronin Publishing, Berkeley, 1992

Strassman, R.J. Hallucinogenic drugs in psychiatric research and treatment. Perspectives and prospects. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 183, p. 127-138, 1995.

Strassman, R. **DMT: the spirit molecule**. Park Street Press, Rochester, 2001.

Threlfall, T. Structural and thermodynamic explanations of Ostwald's rule. **Organic Process Research and Development**, v. 7, p. 1017-1027, 2003.

Tobiszewski, M., Namieśnik, J. Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 67-73, 2012.

Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Zygmunt, B., Namieśnik, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 943-951, 2009.

Tupper, K.W. The globalization of ayahuasca: harm reduction or benefit maximization? **International Journal of Drug Policy**, v. 19, p. 297-303, 2008.

Ueno, A., Ikeya, Y., Fukushima, S., Noro, T., Morinaga, K., Kuwano, H. Studies on the constituents of *Desmodium caudatum* DC, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 2411-2416, 1978.

Wang, Y.H., Samoylenko, V., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Miller, L.S., Chaurasiya, N.D., Rahman, M.M., Tripathi, L.M., Khan, S.I., Joshi, V.C., Wigger, F.T., Muhammad, I. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 662-671, 2010.

Warren, R.J. Fatal nicotine intoxication resulting from the ingestion of Ayahuasca. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 28, p. 287-292, 2004.

Welch, C.J., Wu, N., Biba, M., Hartman, R., Brkovic, T., Gong, X., Helmy, R., Schafer, W., Cuff, J., Pirzada, Z., Zhou, L. Greening analytical chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 667-680, 2010.

Wenkert, E., Kryger, A.C. Oxytryptamines, **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 55, p. 1122-1124, 1978.

Whitney, S., Grigg, R., Derrick, A., Keep, A. [Cp*IrCl₂]₂-Catalyzed indirect functionalization of alcohols: novel strategies for the synthesis of substituted indoles. **Organic Letters**, v. 9, p. 3299-3302, 2007.

Wisconsin Alumni Research Foundation, Ruoho, A.E., Hajipour, A.R., Chu, U.B., Fontanilla, D.A. Sigma-1 receptor ligands and methods of use, **WO2010059711 A1**, 2010.

Wolfes, O., Rumpf, K. Ueber die Gewinnung von Harmin aus einer südamerikanischen Liane. **Archive für Pharmakologie**, v. 266, p. 188-189, 1928.

Vepsäläinen, J.J., Auriola, S., Tukiainen, M., Ropponen, N., Callaway, J.C. Isolation and characterization of yuremamine, a new phytoindole. **Planta Medica**, v. 71, p. 1053-1057, 2005.

Vitale, A.A., Pomilio, A.B., Canellas, C.O., Vitale, M.G., Putz, E.M., Ciprian-Ollivier, J. *In vivo* long-term kinetics of radiolabeled *N,N*-dimethyltryptamine and tryptamine, **Journal of Nuclear Medicine**, v. 52, p. 970-977, 2011.

Yritia, M., Riba, J., Ortuño, J., Ramirez, A., Castillo, A., Alfaro, Y., de la Torre, R., Barbanj, M.J. Determination of *N,N*-dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 779, p. 271-281, 2002.

Zhou, L., Hopkins, A.A., Huhman, D.V., Sumner, L.W. Efficient and sensitive method for quantitative analysis of alkaloids in hardinggrass (*Phalaris aquatica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9287-9291, 2006.

Anexo A

RESOLUÇÃO N° 4 - CONAD, DE 4 DE NOVEMBRO DE 2004

Dispõe sobre o uso religioso e sobre a pesquisa da ayahuasca O PRESIDENTE DO CONSELHO NACIONAL ANTIDROGAS – CONAD, no uso de suas atribuições legais, observando, especialmente, o que prevê o art. 6° do Regimento Interno do CONAD; e CONSIDERANDO que o plenário do CONAD aprovou, em reunião realizada no dia 17 de agosto de 2004, o parecer da Câmara de Assessoramento Técnico-Científico que, por seu turno, reconhece a legitimidade, juridicamente, do uso religioso da ayahuasca, e que o processo de legitimação iniciou-se, há mais de dezoito anos, com a suspensão provisória das espécies vegetais que a compõem, das listas da Divisão de Medicamentos DIMED, por Resolução do Conselho Federal de Entorpecentes - CONFEN, n° 06, de 04 de fevereiro de 1986, suspensão essa que tornou-se definitiva, com base em pareceres de 1987 e 1992, indicados em ata do CONFEN, publicada no D.O. de 24 de agosto de 1992, sendo os subsequentes considerandos baseados na já referida decisão do CONAD; CONSIDERANDO que a decisão adequada, da Administração Pública, sobre o uso religioso da ayahuasca, foi proferida com base em análise multidisciplinar; CONSIDERANDO a importância de garantir o direito constitucional ao exercício do culto e à decisão individual, no uso religioso da ayahuasca, mas que tal decisão deve ser devidamente alicerçada na mais ampla gama de informações, prestadas por profissionais das diversas áreas do conhecimento humano, pelos órgãos públicos e pela experiência comum, recolhida nos diversos segmentos da sociedade civil; **CONSIDERANDO que a participação no uso religioso da ayahuasca, de crianças e mulheres grávidas, deve permanecer como objeto de recomendação aos pais, no adequado exercício do poder familiar (art. 1.634 do Código Civil), e às grávidas, de que serão sempre responsáveis pela medida de tal participação, atendendo, permanentemente, à preservação do desenvolvimento e da estruturação da personalidade do menor e do nascituro;** CONSIDERANDO que qualquer prática religiosa adotada pela família abrange os deveres e direitos dos pais "de orientar a criança com relação ao exercício de seus direitos de maneira acorde com a evolução de sua capacidade" , aí incluída a liberdade de professar a própria religião e as próprias crenças, observadas as limitações legais ditadas pelos interesses públicos gerais (cf. Convenção Sobre os Direitos da Criança, ratificada pelo Brasil, promulgada pelo Decreto nº 99.710, de 21/11/1990, art. 14); CONSIDERANDO a conveniência da implementação de estudo e pesquisa sobre o uso terapêutico da ayahuasca, em caráter experimental; CONSIDERANDO que o controle administrativo e social do uso religioso da ayahuasca somente poderá se estruturar, adequadamente, com o concurso do saber detido pelos grupos de usuários; RESOLVE: Art. 1º Fica instituído GRUPO MULTIDISCIPLINAR DE TRABALHO para levantamento e acompanhamento do uso religioso da ayahuasca, bem como para a pesquisa de sua utilização terapêutica, em caráter experimental. Art. 2º O GRUPO MULTIDISCIPLINAR DE TRABALHO será composto por seis membros, indicados pelo CONAD, das áreas que atendam, entre outros, aos seguintes aspectos: antropológico, farmacológico/bioquímico, social, psicológico, psiquiátrico e jurídico. Além disso, o grupo será integrado por mais seis membros, convidados pelo CONAD, representantes dos grupos religiosos, usuários da ayahuasca. Art. 3º O GRUPO MULTIDISCIPLINAR DE TRABALHO escolherá seu presidente e vice-presidente e deverá, como primeira tarefa, promover o cadastro nacional de todas as instituições que, em suas práticas religiosas, adotam o uso da ayahuasca, devendo essas instituições manter registro permanente de menores integrantes da comunidade religiosa, com a indicação de seus respectivos responsáveis legais, entre outros dados indicados pelo GRUPO MULTIDISCIPLINAR DE TRABALHO. Art. 4º O GRUPO MULTIDISCIPLINAR DE TRABALHO estruturará seu plano de ação e o submeterá ao CONAD, em até 180 dias, com vistas à implementação das metas referidas na presente resolução, tendo como objetivo final, a elaboração de documento que traduza a deontologia do uso da ayahuasca, como forma de prevenir o seu uso inadequado. Art. 5º O CONAD, por seus serviços administrativos, deverá consolidar, em separata, todas as decisões do CONFEN e do CONAD sobre o uso religioso da ayahuasca, para acesso e utilização dos interessados que poderão, às suas próprias expensas, extrair cópias, observadas as respectivas regras administrativas para tanto. Art. 6º Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação.

Anexo B

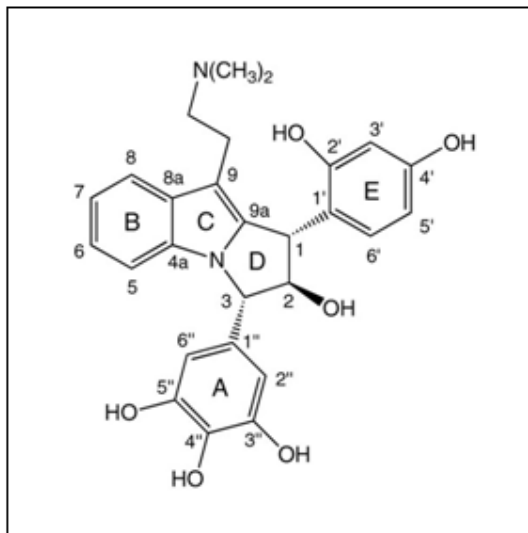


Figura 8. Estrutura sugerida para a ‘yuremamina’ [Vepsäläinen *et al.*, 2005].

Tabela 4. Variação sazonal das concentrações de triptofano, triptamina, serotonina e DMT, em cascas de *M. tenuiflora* [Nicasio *et al.*, 2005].

Composto	Janeiro			Junho		
	cascas	flores	folhas	cascas	flores	folhas
Triptofano	2,1	0,7	2,15	-	-	-
Triptamina	2,2	7,5	3,7	7,1	-	7,4
Serotonina	-	-	9,0	-	-	-
DMT	350	30	10,0	110	-	90

Anexo C

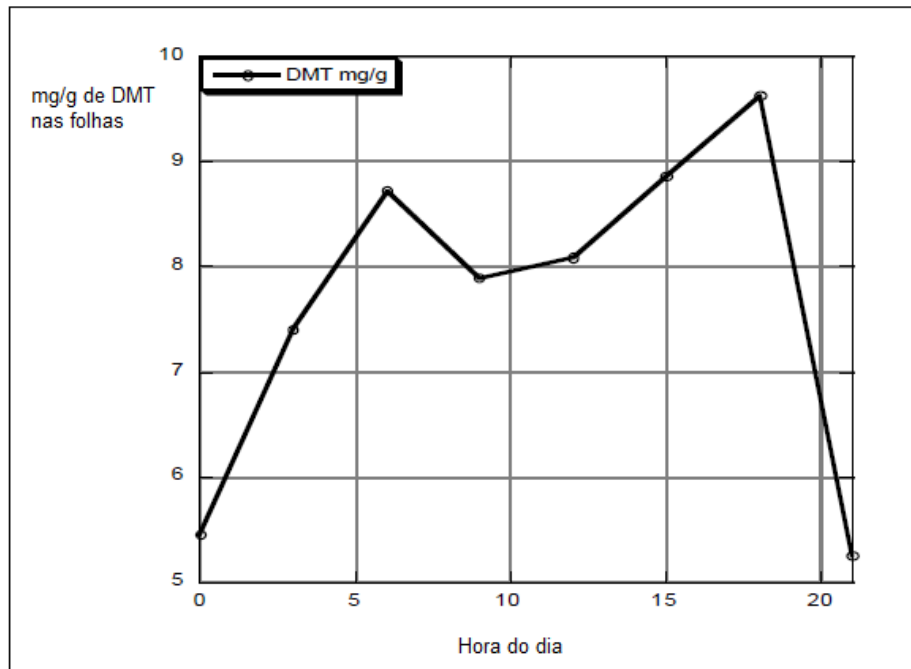


Figura 9. Variação da concentração de DMT nas folhas de *P. Viridis*, ao longo de 21 horas sucessivas [Callaway *et al.*, 2005].

Anexo D

Tabela 5. Concentrações, em mg g^{-1} , de β -carbolinas em diferentes partes de *P. harmala* [Herraiz *et al.*, 2010].

Partes da planta	Harmalol	Harmol	Harmalina	Harmina	THH
Sementes	$6,03 \pm 0,39$	$0,03 \pm 0,007$	$56,0 \pm 2,28$	$43,2 \pm 2,0$	$1,1 \pm 0,2$
Frutos	$4,17 \pm 1,14$	-	$4,55 \pm 0,02$	$6,14 \pm 1,2$	-
Caules	$0,09 \pm 0,09$	$0,10 \pm 0,09$	-	$2,02 \pm 0,32$	-
Folhas	-	-	-	$1,04 \pm 0,06$	-
Raízes	$2,03 \pm 0,43$	$14,1 \pm 2,2$	-	$20,68 \pm 2,5$	-

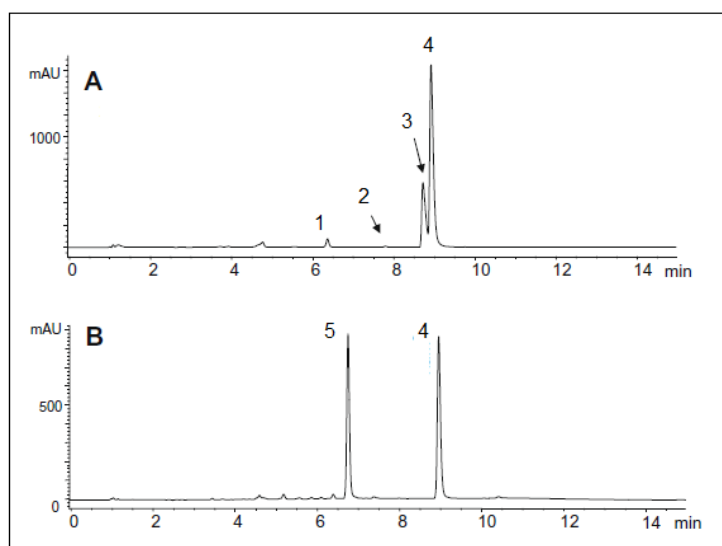


Figura 10. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD da análise de extratos de *P. harmala*. (A) sementes e (B) raízes. (1) Harmalol; (2) Tetrahydroharmina; (3) Harmalina; (4) Harmina e (5) Harmol [Herraiz *et al.*, 2010].

Anexo E

Tabela 6. Mínimos e máximos dos níveis de DMT, THH, harmalina e harmina, em mg mL⁻¹, quantificados em 29 amostras de ayahuasca cedidas por grupos religiosos brasileiros, além de 5 amostras da tribo Shuar, no Equador.

Fonte (quantidade de amostras)	DMT	THH	Harmalina	Harmina
Barquinha (1)	12,67	5,42	0,09	5,58
Santo Daime (3)	2,49-14,15	1,68 – 12,79	0,00	1,98 – 9,80
União do Vegetal (20)	0,00 – 5,84	0,45 – 5,26	0,00 – 0,90	0,45 – 6,25
Shuar (5)	0,00 – 4,12	1,63 – 23,80	0,00 – 0,66	1,80 – 22,85



Short communication

Determination of *N,N*-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC–MSAlain Gaujac^{a,c}, Adriano Aquino^d, Sandro Navickiene^d, Jailson Bittencourt de Andrade^{a,b,*}^a Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, s.210-214, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe, Br 101, Km 96, 49100-000 São Cristóvão-Se, Brazil^d Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, 49100-000 São Cristóvão-Se, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2011

Accepted 5 November 2011

Available online 16 November 2011

Keywords:

N,N-Dimethyltryptamine*Mimosa tenuiflora*

Experimental design

MSPD

GC–MS

ABSTRACT

N,N-dimethyltryptamine (DMT) is a potent hallucinogen found in beverages consumed in religion rituals and neo-shamanic practices over the world. Two of these religions, Santo Daime and União do Vegetal (UDV), are represented in countries including Australia, the United States and several European nations. In some of this countries there have been legal disputes concerning the legalization of ayahuasca consumption during religious rituals, a beverage rich in DMT. In Brazil, even children and pregnant women are legally authorized to consume ayahuasca in a religious context. A simple and low-cost method based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography with mass spectrometric detection (GC–MS) has been optimized for the determination of *N,N*-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner bark. The experimental variables that affect the MSPD method, such as the amounts of solid-phase and herbal sample, solvent nature, eluate volume and NaOH concentration were optimized using an experimental design. The method showed good linearity ($r=0.9962$) and repeatability (RSD < 7.4%) for DMT compound, with detection limit of 0.12 mg/g. The proposed method was used to analyze 24 samples obtained locally. The results showed that concentrations of the target compound in *M. tenuiflora* barks, ranged from 1.26 to 9.35 mg/g for these samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

N,N-Dimethyltryptamine is a psychedelic agent widely present in plants [1]. DMT is contained in ayahuasca and in jurema wine, indigenous beverages made with some plants species and consumed in syncretic religions and neo-shamanic rituals. Nowadays, the use of ayahuasca has become increasingly popular in South America, especially in Brazil, North America and Europe [2,3]. Some species of the Mimosoideae botanical subfamily are considered to be amongst the most potent plant sources of *N,N*-dimethyltryptamine. *Mimosa tenuiflora* or “jurema-preta” (black jurema) is a small tree whose barks are used as the main ingredient in jurema wine [3,4].

The extraction procedure is a critical step in the determination of drugs, pollutants and naturally occurring substances in herbal samples. In general, the determination of these compounds including drugs in plant matrices is accomplished using chromatographic

techniques and involves preliminary steps including sampling, extraction and clean-up [5]. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is a method that provides a good alternative to traditional extraction techniques for chromatographic analysis. MSPD can be carried out simultaneously with sample homogenization, extraction and clean-up and requires only a small sample size and small amounts of solvent [6]. It avoids the drawbacks generally associated with liquid–liquid extraction, such as the use of large volumes of solvent, the occurrence of troublesome emulsions, and slow speed [7–9]. Thus, MSPD is an analytical technique used for extraction of analytes from semi-solid and viscous samples.

The principle of the MSPD technique is based on the use of the same bonded-phase solid supports as used in solid-phase extraction (SPE), which are also used as grinding materials for disruption of the sample matrix. During this procedure, the bonded-phase support acts as an abrasive, and the sample disperses over the surface of the support. The classical methods used for sample disruption, such as mincing, shredding, grinding, pulverizing and pressuring are avoided in this procedure, and the MSPD technique has many applications to the processing of samples of biological origin (animal tissues, plant materials, fats, etc.) [10–12]. The sample is placed in a mortar, together with a bonded phase material, and the mixture is then crushed with a pestle. Recently, some tryptamines

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, s.210-214, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil.
Tel.: +55 71 3283 6821; fax: +55 71 3283 6805.

E-mail address: jailson@ufba.br (J.B. de Andrade).

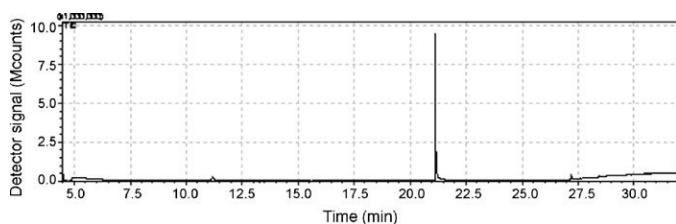


Fig. 1. GC-MS (SCAN mode) chromatogram of DMT isolated from *M. tenuiflora*.

have been studied by GC-MS, HPLC and LC-MS in different matrices [1,2,13–26]. To the best of our knowledge no publication has documented the use of MSPD procedure followed by GC-MS to determine DMT in *M. tenuiflora* barks.

The present work reports a simple method for determination of *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) in tissues of *M. tenuiflora* by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry.

2. Experimental

2.1. Chemicals, reagents and supplies

GC grade solvent *n*-hexane was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA). Analytical grade anhydrous sodium sulfate and Florisil® (80–100 mesh) were supplied from Mallinckrodt Baker (Paris, KY, USA). Analytical grade sodium hydroxide was obtained from Vetec (Duque de Caxias, Brazil).

2.2. Collection and preparation of plant material

Stem bark from *M. tenuiflora* was collected fresh from local habitats, being in two humid coastal counties in municipalities of Aracaju and São Cristóvão (Location A) and three semi-arid regions, municipalities of Simão Dias, Pinhão and Canindé de São Francisco (Location B), all located in the State of Sergipe, Northeast region of Brazil, between August and September 2010. Voucher specimens of these samples have been deposited in the herbarium of the Federal University of Sergipe (ASE18817). Bark samples were powdered by a cutting mill, sieved and dried at 38 °C to a constant mass before use.

2.3. Isolation of *N,N*-dimethyltryptamine from *M. tenuiflora*

Due to the difficult in acquiring a commercial standard of DMT, a method was developed to isolate this compound from the *M. tenuiflora* inner barks. The purity of the *N,N*-dimethyltryptamine obtained was equal to 95% with regard to UV analysis. An aliquot of the isolated compound was analyzed by GC-MS in full scan mode (SCAN) and showed a prominent peak at 21.2 min, Fig. 1. To confirm the identity of the compound, a ¹H and ¹³C NMR spectra of the isolated chemical were generated and are in agreement with others previously described for the DMT in the literature [2,21,26,27].

2.4. Preparation of standard solutions

Standard solutions of DMT were prepared by dissolving 100 mg of DMT in 10 mL acetonitrile to yield concentration of 10.0 mg/mL. Calibration solutions were prepared in a blank stem bark of the *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Betran, which presents a chromatographic profile very similar to *M. tenuiflora*, Fig. 2, by adding respective spiking solution to blank extract, to produce final concentrations varying of 0.62–20.0 mg/g. Besides, these two species belong to the same botanical subfamily Mimosoideae, showed

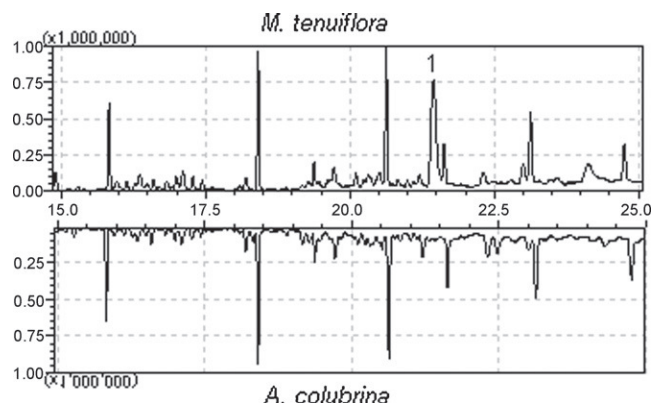


Fig. 2. Comparison chromatograms of *M. tenuiflora* and *A. colubrina* real samples analysis by MSPD/GC-MS (SCAN mode). The numbered peak is *N,N*-dimethyltryptamine.

inner barks with physical properties in good agreement and, according to previous studies, alkaloids were not detected in the inner barks of *A. colubrina* [28]. These standard solutions were stored at 4 °C in the dark, and were stable for a period of at least 1 month.

2.5. MSPD procedure

An aliquot of herbal sample (0.5 g) was placed into a mortar (*ca.* 50 mL), and 0.5 g of Florisil and 0.5 mL of NaOH 0.1 mol/L were added. The sample was then gently blended into the sorbent material with a pestle, until a homogeneous mixture was obtained (*ca.* 3 min). The homogenized mixture was introduced into a 100 mm × 20 mm id polypropylene column, filled with 0.1 g of glass wool at the base and 0.5 g of anhydrous Na₂SO₄. The elution was performed under vacuum with 30 mL of *n*-hexane. The eluent was collected into a round bottom flask and concentrated using a rotary vacuum evaporator (40 °C), and finally purged with a gentle stream of nitrogen to a volume of 1 mL. An aliquot of 1 μL was analyzed by GC-MS.

2.6. GC-MS system and operating conditions

A Shimadzu (Kyoto, Japan) system consisting of a QP-2010 Plus mass spectrometer coupled to a GC 2010 gas chromatograph, with a Shimadzu AOC 20i autosampler and a split/splitless injector, was used for the identification and quantification of DMT. A fused-silica RTX-5MS column (5% phenyl–95% polydimethylsiloxane, 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness), supplied by Restek (Bellefonte, PA, USA), was employed, with helium (purity 99.995%) as carrier gas at a flow rate of 1.2 mL/min. The GC oven temperature was programmed from 60 °C (3.0 min), then at the rate of 8 °C/min to 200 °C and directly to 280 °C (4 min) at 10 °C/min. The solvent delay was 5 min. The injector port was maintained at 250 °C, and 1 μL sample volumes were injected in splitless mode (50 s). The data were acquired and processed on a personal computer, using Shimadzu GC Solution software. The total analysis time was 27 min, and the equilibration time was 2 min. The eluent from the GC column was transferred, via an interface line heated to 280 °C, into the 70 eV electron ionization source, also maintained at 280 °C. The analysis was performed in the selected ion monitoring (SIM) mode. The ions monitored were *m/z* 58 and 188.

2.7. Recovery studies

A 0.5 g homogenized *A. colubrina* sample was spiked prior to the determination procedure by addition of a DMT standard solution to

Table 1
Factors and levels in the optimization of MSPD procedure.

Factors	Low level	High level
(1) Eluent (E)	Petroleum ether	n-Hexane
(2) Support (S)	Aluminium oxide	Florisil®
(3) Eluent volume (V_E) (mL)	10	30
(4) Support mass (m_S) (g)	0.5	2.0
(5) Sample mass (m_{SA}) (g)	0.5	2.0
(6) NaOH concentration (C_{OH^-}) (mol/L)	0.01	0.1

give 1.25, 2.0, 8.0 and 16.0 mg/g ($n=8$ replicates). Spiking samples were left to stand for around 24 h to allow DMT absorption onto the sample.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the MSPD procedure

In order to select the optimal experimental conditions for extraction, a multivariate optimization strategy was employed to assess the influence of the main factors on the MSPD procedure. Tests were then carried out in order to select the factors and the domain to be considered in the multivariate experimental approach, Table 1. The factors included in the factorial design were eluent (E) support (S), eluent volume (V_E), support mass (m_S), sample mass (m_{SA}) and NaOH concentration (C_{OH^-}). Statistical procedures were performed using Statistica 8.0 (StarSoft, Tulsa, USA). Analysis of the Pareto graph, Fig. 3, for the DMT compound demonstrated that all factors within the studied domain were significant, with the exception of the eluent, support mass and sample mass, whose values were insignificant in this domain studied. In this case, 0.5 g of support mass and 0.5 g of sample mass were selected, once an additional amount of these factors did not improve the recovery. Based on the preliminary assays, Florisil® and aluminium oxide were selected to compare their performance using petroleum ether and n-hexane as eluting solvents. Although the same results in terms of recovery were obtained, which were around 70% for the two adsorbents, Florisil® and n-hexane were chosen for producing the cleanest chromatographic profiles with lower baselines than the other solid-phase and solvent. The eluent volume was the most significant factor, which considered volumes varying from 10 to 30 mL, with best results (chromatographic peak area of DMT) in the highest level. Besides, NaOH concentration giving the highest responses with Florisil® based on the MSPD column, in the higher level of concentration, 0.1 mol/L.

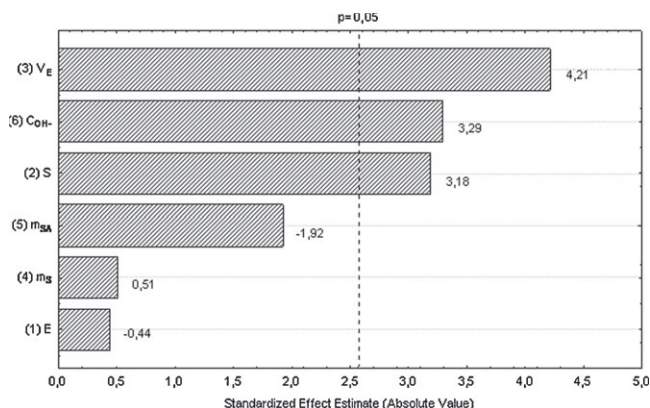


Fig. 3. Experimental design Pareto graph.

3.2. Method validation

3.2.1. Linearity

The linearity of a method is a measure of the range within which detector response is directly proportional to the concentration of the analyte in standard solutions or samples. The linearity for the compound was determined using blank herbal samples fortified at concentration levels ranging from 0.62 to 20.0 mg/g. The slope and intercept values, together with their standard deviations, were determined using regression analyses. Linear regression coefficient for the DMT was equal to 0.9962.

3.2.2. Recovery

DMT compound was extracted from *A. colubrina* by MSPD procedure. Herbal samples were fortified at 1.25, 2.0, 8.0 and 16.0 mg/g before extraction by adding 0.5 mL of the appropriate working standard solution. Eight replicates spiked at each fortification level were assayed. The recovery obtained for DMT ranged from 81.7 to 116.2%.

3.2.3. Repeatability

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision studies, and expressed by the relative standard deviation (RSD). The repeatability (intra-assay precision) was measured by comparing standard deviation of the recovery percentages of spiked herb samples at five concentration levels (1.25, 3.75, 5.0, 10.0 and 15.0 mg/g) run the same day. The samples were injected 8 times with manual injection and the relative standard deviation values obtained for the retention times were lower than 7.4%. The intermediate precision (as between-day precision) was determined by analyzing spiked herb samples at two concentration levels (8.0 and 16.0 mg/g), besides a real sample, for three alternate days by two different analysts. Replicated ($n=8$ for each concentration level) samples were all run and the RSD value was calculated for the DMT compound. The method was found precise (RSD < 16.8%) for DMT compound studied at all spiking levels. The different origins of the samples did not influence the instrumental response, and routine clean-up of the insert and/or ion source box was sufficient to maintain system performance.

3.2.4. Accuracy

The accuracy tests were performed comparing the results obtained using the traditional acid–base method that employs liquid–liquid for alkaloid extraction, with the data obtained using the proposed method, MSPD/GC–MS. The concentrations of DMT in the samples analyzed by the two methods were in good agreement. For a commercial sample, 8.10 mg/g (traditional LLE acid–base method) and 8.24 mg/g (MSPD/GC–MS method), and for the sample 1042R, 7.02 mg/g and 7.20 mg/g, respectively.

3.2.5. Detection and quantification limits

The limit of detection (LOD) of the method was 0.12 mg/g and was calculated considering the standard deviation of the analytical noise (a value of seven times the standard deviation of the blank) and the slope of the regression line. The limit of quantification (LOQ) was determined as the lowest concentration giving a response of ten times the average of the baseline noise, calculated using seven unfortified samples. The LOQ value for this compound was 1.25 mg/g [29].

3.3. Application of the method

A total of 24 *M. tenuiflora* inner bark samples were collected from different localities and analyzed by developing MSPD combined with GC–MS. The DMT concentration in the samples ranged from 1.26 to 9.35 mg/g (Table 2). High levels of DMT were mostly

Table 2

Concentration of DMT found in herb samples from humid coastal region (location A) and semi-arid region (location B).

Locations	Samples ^a	DMT concentrations in <i>M. tenuiflora</i> inner barks (mg/g)		
		Stem bark (S)	Root bark (R)	
Location A Aracaju-Se lat 11.071150°S lon 37.146190°W	0945S	3.19	6.86	
	1005R			
	1022S	1.35	7.20	
	1042R			
	1015S	6.41	5.93	
	1047R			
	0743S	3.47	6.67	
	0800R			
	0810S	2.04	5.97	
	0836R			
São Cristóvão-Se lat 10.905978°S lon 37.188713°W	0955S	2.16	5.29	
	1002R			
	0850S	2.15	1.26	
	0915R			
	0930S	4.00	6.87	
	0940R			
Location B Pinhão-Se lat 10.588435°S lon 37.735462°W	1341S	7.55	-	
	1408S	7.26		
	1138S	4.88		
	1220S	9.35		
	1232S	5.54		
	1246S	4.42		
	1130S	1.54	2.12	
	1136R			
	(specimen centenary)			

^a Samples of *M. tenuiflora* inner barks collected at different days between August and September 2010. The first four digits of sample codes refer to the time of the sample collection.

found in root tissue in comparison to the stem bark of *M. tenuiflora*. Stem barks obtained samples from semi-arid regions were richer in DMT than the coastal herbal samples. *M. tenuiflora* flowers and seeds samples were also analyzed by this method, but its DMT levels were below the limit of quantification. The results obtained were in agreement with a recent work involving Soxhlet extraction technique and HPLC separation with UV detection [30].

4. Conclusion

The proposed MSPD procedure followed by GC/MS (SIM) can be applied to determine DMT in tissues of *M. tenuiflora*. The method uses a Florisil[®] based on the MSPD column and *n*-hexane as elution solvent. The results demonstrate that the accuracy, precision

and selectivity of the proposed method are acceptable for the determination of DMT. In addition, the method requires a small sample size and offers considerable savings in terms of solvent consumption, cost of materials, sample manipulation and analysis time.

Acknowledgements

The authors wish to thank MCT/CNPq (Process No. 620247/2008) and Pronex-FAPESB/CNPq (Process No 0015/2009) for the financial support of this study.

References

- [1] R. Kikura-Hanajiri, M. Hayashi, K. Saisho, Y. Goda, J. Chromatogr. B 825 (2005) 29.
- [2] A.P.S. Pires, C.D.R. Oliveira, S. Moura, F.A. Dörr, W.A.E. Silva, M. Yonamine, Phytochem. Anal. 20 (2009) 149.
- [3] R.S.O. de Souza, U.P. Albuquerque, J.M. Monteiro, L.C. de Amorim, Braz. Arch. Biol. Technol. 51 (2008) 937.
- [4] J. Ott, J. Psychoactive Drugs 31 (1999) 171.
- [5] C.M. Lino, L.M.C. Guarda, M.I.N. Silveira, J. AOAC Int. 82 (1999) 1206.
- [6] C.F. Poole, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 241.
- [7] S.A. Barker, J. Chromatogr. A 885 (2000) 115.
- [8] S.A. Barker, J. Chromatogr. A 880 (2000) 63.
- [9] S.A. Barker, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 151.
- [10] T.F.S. Santos, A. Aquino, H.S. Dórea, S. Navickiene, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 425.
- [11] M.G.D. Silva, A. Aquino, H.S. Dórea, S. Navickiene, Talanta 76 (2008) 680.
- [12] P.H.V. Carvalho, V.M. Prata, P.B. Alves, S. Navickiene, J. AOAC Int. 92 (2009) 1184.
- [13] M. Takahashi, M. Nagashima, J. Suzuki, T. Seto, I. Yasuda, T. Yoshida, J. Health Sci. 54 (2008) 89.
- [14] M. Takahashi, M. Nagashima, J. Suzuki, T. Seto, I. Yasuda, T. Yoshida, Talanta 77 (2009) 1245.
- [15] M. Yritia, J. Riba, J. Ortuño, A. Ramirez, A. Castillo, Y. Alfaro, R. Torre, M.J. Barbanoj, J. Chromatogr. B 779 (2002) 271.
- [16] E.H. McIlhenny, K.E. Pipkin, L.J. Standish, H.A. Wechkin, R. Strassman, S.A. Barker, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8960.
- [17] C.P.B. Martins, M.A. Awan, S. Freeman, T. Herraiz, J.F. Alder, S.D. Brandt, J. Chromatogr. A 1210 (2008) 115.
- [18] C.P.B. Martins, S. Freeman, J.F. Alder, S.D. Brandt, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6119.
- [19] C.P.B. Martins, S. Freeman, J.F. Alder, T. Passie, S.D. Brandt, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 285.
- [20] S.D. Brandt, C.P.B. Martins, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 858.
- [21] S. Moura, F.G. Carvalho, C.D.R. Oliveira, E. Pinto, M. Yonamine, Phytochem. Lett. 3 (2010) 79.
- [22] B.H. Chen, J.T. Liu, W.X. Chen, H.M. Chen, C.H. Lin, Talanta 74 (2008) 512.
- [23] S.A. Barker, M.A. Littlefield-Chabaud, C. David, J. Chromatogr. B 751 (2001) 37.
- [24] T. Ishida, K. Kudo, A. Kiyoshima, H. Inoue, A. Tsuji, N. Ikeda, J. Chromatogr. B 823 (2005) 47.
- [25] K. Björnstad, O. Beck, A. Helander, J. Chromatogr. B 877 (2009) 1162.
- [26] S.D. Brandt, S. Freeman, I.A. Fleet, P. McGagh, J.F. Alder, Analyst 130 (2005) 330.
- [27] A.A. Vitale, A.B. Pomilio, C.O. Cañellas, M.G. Vitale, E.M. Putz, J.C. Ollivier, J. Nucl. Med. 52 (2011) 970.
- [28] C.F.C.B.R. de Almeida, T.C. de Lima e Silva, E.L.C. de Amorim, M.B. de, S. Maia, U.P. de Albuquerque, J. Arid Environ. 62 (2005) 127.
- [29] D.M. Bliesner, Validating Chromatographic Methods – A Practical Guide, Wiley – Interscience, USA, 2006, pp. 304.
- [30] M.P. Nicasio, M.L. Villarreal, F. Gillet, L. Bensaddek, M.A. Fliniaux, Nat. Prod. Res. 19 (2005) 61.

Analytical techniques for the determination of tryptamines and β -carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices

Alain Gaujac,^{a,e,f} Sandro Navickiene,^c Mark I. Collins,^d Simon D. Brandt^e and Jailson Bittencourt de Andrade^{a,b,*}

The consumption of ayahuasca, a hallucinogenic beverage used by indigenous communities in the Amazon, is increasing worldwide due to the expansion of syncretic religions founded in the north of Brazil in the first half of the twentieth century, such as *Santo Daime* and *União do Vegetal*. Another example is the jurema wine, a drink that originated from indigenous cultures of the northeast of Brazil. It is currently used for several religious practices throughout Brazil involving urban neo-shamanic rituals and syncretic Brazilian religions, such as Catimbó and Umbanda. Both plant products contain *N,N*-dimethyltryptamine which requires co-administration of naturally occurring monoamine oxidase inhibitors, for example β -carboline derivatives, in order to induce its psychoactive effects in humans. This review explores the cultural use of tryptamines and β -carbolines and focuses on the analytical techniques that have been recently applied to the determination of these compounds in ayahuasca, its analogues, and the plants used during the preparation of these beverages. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: ayahuasca; jurema wine; plants; tryptamines; β -carbolines; detection; hallucinogens

Introduction

Since the emergence of civilizations, the consumption of psychoactive plants has been used to induce altered states of consciousness. In pre-Columbian societies, the use of these plants was normally associated with mystical-religious rituals and preparation for war. Colonization of the Americas resulted in European explorers coming into contact with a variety of psychoactive plants, including tobacco (*Nicotiana* spp.), maracujá or passion fruit (*Passiflora* spp.), guaraná (*Paulinia cupana*) and yopo (*Anadenanthera peregrina*).^[1–4] Four centuries after the global spread of tobacco, consumption of the plant-derived beverage ayahuasca, which originated in indigenous Amazon cultures, is attracting devotees throughout the world as a result of the creation of syncretic religious groups in Brazil during the twentieth century.^[5] Two of these religions, Santo Daime and União do Vegetal (UDV), are represented in various countries around the world including Australia, the United States, and Europe. In some countries, a number of legal disputes have been described concerning the legalization of ayahuasca and consumption during religious rituals.^[6–9] In addition, 'ayahuasca tourism' is becoming increasingly common in those equatorial South American countries that share areas of the Amazon rainforest.^[6,10] Moreover, the Internet also offers a great variety of opportunities to purchase psychoactive plant materials.^[11–13] Among the many compounds found in some of these plants, the tryptamine and β -carboline derivatives (Figure 1)

represent simple indole alkaloids that are commonly present in the biota.

Ayahuasca is most commonly produced as a decoction using leaves of chacrona (*Psychotria viridis*) and sections of the stem of the yage vine (*Banisteriopsis caapi*). Important key components of the vine are β -carboline derivatives that act as inhibitors of monoamine oxidase (MAO). The leaves of *P. viridis* contain the psychoactive/hallucinogenic *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) and

* Correspondence to: Jailson Bittencourt de Andrade, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Barão de Jeremoabo, s/n. Ondina, CEP 40170–115, Salvador-Ba, Brazil. E-mail: jailsong@ufba.br

a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Ondina, Salvador-Ba, Brazil

b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente, Campus Universitário de Ondina, Salvador-Ba, Brazil

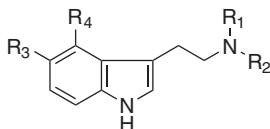
c Universidade Federal de Sergipe (UFS), Campus São Cristóvão, São Cristóvão-Se, Brazil

d Universidade Estadual do Ceará (UECE), Campus do Itaperi, Fortaleza-Ce, Brazil

e Liverpool John Moores University, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool UK

f Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe (IFS), Campus São Cristóvão, São Cristóvão-Se, Brazil

Tryptamine Derivatives



Tryptamine

 $R_1, R_2, R_3, R_4 = H$

5-Hydroxytryptamine (serotonin)

 $R_1, R_2, R_4 = H, R_3 = OH$

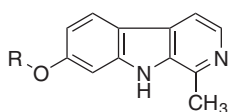
N-Methyltryptamine (NMT)

 $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3, R_4 = H$

N,N-Dimethyltryptamine (DMT)

 $R_1, R_2 = CH_3, R_3, R_4 = H$

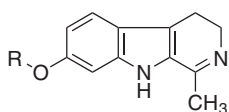
5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT)

 $R_1, R_2 = CH_3, R_3 = OCH_3, R_4 = H$
 β -Carboline Derivatives

Harmol

 $R = H$

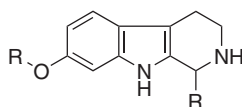
Harmine

 $R = CH_3$


Harmalol

 $R = H$

Harmaline

 $R = CH_3$


Tetrahydronorharmine

 $R = H$

Tetrahydroharmine

 $R = CH_3$

Figure 1. General chemical structure of the tryptamine and β -carboline derivatives.

the combination with reversible MAO inhibitors (MAOIs) renders the DMT orally active.^[14–17]

In an analogous fashion, the jurema wine, originally consumed only by pre-colonial indigenous tribes in the northeast of Brazil, has become a part of the liturgy of the Catimbó and Afro-Brazilian religious groups since colonization. The wine is predominantly produced using the root bark of the jurema tree (*Mimosa* spp.), which also contains DMT.^[18–21] In large urban centres, it is common to obtain the bark of *M. tenuiflora* (black jurema) from online sources^[11,13] and to use the seeds of *Peganum harmala* as a source of MAOIs. *P. harmala* is a Mediterranean shrub that contains a number of β -carbolines also present in *B. caapi*.^[22]

Studies involving the chemical characterization of these plants, together with the development of analytical techniques for the measurement of tryptamines and β -carbolines in plant matrices, as well as in ritual beverages, are essential given the current

expansion in their use for religious, recreational, and clinical research purposes. The need for an in-depth approach towards analytical characterization becomes obvious in cases of untoward effects or even fatal intoxications which can, for example, arise from ill-informed combinations of plant products with other psychoactive substances.^[23–26] At the same time, consideration needs to be given to the promising therapeutic potential that was reported for constituents present in these plant materials.^[27–33] In addition, a wide variation of concentration levels of ayahuasca components that differ not only from church to church, but also between different batches of the same church, were also reported.^[34] Occasionally, an extremely concentrated form called 'ayahuasca honey' can also be encountered which derives its name from high viscosity similar to honey syrup. Detailed studies on the identity and levels of psychoactive substances found in these preparations and appropriately defined criteria for their determination are required. This might be of particular interest in cases where there is the concomitant use of other additives such as *Cannabis*,^[35,36] *P. harmala*, tobacco, and jurema wine, where precautions or quality control might be lacking. The objective of this review is to present some cultural and chemical features of DMT-containing plant products. An account is provided of recent developments in analytical approaches towards the determination of tryptamines, β -carbolines and tetrahydro- β -carbolines detected in tissues of *M. tenuiflora*, *P. viridis*, *P. aquatica*, *B. caapi* and *P. harmala*, as well as in ayahuasca samples.

Psychoactive beverages used for ritual purposes: ayahuasca and jurema wine

Ayahuasca

Ayahuasca (aya = soul, spirit; huasca = vine), a word belonging to the Quechua dialect still spoken in some regions of South America, is a drink that is mostly prepared using a decoction of two plants: the leaves of the DMT-containing chacrona (*Psychotria viridis*) and sections of the jagube vine (*Banisteriopsis caapi*) that provides three major MAOI components such as harmine, harmaline and tetrahydroharmine (THH) (Figure 1). The chemical composition of ayahuasca can differ between indigenous tribes due to the use of different plant species^[1,14,15,37] although the same psychoactive constituents are present in all preparations.^[38–41] Ayahuasca is known by various indigenous names, including *yajé*, *natema* and *caapi*, and was first described by Villavicencio in 1858. Seven years earlier, the English explorer Richard Spruce made contact with the Tukanoan Indians, in Rio Uaupés (Brazilian Amazonia), but his findings concerning the use of a liana called *caapi* were not published before 1908 when the plant was identified as *Banisteria caapi*.^[37] Clinical research on the physiological and psychological effects of ayahuasca in humans re-emerged in the early 1990s which offered important insights into psychopharmacological, biochemical and pharmacokinetic properties of this hallucinogenic plant mixture. More importantly, these investigations set the stage for a range of clinical studies that followed across several disciplines until the present day.

Brazilian legislation, based on a constitutional right to freedom of religion, permits the consumption of ayahuasca within a religious context, including children and pregnant women which, in this case, requires parental consent.^[42,43] Norms concerning the use of ayahuasca in Brazil for religious purposes were published by the

Brazilian National Council on Drug Policies (CONAD) in January 2010^[44] which prohibits the marketing of ayahuasca, its therapeutic use, ayahuasca tourism, and its use with illicit drugs. Under this Resolution, consumption is permitted in a religious context and the same document also emphasizes the need for more multidisciplinary areas of research on ayahuasca.^[9,44] The government of the State of Acre in Brazil has published a Resolution concerning the authorization of extraction and transport of *Banisteriopsis* spp. vines, as well as the leaves of the *Psychotria viridis* shrub carried out by religious organizations in the State of Acre for the purposes of ayahuasca preparation.^[45] It should be noted that while the Brazilian government only legitimized the production and consumption of ayahuasca derived from the *B. caapi* vine^[44] the Acre Resolution covers every species of the *Banisteriopsis* genus.

Jurema wine

Species of the Mimosaceae botanical subfamily, locally known in northeast Brazil as jurema (from the Tupi *yurema*, meaning succulent thorn bush), are considered to be amongst the most potent plant sources of DMT. These medium-sized trees are used by various indigenous groups, such as the Kariri-Xocó whose communities are located on the left border of the São Francisco River, the boundary between the Brazilian States of Sergipe and Alagoas. The inner barks of stems and roots are used to prepare a beverage called *vinho da jurema* (jurema wine), or *ajucá* (by the Pancarú Indians) and *cotcha-lhã*, by the Fulniô Indians.^[46] During the *Toré*, a ritual dance designed to demonstrate the power of resistance and express the depth of Brazil's northeastern indigenous culture, the Indians drink *vinho da jurema* including a number of additives such as tobacco and *Passiflora* juice or a tea made from its leaves.^[47] This beverage can be produced using several species such as *M. tenuiflora* (black jurema), *M. ophthalmocentra* (red jurema) and *M. verrucosa* (white jurema or sweet jurema according to the Kariri-Xocó Indians) and other plants of the Mimosaceae subfamily.^[19,20,47] A mixture of plants is essential to potentiate the psychoactive activity of the DMT, since the *Mimosa* spp. does not appear to contain any appreciable quantities of MAOI inhibitors. Although there have not been any studies that reported oral psychoactivity of jurema wine, it may be relevant to observe that indigenous groups and members of Brazilian syncretic religions use large quantities of tobacco.^[19] It is known that tobacco smoke contains a number of constituents that possess MAOI activity^[48–50] which indicates that orally administered DMT might become psychoactive under these conditions.

The concomitant use of plants belonging to the *Passiflora* species is common in these indigenous communities, while in the syncretic Brazilian groups, besides the smoked tobacco used during the rituals, sugarcane alcohol (cachaça) is also widely used together with other additives during the preparation of the psychoactive beverage.^[47,51] A number of studies have identified the presence of MAOI constituents in *Passiflora* species, especially in *P. incarnata*.^[52–55] Seeds of *Peganum harmala*, which have been shown to be highly effective in inhibiting monoamine oxidase, have also been described to potentiate the oral psychoactivity of jurema wine.^[56,57]

The use of jurema wine has a long history, stretching from its indigenous origins in the *sertão*, i.e. the northeastern region of Brazil, to current days where it is consumed throughout the country by the members of Catimbó-Jurema and followers from other religions. This is a typical example of syncretic evolution

of the original indigenous tradition. The jurema use was adopted by the Afro-Brazilian religions which incorporated the Jurema cult in their own traditions when fugitive African slaves were harboured by the northeastern indigenous tribes during their escape to the *quilombos* (communities of escaped slaves). Nowadays, we can see the incorporation of jurema use into neo-shamanic practices and its popularization via the Internet. In contrast to ayahuasca, the additives used in the preparation of jurema wine, by the Indians and members of these religions, remain a closely guarded secret. In Brazil, there is historical documentation describing the indictment and imprisonment of indigenous Indians who consumed the drink.^[46,51] Jurema rituals were almost extinguished by the devastating impact of Portuguese Christian colonization; however, since the end of the twentieth century the movement has witnessed a substantial resurgence.^[47]

Plants used for Ayahuasca

Psychotria spp

Psychotria spp. belongs to the Rubiaceae family, which also includes coffee. Some species of the genus *Psychotria* are used by Amazonian Indians as additives in the preparation of ayahuasca, namely, *P. viridis*, *P. carthaginensis*, *P. psychotriaefolia* and *P. poeppigiana*. In the Amazon, *P. viridis* (Figure 2b), is a shrub that reaches a maximum height of 2–3 m^[1] and which is popularly known as 'chacrona', 'chacrana', or 'rainha'. Native to the Amazon rainforest, where the plant is becoming increasingly rare, it has become commercially cultivated due to the demand for its leaves, which are used to prepare ayahuasca, although this practice is frowned upon by the Brazilian authorities. In Brazil, the churches tend to be located in the countryside nearby urban centres where there is always a possibility of maintaining their own plantations called *reinos das rainhas* (kingdoms of the Queens). Plantations have also been reported in Hawaii and California.^[58] The leaves of *P. viridis* are collected in the early morning or the late afternoon for the production of ayahuasca. The first description of the presence of DMT in these leaves was published in 1970, as was the first report of the presence of the chemical in a member of the Rubiaceae family.^[59] The leaves have been reported to contain between 0.10 and 0.61% DMT, together with traces of *N*-methyltryptamine (NMT) and 2-methyl-tetrahydro- β -carboline (MTHC).^[58]

Banisteriopsis spp

Some species of the *Banisteriopsis* genus, including *B. argentea*, *B. inebrians*, *B. caapi* and *B. muricata*, are used to prepare ayahuasca and other similar psychoactive beverages, since they contain the MAOI needed to ensure oral psychoactivity of DMT.^[60,61] Nonetheless, *B. caapi* (Figure 2d), is the plant most commonly used for this purpose.^[14,37,58] The entire plant contains β -carboline and tetrahydro- β -carboline alkaloids (in concentrations varying from 0.11 to 1.95%), although the stem of the vine is the part normally used. The main alkaloids present are harmine, harmaline, and THH. The levels of harmine, which exerts a reversible MAOI effect, are equivalent to between 40 and 96% of the total alkaloid content of the plant. On the other hand, it has also been reported that these constituents were absent in *B. caapi* samples.^[58] Similarly the species *P. viridis*, *B. caapi* is also cultivated in Brazil by some religious groups and plantations have also been reported in Hawaii.^[41]

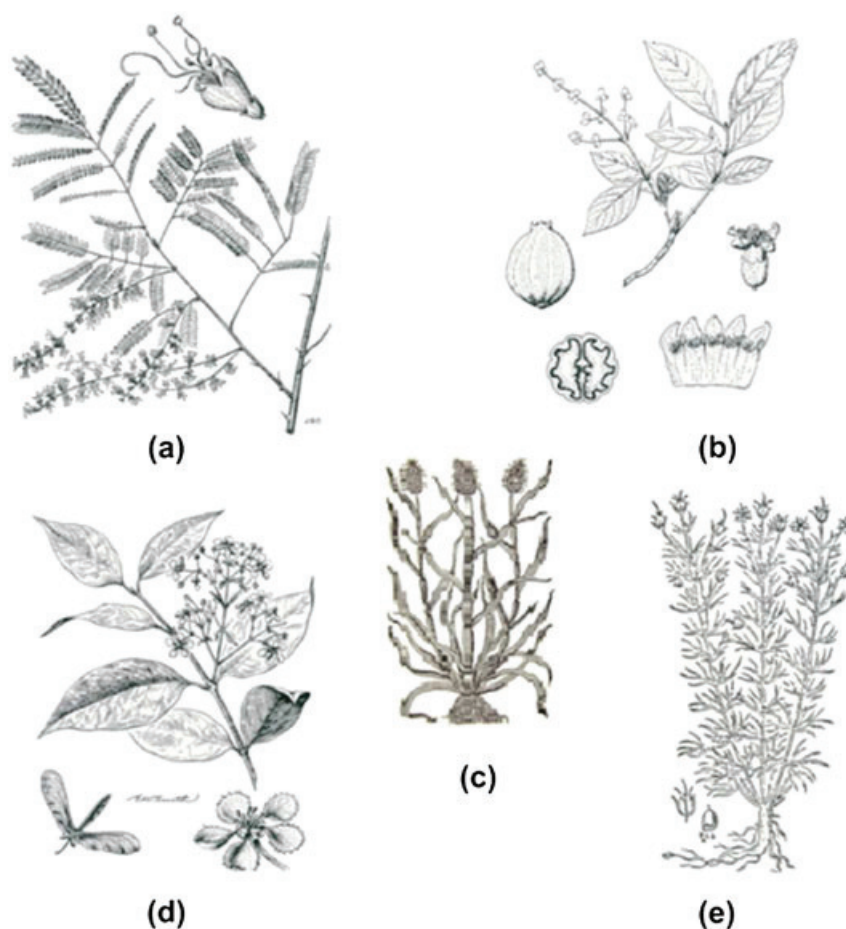


Figure 2. (a) Morphology of *M. tenuiflora* (illustration from J.B. Clark);^[37] (b) Morphology of *P. viridis* (illustration from I. Brady);^[37] (c) *Phalaris aquatica*, eighteenth-century illustration;^[58] (d) Morphology of *B. caapi* (illustration from E.W. Smith);^[37] (e) *Peganum harmala*, seventeenth-century illustration.^[58]

Plants used for Jurema wine

Mimosa spp

Several members of the *Mimosa* genus (Leguminosae family) are known as jurema by rural communities in Brazil.^[1] Some species such as *M. tenuiflora*, *M. Ophthalmocentra*, *M. verrucosa* and *M. scabrella* may contain considerable amounts of psychoactive tryptamines, especially in their barks.^[19,47,58,62,63]

In Brazil, *M. tenuiflora* (Willd.) Poir. [syn. *M. hostilis* (Mart.) Benth.] (Figure 2a), known as 'jurema-preta' (black jurema), is used as the main ingredient in jurema wine since the inner bark of the stem and roots is rich in DMT. Native to low rainfall regions that experience periodical drought, this plant is abundantly found in northeast Brazil, in dry valleys in southern Mexico, in the north of Venezuela and Colombia, as well as in Honduras and El Salvador. In its native habitat it reaches a height of 2.5–5 m and readily colonizes degraded terrain, grows rapidly, and is able to generate new shoots after cutting.^[64] In Mexico, where it is known as *tepescohuite*,^[21] it appears that there are no reports of its usage as a psychotropic product, although the dried and ground bark is used for wound healing and treatment of skin burns.^[65] Jurema wine made from the inner bark of *M. tenuiflora* in addition to *Peganum harmala* seeds which provide the same active principles found in ayahuasca, namely DMT and MAOIs.^[56,57] The illicit use of *M. tenuiflora* has become a concern that is currently being addressed by the Brazilian Federal Police.^[13]

Plants used for ayahuasca and jurema wine analogues

Phalaris spp

The presence of tryptamines in *Phalaris* species was first described in phytochemical studies for agricultural purposes. *P. arundinacea* (reed canary grass), *P. canariensis* and *P. aquatica* are found worldwide. *P. aquatica* (Figure 2c) is a grass native to the Mediterranean region, and is common in wetlands and that is considered to be toxic to ruminant livestock. Instances of animal poisoning involving *Phalaris* species, sometimes fatal, have been reported in Australia, South Africa, Argentina, Brazil, and the USA.^[66–70] Within its genus, *P. aquatica* contains the highest levels of DMT in addition to other tryptamines, such as 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) and NMT.^[71] It has also been increasingly used for the preparation of ayahuasca analogues.^[56,57]

Peganum harmala L

Syrian rue, or *P. harmala* (Figure 2e), is a shrub native to the dry regions of the Mediterranean, North Africa, the Middle East, India, and Mongolia.^[1,22] In North Africa, its seeds are used to the present day as ritual incense. It is an ancient ritual plant, and in folk medicine it is still used for gynecological purposes and as a vermifuge. This plant is increasingly used in North America and

Europe to produce drinks containing DMT and β -carbolines that are analogous to ayahuasca.^[22,57] Three to four grams of the seeds is considered to be sufficient to inhibit the action of monoamine oxidase. The alkaloid content of *P. harmala* seeds is around 2–6 %, and consists principally of harmine and harmaline.^[58]

Analytical methods

Earlier work

The first descriptions of methods used for the determination of tryptamines and β -carbolines in these plant species and their beverages date from the mid-twentieth century. Most of them were based on liquid-liquid extraction (LLE) and purification was usually performed by column chromatography and crystallization techniques.^[46,72–77] Since the late 1960s, the use of high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS) became more prominent.^[14,59–61]

The Brazilian chemist Oswaldo Gonçalves de Lima was the first scientist to study the chemical composition of the jurema wine, as well as its preparation, and also the first to isolate DMT from the bark of black jurema. This study also provided a detailed account of the ceremony and preparation of the *vinho da jurema* by Indians of the Pancarú tribe (Pernambuco, Brazil). This study also described the isolation of the alkaloid fraction of the root bark of *M. tenuiflora* which led to the identification of 'Nigerina', i.e. 'nigerine' (0.31% dry weight, DW).^[46] Years later, this was confirmed to be DMT following the analysis of *M. tenuiflora* bark by Pachter and co-workers. This sample was provided by de Lima and was found to contain up to 0.57% of DMT in the dried plant.^[77] Meckes-Lozoya *et al.*^[21] identified serotonin and DMT in samples of *M. tenuiflora* root bark using GC-MS and Batista *et al.*^[20] isolated the alkaloid fraction of *M. ophthalmocentra* and reported the presence of DMT (1.6%, DW) and NMT (0.0012% DW), respectively.

Regarding ayahuasca, and the plants employed in its preparation, descriptions of analytical quantitative methods date back to the early 1970s. The first description of *P. viridis* analysis was provided in 1969^[78] and Rivier and Lindgren carried out a major investigation into the analytical chemistry of ayahuasca and reported the findings in a landmark paper in 1972.^[14] The authors reported the results of their work carried out on the upper Rio Purus region near the border between Peru and Brazil, in which they reported the use of ayahuasca by the Sharanahua and Culina Indians. The procedure for chemical analysis of the parts of the plants used in its preparation has also been described. Implementation of liquid-liquid extraction (LLE) was followed by an analysis by GC-MS. The leaf samples of *P. viridis* showed a DMT content (DW) of approximately 0.34%. The same substance was also found at higher concentration levels (0.66% DW) in the leaves of *P. carthaginensis*. The presence of NMT and MTHC was also detected at trace levels. However, one of the leaf samples was reported to contain 85% NMT and 12% MTHC (total alkaloid content 0.11%, DW). Dry matter samples of stems, branches, leaves, and roots of *B. caapi* revealed the presence of β -carbolines ranging from 0.05 to 1.90% with the majority being represented by harmine, followed by THH, harmaline, and harmol, respectively.^[14] Also in this work, some samples of ayahuasca were analyzed, stating for each 100 mL of the beverage the presence of

6.6–19 mg for harmine, 1.5–9.8 mg for tetrahydroharmine, 0.3–1.6 mg for harmaline and 5.4–16.0 mg for DMT.

In 1984, and with the use of appropriate standard solutions, samples of ayahuasca from Peru were analyzed qualitatively and quantitatively using two-dimensional thin-layer chromatography (TLC), HPLC, and GC-MS.^[15] The majority of alkaloids obtained from five Peruvian ayahuasca samples were quantified by HPLC-UV (260 nm) which led to the detection of DMT (0.6 mg/mL), harmine (4.67 mg/mL), THH (1.60 mg/mL) and harmaline (0.41 mg/mL), respectively. The same samples were also freeze dried and subjected to analysis by HPLC. The reported values were DMT (6.4 mg/g or 0.64%), harmine (23.8 mg/g or 2.38%), THH (11.1 mg/g or 1.11%), and harmaline (5.1 mg/g or 0.51%). Six samples of *B. caapi* were also evaluated quantitatively by HPLC leading to harmine (0.57–6.35 mg/g or 0.057–0.635%), THH (0.25–3.8 mg/g or 0.025–0.38%), harmaline (0.5–3.8 mg/g or 0.05–0.38%), harmol (0.01–1.2 mg/g or 0.001–0.12%) and harmalol (trace–0.35 mg/g or trace–0.035%). Analyses conducted by GC-MS also confirmed the presence of DMT (1–1.6 mg/g or 0.1–0.16%) in leaves of *P. viridis*.^[15]

Recent analyses

Sample preparation techniques

Most of the methods described for the determination of tryptamines and β -carbolines present in plant matrices and ayahuasca employ sample preparation techniques that require large quantities of toxic organic solvents and that are time-consuming. For herbal samples (Tables 1 and 2), maceration in a suitable solvent, LLE and use of a continuous-flow Soxhlet extraction, are the most commonly used procedures.^[22,38,79–83] An effective alternative technique, especially useful when combined with GC, is matrix solid-phase dispersion (MSPD).^[84,85] This approach was described first in 1989^[86] and was recently employed by Gaujac *et al.* for the quantitative determination of DMT in the bark of *M. tenuiflora*.^[87] This procedure offered the advantage of low solvent consumption while providing excellent indices of selectivity, precision, and recovery. Following optimization using a multivariate procedure, recoveries were reported in the range of 81.7–116.2%.^[87] Callaway *et al.* reported the quantification of β -carbolines and DMT in *P. viridis* leaves and *B. caapi* stems obtained by sonication of a 100 mg sample for 10 min using a minimal volume of methanol (2 mL). The mixture was allowed to stand for 24 h and then centrifuged before dilution a small aliquot of the supernatant in the mobile phase. Validation data for the proposed technique were not reported.^[38]

The extraction of tryptamines was described by Zhou *et al.* who used 0.2 g of dry plant matrix (*P. aquatica*) and macerated the sample in 10 mL of 1% HCl, with periodic agitation.^[71] After 3–4 days the mixture was centrifuged and the supernatant passed through a solid-phase extraction (SPE) column. Analytes retained on the column were eluted with 2 mL of an alkaline alcoholic mixture containing NH_4OH . No recovery tests were reported.^[71] Wang *et al.* used various parts of *B. caapi*, including leaves, stems, large branches, and bark, and employed an extraction into hot water followed by HPLC analysis although method validation data were not provided.^[32] Maceration in methanol and extraction of β -carbolines by LLE with chloroform was reported for the analysis of *P. harmala* seeds^[79,82,83] and Pulpati *et al.* offered a methanol extraction of *P. harmala* seeds (1 g) with methanol (3 x 50 mL) under reflux conditions (1 h).^[88]

Table 1. Methods for the determination of β -carbolines in *B. caapi* and *P. harmala*

		B. caapi				P. harmala				
Reference	Callaway et al. ^[38]	Wang et al. ^[32]	Kartal et al. ^[79]	Hemmateenejad et al. ^[82]	Monsef-Esfahani et al. ^[83]	Pulpati et al. ^[88]	Herraiz et al. ^[22]			
Material analyzed	Stem	Leaves, stems, large branches and bark	Seeds	Seeds	Seeds	Seeds	Leaves, sections of stem, flowers, roots, fruits and seeds			
Analytes of interest	Harmine, harmaline and THH	THNH, harmol, THH, harmaline, harmine and compounds from other chemical classes	Harmol, harmalol, harmine and harmaline	Harmine, harmane, harmalol and harmaline	Harmol, harmalol, harmine and harmaline	Harmine and harmaline and compounds from other chemical classes	Harmol, harmalol, harmine, harmaline and THH			
Sample preparation method	Sonification in methanol and resuspension of residue in mobile phase	Maceration in hot water	Maceration in methanol and extraction by LLE with chloroform	Maceration in methanol and extraction by LLE with chloroform	Maceration in methanol and extraction by LLE with chloroform	Reflux in methanol (1 h)	Maceration in an acid solution of HClO ₄ and methanol (1:1)			
Separation / detection technique	HPLC and detection by fluorescence	HPLC-DAD	HPLC-UV at 330 nm	HPLC-UV at 330 nm	HPLC-UV at 330 nm	HPTLC-UV at 366 nm (densitometer-TLC scanner)	HPLC-DAD			
Figures of merit	–	Linear range: 1.0–500.0 μ g/mL (for THNH and THH) 0.2–100 μ g/mL, (for harmol, harmaline & harmine)	$r^2 > 0.999$; LOD < 10.25 μ g/mL; LOQ < 31.0 μ g/mL; RSD < 4.609%	Linear range: 1.0–10.0 μ g/mL; 94 < R ² < 107% RSD < 5%;	Linear range: 0.5–20 μ g/mL $r^2 > 0.998$ LOD < 0.1 μ g/mL LOQ = 0.5 μ g/mL 0.6 < RSD < 10.2%	Linear range: 4–24ng/spot (for harmine) 8–24ng/spot (for harmaline); $r^2 > 0.993$; LOD = 2 ng; LOQ = 4 ng; 97.7 < R < 98.4%	–			
Concentration levels*	Harmine: 0.31 – 8.43 mg/g (0.031 – 0.843%); Harmaline: 0.03 – 0.83 mg/g (0.003 – 0.083%); THH: 0.05 – 2.94 mg/g (0.005 – 0.294%)	Harmine: 10 ⁻³ – 0.672%; Harmaline: 10 ⁻⁴ – 0.058%; THH: 0.004 – 0.34%; THNH: 0 – 0.014%; Harmol: 4.10 ⁻⁴ – 0.019%	Harmol: 1.094%; Harmine: 0.476%; Harmaline: 0.611%;	Harmine: 1.84%; Harmane: 0.18%; Harmaline: 3.90%; Harmalol: 0.25%	(in dried seeds) Harmine: 0.465 g/100 g (0.465%); Harmaline: 0.355 g/100 g (0.355%)	Harmine: 0.44% (w/w); Harmaline: 0.096% (w/w);	Harmalol: (in seeds) 6 mg/g (0.6%); Harmol: 0.03 mg/g (0.003%); Harmaline: 56 mg/g (5.6%); Harmine: 43 mg/g (4.3%); THH: 1.1 mg/g (0.11%)			

* Concentration levels based on dry weight (DW) of vegetable matter.

** Recovery (R).

Table 2. Methods for the determination of tryptamines in *M. tenuiflora*, *P. viridis* and *P. aquatica*

	<i>M. tenuiflora</i>	<i>P. viridis</i>	<i>P. aquatica</i>
Reference	Nicasio <i>et al.</i> [81]	Gaujac <i>et al.</i> [87]	Zhou <i>et al.</i> [71]
Material analyzed	Inner bark, seeds, leaves and flowers. Cultures <i>in vitro</i> (plantules and callus)	Seeds and flowers. Inner barks of stems and roots.	Entire plant
Analytes of interest	DMT, tryptamine, serotonin	DMT	DMT, 5-MeO-DMT, gramine, hordenine, bufotenine and tryptamine
Sample preparation method	Soxhlet reflux extraction with chloroform and NH ₃ solution (27%) (49:1)	Matrix solid-phase dispersion (MSPD)	Maceration in HCl (1%), centrifugation and solid-phase extraction (SPE)
Separation / detection technique	HPLC-UV at 280 nm	GC-MS	HPTLC and HPLC-MS
Figures of merit	Linear range: 2 – 40 µg/mL (in barks) DMT: 0.11 – 0.35%; Tryptamine: 0.0022 – 0.0071%; (in flowers) DMT: 0.03%; Tryptamine: 0.0075%; (in leaves) DMT: 0.01 – 0.09%; Serotonin: 0.009%; (in cultures) For all analytes: < 0.08%	Linear range: 0.62 – 20 mg/g; $r^2 = 0.9962$; LOD = 0.12 mg/g; LOQ = 1.25 mg/g; 81.7 < R** < 116.2%; Precision inter-day: RSD < 16.8%; Precision intra-day: RSD < 7.4%	Linear range: 120 – 3840 ng/spot; $r^2 > 0.991$; Precision intra-day: RSD < 5%
Concentration levels*		DMT: 1.26 – 9.35 mg/g (0.126 – 0.935%) (in seeds and flowers) DMT: Below the LOQ	DMT: 66.3 – 177 mg/kg (0.00663 – 0.0177%); 5-MeO-DMT: 176 mg/kg (0.0176%)
		DMT: 0 – 17.75 mg/g (0 – 1.775%)	

* Concentration levels based on dry weight (DW) of vegetable matter.

** Recovery (R).

Herraiz *et al.*, on the other hand, described the maceration of 0.2–0.5 g of *P. harmala* components (leaves, sections of stem, flowers, roots, fruits, or seeds) in 20 mL of a 1:1 mixture containing 0.6 mol/L HClO₄ and methanol (1:1). Following centrifugation HPLC analysis was employed after dilution of the supernatant.^[22]

The procedures required to prepare ayahuasca samples (Table 3) for GC analysis can be more time-consuming than those required for HPLC analyses, largely due to incompatibility of GC capillary columns with water. However, a successful implementation of LLE has been reported using *n*-butyl chloride as the organic solvent.^[89] A variation of the theme was offered by Gambelunghe *et al.* who reported a GC-MS analysis of an ayahuasca sample seized in Italy.^[40] In this particular case, sodium hydroxide and an internal standard (diphenylhydramine) were added to 5 mL ayahuasca followed by extraction into ethyl ether and centrifugation. Method validation data were not reported.^[40] On the other hand, a C₁₈ cartridge has also been employed for the determination of ayahuasca alkaloids by GC nitrogen phosphorus detection (NPD) which showed that SPE procedures can be equally applied. Minimal sample manipulation and small amounts of organic solvents were required and recoveries exceeded 68% for measurements in triplicate at concentrations of 0.3, 1.5, and 3.0 mg/mL.^[39] McIlhenny *et al.* prepared ayahuasca samples from parts of specimens of *P. viridis* and *B. caapi* collected from cultivations in the district of South Kona, Hawaii (established using clones originating from Peru).^[41] The *B. caapi* vines were macerated and boiled slowly, together with *P. viridis* leaves, for 10 h in 11 litres of double-distilled water. Aliquots (100 µL) of each ayahuasca preparation were diluted and analyzed by HPLC tandem mass spectrometry (MS/MS). The samples of ayahuasca derived from two extracts prepared simultaneously, in which the biomass of *B. caapi* was maintained constant and the quantity of *P. viridis* was varied (either 150 or 300 leaves).^[41] Moura *et al.* prepared extracts of *P. viridis* for the quantification of DMT by LLE with hexane. An average recovery of 70% was obtained in experiments using three different concentration levels.^[90]

Separation and quantification methods

Kartal and colleagues carried out a full validation exercise for the determination of harmol, harmalol, harmine and harmaline in *P. harmala* seeds using HPLC-UV. Several chromatographic parameters were also measured, including capacity factor and resolution. Harmol, harmine and harmaline were determined in samples at concentrations of 1.0, 0.4 and 0.6%, respectively.^[79] The method described by Gaujac *et al.* included a full evaluation of figures of merit throughout all stages of the process of GC-MS analysis of the *M. tenuiflora* bark. The levels of DMT varied from 1.26 to 9.35 mg/g in samples of stem and root bark that had been collected in regions characterized by different pluviometric regimes.^[87] Vepsäläinen *et al.*, using HPLC-UV and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, discovered the presence of a new phytoindole in the bark of *M. tenuiflora* and it was also observed that heat or pH fluctuations impact on stability of this molecule. The phytoindole was termed yuremamine and further studies would be required in order to determine any potential MAOI activity.^[80] Nicasio *et al.* used reversed phase HPLC, with UV detection at 280 nm, to measure tryptophan, tryptamine, serotonin and DMT in the bark, flowers, and leaves of *M. tenuiflora*, as well as in the callus and plantules using micropropagation techniques. The authors conducted

two measurements in different times of the year to assess the variation of concentration levels of these analytes between winter and summer seasons.^[81]

An HPLC method with a non-polar column and fluorescence detection was reported by Callaway *et al.*,^[38] who employed a method that was based on their earlier work,^[89] to measure β-carbolines and DMT in parts of *B. caapi* and in the leaves of *P. viridis*, respectively. In dry *B. caapi* material the concentrations obtained were 0.31–8.43 mg/g (harmine), 0.03–0.83 mg/g (harmaline) and 0.05–2.94 mg/g (THH), respectively. In dry leaves of *P. viridis* the maximum concentration of DMT measured was 17.75 mg/g. Diurnal fluctuations were also reported where higher concentrations were detected during daytime (with peaks at 06:00 am and 06:00 pm). Since DMT levels tended to reduce at dusk it was suggested that DMT might be produced in the leaves to aid absorption of solar radiation.^[38] A proof-of-principle study using capillary electrophoresis laser-induced fluorescence electrospray ionization mass spectrometry (CE-LIF-ESI-MS) method was presented by Huhn *et al.*^[91] The combination of both detection systems was particularly helpful as it allowed for the ability to obtain favorable peak shapes (50 Hz sampling rate) and structural information based on ESI-MS/MS detection. In case of co-elution or incomplete resolution of peaks, quantitative determinations would be possible only with the use of extracted ion electropherograms. Both detection methods could conveniently detect a set of six β-carboline standards around 770 amol levels. A diluted ayahuasca sample revealed the presence of DMT, harmaline, harmine and THH (no quantitation) and an ethanolic extract obtained from *P. viridis* leaves (ultrasonication at 45 °C) showed DMT and an unidentified species with a protonated molecule at *m/z* 189 and product ions at *m/z* 165, 147, 119, 104, and 87, respectively.^[91]

Hemmateenejad *et al.* applied multivariate statistical procedures to optimize an HPLC procedure (UV detection at 330 nm) for the determination of harmine, harmine, harmalol and harmaline in *P. harmala* seeds^[82] and the chromatographic conditions, including column and mobile phase, were similar to those described earlier by Kartal *et al.*^[79] In validation tests the method gave a precision value of 4.6%, excellent linearity ($r^2 > 0.999$) and limits of detection and quantification in the ranges of 3.1–10.3 µg/mL and 9.3–31.0 µg/mL, respectively. In seeds collected from plants in Iran, concentrations of harmine, harmine, harmaline and harmalol were 1.84, 0.16, 3.90, and 0.25%, respectively.^[79] Other excellent validation results were obtained by Monsefi-Esfarani *et al.* using an adaptation of the same method with changes in mobile phase pH. Calibration curves were linear ($r^2 > 0.998$) for all analytes in the concentration range of 0.5–20 µg/mL and method RSD values ranged from 0.6–10.2% for all analytes. LODs were less than 0.1 µg/mL and LOQs equal to 0.5 µg/mL.^[83] Pulpati *et al.* reported a high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) method for the quantification of harmine, harmaline, vasicine and vasicinone from *P. harmala* seeds.^[88] These compounds were detected by a densitometric method and the seeds were found to contain 0.44% of harmine and 0.096% of harmaline (both DW) with suitable figures of merit. Herraiz *et al.* measured harmol, harmalol, harmine, harmaline, and THH in extracts prepared using different parts of *P. harmala*. Quantification of the β-carbolines employed reversed phase HPLC with UV-diode array detection (DAD).^[22]

Standardized aqueous extracts of *B. caapi* were obtained by Wang *et al.*^[32] These were prepared using different parts of the

Table 3. Methods for the determination of tryptamines and β -carbolines in ayahuasca

Ayahuasca	
Reference	Moura <i>et al.</i> ^[90]
Material analyzed	Extracts prepared from <i>P. viridis</i> leaves, and real ayahuasca samples
Analytes of interest	DMT, NMT, harmol, harmalol, harmine, harmaline and THH
Sample preparation technique	Dilution of samples in the mobile phase
Separation / detection techniques	HPLC-MS/MS
Figures of merit	Linear range: 5 – 100 ng/mL and 5 – 100 μ g/mL; $r^2 > 0.9965$; LOD < 0.0079 ppm; LOQ < 0.24 ppm Linear range: 0.02 – 4.0 mg/mL; 0.9941 < r^2 < 0.9971; LOD = 0.01 mg/mL; LLOQ = 0.02 mg/mL; 1.3% < RSD < 9.7%
Concentration levels	DMT: 0.12 – 3.19 mg/mL; NMT: 0.0052 – 0.0313 mg/mL; Harmalol: 0.0026 – 0.0310 mg/mL; Harmol: 0.0009 – 0.0633 mg/mL; Harmine: 0.91 – 16.1 mg/mL; Harmaline: 0.054 – 1.55 mg/mL; THH: 1.22 – 11.90 mg/mL

* Recovery (R).

plant, including leaves, stem bark, and entire branches, and were collected from different geographical locations in the Hawaiian Islands of Oahu and Hilo during different seasons. Determinations of tetrahydronorharmine (THNH), harmol, THH, harmaline and harmine were performed using HPLC-DAD. The concentrations measured are listed in Table 1. Validation test results were not reported. Zhou *et al.* developed a method to quantify tryptamines and a β -carboline in 14 *P. aquatica* populations using HPTLC.^[71] Visualization of spots included the use of an acidified anisaldehyde reagent spray that produced intense colours which were amenable to quantitation using a flatbed digital scanner. Good linearity was obtained in the concentration range between 120–3840 ng per spot, with a correlation coefficient above 0.991, for hordenine, methyltyramine, gramine, and 5-MeO-DMT. The method provided good specificity for the analytes of interest, as well as adequate repeatability with a variation of less than 5%, on average, for analyses in duplicate. Compound identification was confirmed by atmospheric pressure chemical ionization (APCI) LC-MS.^[71]

Of particular note amongst the methods used to quantify tryptamines and β -carbolines in ayahuasca (Table 3) is GC coupled with either an NPD or a mass spectrometer.^[34,39,40] NMR has also been used to quantify DMT.^[90] Overall, an expansion towards method validation seems indicated in order to examine the reliability of measurements. Callaway^[34] presented a compilation of the results obtained for a large number of ayahuasca samples with measurements of DMT, THH, harmine, and harmaline. Decoctions of *B. caapi* were prepared in Brazil by the three main religious groups involved in its use (*Santo Daime*, *União do Vegetal*, and *Barquinha*), and preparations of ayahuasca were also obtained from the Ecuadorian Shuar Indian tribe. An earlier method^[89] was used for the detection of β -carbolines with separation by HPLC and fluorescence detection. DMT was determined by GC-NPD and large differences were found in the concentrations of the analytes in the samples, with DMT levels varying between zero and 14.15 mg/mL.

Pires *et al.* appeared to be the first to report a validated method for the simultaneous determination of both DMT and the β -carbolines harmine, harmaline, and THH in real samples of ayahuasca using GC-NPD.^[39] For all of the analytes the calibration curves showed excellent linearity in the concentration range 0.02–4.0 mg/mL, with r^2 values varying between 0.9941 and 0.9971. The precision of the method was between 94.0 and 105.4%, and intra-day and inter-day coefficients of variation were lower than 9.7%. LODs and LOQs were provided. In stability tests using spiked water and ayahuasca, losses were less than 10% after 24 h of storage at ambient temperature. The ranges of concentrations measured in eight real ayahuasca samples were 0.42–0.73 mg/mL (DMT), 0.37–0.83 mg/mL (harmine), 0.64–1.72 mg/mL (harmaline) and 0.21–0.67 mg/mL (THH). Despite originating from the same religious group in Araçoiaba da Serra (Brazil), the concentrations in the beverages varied between samples probably due to the use of different quantities and proportions of the plants in each preparation, as well as different alkaloid contents present in the plant specimens.^[39]

McIlhenny *et al.* developed an HPLC electrospray ionization (ESI) MS/MS method for the determination tryptamines and β -carbolines present in ayahuasca samples prepared in the laboratory.^[41] This comprehensive MS/MS procedure was optimized for the detection of 11 alkaloids and revealed that major constituents of ayahuasca included THH, harmine, DMT, and

harmaline, followed by harmalol and NMT. In addition, 5-MeO-DMT, 5-HO-DMT (bufotenin), and MTHC were also detected in some but not all samples. Method validation included determination of precision, method bias, inter- and intra-day precisions, limits of detection and quantification. The analytical curves for the compounds were linear in the concentration ranges employed (5–100 ng/mL and 5–100 μ g/mL, depending on the compound), with r^2 above 0.996.^[41]

Gambelunghie *et al.* measured concentrations of DMT and harmine of 24.6 mg/100 mL and 34 mg/100 mL, respectively, in a sample of ayahuasca that had been seized in Italy, but did not provide any validation data.^[40] An alternative approach was offered by Moura *et al.*^[90] who demonstrated that ^1H NMR could be successfully employed for the detection of DMT in ayahuasca. The optimized method was applied to water samples spiked with DMT and 2,5-dimethoxybenzaldehyde as the internal standard, and excellent figures of merit were obtained in validation experiments (Table 3). The authors analyzed extracts prepared from the leaves of *P. viridis*, as well as eight samples of ayahuasca but results were not reported.^[90] Earlier work,^[34] however, indicated that typical levels of DMT in ayahuasca could well exceed the linear range cited by Moura *et al.* (25–1000 mg/L).^[90] The main advantages of the ^1H NMR technique, compared to chromatography, are that the analysis is fast (~30 s), non-destructive, and that it can provide structural information as well. However, a possible influence of matrix effects was not reported and the method was developed in the absence of any β -carbolines present in fortified aqueous samples. It is well-known that ayahuasca preparations invariably contain material from one of the *Banisteriopsis* spp., which provides the β -carbolines that are vital for the oral psychoactivity of the DMT present in *P. viridis* leaves. Further studies can shed more light on the question as to whether such compounds could interfere with the determination of DMT by NMR.

In summary, while the majority of analytical methods employed in recent years involved the implementation of HPLC-UV procedures, less expensive approaches towards quantitative estimations of at least the major alkaloids found in these psychoactive plant matrices, such as HPTLC, were found to be suitable as well. The key alkaloids, i.e. DMT and the main β -carbolines, are sufficiently volatile to undergo GC-based analysis after extraction into a suitable organic solvent without the need for derivatization. The complementary approach offered by HPLC-based methods is increasingly supported by mass spectrometric applications that offer improved sensitivity and specificity when compared to UV/DAD detection. As described above, the first comprehensive HPLC-MS/MS-based target screening approach of ayahuasca and method validation was reported by McIlhenny *et al.*^[41] who also demonstrated that matrix effects, particularly relevant where ESI is employed, were not observed. The need for such a robust, sensitive, and selective mass spectrometric analysis method is especially helpful when considering bioanalytical research following ayahuasca administration studies in humans.^[92,93] In addition, it is anticipated that future research on the characterization of these diverse psychoactive brews will benefit from more comprehensive unknown screening methodologies based on full-scan modes in order to identify additional constituents that have not yet been identified. Finally, a more thorough application of sensitive and selective MS/MS-based methodologies is expected to shed more light on the role of psychoactive tryptamines present in mammalian tissues including humans.^[94]

Conclusion

The use of psychoactive plant products known to contain bioactive tryptamine and β -carboline derivatives is increasing worldwide which reflects the expansion of syncretic religions derived from South America and straightforward access of plant products that contain these alkaloids. Recent research has been reviewed concerning the implementation of analytical techniques used for the detection of tryptamines and β -carbolines present in plants and psychoactive beverages consumed for religious and recreational purposes. For further studies, an increased focus on method validation procedures is recommended. Given the increasing interest in these plants and the ritual beverages derived from them it is clear that suitable routine analytical techniques will increasingly be required to accurately measure the associated psychoactive compounds in a variety of different matrices. This is especially the case within the clinical and forensic context. An additional avenue for further explorations includes a move towards minimal sample manipulation and low to zero use of environmentally toxic solvents.

Acknowledgements

Helpful comments from Adjunct Professor J.C. Callaway, Ph.D. and Prof. Mark Wainwright, Ph.D. are gratefully appreciated.

References

- [1] R.E. Schultes, A. Hofmann, C. Ratsch, *Plants of the Gods: Their Sacred, Healing and Hallucinogenic Powers*, Healing Art Press. Rochester, NY, **2001**.
- [2] G. Montenegro. O uso de psicotr picos na América Pr -Colombiana a partir de uma perspectiva religiosa. *Amer ndia* **2006**, 2, 1.
- [3] J.P. Ogalde, B.T. Arriaza, E.C. Soto. Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Archaeol. Sci.* **2009**, 36, 467.
- [4] S.T. Martinez, R. Almeida, A.C. Pinto. Alucinógenos naturais: Um voo da Europa medieval ao Brasil. *Quim. Nova* **2009**, 32, 9.
- [5] J. Riba, A. Rodriguez-Fornells, G. Urbano, A. Morte, R. Antonijoan, M. Montero, J.C. Callaway, M.J. Barbanoj. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. *Psychopharmacology* **2001**, 154, 85.
- [6] M. Dobkin de Rios, R. Rummell. *A Hallucinogenic Tea, Laced with Controversy: Ayahuasca in the Amazon and the United States*. Praeger, Westport, CT, **2008**.
- [7] R.K. Bullis. The "Vine of the Soul" vs. the controlled substances act: Implications of the hoasca case. *J. Psychoactive Drugs* **2008**, 40, 193.
- [8] K.W. Tupper. The globalization of ayahuasca: harm reduction or benefit maximization? *Int. J. Drug Policy* **2008**, 19, 297.
- [9] B.C. Labate, K. Feeney. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: implications and challenges. *Int. J. Drug Policy* **2011**, DOI: 10.1016/j.drugpo.2011.06.006
- [10] C. Holman. Surfing for a shaman: Analyzing an ayahuasca website. *Ann. Tourism Res.* **2011**, 38, 90.
- [11] F. Schifano, P. Deluca, A. Baldacchino, et al. Drugs on the web; the Psychonaut 2002 EU project. *Prog. Neuro-Psychoph.* **2006**, 30, 640.
- [12] P. Dalgarno. Buying Ayahuasca and other entheogens online: a word of caution. *Addict. Res. Theory* **2008**, 16, 1.
- [13] M.G.R. Leite. *Estudo do uso ilícito de uma planta alucin gena, Mimosa tenuiflora (jurema-preta), da Caatinga nordestina*, Academia Nacional de Polícia. Brasília, **2009**.
- [14] L. Rivier, J.E. Lindgren. "Ayahuasca," the South American hallucinogenic drink: An ethnobotanical and chemical investigation. *Econ. Bot.* **1972**, 26, 101.
- [15] D.J. McKenna, G.H.N. Towers, F. Abbott. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: Tryptamine and beta-carboline constituents of ayahuasca. *J. Ethnopharmacol.* **1984**, 10, 195.
- [16] M. Yritia, J. Riba, J. Ortuño, A. Ramirez, A. Castillo, Y. Alfaro, R. de la Torre, M.J. Barbanoj. Determination of *N,N*-dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. *J. Chromatogr. B* **2002**, 779, 271.
- [17] Z. Mishor, D.J. McKenna, J.C. Callaway. DMT and human consciousness, in *Altering Consciousness, Volume 2: Biological and Psychological Perspectives*, (Eds: E. Cardena, M. Winkelman). Praeger, Westport, CT, **2011**, pp. 85.
- [18] C.N. da Mota, Jurema e identidades: um ensaio sobre a diáspora de uma planta poderosa. in *O uso ritual das plantas de poder*, (Eds: B.C. Labate, S.L. Goulart). Mercado das Letras, Campinas, **2005**, pp. 219.
- [19] R.S.O. de Souza, U.P. Albuquerque, J.M. Monteiro, L.C. de Amorim. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): A review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2008**, 51, 931.
- [20] L.M. Batista, R.N. Almeida, E.V.L. da Cunha, M.S. da Silva, J.M. Barbosa-Filho. Isolation and identification of putative hallucinogenic constituents from the roots of *Mimosa ophthalmocentra*. *Pharm. Biol.* **1999**, 37, 50.
- [21] M. Meckes-Lozoya, X. Lozoya, R.J. Marles, C. Soucy-Breau, A. Sen, J.T. Arnason. *N,N*-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* bark (tepescohuite). *Arch. Invest. Med.* **1990**, 21, 175.
- [22] T. Herraiz, D. González, C. Ancin-Azpilicueta, V.J. Ar n, H. Guillén. beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48, 839.
- [23] R.J. Warren. Fatal nicotine intoxication resulting from the ingestion of Ayahuasca. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, 28, 287.
- [24] D.E. Brush, S.B. Bird, E.W. Boyer. Monoamine oxidase inhibitor poisoning resulting from Internet misinformation on illicit substances. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **2004**, 42, 191.
- [25] J. Sklerov, B. Levine, K.A. Moore, T. King, D. Fowler. A fatal intoxication following the ingestion of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine in an ayahuasca preparation. *J. Anal. Toxicol.* **2005**, 29, 838.
- [26] J.C. Callaway, C.S. Grob, D.J. McKenna, D.E. Nichols, A. Shulgin, K.W. Tupper. A demand for clarity regarding a case report on the ingestion of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) in an ayahuasca preparation. *J. Anal. Toxicol.* **2006**, 30, 406.
- [27] R.J. Strassman. Hallucinogenic drugs in psychiatric research and treatment. Perspectives and prospects. *J. Nerv. Ment. Dis.* **1995**, 183, 127.
- [28] R. Metzner. Hallucinogenic drugs and plants in psychotherapy and shamanism. *J. Psychoactive Drugs* **1998**, 30, 333.
- [29] D.J. McKenna. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacol. Ther.* **2004**, 102, 111.
- [30] J. Schripsema, D. Dagnino, G. Gossman, Alcalóides Indólicos, in *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, (Eds: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick). Editora da UFSC, Florianópolis, **2007**, pp. 819.
- [31] N.G.M. Gomes, M.G. Campos, J.M.C. Orf o, C.A.F. Ribeiro. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Prog. Neuro-Psychoph.* **2009**, 33, 1372.
- [32] Y.H. Wang, V. Samoylenko, B.L. Tekwani, et al. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, 128, 662.
- [33] R.S. Gable. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction* **2007**, 102, 24.
- [34] J.C. Callaway. Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. *J. Psychoactive Drugs* **2005**, 37, 151.
- [35] E.J.B.N. MacRae. Santo Daime and Santa Maria-the licit use of ayahuasca and the illicit use of cannabis in an Amazonian religion. *Int. J. Drug Policy* **1998**, 9, 325.
- [36] E.J.B.N. MacRae. The religious uses of licit and illicit psychoactive substances in a branch of the Santo Daime religion. *Fieldwork in Religion* **2006**, 2, 393.
- [37] R.E. Schultes, A. Hofmann. *The Botany and Chemistry of Hallucinogens*, Charles C. Thomas. Springfield, IL, **1980**.
- [38] J.C. Callaway, G.S. Brito, E.S. Neves. Phytochemical analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. *J. Psychoactive Drugs* **2005**, 37, 145.
- [39] A.P.S. Pires, C.D.R. de Oliveira, S. Moura, F.A. D rr, W.A.E. Silva, M. Yonamine. Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage. *Phytochem. Anal.* **2009**, 20, 149.

- [40] C. Gambelunghe, K. Aroni, R. Rossi, L. Moretti, M. Bacci. Identification of *N,N*-dimethyltryptamine and beta-carbolines in psychotropic ayahuasca beverage. *Biomed. Chromatogr.* **2008**, *22*, 1056.
- [41] E.H. McIlhenny, K.E. Pipkin, L.J. Standish, H.A. Wechkin, R.J. Strassman, S.A. Barker. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8960.
- [42] Conselho Nacional Antidrogas (CONAD). Resolução n. 05 [Resolution n. 05]. Brasília, 4 November, **2004**.
- [43] B.C. Labate. Consumption of ayahuasca by children and pregnant women: medical controversies and religious perspectives. *J. Psychoactive Drugs* **2011**, *43*, 27.
- [44] Conselho Nacional Antidrogas (CONAD). Resolução n. 01 [Resolution n. 01]. Brasília, 25 January, **2010**.
- [45] Conselho Estadual de Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia & Conselho Florestal Estadual (CEMACT/CFE). Resolução n. 004 [Resolution n. 004]. Acre, 20 December, **2010**.
- [46] O.G. de Lima. Observações sobre o 'vinho da jurema' utilizado pelos índios Pancarú de Tacaratú (Pernambuco). *Arq. Inst. Pesqui. Agron. Recife* **1946**, *4*, 45.
- [47] C.N. da Mota, *Os filhos de Jurema na floresta dos espíritos: ritual e cura entre dois grupos indígenas do nordeste brasileiro*, Edufal. Maceió, **2007**.
- [48] T. Herraiz, C. Chaparro. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 378.
- [49] J. van Amsterdam, R. Talhout, W. Vleeming, A. Opperhuizen. Contribution of monoamine oxidase (MAO) inhibition to tobacco and alcohol addiction. *Life Sci.* **2006**, *79*, 1969.
- [50] A. Lewis, J.H. Miller, R.A. Lea. Monoamine oxidase and tobacco dependence. *Neurotoxicology* **2007**, *28*, 182.
- [51] R.A. Grunewald, Sujeitos da jurema e o resgate da "ciência do índio", in *O uso ritual das plantas de poder*, (Eds: B.C. Labate, S.L. Goulart). Mercado das Letras, Campinas, **2005**, pp. 239.
- [52] J. Löhdefink, H. Kasting. Zur Frage des Vorkommens von Hamanalkaloiden in Passiflora-Arten. *Planta Med.* **1974**, *25*, 101.
- [53] J.R.F. Allen, B.R. Holmstedt. *The simple β -carbolines*. *Phytochem.* **1980**, *19*, 1573.
- [54] B. Meier. Passionsblume: Portrait einer Arzneipflanze. *Z. Phytother.* **1995**, *16*, 115.
- [55] A. Rehwald, O. Sticher, B. Meier. Trace analysis of harmal alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **1995**, *6*, 96.
- [56] J. Ott. Pharmahuasca: Human pharmacology of oral DMT plus harmine. *J. Psychoactive Drugs* **1999**, *31*, 171.
- [57] J. Ott. Farmahuasca, anahuasca e jurema preta: farmacologia humana de DMT oral mais harmina, in *O uso ritual da Ayahuasca*, (Eds: B.C. Labate, W.S. Araújo). Mercado das Letras, Campinas, **2009**, pp. 711.
- [58] C. Rätsch. *The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and its Applications*, Park Street Press. Rochester, **2005**.
- [59] A.H. der Marderosian, K.M. Kensinger, J.M. Chau, F.J. Goldstein. The use of hallucinatory principles of the psychoactive beverage of the Cashinahua tribe (Amazon basin). *Drug Depend.* **1970**, *5*, 7.
- [60] S. Agurell, B. Holmstedt, J.E. Lindgren. Alkaloid content of *Banisteriopsis Rusbyana*. *Am. J. Pharm. Sci. Support. Public Health* **1968**, *140*, 148.
- [61] S. Agurell, B. Holmstedt, J.E. Lindgren, R.E. Schultes. Identification of two new beta-carboline alkaloids in South American hallucinogenic plants. *Biochem. Pharmacol.* **1968**, *17*, 2487.
- [62] E.H.F. Moraes, M.A. Alvarenga, Z.M.G.S. Ferreira, G. Akisue. As bases nitrogenadas da *Mimosa scabrella* Benth. *Quim. Nova* **1990**, *13*, 308.
- [63] L.M. Batista, R.N. Almeida. Central effects of the constituents of *Mimosa ophthalmocentra* Mart. *Ex Benth. Acta Farm. Bonaerense* **1997**, *16*, 83.
- [64] L.P. Queiroz. *Leguminosas da Caatinga*, Universidade Estadual de Feira de Santana in association with Royal Botanic Gardens, Kew and Associação Plantas do Nordeste, Feira de Santana, **2009**.
- [65] E. Rivera-Arce, M.A. Chavez-Soto, A. Herrera-Arellano, S. Arzate, J. Aguero, I.A. Feria-Romero, A. Cruz-Guzman, X. Lozoya. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 523.
- [66] C.A. Bourke, M.J. Carrigan. Mechanisms underlying *Phalaris aquatica* "sudden death" syndrome in sheep. *Aust. Vet. J.* **1992**, *69*, 165.
- [67] N. Anderton, P.A. Cockrum, D.W. Walker, J.A. Edgar. Identification of a toxin suspected of causing sudden death in livestock grazing *Phalaris* pastures, in *Plant Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical, and Ecological Aspects*, (Eds: S.M. Colegate, P.R. Dorling). CAB International, Wallingford, UK, **1994**, pp. 269.
- [68] A. Gava, R.S. Sousa, M.S. de Deus, C. Pilati, J. Cristani, A. Mori, D.S. Neves. *Phalaris angusta* (Gramineae) como causa de enfermidade neurológica em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* **1999**, *19*, 116.
- [69] R.S. Sousa, L.F. Irigoyen. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* **1999**, *19*, 116.
- [70] J.H. Skeritt, S.L. Guihot, S.E. McDonald, R.A. Culvenor. Development of immunoassays for tyramine and tryptamine toxins of *Phalaris aquatica* L. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 27.
- [71] L. Zhou, A.A. Hopkins, D.V. Huhman, L.W. Sumner. Efficient and sensitive method for quantitative analysis of alkaloids in harding-grass (*Phalaris aquatica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9287.
- [72] E. Perrot, R. Hamet. Le Yagé, plante sensorielle des Indiens de la région amazonienne de l'Equateur et de la Colombie. *Comptes Rend.* **1927**, *184*, 1266.
- [73] L. Lewin. Untersuchungen über *Banisteria caapi* Spr. (ein südamerikanisches Rauschmittel) *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **1928**, *129*, 133.
- [74] F. Elger. Ueber das Vorkommen von harmin in einer südamerikanischen Liane (Yagé). *Helv. Chim. Acta* **1928**, *11*, 162.
- [75] O. Wolfes, K. Rumpf. Über das Vorkommen von Harmin in einer südamerikanischen Liane. *Arch. Pharmacol.* **1928**, *266*, 188.
- [76] F.A. Hochstein, A.M. Paradies. Alkaloids from *Banisteria caapi* and *Prestonia amazonicum*. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5735.
- [77] I.J. Pachter, D.E. Zacharias, O. Ribeiro. Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina*, and *Mimosa hostilis*. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 1285.
- [78] H.V. Pinkley. Etymology of *Psychotria* in view of a new use of the genus. *Rhodora* **1969**, *71*, 535.
- [79] M. Kartal, M.L. Altun, S. Kurucu. HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 263.
- [80] J.J. Vepsäläinen, S. Auriola, M. Tukiainen, N. Ropponen, J.C. Callaway. Isolation and characterization of yuremamine, a new phytoindole. *Planta Med.* **2005**, *71*, 1053.
- [81] M.P. Nicasio, M.L. Villarreal, F. Gillet, L. Bensaddek, M.A. Fliniaux. Variation in the accumulation levels of *N,N*-dimethyltryptamine in micro-propagated trees and in in vitro cultures of *Mimosa tenuiflora*. *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 61.
- [82] B. Hemmateenejad, A. Abbaspour, H. Maghami, R. Miri, M.R. Panjehshahin. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *575*, 290.
- [83] H.R. Monsef-Esfahani, M.A. Faramarzi, V. Mortezaee, M. Amini, M.R. Rouini. Determination of harmine and harmaline in *Peganum harmala* seeds by high-performance liquid chromatography. *J. Appl. Sci.* **2008**, *8*, 1761.
- [84] S.A. Barker. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 115.
- [85] S.A. Barker. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Bioph. Meth.* **2007**, *70*, 151.
- [86] S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr.* **1989**, *475*, 353.
- [87] A. Gaujac, A. Aquino, S. Navickiene, J.B. de Andrade. Determination of *N,N*-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC-MS. *J. Chromatogr. B* **2012**, *881/882*, 107.
- [88] H. Pulpati, Y.S. Biradar, M. Raiani. High-performance thin-layer chromatography densitometric method for the quantification of harmine, harmaline, vasicine, and vasicinone in *Peganum harmala*. *J. AOAC Int.* **2008**, *91*, 1179.
- [89] J.C. Callaway, L.P. Raymon, W.L. Hearn, D.J. McKenna, C.S. Grob, G.S. Brito, D.C. Mash. Quantitation of *N,N*-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *J. Anal. Toxicol.* **1996**, *20*, 492.

- [90] S. Moura, F.G. Carvalho, C.D. Rodrigues de Oliveira, E. Pinto, M. Yonamine. qNMR: An applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 79.
- [91] C. Huhn, C. Neuss, M. Pelzing, U. Pyell, J. Mannhardt, M. Putz. Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence-electrospray ionization-mass spectrometry: a case study. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1389.
- [92] E.H. McIlhenny, J. Riba, M.J. Barbanoj, R. Strassman, S.A. Barker. Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of the Amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*, 970.
- [93] E.H. McIlhenny, J. Riba, M.J. Barbanoj, R. Strassman, S.A. Barker. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 301.
- [94] S.A. Barker, E.H. McIlhenny, R. Strassman. A critical review of reports of endogenous psychedelic *N,N*-dimethyltryptamines in humans: 1955–2010. *Drug Test. Analysis* **2012**. DOI: 10.1002/dta.422



Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of *N,N*-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks

Alain Gaujac^{a,c}, Sabrina Teixeira Martinez^d, Arão Araújo Gomes^c, Sandro José de Andrade^a, Angelo da Cunha Pinto^d, Jorge Maurício David^a, Sandro Navickiene^e, Jailson Bittencourt de Andrade^{a,b,*}

^a Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, s.210-214, 40170-115, Salvador, Ba, Brazil

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente, Campus Universitário de Ondina, 40170-115, Salvador, Ba, Brazil

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe, BR 101, Km 96, 49100-000, São Cristóvão, Se, Brazil

^d Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Bloco A-7º andar, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, 49100-000, São Cristóvão, Se, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2011

Received in revised form 22 March 2012

Accepted 30 March 2012

Available online 5 April 2012

Keywords:

N,N-dimethyltryptamine

Mimosa tenuiflora

Structural characterization

Purity assessment

Analytical techniques

ABSTRACT

N,N-dimethyltryptamine (DMT) is a psychoactive indole alkaloid present in beverages consumed in religious ceremonies and in neo-shamanic rituals all around the world. It is a substance banned in most countries, which makes its acquisition difficult. In Brazil, a beverage rich in DMT named ayahuasca is legally consumed in a religious context. On the other hand, DMT is a controlled drug, enforced by the Brazilian National Health Surveillance Agency (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*). The present study describes a simple and fast method to obtain *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) from inner barks of *Mimosa tenuiflora* for the purpose of using it as a chromatographic analytical standard. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), single and tandem stage mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H and ¹³C NMR) and melting point measurements were performed for the structural characterization of *N,N*-dimethyltryptamine. The results obtained were in agreement with previous literature reports. The purity of the compound (>95%) was determined using ultraviolet (UV) absorption spectrometry with a tryptamine analytical standard.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tryptamine derivatives are simple indole alkaloids widely present in biota. *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) (Fig. 1) was first synthesized in 1931, and was isolated from *Mimosa tenuiflora* by Oswaldo Gonçalves de Lima in 1942 [1]. Its hallucinogenic properties were confirmed in 1956. It can be found in a wide range of plants, as well as in the human body [2,3].

Species of the Mimosoideae, a botanical subfamily of the Fabaceae family, are found in northeast Brazil, where some of these plants are known as “jurema”. *M. tenuiflora* (Willd.) Poirer or “jurema-preta” (black jurema) is used as the main ingredient in “vinho da jurema” (jurema wine), since its inner barks of stems and roots are rich in DMT. The drink has indigenous origins, and is used in the rituals of several religious groups and neo-shamanic cults, due to the intermingling of Amerindian, African and European cultures [4,5]. Jurema wine, made from the inner bark of *M. tenuiflora* with addition of *Peganum*

harmala seeds, contains DMT and MAOI (monoamine oxidase enzyme inhibitors), the same active principles present in ayahuasca, which is also an indigenous psychoactive beverage used in syncretic religions worldwide [6]. In Brazil, ayahuasca is legal if consumed during the course of religious activities, even by children and pregnant women [7].

Despite being present in the human body, DMT has been classified internationally as a Schedule 1 controlled drug, following the 1971 United Nations Convention on Psychotropic Substances [8]. However, consideration needs to be given to the therapeutic potential of psychedelic drugs. This is especially important because research on this matter was interrupted in the late 1960s [9–11]. The first subsequent work was conducted by Dr. Strassman between 1990 and 1995, in a clinical research approved by the US DEA (United States Drug Enforcement Administration), during which around four hundred doses of DMT were administered to sixty volunteers [12]. There is currently increased interest in the mode of action of DMT in the brain [8,13–18].

Studies involving the determination of this tryptamine compound in plant matrices, as well as in ritual beverages, are essential given the current expansion in its use for religious and recreational purposes [4,19]. Several methodologies have recently been developed to quantify DMT in plants, as well as in the beverages used in religious practices [4],

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente, Campus Universitário de Ondina, 40170-115, Salvador, Ba, Brazil. Tel.: +55 71 32836821; fax: +55 71 32836805.

E-mail address: jailsong@ufba.br (J.B. de Andrade).

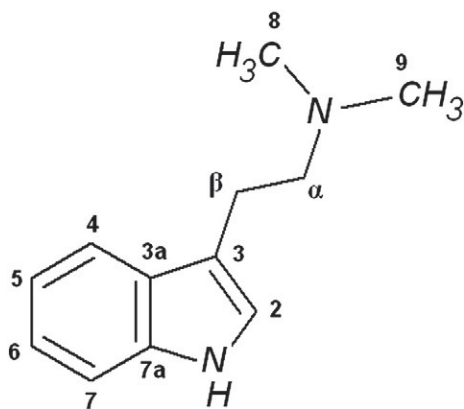


Fig. 1. Molecular structure of *N,N*-dimethyltryptamine (DMT).

and in human blood and urine [20–25]. DMT standards are often produced by synthesis of the compound from tryptamine. However, a difficulty of this procedure is the presence of impurities in the form of other tryptamine and beta-carboline derivatives [26]. Furthermore, the costs involved are high compared to those incurred when DMT is extracted from plant matrices. At our best knowledge, no combination of a fast method of extraction of DMT from the inner barks of *M. tenuiflora* and its structural characterization has been currently proposed in the literature.

The aim of this work was to optimize a method for the isolation of *N,N*-dimethyltryptamine from tissues of *M. tenuiflora*, and to apply analytical techniques for the structural characterization of the alkaloid. A purity assessment test was conducted, based on UV absorption spectrometry, with a view to using the chemical as a chromatographic analytical standard.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

GC grade *n*-hexane was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA). Analytical grade sodium hydroxide, sodium carbonate, and anhydrous sodium sulfate were supplied by Mallinckrodt Baker (Paris, KY, USA). Hydrochloric acid (HCl, 37%) was obtained from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). A certified standard of tryptamine (98% purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Somerset, NJ, USA). Deuterated chloroform (CDCl_3) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The chemicals were used as received, without further purification.

2.2. Sampling and preparation of plant material

Inner barks of stems and roots of *M. tenuiflora* were collected in a forest reserve located on the São Cristóvão campus of the Federal Institute of Sergipe, in northeast Brazil, between April and May 2010. A voucher specimen (ASE18817) of the material was deposited in the herbarium of the Federal University of Sergipe. The bark samples were dried at 40 °C to constant mass and powdered using a cutting mill (Model MA 048, Marconi, Piracicaba, SP, Brazil).

2.3. Isolation of *N,N*-dimethyltryptamine from *M. tenuiflora*

The powdered plant material (60 g) was suspended in 300 mL of 0.1 mol L⁻¹ hydrochloric acid in a glass beaker, and sonicated in an ultrasonic bath for 24 h at a constant temperature of 25 °C. The extract was separated by simple filtration and the residual material was washed twice with 300 mL using the same acid solution. The filtrates were combined, and the solution was washed with hexane to eliminate any plant oils that might be present. The aqueous solution was basified to pH 10–11 with 0.1 mol L⁻¹ NaOH, and then extracted with hexane (5 × 50 mL). The combined extracts were concentrated to dryness under reduced pressure to obtain the crude alkaloid. The solid resulting from filtration was air-dried, and recrystallized from hexane.

2.4. Structural characterization of *N,N*-dimethyltryptamine

2.4.1. Nuclear magnetic resonance

Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded at 200 MHz, using CDCl_3 solutions. Chemical shifts were referenced to the residual solvent peak, or to tetramethylsilane (TMS) as an external reference. The data were reported in terms of the chemical shift (δ , in ppm), multiplicity, coupling constant (*J*, in Hz), and integrated intensity. Carbon-13 nuclear magnetic resonance (¹³C NMR) spectra were recorded at 50 MHz (using CDCl_3 solutions). The chemical shifts were referred to the CDCl_3 solvent peak. The multiplicity of a particular signal was indicated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), or m (multiplet). The ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were measured using a Bruker Spectrospin Avance DPX-200 spectrometer (Fällanden, Switzerland).

2.4.2. Gas chromatography–mass spectrometry

GC–MS/MS analyses were performed with a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA) coupled to a Varian 320-MS QqQ mass spectrometer. Samples were injected into a split/splitless injector (Varian model 1177) using an autosampler (Varian model 1084). A Varian Factor Four VF-5 ms capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) was used. The mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode, at 70 eV. The

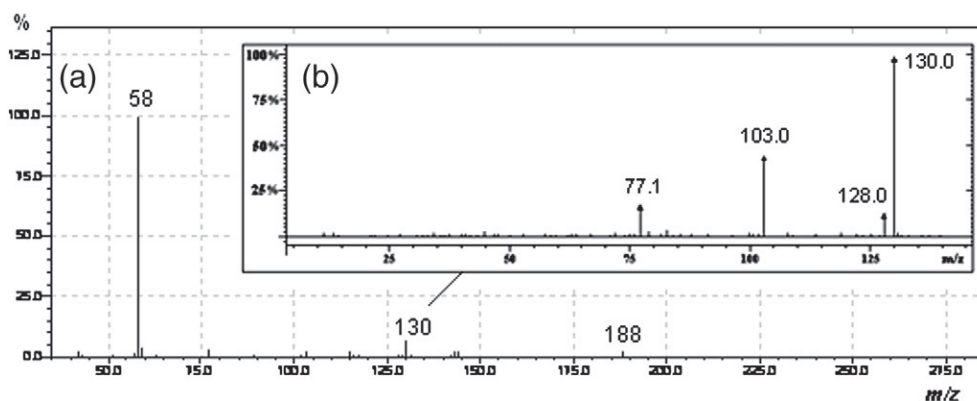


Fig. 2. GC–MS/MS (SRM mode) mass spectrum of DMT isolated from *M. tenuiflora* (a) and mass fragmentation for ion *m/z* 130 (b).

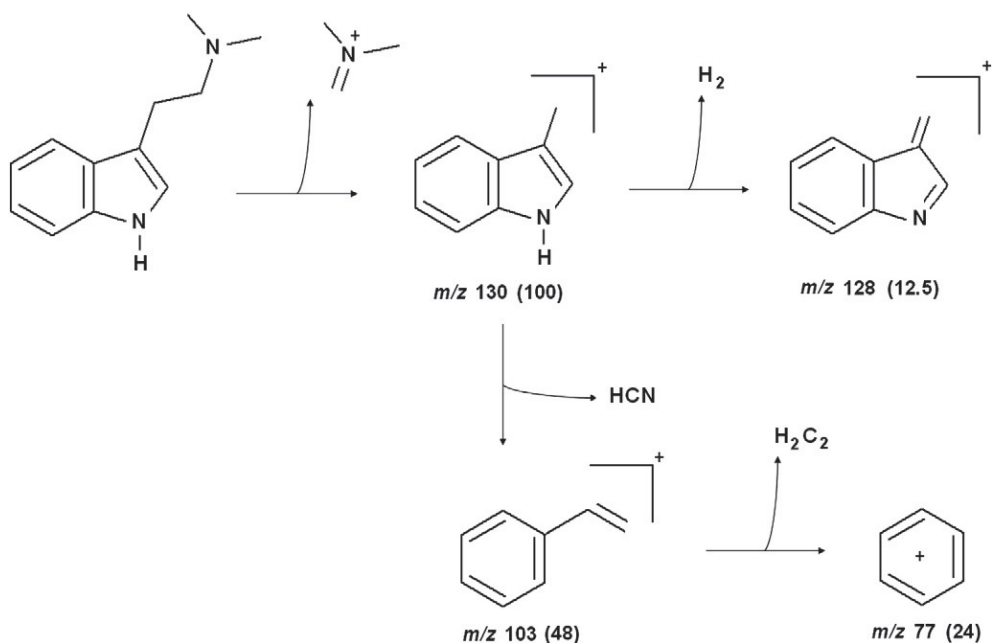


Fig. 3. Suggested fragmentation mechanism for ion m/z 130.

computer that controlled the system also contained an EI-MS library. The mass spectrometer was calibrated with perfluorotributylamine (PFTBA). After the ionization process, ions were passed through a hexapole ion guide to the mass analyzers (mass range is from 40 to 500 m/z). Helium (99.9999% purity) at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} was used as the carrier gas and argon (99.999% purity) was employed as the collision gas at a pressure of 1.5 mTorr. Data acquisition and processing were performed with the Varian workstation software. The injector temperature was 250 °C. The oven temperature program has an initial

temperature of 60 °C for 3 min, followed by a ramp to 200 °C at 8 °C min^{-1} , a further ramp to 280 °C at 10 °C min^{-1} , and a hold at 280 °C for 10 min. The QqQ mass spectrometer was operated in selected reaction monitoring (SRM) mode, and the temperatures of the transfer line, manifold, and ionization source were set at 300, 40, and 250 °C, respectively. The analysis was performed with a filament/multiplier delay of 4.0 min, in order to prevent instrument damage. The electron multiplier voltage was set at 1000 V (the value obtained in the auto-tuning process), and the scan time was 0.6 s. The total run time was 32.5 min.

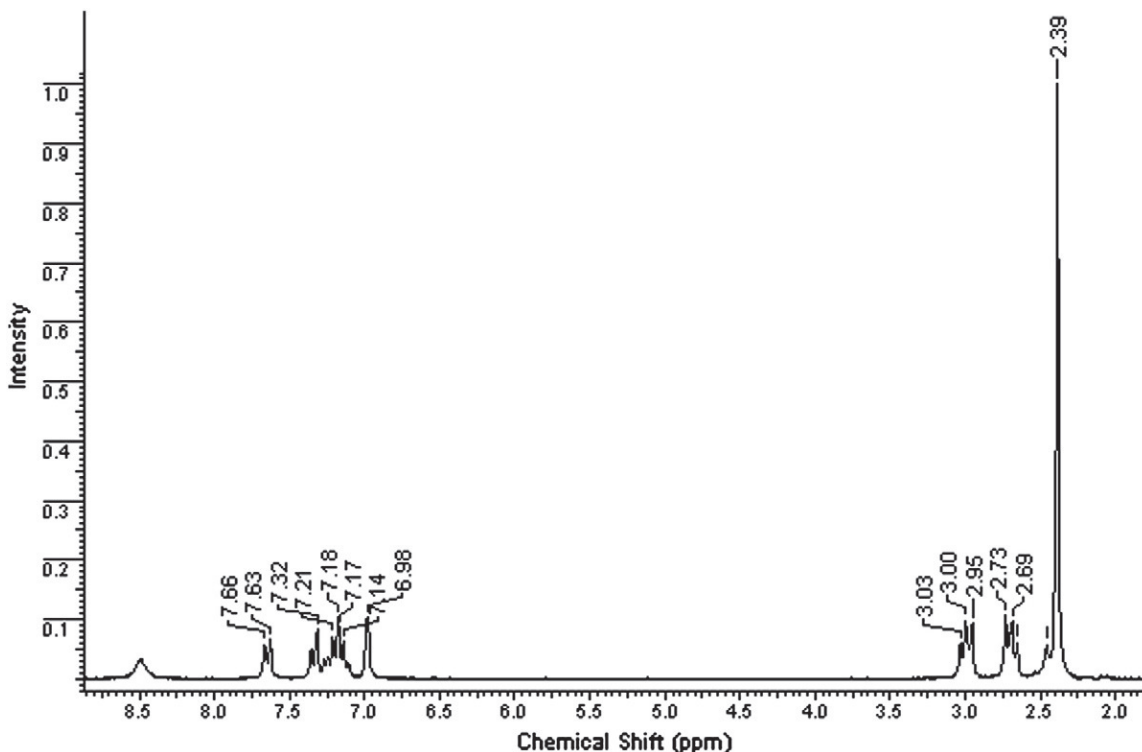


Fig. 4. ^1H NMR spectrum of DMT isolated from *M. tenuiflora*.

Table 1
 ^{13}C -NMR chemical shifts at 50 MHz of the DMT isolated from *M. tenuiflora*.

Carbon	Chemical shifts	
	Reference	Observed
C ₂	122.8 ^a	122.01
C ₃	112.9 ^a	114.37
C _{3a}	127.6 ^a	127.67
C ₄	118.5 ^a	118.94
C ₅	118.6 ^a	119.28
C ₆	121.1 ^a	121.79
C ₇	111.7 ^a	111.36
C _{7a}	136.5 ^a	136.55
C _β	23.7 ^b	23.86
C _α	60.4 ^b	60.53
C ₈ ; C ₉	45.5 ^b	45.61

^a Ref. [29].

^b Ref. [17].

2.4.3. Mass spectrometer direct sample inlet

A Shimadzu DI-2010 direct sample inlet accessory was attached to a QP2010 GC/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan), in order to directly introduce the sample into the mass spectrometer. The temperature was set to 340 °C.

2.4.4. Infrared and melting point measurements

Infrared spectra were recorded with a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), in the range of 4000–400 cm⁻¹, using conventional KBr pallets. Melting points were measured in open capillary tubes, using a Mel-Temp II melting point apparatus (Laboratory Devices Inc., Menlo Park, CA, USA).

2.4.5. Ultraviolet/visible molecular absorption spectrometry

A Cary 50 UV–visible spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used for measurements (in triplicate, at 290 nm) of ten tryptamine standard solutions at concentrations in the range of 0.2 to 100 µg mL⁻¹, in order to generate an analytical curve.

The percentage of DMT was determined using solution concentrations of 6.25, 12.5, 25.0, and 50.0 µg mL⁻¹. The measurements were performed at a wavelength of 275 nm.

3. Results and discussion

3.1. Extraction and isolation of *N,N*-dimethyltryptamine from *M. tenuiflora*

The traditional liquid–liquid procedure for extraction of indole alkaloids from plant matrices was employed [27]. The alkaloids form salts in acidic aqueous media, and show both greater solubility and enhanced stability at low pH values. In addition, the protons in acidic aqueous media assist in breaking down the sample matrix, so that the analyte is released more easily.

The acid extract was basified with sodium hydroxide, and then extracted with hexane, to give 421.4 mg of crude alkaloids (0.7% yield). Final purification was accomplished by recrystallization from hexane. The white crystals of *N,N*-dimethyltryptamine appeared after 24 h at –5 °C, and weighed 181.0 mg (0.3% yield).

3.2. Characterization of *N,N*-dimethyltryptamine

3.2.1. Gas chromatography–mass spectrometry analysis

An aliquot of the isolated compound was analyzed by GC/MS in full scan mode, and showed a prominent peak at 21.2 min. To confirm the identity of the compound, the spectrum of the peak (Fig. 2a) was compared with the spectra available in the Wiley electron impact mass spectrum library (Palisade Corporation, New York, USA). There was 98% similarity between the measured and library spectra, and the ions *m/z* 130 and *m/z* 58 were selected for tandem mass spectrometry. No satisfactory signal was achieved for in-source fragmentation of the *m/z* 58 ion. The mass spectrum obtained for the ion *m/z* 130 can be seen in Fig. 2b and its suggested fragmentation mechanism [28] is shown in Fig. 3.

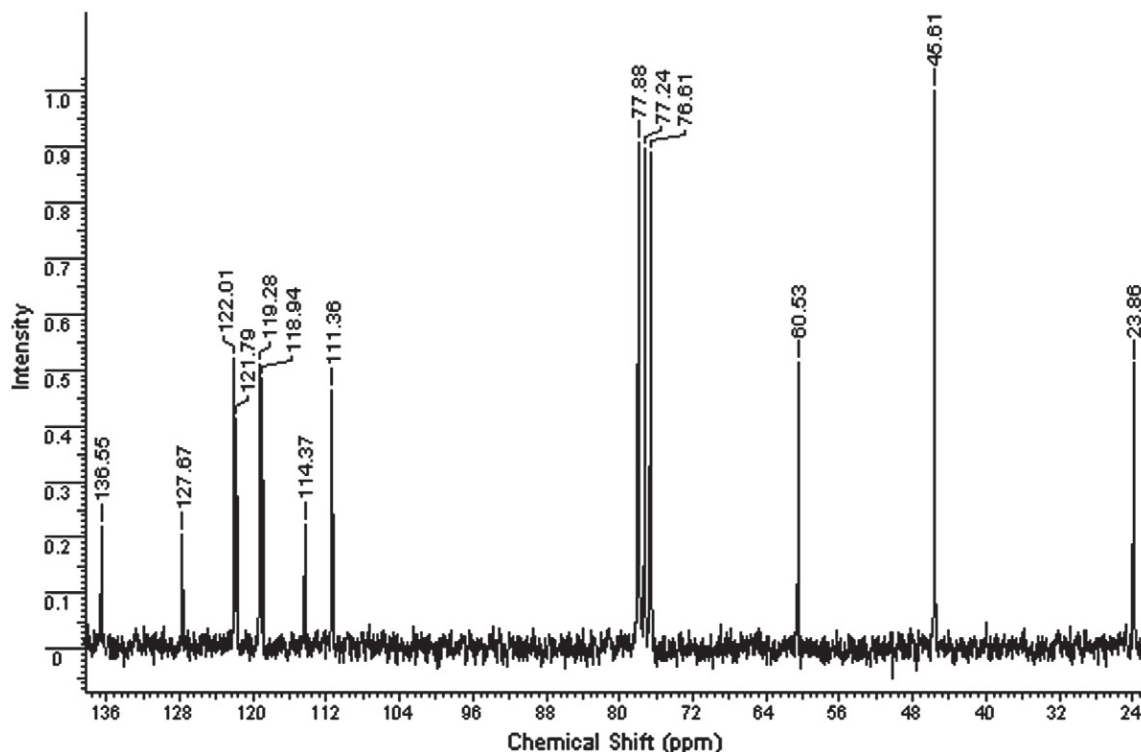


Fig. 5. ^{13}C NMR spectrum of DMT isolated from *M. tenuiflora*.

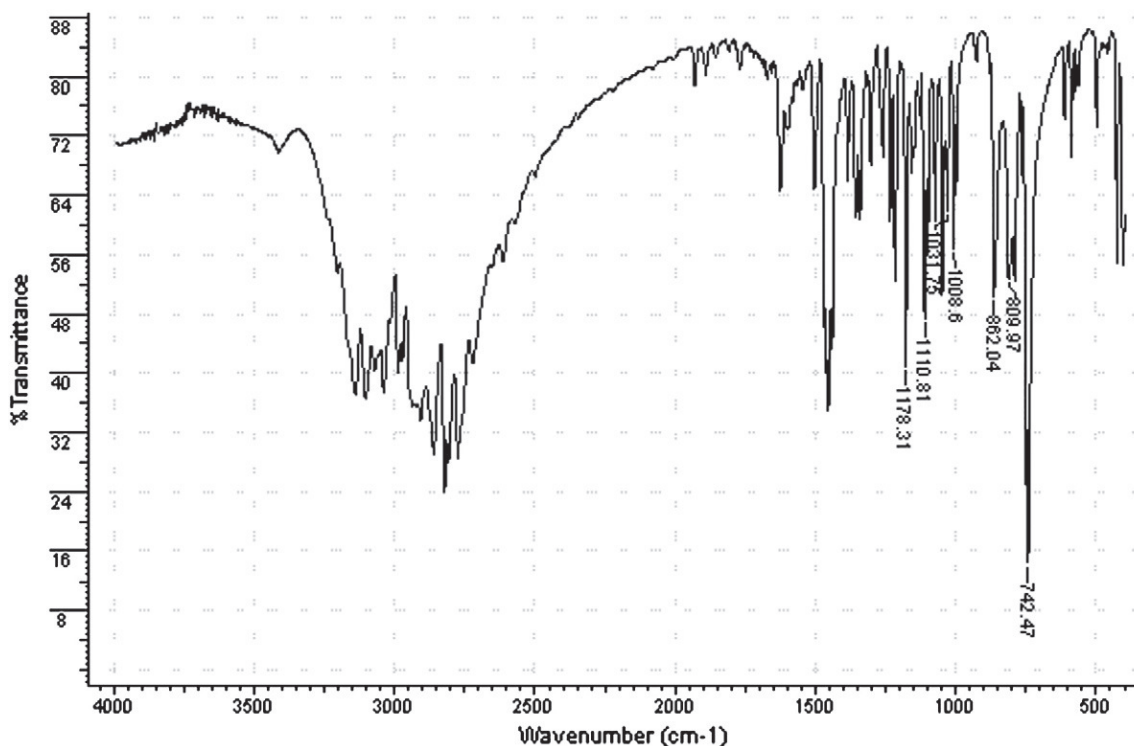


Fig. 6. Infrared spectrum of DMT isolated from *M. tenuiflora*.

3.2.2. Mass spectrometer with direct sample inlet

The direct insertion of crystals into the mass spectrometer resulted in a spectrum with a molecular ion peak at m/z 188, and a base peak at m/z 58. These and other peaks in the *N,N*-dimethyltryptamine spectrum were similar to the spectrum provided in the NIST Mass Spectral Database.

3.2.3. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The chemical shift values of the ^1H NMR spectrum (200 MHz, CDCl_3 , ppm) (Fig. 4) were: 2.39 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$]; 2.69 [br, t, 2H, $J \approx 7.0$; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$]; 3.00 [br, t, 2H, $J \approx 7.00$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$]; 6.98 [br, s, 1H, $\text{C}=\text{H}$]; 7.10–7.39 [3H, m, Ph]; 7.65 [1H, d, $J = 7.51$, H4Ph]; and 8.49 [br, s, 1H, NH]. These values were in agreement with literature data [30,31]. Table 1 compares the ^{13}C NMR data obtained for DMT isolated from *M. tenuiflora* (Fig. 5) with values reported previously [17,29–31].

3.2.4. Infrared analysis

The infrared spectrum obtained for the crystals showed peaks at 742, 809, 862, 1008, 1031, 1110, and 1178 cm^{-1} (Fig. 6), which is in good agreement with the literature [32,33].

3.2.5. Melting point

The melting point of DMT recrystallized from hexane was $55.5\text{ }^\circ\text{C}$, which was compatible with the literature value ($53.5\text{--}57.5\text{ }^\circ\text{C}$) [34]. The literature describes a large difference between the melting points of the DMT ranging between 44 and $68\text{ }^\circ\text{C}$. In addition, no study demonstrated an evidence of DMT crystal polymorphism [32].

3.3. Ultraviolet/visible molecular absorption spectrometry

In order to quantify DMT isolated from *M. tenuiflora*, it was assumed that tryptamine shows the same molar absorbance at 290 nm as *N,N*-dimethyltryptamine at 275 nm , when these compounds are present in methanol [35]. The data revealed a DMT content of $100.19 \pm 4.91\%$ (i.e. higher than 95%). This was corroborated by a

DMT analytical curve constructed at 275 nm , using the absorbance of eight DMT standard solutions at concentrations between 1.56×10^{-3} and 0.1 mg mL^{-1} . Good agreement was obtained between the equations obtained for tryptamine at 290 nm ($y = 28.798x + 0.031$, $r = 0.9968$) and for *N,N*-dimethyltryptamine at 275 nm ($y = 29.844x + 0.015$, $r = 0.9998$).

4. Conclusion

A simple and rapid acid–base extraction method was employed for the isolation of *N,N*-dimethyltryptamine from *M. tenuiflora* stems and roots, resulting in the formation of white crystals with a purity level higher than 95%, which were structurally characterized using ^1H NMR and ^{13}C NMR, MS, FTIR, and UV/vis absorption techniques. The high purity of the *N,N*-dimethyltryptamine obtained by this method enables it to be used as an analytical standard.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Norberto Peporine Lopes and Dr Simon Brandt for helpful discussions. Thanks are also due to MCT/CNPq (Process No. 620247/2008) and Pronex-FAPESB/CNPq (Process No. 0015/2009) for the financial support. This study is dedicated to Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima (1908–1989).

References

- [1] O.G. de Lima, Observações sobre o “vinho da jurema” utilizado pelos índios Pancarú de Tacaratú (Pernambuco), Arq. Inst. Pesq. Agron. Recife 4 (1946) 45–80.
- [2] P. Stafford, Psychedelics Encyclopedia, 3rd ed. Ronin Publishing Inc., Berkeley, 1992.
- [3] S.A. Barker, E.H. McIlhenny, R. Strassman, A critical review of reports of endogenous psychedelic *N,N*-dimethyltryptamines in humans: 1955–2010, Drug Test. Anal. (in press), doi:10.1002/dta.422.
- [4] A. Gaujac, S. Navickiene, M.I. Collins, S.D. Brandt, J.B. de Andrade, Analytical techniques for the determination of tryptamines and β -carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices, Drug Test. Anal. (in press), doi:10.1002/dta.1343.

- [5] R.S.O. de Souza, U.P. Albuquerque, J.M. Monteiro, L.C. de Amorim, Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 5 (2008) 937–947.
- [6] J. Ott, Pharmahuasca: human pharmacology of oral DMT plus harmine, *J. Psychoact. Drugs* 31 (1999) 171–175.
- [7] B.C. Labate, Consumption of ayahuasca by children and pregnant women: medical controversies and religious perspectives, *J. Psychoact. Drugs* 43 (2011) 27–35.
- [8] M.S. Jacob, D.E. Presti, Endogenous psychoactive tryptamines reconsidered: an anxiolytic role for dimethyltryptamine, *Med. Hypotheses* 64 (2005) 930–937.
- [9] D. McKenna, Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges, *Pharmacol. Ther.* 102 (2004) 111–129.
- [10] R. Strassman, Hallucinogenic drugs in psychiatric research and treatment. Perspectives and prospects, *J. Nerv. Ment. Dis.* 183 (1995) 127–138.
- [11] R. Metzner, Hallucinogenic drugs and plants in psychotherapy and shamanism, *J. Psychoact. Drugs* 30 (1998) 333–341.
- [12] R. Strassman, DMT: the spirit molecule, 1st ed. Park Street Press, Rochester, 2001.
- [13] T.-P. Su, T. Hayashi, D.B. Vaupel, When the endogenous hallucinogenic trace amine N,N-dimethyltryptamine meets the sigma-1 receptor, *Sci. Signal.* 2 (2009) 1–4.
- [14] M.B. Gatch, M.A. Rutledge, T. Carbonaro, M.J. Forster, Comparison of the discriminative stimulus effects of dimethyltryptamine with different classes of psychoactive compounds in rats, *Psychopharmacology* 204 (2009) 715–724.
- [15] N.V. Cozzi, A. Gopalakrishnan, L.L. Anderson, J.T. Feih, A.T. Shulgin, P.F. Daley, A.E. Ruoho, Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter, *J. Neural Transm.* 116 (2009) 1591–1599.
- [16] J.V. Wallach Endogenous, hallucinogens as ligands of the trace amine receptors: a possible role in sensory perception, *Med. Hypotheses* 72 (2009) 91–94.
- [17] A.A. Vitale, A.B. Pomilio, C.O. Canellas, M.G. Vitale, E.M. Putz, J. Ciprian-Ollivier, In vivo long-term kinetics of radiolabeled N,N-dimethyltryptamine and tryptamine, *J. Nucl. Med.* 52 (2011) 970–977.
- [18] D. Fontanilla, M. Johannessen, A.R. Hajipour, N.V. Cozzi, M.B. Jackson, A.E. Ruoho, The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator, *Science* 323 (2009) 934–937.
- [19] C. Vince, P. Jacob, M. Alex, Dimethyltryptamine (DMT): subjective effects and patterns of use among Australian recreational users, *Drug Alcohol Depend.* 111 (2010) 30–37.
- [20] J.C. Callaway, L.P. Raymon, W.L. Hearn, D.J. McKenna, C.S. Grob, G.S. Brito, Quantitation of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 492–497.
- [21] M. Yritia, J. Riba, J. Ortuno, A. Ramirez, A. Castillo, Y. Alfaro, Determination of N,N-dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of ayahuasca, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 779 (2002) 271–281.
- [22] E.H. McIlhenny, J. Riba, M.J. Barbanoj, R. Strassman, S.A. Barker, Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 301–313.
- [23] E.H. McIlhenny, J. Riba, M.J. Barbanoj, R. Strassman, S.A. Barker, Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of the Amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 970–984.
- [24] J. Kärkkäinen, T. Forsström, J. Tornaes, K. Wähälä, P. Kiuru, A. Honkanen, U.-H. Stenman, U. Turpeinen, A. Hesso, Potentially hallucinogenic 5-hydroxytryptamine receptor ligands bufotenine and dimethyltryptamine in blood and tissues, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 65 (2005) 189–199.
- [25] J. Riba, E. McIlhenny, M. Valle, S. Barker, Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca, *Drug Test. Anal.* (in press), doi:10.1002/dta.1344.
- [26] S.D. Brandt, S.A. Moore, S. Freeman, A.B. Kanuc, Characterization of the synthesis of N,N-dimethyltryptamine by reductive amination using gas chromatography ion trap mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 2 (2010) 330–338.
- [27] J. Schripsema, D. Dagnino, G. Gossman, Alcalóides indólicos, in: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick (Eds.), *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis, 2007, pp. 819–846.
- [28] V.U. Khuzhaev, U.A. Abdullaev, S.F. Aripova, Alkaloids of *Arundo donax* V. Mass spectrometry of the alkaloids of *Arundo donax*, *Chem. Nat. Prod.* 32 (1996) 190–193.
- [29] S.D. Brandt, S. Freeman, I.A. Fleet, P. McGagh, J.F. Alder, Analytical chemistry of synthetic routes to psychoactive tryptamines Part II. Characterisation of the Speeter and Anthony synthetic route to N,N-dialkylated tryptamines using GC-El-ITMS, ESI-TQ-MS-MS and NMR, *Analyst* 130 (2005) 330–344.
- [30] A.P.S. Pires, C.D.R. Oliveira, S. Moura, F.A. Dórr, W.A.E. Silva, M. Yonamine, Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and β -carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage, *Phytochem. Anal.* 20 (2009) 149–153.
- [31] S. Moura, F.G. Carvalho, C.D.R. Oliveira, E. Pinto, M. Yonamine, qNMR: an applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation, *Phytochem. Lett.* 3 (2010) 79–83.
- [32] A. Shulgin, A. Shulgin, *TIHKAL: Tryptamines I Have Known and Loved*, 1st ed. Transform Press, Berkeley, 1997.
- [33] R. Laing, J.A. Siegel, *Hallucinogens: a Forensic Drug Handbook*, 1st ed. Academic Press, London, 2003.
- [34] H.R. Arthur, S.N. Loo, J.A. Lambertson, N-methylated tryptamines and other constituents of *Acacia confusa* of Hong Kong, *Aust. J. Chem.* 20 (1967) 811–813.
- [35] E.H.F. Moraes, M.A. Alvarenga, Z.M.G.S. Ferreira, G. Akisue, As bases nitrogenadas da *Mimosa scabrella* Benthham, *Quim. Nova* 13 (1990) 308–309.



Short communication

Determination of *N,N*-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry

Alain Gaujac^{a,b,c}, Nicola Dempster^b, Sandro Navickiene^d, Simon D. Brandt^b,
Jailson Bittencourt de Andrade^{a,e,*}

^a Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil

^b Liverpool John Moores University, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, L3 3AF, Liverpool, United Kingdom

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe, Br 101, Km 96, 49100-000 São Cristóvão-Se, Brazil

^d Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, 49100-000 São Cristóvão-Se, Brazil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2012

Received in revised form

8 January 2013

Accepted 10 January 2013

Available online 1 February 2013

Keywords:

DMT

Vinho da jurema

Ayahuasca

Multivariate optimization

SPME/GC-MS

ABSTRACT

A novel analytical approach combining solid-phase microextraction (SPME)/gas chromatography ion trap mass spectrometry (GC-IT-MS) was developed for the detection and quantification *N,N*-dimethyltryptamine (DMT), a powerful psychoactive indole alkaloid present in a variety of South American indigenous beverages, such as ayahuasca and *vinho da jurema*. These particular plant products, often used within a religious context, are increasingly consumed throughout the world following an expansion of religious groups and the availability of plant material over the Internet and high street shops. The method described in the present study included the use of SPME in headspace mode combined GC-IT-MS and included the optimization of the SPME procedure using multivariate techniques. The method was performed with a polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fiber in headspace mode (70 min at 60 °C) which resulted in good precision (RSD < 8.6%) and accuracy values (71–109%). Detection and quantification limits obtained for DMT were 0.78 and 9.5 mg L⁻¹, respectively and good linearity (1.56–300 mg L⁻¹, $r^2=0.9975$) was also observed. In addition, the proposed method showed good robustness and allowed for the minimization of sample manipulation. Five jurema beverage samples were prepared in the laboratory in order to study the impact of temperature, pH and ethanol on the ability to extract DMT into solution. The developed method was then applied to the analysis of twelve real ayahuasca and *vinho da jurema* samples, obtained from Brazilian religious groups, which revealed DMT concentration levels between 0.10 and 1.81 g L⁻¹.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ayahuasca is an indigenous brew produced as a decoction using the leaves of chacrona (*Psychotria viridis*) and sections of the stem of the yage vine (*Banisteriopsis caapi*) which originates from the Amazon region. *Vinho da jurema*, commonly referred to as jurema wine probably due to its visual similarity with the ordinary red wine, is also an indigenous brew but prepared with both root and stem barks of the *jurema preta* tree (*Mimosa tenuiflora*) from the arid Northeast of Brazil [1]. Both are used worldwide by various religious groups and in neo-shamanic urban rituals. Brazilian legislation permits the consumption of ayahuasca within a religious context

and may also include pregnant women and children provided parental consent is given [2].

Previous studies based on gas chromatography (GC) have been reported for the determination of DMT in ayahuasca matrices which employed liquid–liquid extraction (LLE) [3–5] and solid phase extraction (SPE) procedures [6]. Sample preparation techniques based on LLE can be manually intensive, often involve large amounts of toxic organic solvents and may be time-consuming [7], in addition to the risk of analyte loss. A reliable alternative approach is the use of solid-phase microextraction (SPME). SPME is a solvent-free sample preparation technique that reduces sample preparation requirements and allows both extraction and concentration to be achieved in a single step [8].

There are several SPME applications in chemical analysis, bioanalysis, food and environmental sciences, and a growing number of publications describing pharmaceutical and medical studies [9]. The aim of this study was to evaluate the performance

* Corresponding author at: Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil. Tel.: +55 7132836821; fax: +55 7132836805.

E-mail address: jailson@ufba.br (J.B.de. Andrade).

of a new solid phase microextraction method for the determination of DMT content in ayahuasca and *vinho da jurema* samples, using multivariate optimization techniques as factorial design and central composite design to identify the critical points involved in the SPME extraction procedure. To the best of the authors' knowledge, this is the first study based on a SPME procedure followed by gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) to determine DMT levels present in twelve real ayahuasca and *vinho da jurema* samples, and five jurema beverage samples prepared in the laboratory.

2. Experimental

2.1. Standards, reagents and supplies

Methanol was of HPLC grade (Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset, UK). Analytical grade anhydrous sodium hydroxide was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Chemicals were used as received and without further purification. A manual solid phase microextraction (SPME) holder and fiber, coated with polydimethylsiloxane/divinylbenzene (65 μm , PDMS/DVB), was acquired from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Prior to use, the fiber was conditioned in accordance with the manufacturer's recommendations. A magnetic stirrer (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) was used to homogenize beverage samples prior to SPME. *N,N*-Dimethyltryptamine (DMT) (95.8% \pm 0.6) was isolated from *M. tenuiflora* inner barks, using a previously published method [10]. This standard was used in a previous work to quantify DMT in the barks of *M. tenuiflora*, by matrix solid-phase dispersion followed by GC–MS [11]. A total number of twelve ayahuasca and jurema beverage samples were obtained from Brazilian religious groups.

2.2. Preparation of DMT standard solutions and beverage samples

A working standard of 100 mg L^{-1} DMT was prepared by addition of 50 μL DMT standard stock solution (10 g L^{-1} in methanol) to 5 mL of 0.001 mol L^{-1} NaOH solution (pH 11). Standard solutions were prepared similarly with spiked stock solution, leading to concentration standards between 0.78 to 400 mg L^{-1} . These alkaline standard solutions were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$, and were stable for a period of at least 2 weeks. The real beverage samples were prepared by either 10- or 25-fold dilution of ayahuasca or *vinho da jurema* samples using a 0.001 mol L^{-1} NaOH aqueous solution. The final volume was 5 mL. 50 μL of methanol was added and the pH was corrected to pH 11, using small crystals of sodium hydroxide and a pH meter. These real samples were analyzed immediately after preparation.

2.3. SPME procedure

A 5 mL beverage sample was added to a 9 mL headspace vial and sealed with a cap containing a PTFE-faced silicone septum. The vial was placed into an aluminum block to ensure uniform heating at 60 $^{\circ}\text{C}$. The sample was stirred (900 rpm) for 10 min to ensure thermal equilibration. The SPME syringe needle penetrated the vial septum, and the PDMS/DVB (65 μm) fiber was then lowered into the headspace located above the sample solution. The extraction time was 70 min followed by removal of the SPME fiber and insertion into the GC injection port for a desorption (and cleaning) period of 5 min. Statistical procedures were performed using Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

2.4. GC-ion trap-MS system and operating conditions

GC–MS analysis was performed using a Varian 450-GC gas chromatograph (Walnut Creek, CA, USA) coupled to a Varian 200-MS ion trap (IT) mass spectrometer. The 1177 injector was operated in splitless mode for 60 s and heated at 250 $^{\circ}\text{C}$. A straight SPME liner ($L \times \text{o.d.} \times \text{i.d.}$, 105 \times 2.75 \times 0.75 mm) was used for sample introduction. The system was operated by the Saturn GC/MS Workstation, version 6.9. Separation was carried out on a Supelco SLB-5 ms capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Helium (purity 99.995%) was employed as carrier gas at a constant column flow of 1.0 mL min^{-1} . The GC oven temperature was programmed from 50 $^{\circ}\text{C}$ (held for 3.5 min) to 280 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (held for 10 min). The ion trap mass spectrometer was operated in the electron ionization (EI) mode. Manifold, ion trap, ion source and transfer line temperatures were maintained at 80, 220, 300 and 300 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Helium was also used as damping gas at a flow of 0.8 mL min^{-1} . In the full scan mode the mass range was varied from m/z 40 to 400 at 0.6 s scan $^{-1}$. The identification of DMT in beverages (GC retention time and mass spectral comparison) was verified with reference material. For quantification purposes the scan range was restricted to m/z 57–59 which reflected the dominating abundance of the m/z 58 iminium ion in the mass spectrum of DMT.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the SPME method

Initially, a sample of herbal beverage was used to determine the optimum sample volume (5 mL), desorption time (5 min) and pH value (pH 11), respectively, which were carried out by univariate analyses. The PDMS/DVB fiber was well suited for analyzing volatile and semi-volatile compounds of medium polarity. In order to select the optimal experimental conditions for extraction, a multivariate optimization strategy was employed to assess the influence of the main factors on the SPME procedure. Several tests were carried out in order to select the factors and the domain to be considered in the multivariate experimental approach to maximize the yield of DMT extracted from beverages, and to obtain a good precision for the method. The factors included in the 2³ factorial design (Table 1) were temperature (T), equilibrium time (t_{EQU}) and extraction time (t_{EXT}), respectively. The relationship between each investigated variable and impact of possible cross effects on DMT signal response was determined by using the Pareto graph (Fig. 1). Analysis of the Pareto graph indicated that, within the studied domain, the impact of temperature and extraction time was significant. The temperature was fixed at 60 $^{\circ}\text{C}$. In order to find the critical factors of the sample preparation method, a response surface technique was employed as a central composite design. Although equilibration time factor did not appear to show any significant influence in the domain previous studied (15–25 min), it was decided to include this in the central composite design with a new domain, ranging between 5 and 15 min. The extraction time was also

Table 1
Factors and levels for 2³ factorial design.

Factor	Low level (-)	Central point (C)	High level (+)
Temperature (T , $^{\circ}\text{C}$)	40	50	60
Equilibrium time (t_{EQU} , min)	15	20	25
Extraction time (t_{EXT} , min)	20	35	50

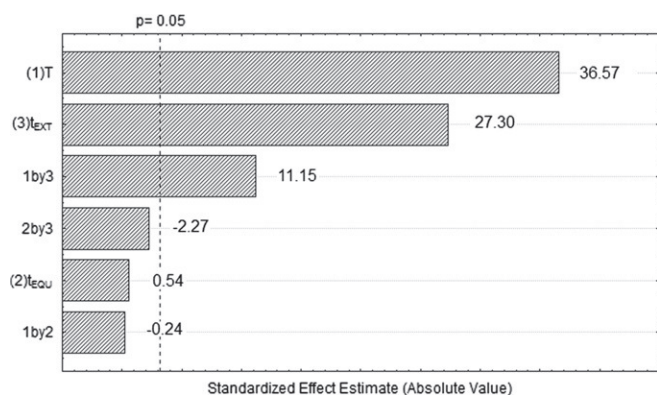


Fig. 1. Pareto chart used to describe the optimization of SPME variables.

Table 2

Factors and levels for central composite design.

Factor	Low level (-)	Central point (C)	High level (+)
Equilibrium time (t_{EQU} , min)	5	10	15
Extraction time (t_{EXT} , min)	20	50	80

evaluated in the central composite design, which considered time intervals varying from 20 to 80 min (Table 2). The response surface model generated by the execution of the central composite design matrix confirmed that the equilibrium time factor had no impact on the peak area of DMT (Fig. 2). For this factor, it was adopted on the central point level, 10 min, long enough to ensure that the fiber reaches thermal equilibrium with the sample medium, at 60 °C, before exposition on the headspace. The extraction time factor, on the other hand, had a major influence on the signal response and the surface (Fig. 2) revealed that chemical equilibrium was reached after 60 min, in the region where maximum DMT peak area values were obtained. In order to verify the prediction a set of extraction time experiments were carried (5–110 min) while maintaining all other factors unchanged, i.e. pH 11, equilibrium time 10 min, desorption time 5 min and temperature 60 °C. The results are presented in Fig. 3. Following this evaluation an extraction time of 70 min was chosen in order to achieve improved method robustness. In the all optimization designs, triplicate analyses were carried out at the central point of the studied domains in order to provide statistically meaningful figures.

3.2. Method validation

3.2.1. Linearity

The DMT calibration curve was prepared using twelve concentration levels between 1.56 and 300 mg L⁻¹ using the solution standards described on Section 2, and duplicate analysis per concentration level. The slope and intercept values, together with their standard deviations (see below), were determined using regression analyses which yielded a correlation coefficient for DMT of $r^2=0.9975$.

3.2.2. Accuracy

To determine the accuracy of the developed method, a recovery study was carried out using beverage samples and the standard addition method. In this case, a known amount of isolated DMT was added to the sample at three different concentration levels, i.e. 9.5, 50 and 152 mg L⁻¹, respectively. Each concentration level analyzed in triplicate employing seven samples and the results were expressed as mean recovery and %RSD.

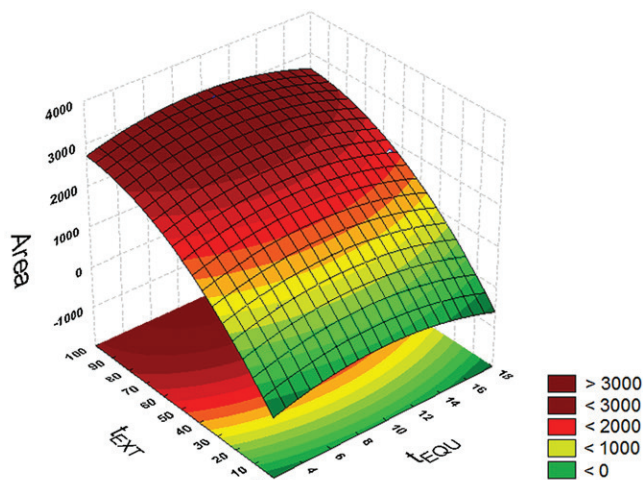


Fig. 2. Surface response model.

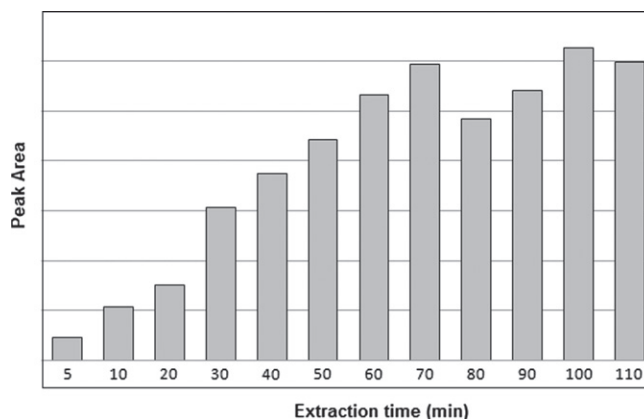


Fig. 3. Effect of extraction time on DMT peak area.

Under standard addition conditions, consistent and high recovery values were obtained and mean absolute recovery values for DMT were found to range between 71 and 109%. This recovery study indicated that the method was suitable for the determination of DMT from herbal preparations.

3.2.3. Precision

The precision of the method was determined by repeatability studies and expressed as relative standard deviation (%RSD). The repeatability (intra-assay precision) was measured by comparing standard deviation values obtained from recovery percentages derived from spiked samples (concentration levels 9.5, 50 and 152 mg L⁻¹) that were run on the same day. Each concentration level was determined seven times followed by RSD calculations. The RSD values for DMT levels were found to be below 8.3% at all spiked levels and considered suitable.

3.2.4. Limits of detection and quantification

The limit of detection (LOD) was calculated considering the standard deviation of the analytical noise (a value seven times the standard deviation of the blank) and the slope of the regression line, and it was equal to 0.78 mg L⁻¹. The limit of quantification (LOQ) was determined as the lowest concentration that provided a response of ten times the average of the baseline noise, and were calculated using seven unfortified samples. The LOQ value for this compound was 9.5 mg L⁻¹.

3.2.5. Robustness

The robustness of this proposed method was estimated by testing the reliability of analysis with respect to small but deliberate variation of optimized method parameters. A three-factor face-centered design consisting of fifteen experiments was employed. The extraction time (69.5–70.5 min), temperature (59–61 °C) and pH of aqueous phase (pH 10.5–11.5) were considered critical factors. Pareto graph plots (Fig. 4) indicated that the obtained response remained unaffected by small changes in these

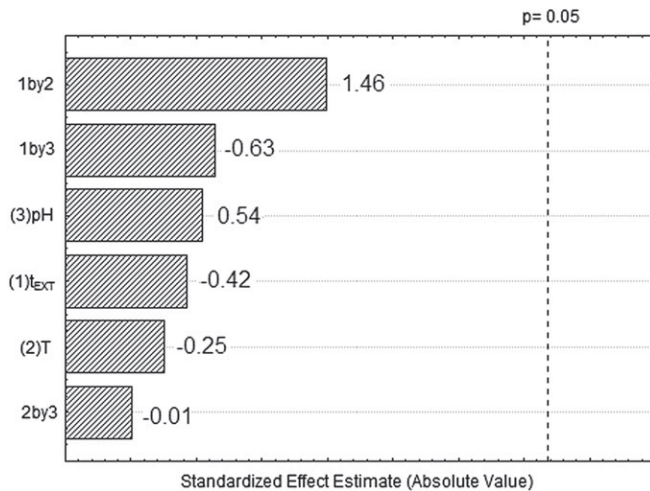


Fig. 4. Evaluation of robustness using the Pareto chart.

Table 3

DMT concentration in jurema beverage samples prepared in the laboratory under different conditions.

Jurema beverage sample preparation condition	DMT conc. (g L ⁻¹)
1 Extraction into water at room temperature	1.32
2 Extraction into acidified water (HCl, pH=1) at room temperature	1.57
3 Extraction into water at 100 °C	1.17
4 Extraction into acidified water (HCl, pH=1) at 100 °C	1.79
5 Extraction into water:ethanol (50:50, v/v) at room temperature	1.73

critical method parameters. Statistical analysis revealed that there was good agreement between experimental and predicted values. Furthermore, none of the factors studied in these domains showed significant effect on system efficiency.

3.2.6. Estimation of DMT content in jurema beverages

The analytical procedure described above was also used to study the influence of several parameters typically involved in the preparation of jurema products from plant material on DMT content. This included an assessment of temperature (room temperature Vs. 100 °C), pH of aqueous phase and the percentage of ethanol in the aqueous extraction medium. Thus, five jurema beverages samples were prepared in the laboratory using 5 g of inner bark of *jurema preta* (*M. tenuiflora*) per 100 mL of sample, employing the same time of extraction. The concentrations of DMT found in the analyzed samples are summarized in Table 3. For example, it was found that simply heating the decoction during preparation did not lead to increased DMT levels, however, concentrations of DMT did increase when an aqueous acid medium (pH 1), or a mix of water and ethanol (50:50, v/v), was employed. All samples were analyzed in triplicate.

Table 4

DMT levels in ayahuasca (A) and *vinho da jurema* (J) preparations obtained from Brazilian religious groups.

Samples	DMT conc. (g L ⁻¹)
A1	0.44
A2	1.14
A3	0.58
A4	0.57
A5	0.72
A6	0.29
A7	0.17
J1	1.76
J2	1.81
J3	0.73
J4	0.10
J5	0.68

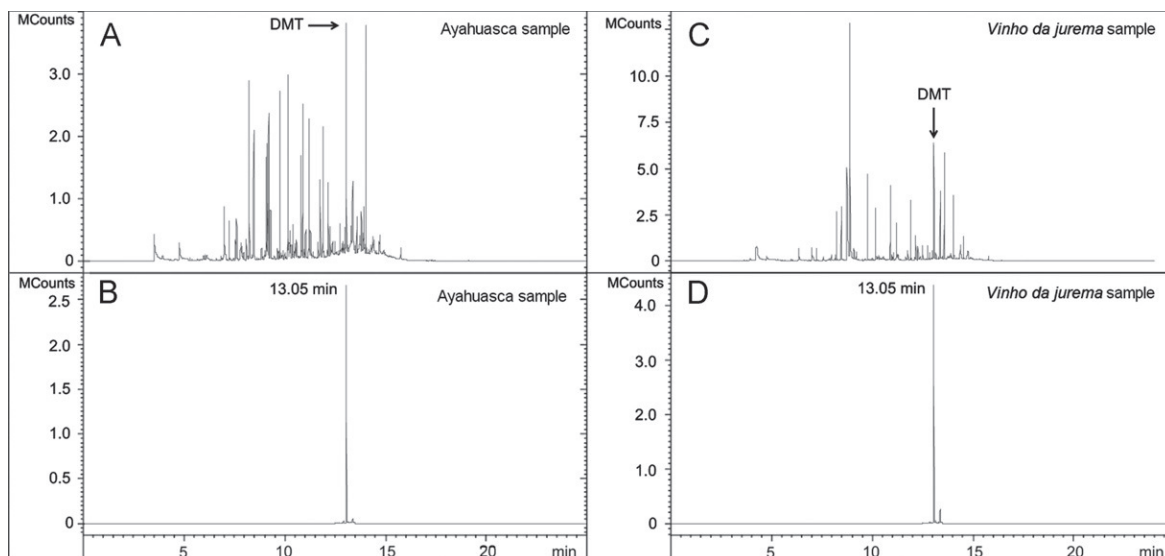


Fig. 5. Representative SPME GC-ion trap-MS traces obtained from real samples of ayahuasca (A and B) and *vinho da jurema* (C and D). A and C: full scan mode; B and D: quantification of DMT (13.05 min) at a reduced scan range between *m/z* 57–59 which reflected the formation of the *m/z* 58 iminium ion base peak.

3.3. Application of the method

Twelve samples of ayahuasca (A1–A7) and *vinho da jurema* samples (J1–J5) were collected from different Brazilian religious groups and analyzed in triplicate by using the developed SPME/GC-IT-MS method. All samples were diluted by a factor of 10 or 25, depending on the level of DMT present in the beverages. Representative chromatograms are shown in Fig. 5. High levels of DMT were found in both sample types. The DMT concentration in the *vinho da jurema* samples ranged from 0.10 to 1.81 g L⁻¹, whereas ayahuasca products revealed the presence of DMT in the range of 0.17 to 1.14 g L⁻¹, (Table 4), which was consistent with previous reports on liquid samples [1].

4. Conclusions

The present study provided a new method for the determination of DMT in ayahuasca and *vinho da jurema* matrices based on headspace solid-phase microextraction gas chromatography ion trap mass spectrometry. The optimization of SPME-related parameters were carried out by multivariate techniques and provided excellent figures of merit. The fact that it was possible to work with a small sample size and that the extent of sample manipulation was minimized, made the SPME/GC-MS technique particularly useful. There were considerable variations in DMT levels detected in ayahuasca and *vinho da jurema* samples obtained from Brazilian religious groups.

Acknowledgments

The authors wish to thank MCT/CNPq (Process no. 620247/2008-8) and Pronex-FAPESB/CNPq (Process no. 0015/2009) for the financial support of this study. We are also grateful to Mark Ian Collins for providing a large part of ayahuasca and *vinho da jurema* samples. Prof. Mark Wainwright is thankfully acknowledged for proof-reading the manuscript.

References

- [1] A. Gaujac, S. Navickiene, M.I. Collins, S.D. Brandt, J.B. de Andrade, *Drug Test. Anal.* 4 (2012) 636–648.
- [2] B.C. Labate, *J. Psychoactive Drugs* 43 (2011) 27–35.
- [3] J.C. Callaway, *J. Psychoactive Drugs* 37 (2005) 151–155.
- [4] C. Gambelunghe, K. Aroni, R. Rossi, L. Moretti, M. Bacci, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 1056–1059.
- [5] S. Moura, F.G. Carvalho, C.D.R. de Oliveira, E. Pinto, M. Yonamine, *Phytochem. Lett.* 3 (2010) 79–83.
- [6] A.P.S. Pires, C.D.R. de Oliveira, S. Moura, F.A. Dórr, W.A.E. Silva, M. Yonamine, *Phytochem. Anal.* 20 (2009) 149–153.
- [7] Y. Chen, Z. Guo, X. Wang, C. Qiu, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 191–219.
- [8] F. Bonadio, P. Margot, O. Delémont, P. Esseiva, *Forensic Sci. Int.* 182 (2008) 52–56.
- [9] B. Bojko, E. Cudjoe, G.A. Gómez-Ríos, K. Gorynski, R. Jiang, N. Reyes-Garcés, S. Risticvic, E.A.S. Silva, O. Togunde, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta* 750 (2012) 132–151.
- [10] A. Gaujac, S.T. Martinez, A.A. Gomes, S.J. de Andrade, A.C. Pinto, J.M. David, S. Navickiene, J.B. de Andrade, *Microchem. J.* in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.033>.
- [11] A. Gaujac, A. Aquino, S. Navickiene, J.B. de Andrade, *J. Chromatogr. B* 881–882 (2012) 107–110.



Investigations into the polymorphic properties of *N,N*-dimethyltryptamine by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry

Alain Gaujac^{a,b,c}, James L. Ford^b, Nicola M. Dempster^b, Jailson Bittencourt de Andrade^{a,d}, Simon D. Brandt^{b,*}

^a Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil

^b Liverpool John Moores University, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, L3 3AF, Liverpool, United Kingdom

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe, Br 101, Km 96, 49100-000 São Cristóvão-Se, Brazil

^d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, Centro Interdisciplinar de Energia e Ambiente, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador-Ba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2013

Received in revised form 12 March 2013

Accepted 12 March 2013

Available online 20 March 2013

Keywords:

N,N-dimethyltryptamine

DMT

Melting points

Polymorphism

Crystals

Differential scanning calorimetry

X-ray diffraction

ABSTRACT

The powerful psychoactive features of *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) have sparked the imagination of many research disciplines for several decades. One of the key chemical features associated with compound identity is the determination of melting points. The descriptions of both melting points and morphology associated with DMT free base have long been a source of interest and discussion, especially when considering that these values encountered in the scientific literature range dramatically between 38–40 °C and 73–74 °C, respectively. Such variations in reported melting points suggest that DMT may exist in two or more polymorphic forms and it was the aim of this study to examine the potential polymorphism of DMT via X-ray powder diffraction (XRPD) and differential scanning calorimetry (DSC), including fast scan DSC. DMT samples were prepared following extraction from *Mimosa tenuiflora* inner barks or by laboratory synthesis and then its crystals were recrystallized from solutions of the alkaloid using either hexane or acetonitrile. Irrespective of source, crystals originating from synthesis were predominantly white crystals obtained using crystallization from hexane, whereas yellow samples following recrystallization with acetonitrile. Irrespective of source or solvent, two polymorphs appeared to exist with melting points, determined by DSC, of 57 °C to 58 °C for Form I and 45 °C to 46 °C for Form II. Estimates for their enthalpies were $91.9 \pm 2.4 \text{ J g}^{-1}$ for Form I and $98.3 \pm 2.8 \text{ J g}^{-1}$ for Form II. Form II converted to Form I during DSC; conversion was thus prevented by fast scanning rates of 100 °C min^{-1} . A transition temperature (T_g) in the range -21 °C (2 °C min^{-1}) to -13 °C (100 °C min^{-1}) was determined depending on DSC scanning rate. Its closeness to the melting point indicates a tendency of Form II to convert to Form I on storage, a phenomenon that was also facilitated by grinding. This study indicates that the presence of differently colored DMT free base crystals obtained from recrystallization might also point towards the existence of polymorphs rather than just the presence of impurities.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The widespread interest in *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) stems from its powerful psychoactive properties observed in humans and, for this reason, is frequently referred to as a psychedelic/hallucinogenic substance [1,2]. It is therefore not surprising that investigations into its (psycho-)pharmacological profile have been long carried out in order to elucidate the mechanisms involved in the changes of thought, perception, mood and cognition brought about by this simple indole alkaloid [3–6]. Although the synthesis of DMT was reported in 1931 [7], first observations regarding its psychoactive properties started to surface in the literature in the 1950s [8].

The need for chemical and analytical investigations associated with DMT [9,10] arises from several areas of inquiry which include the

presence of DMT and related derivatives in psychoactive beverages used for religious and recreational purposes [11,12], its abundant presence in the plant kingdom [13], and the long-standing interest in DMT and other *N,N*-dimethylated analogs as naturally-occurring substances in humans [14]. In addition, a forensic perspective develops from the fact that DMT is a controlled substance which makes it an attractive target for clandestine synthesis and impurity profiling studies [15–17]. A simple but important feature of each chemical entity is the determination of melting points. However, as far as the availability of these data on DMT is concerned it was interesting to notice that the melting points reported for DMT free base ranged dramatically, i.e. between 38–40 °C [18] and 73–74 °C [19], respectively.

Such variations in reported melting points suggest that DMT may exist in two or more polymorphic forms. Generally, multiple crystal forms with different solid state properties can exhibit differences in bio-availability of the active drug substance [20]. Resolution of these polymorphs can be made by a combination of experimental techniques, in

* Corresponding author. Tel.: +44 151 231 2184; fax: +44 151 231 2170.
E-mail address: s.brandt@ljmu.ac.uk (S.D. Brandt).

this case X-ray powder diffraction (XRPD) and differential scanning calorimetry (DSC) [21,22]. Fast Scan DSC, where scanning rates up to $500\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ have been used, is a recently developed sub-technique of DSC [23] which has been used in the assessment of polymorphs that convert during analysis at conventional heating rates. Examples of drugs thus studied included carbamazepine [24] and sulfathiazole [25].

XRPD is a powerful tool in identifying different crystal phases and the position of diffraction peaks and the d-spacings that they represent provide information about the location of lattice planes in the crystal structure [26]. Each peak measures a d-spacing that represents a family of lattice planes and shifts in peak position or small changes in XRPD patterns can identify different hydrates of the same compound or the presence of additional polymorphic forms [27]. The aim of this study was to examine further the potential polymorphism of DMT via XRPD and DSC, including fast scan DSC, in an attempt to resolve the discrepancies in the melting points described in the literature and to assess the potential of the drug to form amorphous or waxy solids. The present investigation follows on from a previous report on an optimized isolation of DMT as reference material from *Mimosa tenuiflora* inner barks [28].

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used were from Aldrich (Dorset, UK) and were of analytical grade or equivalent. *N,N*-Dimethyltryptamine (DMT) free base samples were obtained both from organic synthesis and isolation from *M. tenuiflora* inner barks as reported previously [15,28].

2.2. Sample preparation procedures

DMT samples were obtained by recrystallization of the crude alkaloid in hexane. The free base substance was dissolved in hexane at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ to give a concentration of 30 g L^{-1} . After cooling to room temperature, the solutions were placed in a freezer at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for two days. Following crystallization, the mother solution was subsequently removed by filtration from the precipitated material. The pure DMT was dried gently under a stream of nitrogen, and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The free base products were dissolved at room temperature using minimal amounts of either hexane or acetonitrile until further dissolution was not observable. The solvent of each solution was evaporated at room temperatures under a gentle stream of nitrogen, giving samples W1, W2, Y1 and Y2. DMT samples W1 and W2 were predominantly white crystals obtained using crystallization from hexane; whereas yellow DMT samples Y1 and Y2 were obtained following crystallization with acetonitrile. Samples W1 and Y1 were crystallized from DMT prepared by organic synthesis, while samples W2 and Y2 were from DMT isolated from the bark of *M. tenuiflora*. Crystals were used without further treatment for DSC and XRPD except where samples of the four products were ground to determine the effect of grinding on their physical nature. Grinding of DMT samples was undertaken manually using an agate mortar and pestle performed using two different grinding intensities; i) brief crush and light grind and ii) a sixty second, more intensive, grind.

2.3. Instrumentation and experimental

2.3.1. Differential scanning calorimetry (DSC)

A PerkinElmer DSC 8000 with Intracooler 2 cooling accessory and Pyris v. 10.1.0.0420 software were used (Seer Green, UK). The furnace temperature was calibrated using the Perkin Elmer supplied standard reference materials indium (m.p. = $156.60\text{ }^{\circ}\text{C}$) and zinc (m.p. =

$419.47\text{ }^{\circ}\text{C}$). Enthalpies of transition were calibrated with indium with a heat of fusion $\Delta H_f = 28.45\text{ J g}^{-1}$.

The sample size used was around 2–4 mg accurately weighed in crimped, standard aluminum pans. All samples were cooled to $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, held isothermally for 1 min before heating at 2, 10, 20, 50 or $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ at which the temperature set points were held isothermally for 1 min. The cool–reheat cycle was then repeated following cooling from $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and again, samples were held isothermally at this temperature before subsequent reheating to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ using the same temperature heating rate described above. In addition, untreated samples (W1 and W2 only) were heated at $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, held isothermally at this temperature for 20 min prior to cooling to $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were then cooled to $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, held isothermally for 1 min and re-scanned from $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Extrapolated onset temperatures were used as the melting point (m.p.) of the samples. Glass transition temperatures were calculated from the point on heat flow curves where the specific heat change was half of the change in the complete transition [21]. The DMT samples were also analyzed at the fast scan heating rate ($100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) following grinding.

2.3.2. X-ray powder diffraction (XRPD)

XRPD patterns were collected using a Rigaku Miniflex X-ray diffractometer (Osaka, Japan) calibrated using a silica standard plate. The patterns were obtained using $\text{Cu K}\alpha$ (1.54 \AA) radiation, a voltage of 30 kV, and a current of 15 mA. Samples were prepared in 0.5 mm diameter zero background sample holders and analyzed between 3 and $60^{\circ}2\theta$, with step increments of $0.02^{\circ}2\theta$ and scanning speed of $2^{\circ}2\theta\text{ min}^{-1}$.

3. Results and discussion

Previous work on the isolation of DMT from *M. tenuiflora* inner barks was guided by its history of use in humans [29,30] and the need for reference material used for analytical determinations [28]. The present study employed fast scan DSC and XRPD to the characterization of DMT free base and aimed to assess the potential of the drug to form polymorphs and/or amorphous or waxy solids. Published melting points of DMT free base and their morphological variations are summarized in Table 1. The wide range observed from these data, and the lack of more detailed investigations, led to the consideration of potential polymorphism. The lowest melting point encountered was described by Whitney et al. who, following its preparation, described it as a pale amorphous solid that melted at $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ [18]. At the other end of the spectrum was the report provided by Fish et al. that noted a melting point of $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $49\text{ }^{\circ}\text{C}$ following its synthesis and recrystallization from hexane. Interestingly, the authors then mentioned a conversion of this sample to a form with a higher melting point ($71\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $73\text{ }^{\circ}\text{C}$), also by recrystallization from hexane, by seeding with an authentic sample with a melting point of $73\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $74\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. More details about this conversion, however, were not reported [19]. Another study on the isolation of DMT from *Acacia maidenii* F. Muell. provided another example of the conversion of melting point values by seeding. In this case, the first melting point obtained after recrystallization from hexane was $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $47\text{ }^{\circ}\text{C}$, and when the solution was seeded with an authentic sample ($56\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $58.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), the corresponding melting point reported then was $57.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $58.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ instead [31].

Following the implementation of liquid–liquid extraction using 60 g of powdered inner bark of *M. tenuiflora*, 421.4 mg of crude alkaloids (0.7% yield) was obtained from a concentrated hexane layer at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [28]. The majority of crystal material was white in color but spots of yellow-colored crystals were also observed. In order to carry out a recrystallization from hexane the total amount of crude alkaloids was re-dissolved in 10 mL of warm hexane ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) which led to the formation of two distinctly colored layers. During analytical characterization (data not shown) it was found that both layers

Table 1

Melting points reported in the literature for DMT free base.

Melting point [°C]	(Re)crystallization solvent ^a	Comment	Reference
38–40	–	Pale amorphous solid	Whitney et al. [18]
39–44	–	White solid	Grina et al. [32]
44	Petroleum ether	–	Rovelli and Vaughan [33]
44–45	–	–	Sintas and Vitale [34]
44.6–46.8 ^b	–	–	Hochstein and Paradies [35]
45	Hexane	–	Julia et al. [36]
45.5–46.8	Methanol	–	Meckes-Lozoya et al. [38]
45.8–46.8	Xylene	Fine needle-shaped crystals	Gonçalves de Lima [29]
45–47	–	Yellowish crystals	Wisconsin Alumni Research Foundation et al. [39]
45–49	–	–	Hall et al. [40]
45–47	–	Colorless crystals	Häfelinger et al. [41]
45–47	Hexane	Crystalline/colorless	Wenkert and Kryger [42]
46	Ethanol/petroleum ether	Plates	Fleming and Woolias [43]
45	Petroleum ether	–	Culvenor et al. [37]
46–47 ^c	Hexane	–	Fitzgerald and Sioumis [31]
47	–	–	Ghosal and Mukherjee [44]
47	–	Very fine ill-defined needles	Manske [7]
47	–	Off-white solid	Shulgin and Shulgin [2]
47–48	–	–	Heinzelman and Szmuszkovicz [45]
47–49 ^d	Hexane	–	Fish et al. [19]
48–49	Hexane	Colorless prisms	Ueno et al. [46]
48.5–49	Petroleum ether	Colorless needles	Ueno et al. [46]
48–49	Ethyl acetate/petroleum ether	–	Bodendorf and Walk [47]
48–49	Hexane/ethyl acetate	–	Pachter et al. [48]
48–49	–	–	Boit [49]
49	Petroleum ether	Colorless prisms	Morimoto and Matsumoto [50]
49	Petroleum ether	Colorless prisms	Morimoto and Oshio [51]
49–50	–	White, pungent-smelling crystalline solid	Shulgin [52]
49–50	Diethyl ether/petroleum ether	Colorless needles	Hoshino and Shimodaira [53]
53.5–57.5	Hexane	–	Arthur et al. [54]
55.5	Hexane	White crystals	Gaujac et al. [28]
57	Hexane ^d	–	Poisson [55]
57	Hexane	–	Kan-Fan et al. [56]
57.5–58.5 ^c	Hexane	–	Fitzgerald and Sioumis [31]
57–59	–	Crystalline solid	Shulgin and Shulgin [2]
58.2	–	Transparent acicular	Bergin et al. [57]
64	Hexane/ethyl acetate (80:20)	White crystals	Moura et al. [58]
65.5	–	Transparent colorless hexagonal prisms	Falkenberg [59]
67	Hexane	White crystals	Shulgin and Shulgin [2]
67–68	Hexane	–	Shulgin and Shulgin [2]
71–73 ^e	Hexane	–	Fish et al. [19]

^a In cases where (re)crystallization solvents were not explicitly mentioned, melting points were obtained from the solid free base following evaporation of a solvent during work-up or following distillation of the crude product.

^b Melting obtained from a second distillation. The first distillation yielded an oil that crystallized with a melting point of 44 °C–46 °C.

^c DMT free base, isolated by column chromatography, was crystallized from hexane and yielded a m.p. of 46 °C–47 °C. It was then reported that a solution seeded with an authentic sample of DMT (m.p. 58 °C–58.5 °C) gave a m.p. of 57.5 °C–58 °C which was not depressed on mixing.

^d Crystallization in hexane followed by sublimation.

^e Recrystallization from hexane resulted in a product that melted at 47 °C–49 °C. The authors stated that this material was then converted to a “higher melting form (71 °C–73 °C) by crystallization from hexane after seeding with an authentic specimen of m.p. 73 °C–74 °C”. Further details were not provided.

contained DMT where the bottom layer (yellow in color and minor in abundance with regards to volume) represented an amorphous, high density, and viscous form of pure DMT. The top transparent layer consisted of DMT dissolved in hexane. The transparent layer was removed and stored at –18 °C which led to the formation of white DMT crystals (181.0 mg, 0.3% yield). Storage of the yellow layer in the fridge at 5 °C produced a yellow amorphous solid which was not investigated further.

The effect of heating rates on the DSC heating scans of W1, W2, Y1 and Y2 are shown in Figs. 1–4. It is clear from cursive examination of these figures *in toto* that, at various heating rates, two endotherms were apparent which would correspond to two polymorphic forms of DMT. Increase in scanning rate increases the apparent size of endotherms or exotherms since DSC measures heat flow as a function of time and makes more apparent any change in heat flow. The heat flow will increase with increase in heating rate [60]. Adapting conventionally used classification, the higher melting polymorph was deemed Form I whereas the lower melting polymorph was termed Form II. Again, the scans corresponding to reheats all displayed a glass transition indicating the ability of DMT to form an amorphous

state. Tables 2 to 5 give the melting points and thermodynamic data of W1, W2, Y1 and Y2, respectively.

One of the advantages of fast scan DSC was that the fast rates prevent transformation of a sample during the heating process which provides a scan more representative of the original material [23]. Fig. 1 shows the DSC of sample W1 that was recrystallized using hexane from DMT prepared by organic synthesis. Taking DSC scans from sample W1 at 100 °C min⁻¹ as a starting point (Fig. 1a), it can be seen that there were two melting endotherms present with onset temperatures of 47.5 °C and 58.3 °C for Form II and Form I, respectively. At 50 °C min⁻¹ sample W1 (Fig. 1b) again displayed two endotherms, in this case with an exotherm positioned between them indicating that when Form II melted, some recrystallization occurred into Form I prior to the melting of Form I. As the heating rates were further decreased (Fig. 1c and d), this recrystallization became more obvious, and indeed at 2 °C min⁻¹, there was less evidence of the melting of Form II which indicated that conversion to Form I occurred during the scanning of the samples (Fig. 1e). Fast-Scan DSC allowed melting of the metastable polymorph to be separated from any subsequent recrystallization because the later event was moved to a

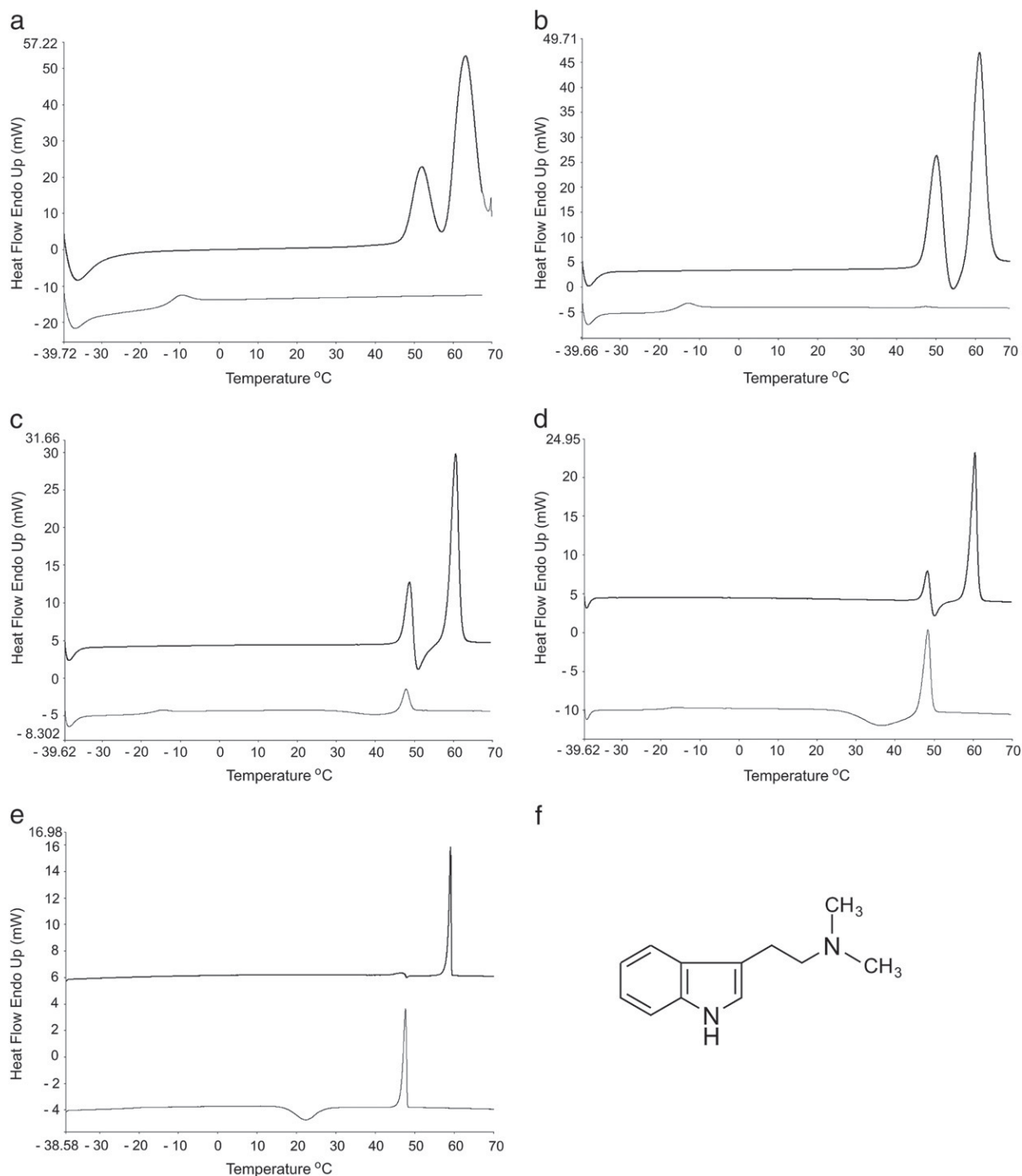


Fig. 1. DSC scans of sample W1 showing initial scan (upper) and re-scan (lower) curves obtained at a) $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ b) $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ c) $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ d) $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and e) $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$; f) structure of *N,N*-dimethyltryptamine (DMT).

temperature higher than the melting temperature, i.e. providing separation of the events. Ford and Mann [23] demonstrated the use of Fast-Scan DSC in characterizing the polymorphic transitions of nifedipine. Using glassy material, the drug exhibited a number of transition events in the range $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and transitions from Form III to Form II and hence to Form I were easily observed. At higher scanning rates, the ratio of Form II to Form I changed during recrystallization and the relative amount of Form I increased with increase in scan rate (up to $300\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) [23]. Further confirmation on the usefulness of Fast-Scan DSC was clearly demonstrated for carbamazepine which enabled the characterization

of lower melting polymorphs by preventing multiple external events due to overlapping recrystallization [24].

In DMT sample W1, the general increase in the heat of fusion corresponding to Form II as the heating rate was increased (Table 2) further confirmed that the untreated sample contained both polymorphic forms. Assuming that 100% conversion to Form I occurred at $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, an estimate for the enthalpy of fusion of Form I was made at $91.9 \pm 2.4\text{ J g}^{-1}$.

The re-scans show the glass transition temperatures (T_g) and are given in Table 2 with the $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ scan displaying only a glass transition and no subsequent recrystallization. The glass transition

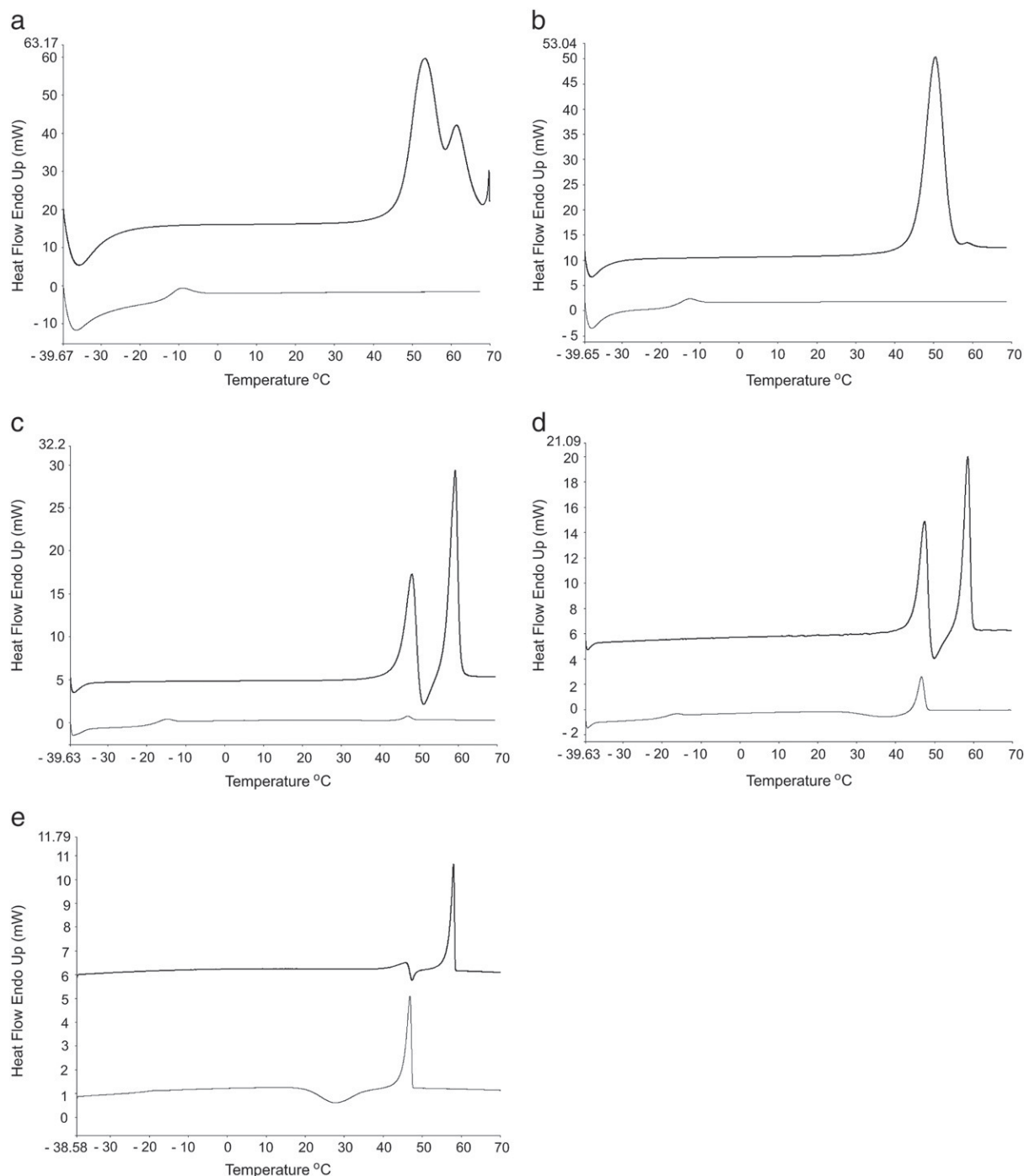


Fig. 2. DSC scans of sample W2 showing initial scan (upper) and re-scan (lower) curves obtained at a) 100 °C min^{-1} b) 50 °C min^{-1} c) 20 °C min^{-1} d) 10 °C min^{-1} and e) 2 °C min^{-1} .

represents the transformation from a glassy state to a rubbery state [61] and occurs at the T_g . Below this temperature the molecules are locked in position and relatively incapable of movement, whereas above the T_g , molecules are able to move and crystallization is favored. Decreasing heating rates showed an endotherm corresponding to the melting of Form II preceded by a recrystallization exotherm. This follows the expected thermodynamic theory that the less stable polymorph will crystallize from a melt on crystallization [62,63]. The recrystallization became more apparent as the heating rate decreased and concomitantly moved to lower temperatures. As expected the glass transition became less apparent with decreased

scanning rates as the measured heat flow into and away from samples is reduced at lower scanning rates [23]. Assuming that the exotherm corresponded to 100% conversion to Form II, an enthalpy of fusion for this polymorph was estimated at $98.3 \pm 2.8\text{ J g}^{-1}$.

Fig. 2 shows the DSC of sample W2 that was recrystallized using hexane from the *M. tenuiflora* plant extract. Comparison of the scans obtained at 100 °C min^{-1} , (Figs. 2a and 1a) indicated that DMT W2 contained proportionately more of Form II. Indeed, at 50 °C min^{-1} the sample displayed almost exclusively the melting of Form II (Fig. 2b) but its enthalpy of fusion was $73.5 \pm 0.5\text{ J g}^{-1}$ and indicated that there was some Form I in the sample. Scans at 20 °C , 10 °C and

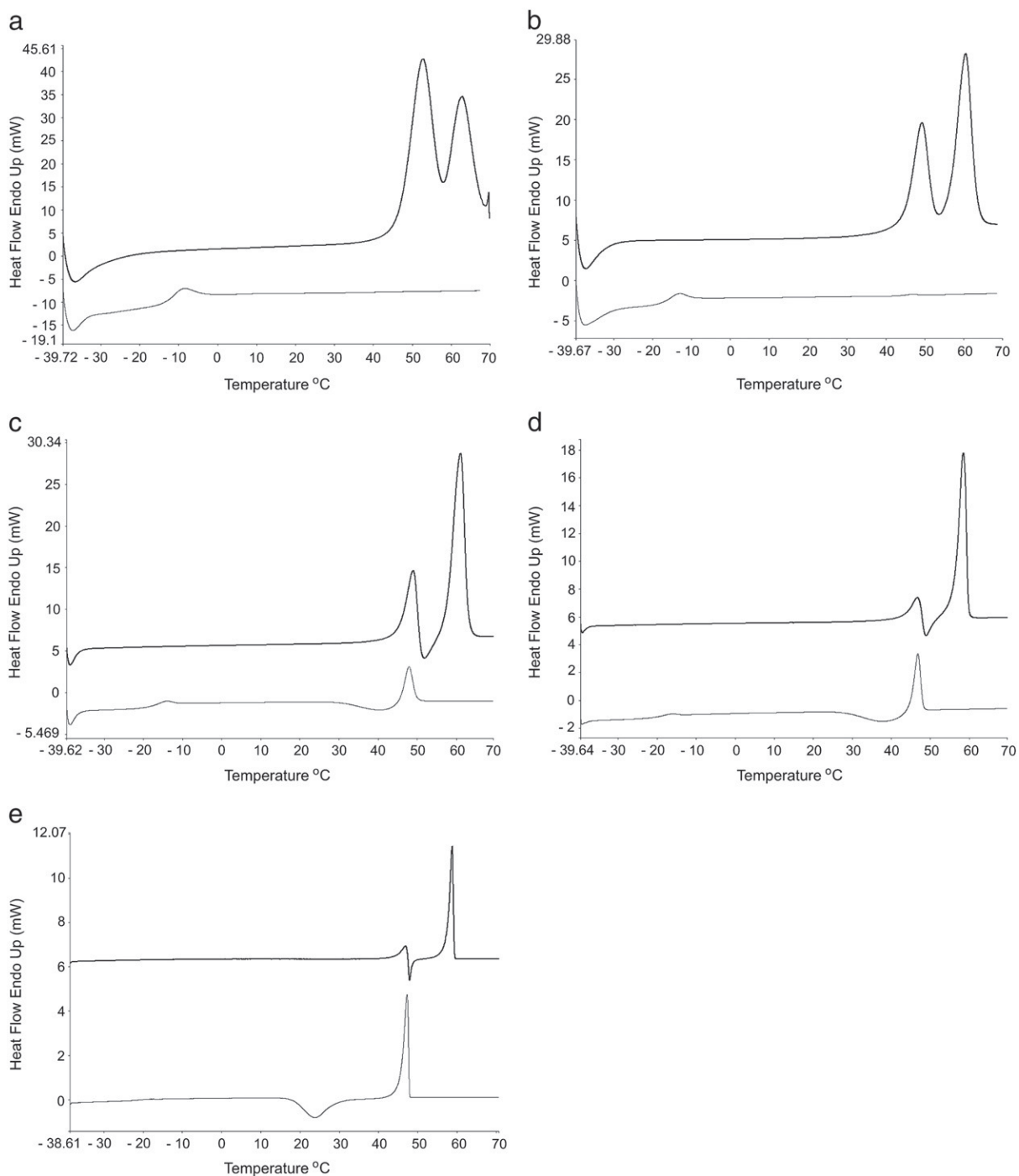


Fig. 3. DSC scans of sample Y1 showing initial scan (upper) and re-scan (lower) curves obtained at a) $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ b) $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ c) $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ d) $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and e) $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

$2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Fig. 2c, d and e) confirmed the prevalence of Form II in this sample compared with DMT W1 and that again it converted to Form I at the slower heating rates. The values of the enthalpies of fusion (see Tables 2 and 3 for comparison) confirmed the apparent higher ratio of Form II in sample W2. Estimates across the heating rates of the melting points of Form II and Form I in DMT W2 (Table 3) were $42.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $46.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $56.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $58.4\text{ }^{\circ}\text{C}$, values not dissimilar to those found for DMT W1 (Table 2).

The reheat curves for DMT W2 (Fig. 2) showed similar trends to DMT W1 except that the recrystallization exotherm was closer in position to the melting endotherm for Form II indicating that

recrystallization to Form II in DMT W2 was not as easily accomplished as in DMT W1. This is evidenced by the lower enthalpies of fusion in the reheated sample of DMT W2 (Table 3) compared to those of DMT W1 (Table 2). The reasons for the increased difficulty in recrystallization to Form II are not easily understood since the initial heat should destroy the thermal history of the sample. In summary, both samples DMT W1 and W2 were a mixture of polymorphic forms whose melting points reflected the melting points found in the literature while explaining the literature discrepancies because two forms had not previously been identified. In addition, the T_g values (Tables 2 and 3) accounted for the potential for amorphicity in DMT because

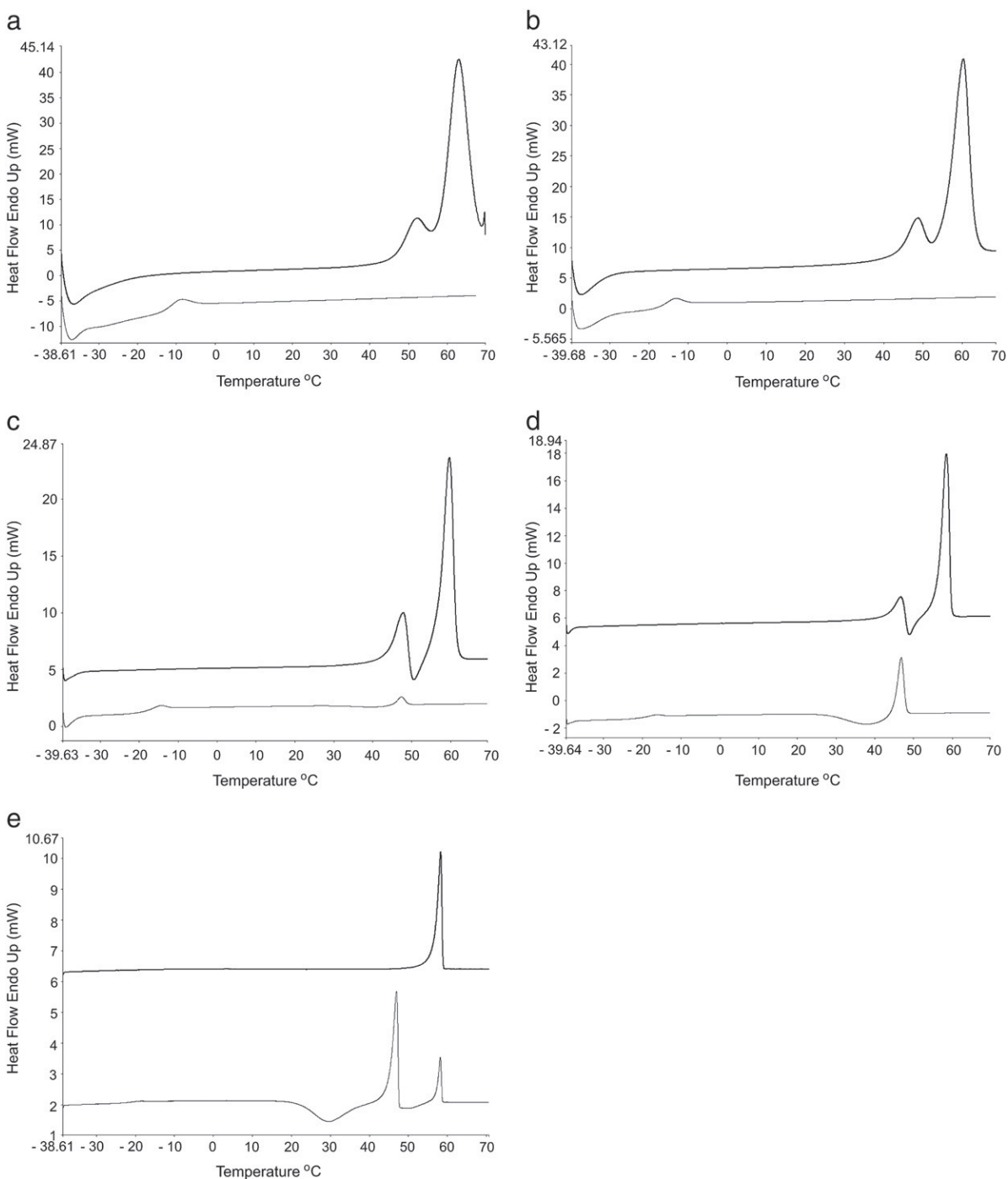


Fig. 4. DSC scans of sample Y2 showing initial scan (upper) and re-scan (lower) curves obtained at a) 100 °C min^{-1} b) 50 °C min^{-1} c) 20 °C min^{-1} d) 10 °C min^{-1} and e) 2 °C min^{-1} .

Table 2

Thermal data of DMT W1 obtained by DSC. [Key ($n = 3$) except where standard deviations are not given ($n = 1$), nt = no transition].

Heating rate ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Initial heating				Secondary heating				
	Form II		Form I		T_g ($^{\circ}\text{C}$)	Form II		Form I	
	Onset ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Onset ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})		Onset ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})	Onset ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_f (J g^{-1})
2	44.8 ± 0.1	10.0 ± 3.4	58.4 ± 0.1	91.9 ± 2.4	-21.8 ± 0.9	46.5 ± 0.1	98.3 ± 2.8	58.6	11.1
10	46.2 ± 0.1	26.1 ± 1.3	57.8 ± 0.1	86.8 ± 1.3	-19.2 ± 0.4	45.6 ± 0.1	51.8 ± 9.9	nt	nt
20	46.7 ± 0.1	23.0 ± 2.1	58.3 ± 0.1	85.2 ± 21.1	-18.5 ± 0.4	45.9 ± 0.1	12.1 ± 3.6	nt	nt
50	46.7 ± 0.3	42.5 ± 4.6	57.7 ± 0.1	57.9 ± 7.0	-16.7 ± 0.1	nt	nt	nt	nt
100	47.5	29.2	58.3	76.1	-13.0	nt	nt	nt	nt

Table 3Thermal data of DMT W2 obtained by DSC. [Key ($n = 3$) except where standard deviations are not given ($n = 1$), nt = no transition].

Heating rate (°C min ⁻¹)	Initial heating				Secondary heating				
	Form II		Form I		T _g (°C)	Form II		Form I	
	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)		Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)
2	42.8 ± 2.0	18.0 ± 6.0	57.3 ± 0.6	83.8 ± 0.7	-21.5	46.5 ± 0.1	98.3 ± 2.8	45.1	87.7
10	44.5 ± 0.3	43.8 ± 6.7	56.1 ± 0.4	64.1 ± 6.7	-20.0 ± 0.3	44.6 ± 0.0	10.9 ± 3.7	nt	nt
20	45.2 ± 0.4	58.4 ± 17.9	56.8 ± 0.4	42.1 ± 15.6	-18.5 ± 0.3	45.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	nt	nt
50	45.3 ± 0.2	73.5 ± 0.5	57.1 ± 0.3	0.5 ± 0.4	-16.3 ± 0.4	nt	nt	nt	nt
100	46.9	83.4	58.4	24.9	-12.8	nt	nt	nt	nt

Table 4Thermal data of DMT Y1 obtained by DSC. [Key ($n = 1$), nt = no transition].

Heating rate (°C min ⁻¹)	Initial heating				Secondary heating				
	Form II		Form I		T _g (°C)	Form II		Form I	
	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)		Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)
2	44.8	32.3	58.8	79.5	-20.8	45.6	92.1	nt	nt
10	44.9	29.9	56.9	79.7	-18.8	44.9	39.6	nt	nt
20	45.1	32.5	57.5	69.4	-17.8	45.4	12.1	nt	nt
50	45.0	22.8	56.4	38.4	-16.5	nt	nt	nt	nt
100	47.2	39.3	58.8	23.6	-12.0	nt	nt	nt	nt

Table 5Thermal data of DMT Y1 obtained by DSC. [Key ($n = 1$), nt = no transition].

Heating rate (°C min ⁻¹)	Initial heating				Secondary heating				
	Form II		Form I		T _g (°C)	Form II		Form I	
	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)		Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)	Onset (°C)	ΔH _f (J g ⁻¹)
2	nt	nt	56.8	59.5	-20.6	45.0	92.7	57.1	21.7
10	43.8	15.8	56.5	69.8	-19.5	44.8	24.3	nt	nt
20	44.1	19.9	56.5	71.8	-17.5	45.2	2.1	nt	nt
50	44.3	7.1	55.6	50.4	-16.4	nt	nt	nt	nt
100	47.9	5.7	58.5	49.0	-12.4	nt	nt	nt	nt

of the closeness of the T_g to ambient temperatures. This also will explain the difficulty in obtaining a sample consisting of either pure Form I or pure Form II.

One attempt to obtain pure Form 1 was by heating the untreated samples to 45 °C and holding the samples at this temperature for 20 min to allow conversion of the Form II in the sample to Form I, prior to cooling and then re-scanning at 2 °C min⁻¹. Fig. 5 displays that this approach indeed worked and it was estimated that the

heats of enthalpy for Form I obtained from DMT W1 and W2 were 93.4 and 86.8 J g⁻¹, respectively. Again there is the probability of amorphousness remaining in the sample following the isothermal hold.

Table 6Summary of XRPD data for major peaks from DMT sample W1.^a

Peak	2theta	FWHM	d-Value	Intensity	I/I ₀
1 ^b	7.60	0.200	11.6223	793	70
2	9.04	0.212	9.7739	800	71
3	12.05	0.271	7.3384	402	36
4	12.86	0.259	6.8779	596	53
5	14.52	0.153	6.0951	254	23
6 ^b	15.22	0.235	5.8163	1138	100
7	17.73	0.188	4.9982	723	64
8	18.17	0.259	4.8781	1023	90
9 ^b	19.20	0.224	4.6187	690	61
10 ^b	19.57	0.200	4.5322	489	43
11	19.90	0.176	4.4578	501	44
12	20.41	0.106	4.3475	320	29
13	20.54	0.235	4.3203	349	31
14	21.44	0.200	4.1409	254	23
15	22.35	0.271	3.9744	468	42
16	22.85	0.188	3.8885	486	43
17	23.19	0.259	3.8323	295	26
18	24.56	0.118	3.6215	263	24
19	25.42	0.224	3.5009	391	35
20	26.29	0.200	3.387	250	22
21	27.30	0.247	3.2639	481	43
22	30.65	0.376	2.9144	240	22

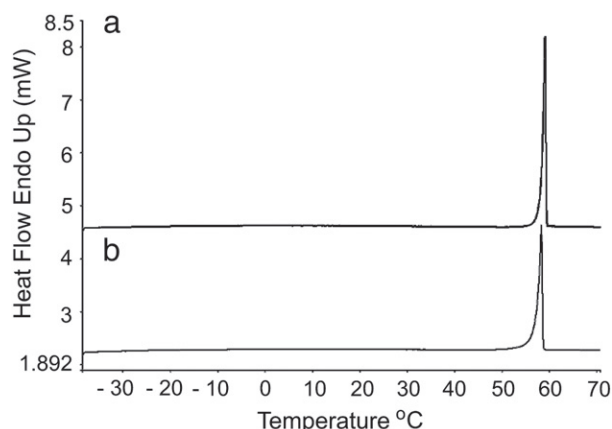
^{a,b}: major peaks attributed to polymorphic Form II.**Fig. 5.** DSC scans of samples W1 (a) and W2 (b) showing curves obtained at 2 °C min⁻¹ after heat treatment at 45 °C.

Table 7Summary of XRPD data for major peaks from DMT sample W2.^a

Peak no.	2theta	FWHM	d-Value	Intensity	I/I ₀
1 ^b	7.56	0.141	11.6837	2827	60
2	8.96	0.176	9.861	567	12
3	11.97	0.153	7.3873	1002	22
4	12.77	0.153	6.9262	981	21
5 ^b	15.17	0.153	5.8354	4737	100
6	17.68	0.106	5.0122	383	9
7	18.07	0.176	4.9049	811	18
8	18.17	0.059	4.8781	576	13
9 ^b	19.75	0.071	4.4913	311	7
10	19.83	0.118	4.4734	319	7
11	22.29	0.118	3.9849	284	6
12	22.84	0.176	3.8902	483	11
13	24.09	0.200	3.6911	407	9
14	27.22	0.071	3.2733	302	7
15	30.68	0.129	2.9116	274	6

^{a,b}: major peaks attributed to polymorphic Form II.

The two additional samples of DMT, crystallized from acetonitrile, were subjected to similar experimental conditions and studied. Macroscopically and microscopically, DMT Y1 and DMT Y2 were both yellow and appeared denser and less crystalline when using optical microscopy. DMT Y1 behaved similarly to DMT Y2 under DSC analysis conditions. Fig. 3a shows a preponderance of Form II in sample DMT Y1 as demonstrated for the heating rate of 100 °C min⁻¹. As the rates decreased the amount of unconverted Form II decreased (Fig. 3b–e). However the measured heats of fusion, with the exception of one sample, were consistently less for DMT Y1 (Table 4) than DMT W1 (Table 2) or DMT W2 (Table 3) and this confirmed the apparent increased amorphicity of this sample. Estimates across the heating rates (Table 4) of the melting points of Form II and Form I in DMT Y1 were 44.8 °C to 47.2 °C and 56.4 °C to 58.8 °C, respectively. The DSC re-scans of DMT Y1 (Fig. 3a–e) were similar to those of DMT W2 (Fig. 2a–e).

Table 8Summary of XRPD data for major peaks from DMT sample Y1.^a

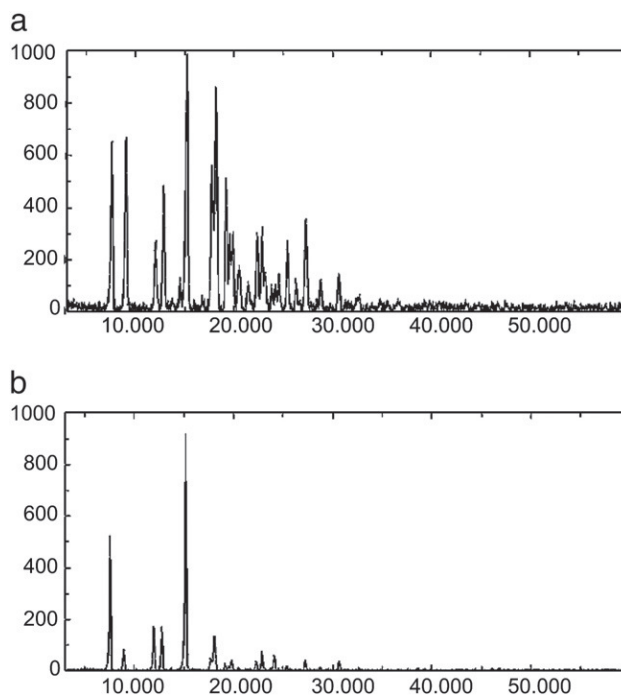
Peak no.	2theta	FWHM	d-Value	Intensity	I/I ₀
1 ^b	7.59	0.200	11.6376	1067	52
2	9.01	0.200	9.8064	1666	81
3	12.00	0.200	7.3689	1394	68
4	12.80	0.235	6.9100	1443	70
5	14.49	0.176	6.1077	241	12
6 ^b	15.21	0.200	5.8201	1593	77
7	16.78	0.282	5.279	258	13
8	17.69	0.212	5.0094	795	39
9	18.10	0.235	4.8968	2078	100
10 ^b	19.18	0.212	4.6235	1390	67
11 ^b	19.55	0.200	4.5368	854	42
12	19.84	0.176	4.4711	683	33
13	20.45	0.212	4.3391	453	22
14	20.62	0.200	4.3037	373	18
15	21.43	0.235	4.1429	301	15
16	21.75	0.165	4.0826	276	14
17	22.31	0.247	3.9814	698	34
18	22.84	0.224	3.8902	419	21
19	23.14	0.188	3.8404	361	18
20	23.77	0.188	3.7400	294	15
21	24.14	0.247	3.6836	649	32
22	24.57	0.200	3.6201	262	13
23	25.38	0.247	3.5063	429	21
24	26.26	0.247	3.3908	325	16
25	26.63	0.165	3.3445	219	11
26	27.26	0.224	3.2686	827	40
27	27.81	0.176	3.2052	209	11
28	28.78	0.188	3.0994	266	13
29	30.60	0.341	2.9190	248	12
30	32.65	0.165	2.7403	212	11

^{a,b}: major peaks attributed to polymorphic Form II.**Table 9**

Summary of XRPD data for major peaks from DMT sample Y2.

Peak no.	2theta	FWHM	d-Value	Intensity	I/I ₀
1	9.02	0.200	9.7956	3418	32
2	12.02	0.200	7.3566	10,834	100
3	12.83	0.212	6.8940	8726	81
4	13.58	0.176	6.5149	325	3
5	15.03	0.212	5.8894	2277	22
6	17.71	0.188	5.0038	920	9
7	18.11	0.224	4.8942	5178	48
8	19.84	0.224	4.4711	887	9
9	20.52	0.165	4.3245	268	3
10	21.75	0.200	4.0826	449	5
11	22.30	0.212	3.9832	659	7
12	22.79	0.200	3.8986	427	4
13	23.82	0.153	3.7323	457	5
14	24.16	0.235	3.6805	4384	41
15	25.39	0.200	3.5050	600	6
16	25.72	0.235	3.4607	262	3
17	27.27	0.224	3.2675	1265	12
18	27.78	0.235	3.2086	269	3
19	28.79	0.259	3.0983	306	3
20	30.57	0.200	2.9218	289	3
21	32.65	0.271	2.7403	262	3
22	36.68	0.341	2.4479	261	3
23	41.11	0.282	2.1938	262	3

In comparison to the other three samples, DMT Y2 displayed an increased prevalence of Form I in the sample (Fig. 4a) at 100 °C min⁻¹. Indeed, at 2 °C min⁻¹ there was little evidence for any melting or conversion from Form II to Form I (Table 5) during heating. The enthalpies of fusion (Table 5) of the initial heats were less than the other samples and confirmed that DMT Y2 initially was the most amorphous of the samples and contained the highest level of Form I of DMT. For DMT Y2 the melting ranges of Form II and Form I were 43.8 °C to 47.9 °C and 55.6 °C to 58.5 °C, respectively. The DSC re-scans (Fig. 4a–e) were once again similar to the other rescans with the exception of that obtained at 2 °C min⁻¹ which displayed evidence for the melting of both Form II (seen in all other samples at 20°, 10° and 2 °C min⁻¹) and Form I which melted after some recrystallization. This

**Fig. 6.** XRPD patterns from DMT samples W1 (a) and W2 (b).

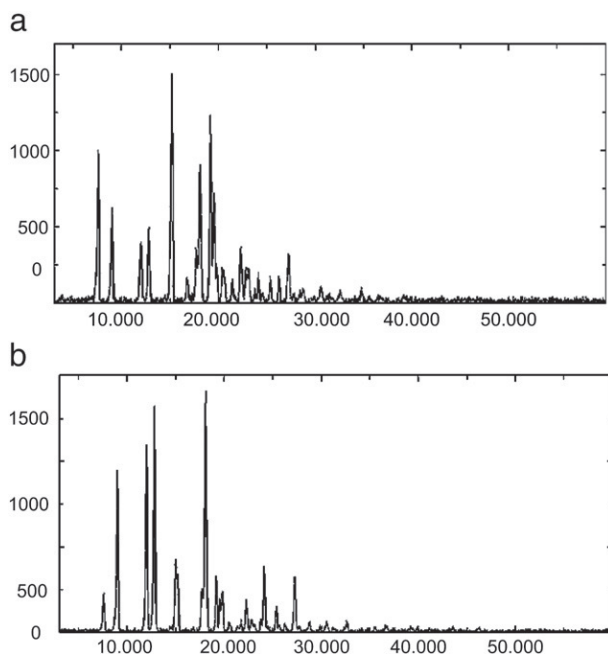


Fig. 7. XRPD patterns from DMT samples Y1 (a) and Y2 (b).

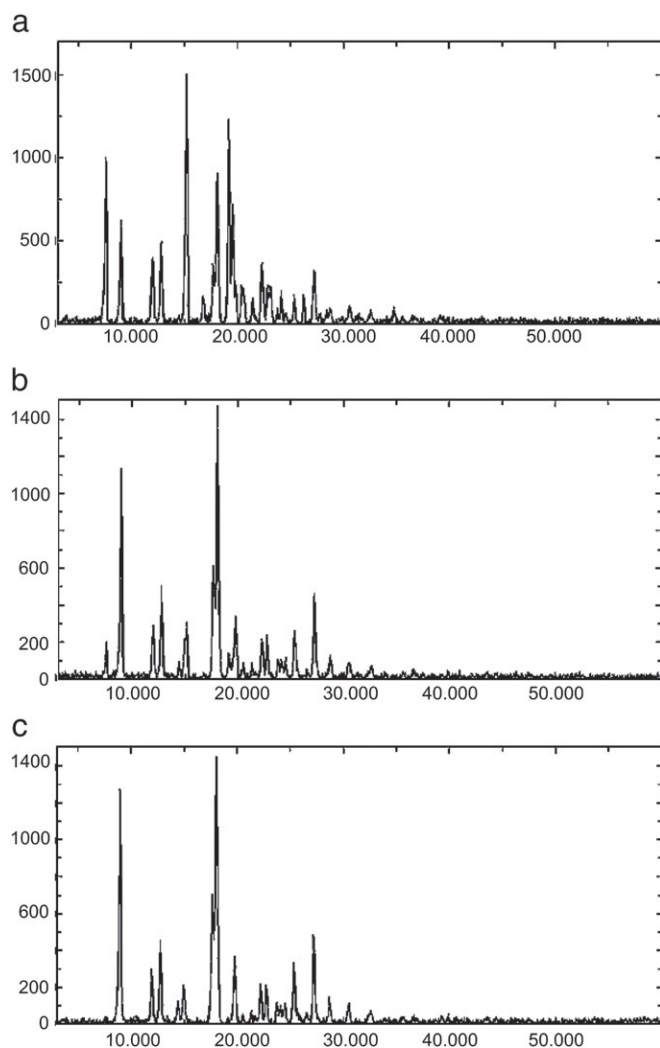


Fig. 8. XRPD patterns from DMT sample Y1 that were a) untreated b) lightly ground and c) more heavily ground.

probably equated to a conversion to Form I of ~18% given the value for the enthalpy of this event (21.7 J g^{-1}).

This raises interesting insight into the cause of yellowness in the two samples DMT Y1 and DMT Y2. There are the possibilities that the yellow color is caused either by the solvent used during recrystallization (hexane or acetonitrile) or by the presence of amorphousness in the sample. In an attempt to rule out solvent effects, and assuming that they were not lost from the enclosed DSC aluminum pans during heating, the effect of heating rate on the observed T_g values is shown in Tables 2 to 5. The apparent value of the T_g generally did increase with increase in heating rate, a phenomenon recognized for other glassy materials

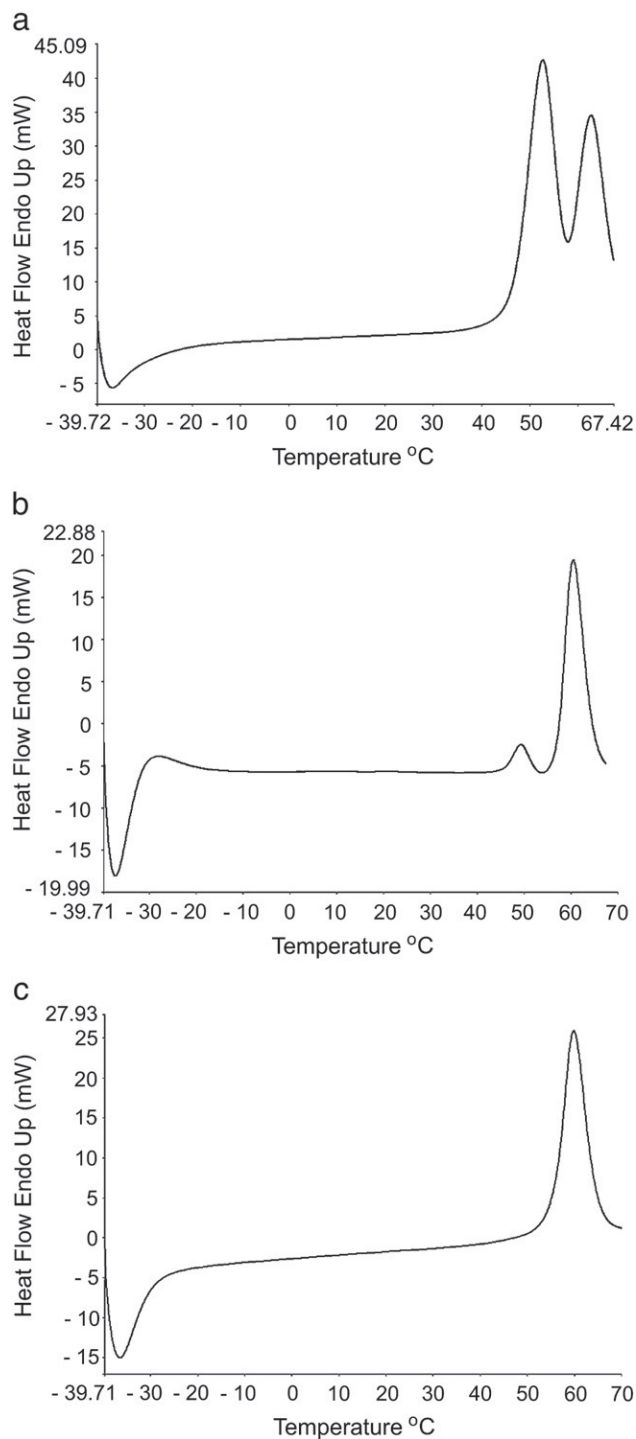


Fig. 9. DSC scans of sample Y1 from a) untreated b) lightly ground and c) more heavily ground material obtained at $100 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

[64] but the similarities in their values for the four samples at a given heating rate seemed to preclude the presence of a second impurity in the sample that promotes the color. The data thus suggest that this was solvent-mediated through increased amorphicity in the sample rather than a specific solvent–DMT interaction.

The XRPD data obtained from analysis of diffraction peaks from DMT samples W1, W2, Y1 and Y2 are provided in Tables 6–9, respectively. XRPD spectra obtained from DMT samples W1 and W2 are shown in Fig. 6, while those from DMT samples Y1 and Y2 are presented in Fig. 7. The XRPD pattern obtained from sample DMT Y2 exhibited fewer peaks than observed in DMT W1 and Y1 and this pattern was attributed to a predominance of the Form I polymorph. This was confirmed following XRPD analysis of heat treated samples held at 45 °C and determined to consist of Form I by DSC (Fig. 5). Peaks attributed to Form II were then identified and d-values assigned to prominent peaks characteristic of the two polymorphic forms determined in the mixed samples (Tables 6–9). The XRPD data from DMT W2 indicated that Form II was more prevalent in this sample while DMT W1 and Y1 presented as more equal mixtures of the polymorphs.

Sample preparations for XRPD analysis ideally include grinding of samples to decrease particle size and minimize preferential orientation of crystal lattices [26]. However, due to the low thermal stability of the Form II DMT polymorph, the incidental thermal energy introduced during mixing and grinding was found to alter the polymorph contents in the samples. This was verified by XRPD and fast scan DSC analysis (100 °C min⁻¹) of untreated samples and subsequent to light grinding and more heavily ground samples. A decrease in the content of the meta-stable Form II DMT polymorph was observed in all four DMT samples following grinding treatments; the extent of decrease was related to the degree of grinding. Typical XRPD and DSC spectra from grinding experiments are provided in Figs. 8 and 9 respectively, from analysis of sample DMT Y1 and demonstrate the reduction in Form II in lightly ground materials and the apparent absence of the meta-stable form following a heavier grind. Such data also confirm the apparent instability of the Form II of DMT.

4. Conclusion

The data provided in this paper have shown that DMT can be recrystallized from the solvents hexane and acetonitrile to give crystals that are a mixture of two polymorphs. The fact that two clearly exist explains the variation in melting points reported previously in the literature. It seems possible that use of the latter solvent gives crystals with a greater amorphousness and a yellow coloration. This solvent dependency was independent of the source of DMT, whether it was extracted from natural products or synthesized in the laboratory. The XRPD data correlated with the fast scan DSC data (Figs. 2–5a at 100 °C min⁻¹) and confirmed that all four samples studied contained at least two polymorphic forms of DMT with varying ratios of concentration, the proportion of which appears unrelated to sample color.

Acknowledgments

The authors wish to thank MCT/CNPq (process no. 620247/2008-8) and Pronex-FAPESB/CNPq (process no. 0015/2009) for financial support of this study. Dr. Timothy E. Mann (PETA Solutions) and Dr. Linda Seton (LJMU) are gratefully acknowledged for their helpful comments on the manuscript.

References

- [1] A. Hoffer, H. Osmond, The Hallucinogens, Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 1967.
- [2] A.T. Shulgin, A. Shulgin, TIHKAL: The Continuation, Transform Press, Berkeley, 1997.
- [3] R.J. Strassman, Human psychopharmacology of N, N-dimethyltryptamine, Behav. Brain Res. 73 (1996) 121–124.
- [4] J. Riba, S. Romero, E. Grasa, E. Mena, I. Carrio, M.J. Barbanoj, Increased frontal and paralytic activation following ayahuasca, the pan-amazonian inebriant, Psychopharmacology 186 (2006) 93–98.
- [5] D. Fontanilla, M. Johannessen, A.R. Hajipour, N.V. Cozzi, M.B. Jackson, A.E. Ruoho, The hallucinogen N, N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator, Science 323 (2009) 934–937.
- [6] N.V. Cozzi, A. Gopalakrishnan, L.L. Anderson, J.T. Feih, A.T. Shulgin, P.F. Daley, A.E. Ruoho, Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter, J. Neural Transm. 116 (2009) 1591–1599.
- [7] R.H.F. Manske, A synthesis of the methyltryptamine and some derivatives, Can. J. Res. 5 (1931) 592.
- [8] S. Szára, Dimethyltryptamin: its metabolism in man; the relation of its psychotic effect to the serotonin metabolism, Experientia 12 (1956) 441–442.
- [9] C.P.B. Martins, S. Freeman, J.F. Alder, T. Passie, S.D. Brandt, The profiling of psychoactive tryptamine drug synthesis focusing on mass spectrometry, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 285–296.
- [10] S.D. Brandt, C.P.B. Martins, Analytical methods for psychoactive N,N-dialkylated tryptamines, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 858–869.
- [11] D.J. McKenna, Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges, Pharmacol. Ther. 102 (2004) 111–129.
- [12] A. Gaujac, S. Navickiene, M.I. Collins, S.D. Brandt, J.B. de Andrade, Analytical techniques for the determination of tryptamines and β -carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices, Drug Test. Anal. 4 (2012) 636–648.
- [13] R.E. Schultes, A. Hofmann, The Botany and Chemistry of Hallucinogens, Charles C. Thomas, Springfield, 1980.
- [14] S.A. Barker, E.H. McIlhenny, R. Strassman, A critical review of reports of endogenous psychedelic N,N-dimethyltryptamines in humans: 1955–2010, Drug Test. Anal. 4 (2012) 617–635.
- [15] S.D. Brandt, S.A. Moore, S. Freeman, A.B. Kanu, Characterisation of the synthesis of N,N-dimethyltryptamine by reductive amination using gas chromatography ion trap mass spectrometry, Drug Test. Anal. 2 (2010) 330–338.
- [16] C.P.B. Martins, M.A. Awan, S. Freeman, T. Herraiz, J.F. Alder, S.D. Brandt, Fingerprint analysis of thermolytic decarboxylation of tryptophan to tryptamine catalyzed by natural oils, J. Chromatogr. A 1210 (2008) 115–120.
- [17] C.P.B. Martins, S. Freeman, J.F. Alder, S.D. Brandt, Characterisation of a proposed internet synthesis of N, N-dimethyltryptamine using liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6119–6123.
- [18] S. Whitney, R. Grigg, A. Derrick, A. Keep, [Cp*IrCl₂]₂-Catalyzed indirect functionalization of alcohols: novel strategies for the synthesis of substituted indoles, Org. Lett. 9 (2007) 3299–3302.
- [19] M.S. Fish, N.M. Johnson, E.C. Horning, t-Amine oxide rearrangements. N,N-Dimethyltryptamine oxide, J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 3668–3671.
- [20] D. Giron, Investigations of polymorphism and pseudo-polymorphism in pharmaceuticals by combined thermoanalytical techniques, J. Therm. Anal. Calorim. 64 (2001) 37–60.
- [21] J.L. Ford, P. Timmins, Pharmaceutical thermal analysis: techniques and applications, Halsted Press, Chichester, 1989.
- [22] D. Giron, Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates, Thermochim. Acta 248 (1995) 1–59.
- [23] J.L. Ford, T.E. Mann, Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection, Adv. Drug Delivery Rev. 64 (2012) 422–430.
- [24] C. McGregor, M.H. Saunders, G. Buckton, R.D. Saklatvala, The use of high-speed differential scanning calorimetry (Hyper-DSC™) to study the thermal properties of carbamazepine polymorphs, Thermochim. Acta 417 (2004) 231–237.
- [25] J.A. Zeitler, D.A. Newnham, P.F. Taday, T.L. Threlfall, R.W. Lancaster, R.W. Berg, C.J. Strachan, M. Pepper, K.C. Gordon, T. Rades, Characterization of temperature-induced phase transitions in five polymorphic forms of sulfathiazole by terahertz pulsed spectroscopy and differential scanning calorimetry, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 2486–2498.
- [26] R. Jenkins, R.L. Snyder, Introduction to X-ray Powder Diffractometry, Wiley-Interscience, New York, 1996.
- [27] L. Seton, D. Khamar, I.J. Bradshaw, G.A. Hutcheon, Solid state forms of theophylline: presenting a new anhydrous polymorph, Cryst. Growth Des. 10 (2010) 3879–3886.
- [28] A. Gaujac, S.T. Martinez, A.A. Gomes, S.J. de Andrade, A. da Cunha Pinto, J.M. David, S. Navickiene, J.B. de Andrade, Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks, Microchem. J. (in press), <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.033>.
- [29] O. Gonçalves de Lima, Observações sobre o “vinho da jurema” utilizado pelos índios Pancarú de Tacaratú (Pernambuco), Arq. Inst. Pesqui. Agron. Recife 4 (1946) 45–80.
- [30] R.S.O. de Souza, U.P. Albuquerque, J.M. Monteiro, L.C. de Amorim, Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology, Braz. Arch. Biol. Technol. 51 (2008) 931.
- [31] J.S. Fitzgerald, A.A. Sioumis, Alkaloids of the Australian Leguminosae. V. The occurrence of methylated tryptamines in *Acacia maidenii* F. Muell, Aust. J. Chem. 18 (1965) 433–434.
- [32] J.A. Grina, M.R. Ratcliff, F.R. Stermitz, Old and new alkaloids from *Zanthoxylum arborens*, J. Org. Chem. 47 (1982) 2648–2651.
- [33] B. Rovelli, G.N. Vaughan, Alkaloids of *Acacia*. I. N₆N₆-Dimethyltryptamine in *Acacia phlebophylla* F. Muell, Aust. J. Chem. 20 (1967) 1299–1300.
- [34] J.A. Sintas, A.A. Vitale, Synthesis of ¹³¹I derivatives of indolealkylamines for brain mapping, J. Label. Compd. Radiopharm. 39 (1997) 677–684.

- [35] F.A. Hochstein, A.M. Paradies, Alkaloids of *Banisteria caapi* and *Prestonia amazonicum*, J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 5735–5736.
- [36] M. Julia, J. Bagot, O. Siffert, Sur une nouvelle voie d'accès aux tryptamines, Bull. Soc. Chim. Fr. 4 (1973) 1424–1426.
- [37] C.C.J. Culvenor, R. Dal Bon, L.W. Smith, Occurrence of indolealkylamine alkaloids in *Phalaris tuberosa* and *arundinacea*, Aust. J. Chem. 17 (1964) 1301–1304.
- [38] M. Meckes-Lozoya, X. Lozoya, R.J. Marles, C. Soucy-Breau, A. Sen, J.T. Arnason, N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* bark (tepescohuite), Arch. Invest. Méd. (Méx) 21 (1990) 175–177.
- [39] Wisconsin Alumni Research Foundation, A.E. Ruoho, A.R. Hajjipour, U.B. Chu, D.A. Fontanilla, Sigma-1 Receptor Ligands and Methods of Use, WO2010059711 A1, 2010.
- [40] E.S. Hall, F. McCapra, A.I. Scott, Biogenetic-type synthesis of the calycanthaceous alkaloids, Tetrahedron 23 (1967) 4131–4141.
- [41] G. Häfelinger, M. Nimtz, V. Horstmann, T. Benz, Trifluoroacetylation of methylated derivatives of tryptamine and serotonin by different reagents. Synthesis, spectroscopic characterizations, and separations by capillary-gas-chromatography, Z. Naturforsch. B 54 (1999) 397–414.
- [42] E. Wenkert, A.C. Kryger, Oxytryptamines, J. Indian Chem. Soc. 55 (1978) 1122–1124.
- [43] I. Fleming, M. Woolias, A new synthesis of indoles particularly suitable for the synthesis of tryptamines and tryptamine itself, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (3) (1979) 829–837.
- [44] S. Ghosal, B. Mukherjee, Alkaloids of *Desmodium pulchellum* Benth. ex Baker, Chem. Ind. (1964) 1800.
- [45] R.V. Heinzelman, J. Szmuszkovicz, Recent studies in the field of indole compounds, Prog. Drug Res. 6 (1963) 75–150.
- [46] A. Ueno, Y. Ikeya, S. Fukushima, T. Noro, K. Morinaga, H. Kuwano, Studies on the constituents of *Desmodium caudatum* DC, Chem. Pharm. Bull. 26 (1978) 2411–2416.
- [47] K. Bodendorf, A. Walk, Darstellung und Reduktion von Indolyl-(3)-aminomethylketonen, Arch. Pharm. 294 (1961) 484–487.
- [48] I.J. Pachter, D.E. Zacharias, O. Ribeiro, Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina*, and *Mimosa hostilis*, J. Org. Chem. 24 (1959) 1285–1287.
- [49] H.G. Boit, Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960 unter Berücksichtigung der Fortschritte seit 1950, Akademie-Verlag, Berlin, 1961.
- [50] H. Morimoto, N. Matsumoto, Über Alkaloide, VI. Inhaltsstoffe von *Lespedeza bicolor* var. *japonica*, II, Justus Liebigs Ann. Chem. 692 (1966) 194–199.
- [51] H. Morimoto, H. Oshio, Über Alkaloide, V. Inhaltsstoffe von *Lespedeza bicolor* var. *japonica*, I. Über Lespedamin, ein neues Alkaloid, Justus Liebigs Ann. Chem. 682 (1965) 212–218.
- [52] A.T. Shulgin, Profiles of psychedelic drugs: DMT, J. Psychedelic Drugs 8 (1976) 167–168.
- [53] T. Hoshino, K. Shimodaira, Synthese des Bufotenins und über 3-Methyl-3- β -oxyäthyl-indolenin. Synthesen in der Indol-Gruppe. XIV, Justus Liebigs Ann. Chem. 520 (1935) 19–30.
- [54] H.R. Arthur, S.N. Loo, J.A. Lambertson, N₁-Methylated tryptamines and other constituents of *Acacia confusa* Merr. of Hong Kong, Aust. J. Chem. 20 (1967) 811–813.
- [55] J. Poisson, Note sur le "Natem", boisson toxique péruvienne et ses alcaloïdes, Ann. Pharm. Fr. 23 (1965) 241–244.
- [56] C. Kan-Fan, B.C. Das, P. Boiteau, P. Potier, Alcaloïdes de *Vepris ampody* (Rutacées), Phytochemistry 9 (1970) 1283–1291.
- [57] R. Bergin, D. Carlström, G. Falkenberg, H. Ringertz, Preliminary X-ray crystallographic study of some psychoactive indole bases, Acta Cryst. B. 24 (1968) 882.
- [58] S. Moura, F.G. Carvalho, C.D. Rodrigues de Oliveira, E. Pinto, M. Yonamine, qNMR: an applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation, Phytochem. Lett. 3 (2010) 79–83.
- [59] G. Falkenberg, The crystal and molecular structure of (N, N)-dimethyltryptamine, Acta Cryst. B 28 (1972) 3075–3083.
- [60] J.C. Van Miltenburg, M.A. Cuevas-Diarte, The influence of sample mass, heating rate and heat transfer coefficient on the form of DSC curves, Thermochim. Acta 156 (1989) 291–297.
- [61] O. Bley, J. Siepmann, R. Bodmeier, Importance of glassy-to-rubbery state transitions in moisture-protective polymer coatings, Eur. J. Pharm. Biopharm. 73 (2009) 146–153.
- [62] T. Threlfall, Structural and thermodynamic explanations of Ostwald's rule, Org. Process. Res. Dev. 7 (2003) 1017–1027.
- [63] M.M. Parmar, O. Khan, L. Seton, J.L. Ford, Polymorph selection with morphology control using solvents, Cryst. Growth Des. 7 (2007) 1635–1642.
- [64] G. Buckton, A.A. Adeniyi, M. Saunders, A. Ambarkhane, HyperDSC studies of amorphous polyvinylpyrrolidone in a model wet granulation system, Int. J. Pharm. 312 (2006) 61–65.