



Instituto de Química
Programa de Pós-graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO EM
ÍNDICE DE RETENÇÃO E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM
ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS
SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS (NSP)**

GABRIELLA HAMÚ GIUDICE

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÂNGELO HENRIQUE DE LIRA MACHADO

COORIENTADOR: Dr. JORGE JARDIM ZACCA

Brasília, DF

2019



**Instituto de Química
Programa de Pós-graduação em Química**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO EM
ÍNDICE DE RETENÇÃO E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM
ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS
SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS (NSP)**

GABRIELLA HAMÚ GIUDICE

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÂNGELO HENRIQUE DE LIRA MACHADO

COORIENTADOR: Dr. JORGE JARDIM ZACCA

Brasília, DF

2019

Ficha catalográfica

Giudice, Gabriella Hamú.

Desenvolvimento e validação de método analítico baseado em índice de retenção e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas para identificação de novas substâncias psicoativas (NPS) / Gabriella Hamú Giudice. - Brasília: Universidade de Brasília, 2019.

Xx f, 104 p.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado. Instituto de Química.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília / Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química.

1. NSP. 2. CC/EM. 3. Índice de Retenção de Kovats. I. Machado, Ângelo Henrique de Lira. II. Universidade de Brasília. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Gabriella Hamú Giudice**, matrícula nº **17/0177394**, intitulada ***“Desenvolvimento e validação de método analítico baseado em índice de retenção e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas para identificação de novas substâncias psicoativas (NSP)”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 2 de julho de 2019.

Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado
Presidente de Banca

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga
Membro Titular

Prof. Dr. Adriano Otávio Maldaner
Membro Titular INC/PF

Dra. Diana Brito da Justa Neves
Membro Suplente

Em 2 de julho de 2019.

“Be less curious about people and more curious
about ideas”

Marie Currie

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar tudo possível.

À minha família por sempre saber como me amparar.

Aos meus orientadores, Ângelo e Zacca, por toda a compreensão, auxílio e ensinamentos durante este trabalho.

Ao Pedro por sempre confiar em mim, mais do que eu mesma.

Às MG's por tantos anos de amor e companheirismo que não existem em outro lugar.

Aos amigos de ANVISA, em especial à Renata, Thaís, Luciana, Moema e Daniela, por tornarem a rotina agradável.

Aos colegas do SEPLAB, Mônica, Maurício, Élvio, João e Luíza, pelo apoio durante o projeto.

Aos meus colegas de graduação por tanto tempo ao meu lado.

Às instituições envolvidas no projeto – Universidade de Brasília, Polícia Federal e Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	v
ÍNDICE	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lei de Drogas e as NSP	1
1.2 O desafio da análise das NSP	4
2. OBJETIVO GERAL.....	5
2.1 Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Novas Substâncias Psicoativas (NSP)	6
3.2 Índices de Retenção aplicados às NSP	7
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
4.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	10
4.2 Índice de Retenção de Kovats	12
4.3 Validação de métodos analíticos qualitativos	14
4.3.1 Seletividade.....	14
4.3.2 Limite de Detecção	15
4.3.3 Robustez	15
4.3.4 Fator de Separação.....	15
4.3.5 Resolução.....	15
4.3.6 Número de Pratos Teóricos	16
4.3.7 Fator de alargamento ou <i>Tailing</i>	16
4.3.8 Precisão	17

4.4 Planejamento Fatorial Fracionado	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1 Amostras utilizadas na etapa de desenvolvimento do método analítico.....	24
5.2 Amostras utilizadas no Mix de Drogas para o desenvolvimento e validação do método analítico	26
5.3 Equipamentos	27
5.4 Métodos	28
5.4.1 Método “Drogas Sintéticas”.....	28
5.4.2 Método01	29
5.4.3 Método02	29
5.4.4 Método03	29
5.4.5 Método04	30
5.4.6 Método05	30
5.4.7 Método06	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
6.1 Desenvolvimento do método analítico	32
6.1.1 Fator de Separação	33
6.1.2 Resolução	34
6.1.3 Número de Pratos Teóricos	35
6.1.4 Fator de alargamento ou <i>Tailing</i>	35
6.1.5 Avaliação conjunta das figuras de mérito.....	36
6.2. Aperfeiçoamento do método analítico	37
6.3 Utilização do método selecionado “Método03” para verificação dos Índices de Retenção de Kovats.....	43
6.4 Validação do método	44
6.4.1 Seletividade	44
6.4.2 Limite de Detecção	44
6.4.3 Fator de Separação	44
6.4.4 Resolução	46
6.4.5 Número de Pratos Teóricos	47
6.4.6 Fator de Alargamento ou <i>Tailing</i>	48
6.4.7 Precisão	49

6.4.7.1 Repetibilidade	49
6.4.7.2 Precisão Intermediária	50
6.4.8 Robustez e Estudo dos Fatores	54
6.5 Relação Final para os Índices de Retenção de Kovats calculados com o “Método03” validado.	59
6.6 Utilização do “Método03” em amostras apreendidas pela Polícia Federal	60
CONCLUSÕES E PRÓXIMAS ETAPAS	62
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	67

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAE-QTOF	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com analisador do tipo Quadrupolo e Tempo de Voo (do Inglês, <i>Time of Flight</i>)
CV	Coeficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
EI	Impacto de elétrons (do Inglês, <i>Electron Impact</i>)
EM	Espectrometria de Massas
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction.
ENFSI	European Network of Forensic Science Institutes
EWA	Sistema de Alerta Prévio (do Inglês <i>Early Warning Advisory</i>)
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase estacionária.
FM	Fase móvel.
G.L.	Graus de Liberdade
GT	Grupo de Trabalho
INC	Instituto Nacional de Criminalística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IRK	Índice de Retenção de Kovats
ISO	Organização Internacional de Normalização (do Inglês <i>International Organization for Standardization</i>)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MS	Ministério da Saúde
NSP	Novas Substâncias Psicoativas.
PF	Polícia Federal
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RI	Índices de Retenção (do Inglês, <i>Retention Index</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RTL	Retention Time Locking.
SENAD	Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas
SENASP	Secretaria Nacional de Segurança Pública

SEPLAB	Serviço de Perícias de Laboratório e de Balística do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
SWGDRUG	Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do Inglês United Nations Office on Drugs and Crime)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cromatogramas comparativos. (a) Amostra de metanfetamina, em metanol, com o método “Drogas Sintéticas”. (b) Amostra de MDMA, em metanol, com o método “Drogas Sintéticas”. (c) Amostra de metanfetamina, em metanol, utilizando o método “Método01”. (d) Amostra de MDMA, em metanol, utilizando o método “Método01”.	32
Figura 2	Cromatograma utilizando o método “Método02” do AM2201, em metanol, evidenciando sinal de JWH-210 de tempo de retenção 23.041 minutos.	38
Figura 3	Cromatograma da amostra extraída das folhas de <i>Salvia Divinorum</i> com metanol utilizando o método “Método02”.	39
Figura 4	Ampliações de dois momentos do cromatograma: os pares de sinais de tempos de retenção 3,080min/3,117min e 7,607min/7,653min, utilizando o método “Método02”	39
Figura 5	Especificações da coeluição. (a) Ampliação do sinal cromatográfico indicativo da coeluição da metiopropamina e da metanfetamina. (b) Lista de sugestões de componentes gerada pelo software <i>Chemstation</i> . (c) Espectro de massas e fórmula estrutural da metiopropamina. (d) Espectro de massas e fórmula estrutural da metanfetamina. (e) Espectro de massas do sinal da coeluição.	40
Figura 6	Ampliações de dois momentos do cromatograma: os pares de sinais de tempos de retenção 5,100min/5,162min (anfetamina/2-FA) e 10,529min/10,578min (5-MAPB/MDMA), utilizando o método “Método03”.	41
Figura 7	Ampliações de dois momentos do cromatograma: os pares de sinais de tempos de retenção 6,904min/7,032min (anfetamina/2-FA) e 13,460min/13,511min (5-MAPB/MDMA), utilizando o método “Método03”.	42
Figura 8	Ampliações dos sinais das substâncias 5-MAPB e MDMA utilizando o “Método03”.	46
Figura 9	Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância anfetamina.	67
Figura 10	Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância metanfetamina.	67
Figura 11	Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância MDMA.	67
Figura 12	Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância cocaína.	68
Figura 13	Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância heroína.	68
Figura 14	Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância THC.	68
Figura 15	Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da mistura <i>n</i> -alcanos.	69
Figura 16	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância anfetamina.	69
Figura 17	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância cocaína.	69

Figura 18	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância heroína.	70
Figura 19	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância THC.	70
Figura 20	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da mistura <i>n</i> -alcanos.	70
Figura 21	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância anfetamina.	71
Figura 22	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância metanfetamina.	71
Figura 23	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância MDMA.	71
Figura 24	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância cocaína.	72
Figura 25	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância heroína.	72
Figura 26	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância THC.	72
Figura 27	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da mistura <i>n</i> -alcanos.	73
Figura 28	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" para o Mix de drogas.	73
Figura 29	Sobreposição de cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" para o Mix de drogas (em azul) e mistura de <i>n</i> -alcanos (em preto).	73
Figura 30	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método03" para o Mix de drogas.	74
Figura 31	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método04" para o Mix de drogas.	74
Figura 32	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método05"	75
Figura 33	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método06" para o Mix de drogas.	75
Figura 34	Cromatograma obtido empregando-se o método "Método03" para a mistura de <i>n</i> -alcanos. O primeiro pico de $t_r = 2,211$ é referente ao C_9H_{20} enquanto o último sinal de $t_r = 30,292$ se refere ao $C_{40}H_{82}$.	76
Figura 35	Sobreposição de cromatograma obtido empregando-se o método "Método03" para o Mix de drogas (em azul) e mistura de <i>n</i> -alcanos (em preto).	76
Figura 36	Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 1 - Equipamento CGEM_A, Dia 1.	78
Figura 37	Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 2 - Equipamento CGEM_A, Dia 2.	79
Figura 38	Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 3 - Equipamento CGEM_B, Dia 3.	80
Figura 39	Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 4 - Equipamento CGEM_B, Dia 4	81
Figura 40	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 1.	82
Figura 41	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as	83

	condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 2.	
Figura 42	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 3.	84
Figura 43	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 4.	86
Figura 44	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 5.	87
Figura 45	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 6.	88
Figura 46	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 7.	89
Figura 47	Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 8.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Planejamento Fatorial Fracionado das corridas cromatográficas.	20
Tabela 2	Quantidades utilizadas para as substâncias sólidas durante a comparação entre os métodos.	24
Tabela 3	Seleção de substâncias e suas medidas para etapa de aperfeiçoamento inicial do método.	25
Tabela 4	Seleção de substâncias e suas quantidades utilizadas para etapa de montagem do <i>Mix</i> de drogas.	26
Tabela 5	Valores calculados para o fator de separação para solução padrão de <i>n</i> -alcanos utilizando os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”.	34
Tabela 6	Valores calculados de resolução para solução padrão de <i>n</i> -alcanos utilizando os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”.	34
Tabela 7	Valores calculados de número de pratos teóricos para solução padrão de <i>n</i> -alcanos e para	35
Tabela 8	Valores calculados de fator de alargamento ou <i>tailing</i> para solução padrão de <i>n</i> -alcanos e para padrões das drogas utilizando os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”.	36
Tabela 9	Relação das substâncias utilizadas no <i>Mix</i> de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método02” e os Índices de Retenção de Kovats calculados.	37
Tabela 10	Relação dos valores calculados de Resolução dos pares de substâncias anfetamina/2-FA e 5-MAPB/MDMA para os métodos avaliados.	42
Tabela 11	Relação das substâncias utilizadas no <i>Mix</i> de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e os Índices de Retenção de Kovats calculados.	43
Tabela 12	Valores calculados para o fator de separação para o <i>Mix</i> de drogas utilizando o “Método03”.	45
Tabela 13	Relação das substâncias utilizadas no <i>Mix</i> de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e as resoluções calculadas.	46
Tabela 14	Relação das substâncias utilizadas no <i>Mix</i> de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e os valores de número de pratos teóricos calculados.	47
Tabela 15	Relação das substâncias utilizadas no <i>Mix</i> de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e os <i>tailing</i> calculados.	48
Tabela 16	Relação de experimentos realizados para avaliação da Precisão.	50
Tabela 17	Valores calculados para a avaliação da precisão intermediária para o equipamento CGEM_A.	50
Tabela 18	Valores calculados para a avaliação da precisão intermediária para o equipamento CGEM_B.	52
Tabela 19	Valores calculados para a avaliação da precisão intermediária que compara	53

	os equipamentos CGEM_A e CGEM_B.	
Tabela 20	Valores calculados para a avaliação da precisão intermediária que compara os equipamentos CGEM_A e CGEM_B.	59
Tabela 21	Relação das substâncias componentes do <i>Mix</i> de drogas, os Índices de Retenção de Kovats Globais, suas variâncias, intervalos de confiança e DPR correspondentes, calculados para todas as corridas que empregaram o “Método03” nos equipamentos CGEM_A e CGEM_B.	77
Tabela 22	Valores de Repetibilidade calculados para as corridas do Grupo 2 - Equipamento CGEM_A, Dia 2.	78
Tabela 23	Valores de Repetibilidade calculados para as corridas do Grupo 3 - Equipamento CGEM_B, Dia 3.	79
Tabela 24	Valores de Repetibilidade calculados para as corridas do Grupo 4 - Equipamento CGEM_B, Dia 4.	80
Tabela 25	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 1.	81
Tabela 26	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 2.	82
Tabela 27	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 3.	83
Tabela 28	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 4.	85
Tabela 29	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 5.	86
Tabela 30	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 6.	87
Tabela 31	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 7.	88
Tabela 32	Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 8.	89
Tabela 33	Valores calculados para o efeito “Marca da Coluna”, sua Variância e Intervalo de Confiança.	90
Tabela 34	Valores calculados para o efeito “Polaridade da Coluna”, sua Variância e Intervalo de Confiança.	91
Tabela 35	Valores calculados para o efeito “Fluxo do gás de arraste”, sua Variância e Intervalo de Confiança.	92
Tabela 36	Valores calculados para o efeito “Taxa de split”, sua Variância e Intervalo de Confiança.	93

Tabela 37	Valores calculados para o efeito “Temperatura do injetor”, sua Variância e Intervalo de Confiança.	94
Tabela 38	Valores calculados para o efeito “Rampa de Temperatura”, sua Variância e Intervalo de Confiança.	95
Tabela 39	Seleção das corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo (menor polaridade 100% Dimethylpolysiloxane).	96
Tabela 40	Seleção das corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto (maior polaridade (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane).	96
Tabela 41	Valores calculados para o efeito “Marca da Coluna” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.	96
Tabela 42	Valores calculados para o efeito “Marca da Coluna” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.	97
Tabela 43	Valores calculados para o efeito “Fluxo do Gás de Arraste” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.	98
Tabela 44	Valores calculados para o efeito “Fluxo do Gás de Arraste” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.	99
Tabela 45	Valores calculados para o efeito “Taxa de Split” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.	100
Tabela 46	Valores calculados para o efeito “Taxa de Split” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.	101
Tabela 47	Valores calculados para o efeito “Temperatura do injetor” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.	102
Tabela 48	Valores calculados para o efeito “Temperatura do injetor” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.	103
Tabela 49	Valores calculados para o efeito “Rampa de Temperatura” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.	104
Tabela 50	Valores calculados para o efeito “Rampa de Temperatura” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.	105

RESUMO

Novas Substâncias Psicoativas (NSP) são definidas pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) como “*substâncias de abuso que podem estar tanto em sua forma pura quanto em preparações e que não são controladas pelas Convenções de Narcóticos de 1961 ou pela Convenção de Psicotrópicos de 1971, mas que apresentam risco para saúde. O termo “novas” não se refere necessariamente a novas invenções, mas sim a substâncias que foram recentemente disponibilizadas no mercado*”. Por serem substâncias desenhadas com o objetivo de contornar normas em vigor, possuem alta velocidade de introdução no mercado, o que representa um enorme desafio tanto do ponto de vista regulatório quanto do ponto de vista pericial.

Nesse contexto, surge a necessidade, na rotina técnica, de um método capaz de identificar NSP, sem a disponibilidade de padrões analíticos certificados. Por consequência, o objetivo do trabalho é o desenvolvimento e a validação de um método analítico para identificação de NSP utilizando Índice de Retenção de Kovats, por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas que possa ser implementado em diferentes laboratórios periciais brasileiros.

A metodologia consistiu no aperfeiçoamento do método em CG/EM, de forma a ser aplicável à ampla diversidade de NSP existente; na sua validação, utilizando figuras de mérito como seletividade, precisão e robustez; e no cálculo do Índice de Retenção de Kovats para as substâncias analisadas. Esse índice foi selecionado por ter sido reportado na literatura como ferramenta para identificação de compostos com alta precisão.

Um total de vinte e duas drogas ilícitas foram utilizadas. São elas: quatro canabinoides sintéticos (AM-2201, MAM-2201, JWH-081, JWH-210), uma catinona sintética (*N*-etilpentilona), três feniletilaminas (5-MAPB, 2-FA, 25C-NBOMe), duas piperazinas (o-CPP, p-CPP), um derivado opioide (U-47700), uma triptamina (5-MeO-MiPT), um aminoindano (5-IAI), uma substância de origem vegetal (*Salvia divinorum*), uma substância da categoria “outros” (Metiopropamina) e sete drogas de abuso tradicionais (THC, Heroína, Anfetamina, Metanfetamina, MDMA, Cocaína, Efedrina).

O método apresentou apenas uma limitação de Seletividade, representada pela coeluição da metiopropamina e da metanfetamina. Os valores de Resolução foram superiores a 1,25, indicando separação dos sinais, e as figuras de mérito Fator de Separação, Número de Pratos Teóricos e *Tailing* também apresentaram resultados satisfatórios. A avaliação da Precisão Intermediária constatou Desvios Padrão Relativos na faixa de 0,02 – 0,29%, valores estes inferiores ao encontrados na literatura. A avaliação da Robustez por meio de um Planejamento Fatorial Fracionado identificou que a alteração realizada na polaridade da coluna foi o fator mais influente, enquanto a marca da coluna, fluxo do gás de arraste, taxa de *split*, temperatura do injetor e rampa de temperatura não apresentaram interferências com valores de alta magnitude.

Dessa forma, os resultados do desenvolvimento e validação do método utilizando um total de vinte e duas drogas ilícitas indicam a adequação do uso do Índice de Retenção de Kovats na identificação de NSP com o método desenvolvido.

Palavras-chave: NSP, CG/EM, Índice de Retenção de Kovats.

ABSTRACT

UNODC defines new psychoactive substances (NPS) as “*substances of abuse, either in a pure form or a preparation, that are not controlled by the 1961 Single Convention on Narcotic Drugs or the 1971 Convention on Psychotropic Substances, but which may pose a public health threat. The term “new” does not necessarily refer to new inventions but to substances that have recently become available on the market.*” Because they are substances designed to circumvent existing norms, they have a high introduction rate into the market and represents a huge challenge for regulatory and forensic point of view.

In this context, the need for a method capable of identifying NPS, without the availability of certified analytical standards arises. Thus, the objective of this work was the development and validation of an analytical method for the identification of NPS using Kovats’ Retention Index and Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry that can be implemented in different Brazilian laboratories.

The methodology of the work relies on the development of a GC/MS method, in order to be applicable to a wide diversity of existing NPS; its validation, using figures of merit such as selectivity, precision and robustness; and calculation of the Kovats’ Retention Index for the substances analysed. This index was selected because it was reported in the literature as a tool for high precision identification.

A total of twenty-two illicit drugs were used. They are four synthetic cannabinoids (AM-2201, MAM-2201, JWH-081, JWH-210), one synthetic cathynone (*N*-ethylpentylone), three phenylethylamines (5-MAPB, 2-FA, 25C-NBOMe), two piperazines (o-CPP, p-CPP), one opioid (U-47700), one triptamine (5-MeO-MiPT), one aminoindane (5-IAI), one plant-base substance (*Salvia divinorium*), one listed as “other” (Methiopropamine) and seven traditional drugs (THC, Heroin, Amphetamine, Methamphetamine, MDMA, Cocaine, Efedrine).

The method presented only one Selectivity limitation, represented by the coelution of methiopropamine and methamphetamine. The calculated Resolution values were higher than 1.25, indicating separation of the signals, and the figures of merit Separation Factor, Number of Theoretical Plates and *Tailing* also presented satisfactory results. The evaluation of the Intermediate Precision indicated Relative Standard Deviations in the range of 0.02 - 0.29%, values lower than those found in the literature. The Robustness evaluation using a Fractional Factorial Design identified that the change in the column polarity was the most influential factor, while the column brand, gas flow, split rate, injector temperature and ramp temperature did not interferences with high magnitude values.

Thus, the results of the method’s development and validation using a total of twenty-two illicit drugs indicate the adequacy of using the Kovats’ Retention Index in the identification of NPS with the developed method.

Keywords: NPS, GC/MS, Kovats’ Retention Index.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lei de Drogas e as NSP

A Lei 11.343 de 23 de agosto de 2006 (Lei de Drogas) define o termo “drogas”, além de estipular o órgão responsável pela listagem de quais substâncias são classificadas como tal. Ela estabelece, em seu artigo 1º, parágrafo único, que *“consideram-se como drogas as substâncias ou os produtos capazes de causar dependência, assim especificados em lei ou relacionados em listas atualizadas periodicamente pelo Poder Executivo da União”*. Conforme o artigo 66 da referida Lei, *“denominam-se drogas substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras sob controle especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998”*.

O Decreto Presidencial nº 5.912/2006, que regulamenta a Lei nº 11.343/2006, em seu inciso I do artigo 14, define que o Ministério da Saúde, representado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e considerando sua atribuição, é o órgão competente por editar normas de caráter geral ou específico sobre limitação, fiscalização e controle da produção, do comércio e do uso das drogas, dentre outras atividades relacionadas a este tema.

Consequentemente, cabe à Autoridade Sanitária, entidade do Poder Executivo, representada atualmente pela ANVISA, a classificação de quais substâncias são consideradas drogas no Brasil.

Internacionalmente, o início do século XX foi marcado pelo encontro de países na Comissão do Ópio de 1909 em Xangai. A Comissão definiu uma das primeiras estratégias de controle de substâncias e, para acompanhar a variedade de drogas em escala mundial, diversos países assinaram as três convenções sobre drogas, no âmbito das Nações Unidas, que estabelecem os controles mínimos das substâncias listadas para os países signatários.¹

Em concordância com o preconizado na Convenção Única sobre Entorpecentes de 1961, na Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971 e na Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Entorpecentes e Substâncias Psicotrópicas de 1988, os Decretos Presidenciais nºs. 54.216/1964, 79.388/1977 e 162/1961 internalizaram os controles dispostos nas Convenções, respectivamente.

De forma a unificar o previsto nas referidas Convenções e a cumprir o estabelecido na Lei de Drogas, a Portaria SVS/MS nº 344 de 12 de maio de 1998, em conjunto com sua Instrução Normativa (Portaria SVS/MS nº 06/1999), regulamenta o comércio, transporte,

prescrição, guarda, balanços, embalagens, controle e fiscalização das substâncias sujeitas a controle especial e dos medicamentos que as contenham.

As listas da Portaria SVS/MS nº 344/1998 apresentam níveis diferenciados de regramentos, especificados na norma, na qual as substâncias proscritas - aquelas que não apresentam uso medicamentoso conhecido e que são enquadradas como drogas de abuso - estão elencadas nas Listas E e F.

A ferramenta normativa capaz de incluir novas substâncias na Portaria SVS/MS nº 344/1998 é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), publicada periodicamente pela ANVISA. Para que uma substância seja incluída na Portaria, ela deve ser avaliada tecnicamente pela Agência e sua inclusão é publicada em uma RDC.

Para discutir e aperfeiçoar o modelo regulatório vigente, foi criado um Grupo de Trabalho (GT), publicado na Portaria ANVISA nº 898, de 6 agosto de 2015. O Grupo foi instituído no âmbito da ANVISA, com a participação do Ministério da Justiça e Segurança Pública, representado pela Polícia Federal (PF), pela Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP) e pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD). A formação do GT se deu, principalmente, em resposta ao rápido aparecimento e disseminação das Novas Substâncias Psicoativas (NSP), sendo que, após sua criação, o quantitativo de atualizações da Portaria SVS/MS 344/1998 aumentou consideravelmente, proporcionando a inclusão nominal de 70 substâncias, das quais 58 são NSP.

Segundo o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC), Novas Substâncias Psicoativas são definidas como “*substâncias de abuso, que podem estar tanto em sua forma pura quanto em preparações e que não são controladas pelas Convenções de Narcóticos de 1961 ou pela Convenção de Psicotrópicos de 1971, mas que apresentam risco para saúde*”. O termo “novas” não se refere, necessariamente, a novas moléculas, mas sim a substâncias que foram recentemente disponibilizadas no mercado.² Alguns dos principais subgrupos de NSP são: canabinoides sintéticos, catinonas sintéticas, cetaminas, feniletilaminas, piperazinas, substâncias de origem vegetal e o grupo denominado “outros” que contém substâncias diversas.³

As NSP são compostos desenhados com o objetivo de contornar normas em vigor e que mimetizam efeitos de outras drogas já controladas, por isso são conhecidas como “drogas legais” (do Inglês, *legal highs*). Mais de 110 países já reportaram alguma apreensão de NSP e, até o ano de 2018, mais de 888 substâncias já haviam sido inseridas no sistema Early Warning

Advisory (EWA) da UNODC.² A identidade química de uma NSP consumida é, por vezes, desconhecida ou mascarada, levando a efeitos imprevisíveis aos usuários. É usual que apresentações idênticas contenham compostos diferentes ou que as NSP sejam vendidas sob o nome das drogas comumente conhecidas, das quais imitam os efeitos.⁴

Dados sobre toxicidade e potencial carcinogênico de muitas NSP não estão disponíveis ou são muito limitados. Para essas substâncias, o perfil de risco pode ser maior, quando comparados às drogas que inspiraram seu desenvolvimento.³ O risco produzido pela escassez de dados toxicológicos² e a velocidade de introdução dessas substâncias no mercado mundial representam um enorme desafio tanto do ponto de vista regulatório quanto do ponto de vista pericial.

Como resposta à elevada taxa de surgimento de novas substâncias, as normas de controle precisam ser atualizadas cada vez mais rapidamente para proibir compostos que entraram recentemente no mercado. Assim, com o objetivo de tornar mais eficiente o combate ao aparecimento e disseminação de NSP, no Brasil, foi adotado o sistema genérico de classificação de substâncias, primeiramente publicado na RDC nº. 79 de 23 de maio de 2016, que, seguindo tendência mundial, indicou estruturas nucleares para a classe dos canabinoides sintéticos e estabeleceu possíveis substituições em suas estruturas-base, de forma que todas essas possibilidades de alterações estão controladas pela norma.

Em uma seguinte atualização, foi publicada, por meio da RDC nº. 175 de 19 de setembro de 2017, a classificação genérica para o grupo das catinonas sintéticas, seguindo o mesmo preceito utilizado para os canabinoides sintéticos.

Países como a Irlanda, o Reino Unido, os Estados Unidos e o Canadá também adotam a classificação de substâncias por meio do sistema genérico aliado à listagem nominal de substâncias.

1.2 O desafio da análise das NSP

Além do ponto de vista regulatório, descrito na sessão 1.1, os peritos e institutos de perícia também são desafiados tecnicamente ao se depararem com substâncias novas que precisam ser identificadas e caracterizadas para verificação do enquadramento nas listas da Portaria SVS/MS 344/1998. Parte desse desafio reside no fato de que padrões analíticos para essas substâncias não são produzidos na mesma velocidade do surgimento das drogas.

Entre 2014 e 2017, mais de 100 NSP foram identificadas pela Polícia Federal do Brasil (PF). Em 2017, sete NSP, dentre um total de 38, foram identificadas pela primeira vez no Brasil (25B-NBOH, ADB-FUBINCA, fluorometanfetamina, eutilona, pentilona, FUB-AMB e U-47700).⁴

A elevada taxa de apreensão de novas substâncias associada às dificuldades de identificação desses compostos despertou o interesse em métodos de análise não específicos (do Inglês, “*non-target*”) destinados a analitos individuais, mas que são capazes de identificar compostos desconhecidos em uma amostra. Assim, a busca por metodologias eficazes para o controle e a identificação de Novas Substâncias Psicoativas é, atualmente, um empenho global motivado pela necessidade de coibir o tráfico de drogas.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta pesquisa foi o desenvolvimento e a validação de um método analítico baseado em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) para identificação de Novas Substâncias Psicoativas por meio do Índice de Retenção de Kovats, como forma de contornar a indisponibilidade comercial de padrões analíticos.

2.1 Objetivos específicos

- Propor a utilização de um método que tem como base o uso de CG/EM, por ser um equipamento de uso frequente nos laboratórios de análise de perícia disponível nas Polícias Federal e Civil, com o fim de gerar um método acessível e reprodutível com potencial de utilização em todos os laboratórios de perícia em química forense do país.
- Propor um método objetivo e capaz de reduzir a necessidade de aquisição de padrões analíticos certificados de alto valor comercial, como aqueles de Novas Substâncias Psicoativas, de forma que ele seja aplicável à rotina pericial dos diferentes estados brasileiros, com realidades diversas.
- Elaborar listagem de Índices de Retenção de Kovats e disponibilizá-la para consultas de usuários do método, como forma de identificação de NSP.
- Aperfeiçoar a capacidade de identificação das Polícias e dos Institutos de Perícia de forma a facilitar a detecção e identificação de Novas Substâncias Psicoativas que passarem a ser controladas pelas Listas da Portaria SVS/MS 344/1998.
- Aplicar o método na identificação de Novas Substâncias Psicoativas com a utilização do Índice de Retenção de Kovats como forma de verificação de identidade.
- Combinar Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com o Índice de Retenção em uma técnica validada e robusta como ferramenta para a identificação de Novas Substâncias Psicoativas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Novas Substâncias Psicoativas (NSP)

Novas Substâncias Psicoativas são compostos sintéticos desenhados com o objetivo de reproduzir os efeitos de drogas de abuso conhecidas. As NSP já são um fenômeno global no qual 119 países e territórios reportaram apreensão de ao menos uma substância da categoria. Até dezembro de 2018, as NSP com efeitos estimulantes foram as mais notificadas ao EWA, seguida pelas NSP sintéticas agonistas dos receptores de canabinoides e pelos alucinógenos clássicos.² Alguns dos subgrupos ou classes de NSP são: canabinoides sintéticos, catinonas sintéticas, cetaminas, feniletilaminas, piperazinas, substâncias de origem vegetal e o grupo denominado “outros” que contém substâncias diversas.

A dinâmica de alteração da estrutura molecular das NSP envolve pequenas modificações em sítios da molécula que podem modificar ou não sua atividade. Essa prática gera dificuldades à comunidade forense, sendo uma delas a aquisição de padrões analíticos com a mesma velocidade da introdução de novas moléculas no mercado de drogas.⁵

Técnicas analíticas acopladas à Espectroscopia de Massas (EM) vêm sendo utilizadas para identificação de NSP. A Cromatografia Líquida (CL) acoplada à Espectroscopia de Massas *tandem* (EM/EM) é bastante utilizada para análises de fluidos biológicos, como urina e sangue, enquanto a Cromatografia Gasosa (CG) é preferencialmente utilizada para avaliações de drogas apreendidas.⁶

Atualmente, no escopo forense, a técnica de CG/EM é a mais empregada para identificação de NSP.⁵ Com ela, é possível separar uma mistura de substâncias, identificar e quantificar cada uma delas. Assim, duas informações complementares são fornecidas: o espectro de massas e os tempos de retenção das substâncias.⁷

Durante o processo de identificação de uma substância, os dados do espectro de massas e os tempos de retenção podem ser comparados aos de um padrão analítico, analisado nas mesmas condições ou obtido na literatura disponível, ou mesmo serem confrontados com as bibliotecas de busca disponíveis nos softwares dos equipamentos. Para o caso das NSP, as formas tradicionais de análise qualitativa frequentemente não são totalmente eficazes, devido à indisponibilidade de padrões analíticos.⁵

3.2 Índices de Retenção aplicados às NSP

A identificação da grande variedade de NSP disponível no mercado ilícito de drogas frequentemente não pode ser realizada por meio da comparação com padrões analíticos. O termo “*non-target analysis*” reflete esta limitação, na qual a identificação dependerá de dados instrumentais, como o espectro de massas e o tempo de retenção.⁵

A utilização da técnica de Cromatografia Gasosa fornece o tempo de retenção do analito. A fim de que a informação associada ao tempo de retenção possa ser utilizada como forma de identificação de substâncias, ela deve ser registrada de sorte a se tornar comparável entre instrumentos, para ser mais independente das condições experimentais.⁵ Uma ferramenta utilizada para realizar essa comparação é o Índice de Retenção (RI) que relaciona o tempo de retenção do analito aos tempos de retenção de outros dois padrões.⁸ Para algumas substâncias, a informação de seus Índices de Retenção consta em bancos de espectros de massas. Tais informações podem ser utilizadas para incluir ou excluir uma substância durante o procedimento de identificação.⁵

O emprego de uma mistura de *n*-alcanos como padrões normalizadores do tempo de retenção do analito foi proposta por Kovats em 1958, publicado na revista *Helvetica Chimica Acta* em artigo intitulado “*Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen Teil 1 : Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone*” que utilizou como base a linearidade da relação entre o logaritmo do tempo de retenção ajustado (ou seja, o tempo de retenção do analito subtraído pelo tempo de retenção do solvente) com o número de carbonos dos alcanos que eluem imediatamente antes e imediatamente depois da substância de interesse.⁹

Estudos recentes buscam informações a respeito da reprodutibilidade do Índice de Retenção de Kovats (IRK) para identificação de substâncias. Miyagawa e colaboradores provocaram variações da média da velocidade linear do gás de arraste (fluxo do gás de arraste) e do comprimento da coluna Rtx-5MS aplicadas à identificação de pesticidas e de metil-ésteres de ácidos graxos.¹⁰ Os resultados obtidos indicaram estabilidade do Índice ao manter a velocidade linear do gás de arraste constante, mesmo que houvesse alteração do comprimento da coluna cromatográfica. O Índice foi capaz de distinguir moléculas que apresentam espectros de massas similares e, quando calculado a partir de medições em momentos diversos, apresentou reprodutibilidade aceitável.¹⁰

Diversas moléculas de NSP apresentam espectros de massa semelhantes, especialmente para os casos em que a análise é conduzida por meio de ionização por Impacto de Elétrons.¹¹ Para esses casos, o emprego de Índices de Retenção como forma de diferenciar substâncias de espectros similares apresenta-se como uma alternativa viável.

Trabalhos que utilizam a técnica de CG/EM para identificação de diferentes classes de NSP estão disponíveis na literatura científica. Em 2014, Leffler e colaboradores analisaram 14 amostras de apreensões e identificaram 10 catinonas sintéticas utilizando GC/EM. Em 2010, Emanuel e colaboradores caracterizaram pela primeira vez os componentes vendidos pelos nomes de “Gold Spirit”, “Gold” e “Diamond”. Os pesquisadores encontraram os canabinoides sintéticos CP 47497-C8, JWH-018, dentre outras substâncias. Não obstante, metodologias que utilizam CG/EM foram úteis para identificar o canabinoide sintético JWH-018 na Alemanha e impulsionaram sua proibição no país.¹²

Baron e colaboradores utilizaram a referida técnica para caracterizar sete amostras de diferentes NSP adquiridas online. A equipe verificou que, dentre o total, seis amostras não continham a substância informada ao usuário.¹³

A técnica analítica de CG/EM também pode ser utilizada para identificação de piperazinas e aminoindanos¹², além de ter sido empregada por Jermain e colaboradores para a identificação de Salvinorina A em amostras de *Salvia Divinorum*.¹⁴

A utilização do Índice de Retenção de Kovats, aplicado à identificação de 15 Novas Substâncias Psicoativas em CG/EM avaliou, em estudo desenvolvido por Kelly e colaboradores, a incerteza ou variabilidade dos Índices em equipamentos diferentes, além da variação observada nos espectros de massas utilizando o mesmo equipamento e também comparando-o a outros equipamentos.⁵

No referido estudo, as diferentes NSP foram divididas em três soluções. O “Mix Azul” era composto por 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina, 25I-NBOMe, anfetamina, butilona e JWH-018. O “Mix Vermelho” possuía, em sua constituição, as substâncias 1-(3-clorofenil)piperazina, 4-fluoroanfetamina, 25C-NBOMe, benzilpiperazina e UR-144, enquanto o “Mix Amarelo” era constituído por 5-MeO-AMT, dimetiltriptamina, MDMA, mefedrona e AH-7921⁵. As classes de drogas empregadas no trabalho são feniletilamina, drogas clássicas, canabinoides sintéticos, piperazina, triptamina, catinonas sintéticas e opioides sintéticos.

Adicionalmente, três diferentes montagens de equipamentos de CG/EM foram avaliadas, todas empregando colunas com composição (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane e variando apenas o modelo dos equipamentos, a marca da coluna e suas dimensões, a temperatura de injeção e a rampa de temperatura.

O estudo descrito apresentou valores calculados de Desvios Padrão Relativos inferiores a 0,35% para a variável Índice de Retenção de Kovats, levando em consideração todos os equipamentos e compostos avaliados, o que ressalta a elevada precisão do método. A maior diferença em unidades de Índice de Retenção entre instrumentos, para um único composto, foi de 37,0.⁵

A utilização da técnica de CG/EM para identificação de NSP por meio do Índice de Retenção de Kovats mostra-se promissora, tendo em vista que, durante a realização da pesquisa, a Polícia Federal recebeu, por meio do European Monitoring Centre for Drugs and Drug Adiction (EMCDDA), requerimento de avaliação de reprodutibilidade de um método de CG/EM com Índice de Retenção em desenvolvimento pelos peritos Tamás Csesztregi e Dávid Boros no Hungarian Institute for Forensic Sciences, conforme apresentado no 23rd annual meeting of ENFSI Drugs Working Group.¹⁵

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

A separação por meio de métodos cromatográficos baseia-se na distribuição da amostra entre uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM) durante o transporte através de, por exemplo, uma coluna. Os compostos retidos mais fortemente na FE movem-se mais lentamente através da coluna e seus sinais levam um maior tempo para surgir nos cromatogramas.

O processo de eluição consiste no arraste da amostra através da coluna por adição contínua da FM. Dessa forma, a eficiência da separação de dois analitos depende da velocidade de eluição e a resolução da coluna é proporcional à raiz quadrada do número de pratos teóricos.¹⁶

A fase móvel em CG é chamada de gás de arraste e deve ser quimicamente inerte. Nesse sentido, o gás hélio é comumente utilizado, assim como o hidrogênio e nitrogênio¹⁵. A fase estacionária que recobre a parede da coluna, normalmente, é um líquido viscoso de alto ponto de ebulição. Ele deve ser estável e inerte, pois a interação desses polímeros com o analito pode acarretar alargamentos do pico cromatográfico.

As duas formas mais utilizadas de injeção da amostra são o modo *Split* - método comum em colunas capilares no qual apenas uma parte da amostra vaporizada é transferida à coluna e utilizado no presente estudo – e o modo *Splitless* – no qual toda a amostra vaporizada é transferida, comumente usado para soluções pouco concentradas.¹⁶

Entre o injetor e o detector encontra-se a coluna cromatográfica propriamente dita. Sua temperatura é uma variável importante para se obter boa resolução. Para isso, usa-se a *programação de temperatura*, com a qual a temperatura da coluna é alterada, na medida em que a separação se processa, de tal forma que a afinidade de uma substância pela FM é modificada e os compostos mais fortemente ligados à FE possam sair no cromatograma em tempos aceitáveis, sem que a resolução dos sinais dos compostos mais voláteis seja comprometida.¹⁶

Após a passagem pela coluna, os componentes da amostra alcançam o detector, dispositivo que gera sinal elétrico que indicará o tempo da passagem de cada substância pela coluna. Para o presente estudo, empregou-se um Espectrômetro de Massas (EM) que tem seu

funcionamento baseado na conversão de moléculas neutras em íons e sua separação em função da razão entre o valor de sua massa e de sua carga.

Um espectro de massa apresenta a intensidade dos íons detectados contra o valor correspondente da relação massa/carga (m/z). Esse valor surge ao ionizar a amostra, acelerar e separar os íons resultantes, por meio de campos elétricos e magnéticos, segundo a razão entre suas massas e cargas elétricas.¹⁷

Uma forma comum de ionização em espectroscopia de massas, utilizada neste projeto, é a ionização por *impacto de elétrons* (EI) na qual um filamento aquecido emite elétrons que são acelerados por meio de um potencial de 70 eV. Algumas moléculas do analito absorvem essa energia e se ionizam, podendo gerar o correspondente *íon molecular* M^+ , que possui uma carga positiva após perder um elétron, ou efetuar reações de rearranjo ou fragmentação. Os íons produzidos são acelerados em direção ao analisador.¹⁶

O analisador de massas mais comumente utilizado em associação à cromatografia gasosa é o do tipo *quadrupolo* na qual cilindros metálicos paralelos são submetidos, alternadamente, a potenciais de rádio frequência ou a correntes elétricas que propiciam interações diferentes dos íons relacionadas à razão m/z .¹⁷

O analisador quadrupolo linear, frequentemente encontrado nos equipamentos de CG/EM, apresenta maior eficiência de captura e de aprisionamento que a técnica de captura de íons (*ion trap*) por quadrupolo tridimensional. O método seleciona íons pelo valor de sua razão m/z para serem transmitidos através de um filtro. Um coletor de íons linear cria poços de potencial para coletar os íons em sua parte central. Ao variar o potencial a qual o sistema está submetido, íons com valores específicos de m/z são orientados em direção aos detectores.¹⁶ Esse detector varre as massas diversas vezes durante a separação cromatográfica e um gráfico em função da intensidade de íons na sua razão massa/carga é gerado.¹⁷

A forma mais rápida e simples de se identificar NSP é utilizar o registro gerado pela técnica de CG/EM com ionização por impacto de elétrons (EI) e comparar os dados obtidos às bibliotecas disponíveis.¹¹ Assim, pode-se considerar a técnica de CG/EM por ionização de elétrons como instrumentação chave para identificação de amostras apreendidas no cenário forense.¹⁸

4.2 Índice de Retenção de Kovats

A normalização do tempo de retenção de analitos utilizando padrões de n -alcanos como referência foi proposta por Ervin Kovats em 1958 e utilizou como fundamento a relação entre o logaritmo do tempo de retenção ajustado do analito com o número de carbonos dos alcanos que eluem imediatamente antes e imediatamente depois da substância de interesse.⁹

O Índice de Retenção de Kovats (IRK) relaciona tempos de retenção sujeitos às mesmas condições, diminuindo assim sua dependência a pequenas variações experimentais.⁷ Assim, enquanto os tempos de retenção podem variar a depender de fatores tais como fluxo do gás de arraste ou rampa de temperatura, os valores de Índice de Retenção de Kovats se mostram constantes dentro de certas variações de condições.

O IRK tem como base a relação linear entre o tempo de retenção ajustado do analito e o número de carbonos dos alcanos próximos. A Equação 1 é utilizada para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats em métodos isotérmicos.¹⁹

$$I = 100 Z + 100 \frac{\log t'_{R(X)} - \log t'_{R(Z)}}{\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{R(Z)}} \quad \text{Equação 1}$$

Para os casos de programação de temperatura, nos quais a temperatura do forno do Cromatógrafo Gasoso não é constante, a versão linear da Equação 1 (Equação 2) apresenta melhores resultados.¹⁹

$$I^T = 100 Z + 100 \frac{t'_{R(X)} - t'_{R(Z)}}{t'_{R(Z+1)} - t'_{R(Z)}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde Z é o número de carbonos do alcano que elui imediatamente antes da substância de interesse, $t'_{R(X)}$ é o tempo de retenção ajustado da substância de interesse, $t'_{R(Z)}$ é o tempo de retenção ajustado do alcano que elui imediatamente antes da substância de interesse e $t'_{R(Z+1)}$ é o tempo de retenção ajustado do alcano que elui imediatamente após a substância de interesse.

As operações matemáticas que envolvem a equação empregada no cálculo do Índice de Retenção de Kovats (IRK) permitem que o tempo de retenção ajustado seja substituído

pelo tempo de retenção bruto, do qual não se subtrai o tempo de retenção do solvente.^{9,20} A operação descrita não apresenta prejuízo aos cálculos, pois a utilização de injetores automáticos e colunas capilares minimizou as variações outrora identificadas e corrigidas pelo uso da subtração do tempo morto, gerando o tempo de retenção ajustado. Essa é a equação utilizada para os cálculos dos Índices de Retenção de Kovats no restante deste estudo.

$$IRK = 100 Z + 100 \frac{t_{R(X)} - t_{R(Z)}}{t_{R(Z+1)} - t_{R(Z)}} \quad \text{Equação 3}$$

O emprego do Índice de Retenção de Kovats para identificação de drogas remonta ao século passado. Em 1970, o Índice, em sua versão linear, foi empregado para identificação de drogas por cromatografia gasosa com colunas empacotadas. Já em 1982, Schepers e colaboradores utilizaram colunas capilares em métodos com programação de temperatura para calcular Índices de Retenção de Kovats lineares para drogas.²¹ A variabilidade dentre os valores calculados dos Índices de Retenção de Kovats entre laboratórios, comparando-se colunas capilares e empacotadas, é da mesma ordem (em torno de 50 unidades de medida).⁹

Por se relacionar ao tempo de retenção de um analito, o Índice de Retenção de Kovats pode ser influenciado, dentre outros fatores, pelo fluxo do gás de arraste⁷ e pela rampa de temperatura empregada no método.^{7,9} Por consequência, aumentar a confiabilidade na identificação de substâncias utilizando CG/EM em diferentes locais, implica obter reprodutibilidade interlaboratorial dos Índice de Retenção de Kovats.²²

Os Índices de Retenção de Kovats são ferramentas importantes para a identificação de substâncias as quais não possuem padrões analíticos certificados de fácil acesso, uma vez que podem ser utilizados como instrumento para reconhecimento de um pico cromatográfico ou também podem ser empregados para eliminar hipóteses de possíveis correspondências durante uma pesquisa de identificação. É por este motivo que tal ferramenta foi selecionada para o presente estudo, uma vez que se apresentou como forma eficaz de identificar Novas Substâncias Psicoativas sem o emprego de padrões analíticos certificados, muitas vezes indisponíveis no mercado ou de difícil acesso na rotina pericial.

4.3 Validação de métodos analíticos qualitativos

Os laboratórios devem garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos ao se utilizar métodos analíticos. Para assegurar que os resultados analíticos são adequados ao objetivo proposto, um método deve ser validado, previamente à sua implementação em rotina. Assim, é possível afirmar que a validação estabelece a adequação do método analítico ao seu propósito.

De acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO), a validação de um método é definida como “confirmação, por meio de exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para um uso pretendido específico ou para uma aplicação foram atendidos”.²³

Durante a validação, diversas figuras de mérito são avaliadas, a depender do tipo de método e de seu objetivo. Segundo a Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO, métodos qualitativos, em regra, exigem o estudo de especificidade ou seletividade, robustez e limite de detecção.²³

Métodos qualitativos são definidos pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) como sendo “*a análise na qual substâncias são identificadas ou classificadas baseando-se em suas propriedades químicas ou físicas*”. Para o U.S. Food and Drug Administration (FDA), métodos qualitativos são aqueles em que as substâncias são analisadas baseando-se em suas propriedades químicas, físicas ou biológicas. Além disso, as respostas fornecidas por esses métodos devem ser apresentadas no formato de “presença” ou “ausência” dos analitos.²⁴

4.3.1 Seletividade

A seletividade de um método quantitativo se refere à capacidade do método de distinguir o analito das demais substâncias.²⁴ Um método capaz de identificar apenas um analito é denominado específico, enquanto o que é capaz de identificar diversas substâncias e diferenciá-las é denominado seletivo.²³

Para um método qualitativo, seletividade diz respeito à capacidade do método de identificar corretamente uma amostra negativa, que é aquela que não apresenta o analito em sua composição.²⁴

4.3.2 Limite de Detecção

O limite de detecção indica a menor quantidade da substância em questão que pode ser identificada pelo equipamento. Ele é medido levando em consideração a razão sinal/ruído ou a concentração da substância que, a certo grau de confiança, apresenta-se maior que zero.²³

4.3.3 Robustez

A robustez assinala a estabilidade de um método frente a pequenas variações.²³ Para determinar a robustez, pode-se recorrer ao Planejamento Fatorial, que permite avaliar a forma com que a resposta varia de acordo com alterações realizadas em alguns fatores selecionados.²⁵

4.3.4 Fator de Separação

Segundo Collins e demais colaboradores, o fator de separação pode ser calculado conforme a Equação 4, onde t'_{R2} é o tempo de retenção ajustado de uma substância e t'_{R1} é o tempo de retenção ajustado da substância que elui imediatamente antes ($t'_R = t_R - t_{solvente}$).¹⁹ No entanto, para o presente estudo, esse valor foi calculado utilizando os tempos de retenção brutos, ou seja, sem a subtração do tempo de retenção do solvente, pois a grande quantidade de solvente que passaria pelo Quadrupolo seria capaz de diminuir a vida útil do filamento, responsável pela geração dos elétrons de ionização.

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad \text{Equação 4}$$

4.3.5 Resolução

A medida de resolução indica o quão separados estão dois sinais adjacentes, conforme Equação 5.²⁶

$$R = \frac{(2,35/2)(t_{R(b)} - t_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde t_R é o tempo de retenção de cada composto e W_{50} é a largura do sinal a meia altura, expressa em minutos.²⁶

Segundo Carol Collins e colaboradores, valores de resolução superiores a 1,5 indicam separação completa da mistura.¹⁹

4.3.6 Número de Pratos Teóricos

O número de pratos teóricos é uma função da eficiência que descreve o poder de separação da coluna e pode ser calculado pela Equação 6, onde W_b é a largura do pico, em minutos, em sua base.¹⁹

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{Equação 6}$$

Um prato teórico corresponde a um estágio de equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel (gás de arraste). Quanto maior o número de pratos teóricos de uma coluna, maior é a chance de separação cromatográfica dos analitos.

4.3.7 Fator de alargamento ou *tailing*

O fator de alargamento é capaz de medir a assimetria dos picos. Essa figura de mérito pode ser avaliada segundo a Equação 7.²⁶

$$t = \frac{W_{5.0}}{2 \times t_W} \quad \text{Equação 7}$$

Na qual $W_{5.0}$ indica a largura, em minutos, do sinal a 5% da sua altura e t_W é a distância, em minutos, entre o início do sinal e seu tempo de retenção, medida a 5% da altura.²⁶

É importante observar que valores mais próximos da unidade indicam sinais mais simétricos. Valores de t maiores que a unidade indicam sinais com cauda, enquanto valores menores que a unidade apontam picos com distorções frontais.

A assimetria frontal está frequentemente relacionada ao excesso de amostra injetada ou a temperaturas do forno abaixo da ideal. As caudas se apresentam, normalmente, devido às falhas na injeção da amostra ou por conta de absorção na fase estacionária da coluna cromatográfica.¹⁹

4.3.8 Precisão

Segundo a Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO, a precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios e é habitualmente descrita pelo Desvio-Padrão ou Coeficiente de Variação (CV) das medidas.²³

O Coeficiente de Variação, também chamado de Desvio Padrão Relativo (DPR) é calculado conforme Equação 8, a seguir:

$$CV = DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad \text{Equação 8}^{23}$$

Onde DP é o desvio-padrão e CMD é a concentração média determinada. Para o caso do presente estudo, a concentração é mantida constante durante a validação, pois a resposta que se deseja avaliar é a precisão nos cálculos dos Índices de Retenção de Kovats. Por esse motivo, o valor de CMD foi substituído pelo valor médio dos Índices de Retenção de Kovats (\overline{IRK}), segundo descrito a seguir:

$$CV = DPR = \left(\frac{DP}{\overline{IRK}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

$$\overline{IRK} = \frac{\sum_{i=1}^n IRK_i}{n} \quad \text{Equação 10}$$

Onde: IRK_i = índice de retenção de Kovats para a medição i ; n = número de medições efetuadas.

Como forma de avaliar o intervalo observado dos valores calculados para o Índice de Retenção de Kovats de cada substância, os Intervalos de Confiança (I.C.) foram calculados conforme Equação 11:

$$I.C. = t_{gl,\alpha} \times DP \quad \text{Equação 11}$$

Onde DP é o desvio-padrão, calculado como a raiz quadrada da variância, gl são os graus de liberdade e α é o nível de confiança aplicado. Para o presente estudo, $\alpha = 95\%$.

A Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº. 166 de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, prevê que os critérios de

aceitação para a precisão deverão ser definidos e justificados levando em consideração o objetivo do método, sua variabilidade intrínseca, dentre outros possíveis critérios. Para o presente estudo, foi utilizada a comparação dos valores de desvios padrão relativos calculados aos encontrados em literatura.

4.3.8.1 Repetibilidade

A repetibilidade representa o grau de concordância entre resultados de experimentos realizados sob as mesmas condições de medição, mesmos operadores e mesmo local, em curto intervalo de tempo. Para avaliar a repetibilidade do método, o número mínimo de repetições para cada nível de concentração é, comumente, entre seis e quinze.²³

De acordo com a RDC nº. 166/2017, a repetibilidade deverá ser avaliada utilizando “no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste”.

A repetibilidade é ilustrada pelo cálculo do Desvio Padrão Relativo, conforme Equação 9, e da estimativa da variância das medições (s^2), calculada conforme a seguir:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (IRK_i - \overline{IRK})^2}{n-1} \quad \text{Equação 12}$$

4.3.8.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária indica a precisão do método, sob as mesmas condições de medida, avaliada ao longo do tempo. Além do lapso temporal, a análise da precisão intermediária também pode incluir alterações de analistas e de equipamentos de forma a representar a variação dos resultados em um laboratório.²³

4.3.8.2 Reprodutibilidade ou Precisão Interlaboratorial

Trata-se da análise de precisão do método quando aplicado em outro laboratório e também pode ser medido pelo Desvio Padrão Relativo.²³

4.4 Planejamento Fatorial Fracionado

Conforme disposto na seção 4.3.3, o Planejamento Fatorial Fracionado pode ser usado como ferramenta para auxiliar na avaliação da robustez, já que permite alterar diversos fatores

de forma simultânea, reproduzindo com maior fidelidade as alterações da rotina de uso do método. São denominados *fatores* os parâmetros que podem ser variados durante o teste de robustez. Cada um dos fatores selecionados são testados em diferentes *níveis*: valores, para os casos quantitativos; classes, para fatores qualitativos.²⁵ Os planejamentos de dois níveis costumam representar os níveis alto e baixo com sinais de (+) e (-), respectivamente.²⁶

Um Planejamento Fatorial de dois níveis e n fatores, necessita de 2^n experimentos para avaliação de todas as variáveis. Para os casos em que a validação apresentar elevada quantidade de fatores, o que implicaria em um crescimento exponencial do número de experimentos requeridos, a técnica de Planejamento Fatorial Fracionado pode ser empregada.²⁵

A diminuição no número de experimentos proporcionada pelo Planejamento Fatorial Fracionado é possível devido a dois aspectos:

- Para a maioria dos casos experimentais, as interações de ordem elevada entre os fatores apresentam valores pequenos e não são estatisticamente relevantes;
- À medida em que o número de fatores aumenta, também aumenta a chance de algum dos fatores não exercer influência sobre a resposta.

Baseado no número de experimentos, é possível definir a quantidade de fatores que podem ser determinados de forma independente, pois um grau de liberdade sempre será utilizado para o cálculo da média, enquanto os demais serão utilizados para o cálculo dos fatores e de suas interações.²⁵

Para o presente estudo, cada condição experimental gerou como resposta os tempos de retenção de cada substância analisada. Por sua vez, os tempos de retenção foram utilizados para o cálculo dos Índices de Retenção de Kovats para cada uma das substâncias em questão, conforme Equação 3. Dessa forma, os efeitos analisados são baseados nos valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats.

A notação que descreve um Planejamento Fatorial Fracionado de n fatores de dois níveis e k experimentos pode ser descrita como 2^{n-x} , de tal forma que o resultado da operação seja o número de experimentos k , ou seja, $k = 2^{n-x}$. Em um planejamento fatorial completo, não existe a necessidade de confundir efeitos principais com interações. No caso de planejamentos fatoriais fracionados, o modo como os diferentes fatores e suas interações estão relacionados é definido por suas relações geradoras.

O número de fatores que compõem a relação geradora com menor número de fatores de um fatorial define a *Resolução do planejamento*.^{23,25} A Resolução de um Planejamento Fatorial pode ser definida como a menor ordem, acrescida da unidade, das interações que podem se confundir com os efeitos principais.

A Resolução representa a limitação imposta tanto pelo número de experimentos realizados (k) – pois só é possível avaliar $k-1$ fatores – quanto pela escolha do Planejamento Fatorial Fracionado que obriga a confundir fatores. Assim, quanto maior a Resolução, menos se confundem os efeitos principais, já que interações de ordem elevada são pouco frequentes em fenômenos naturais.

A Tabela 1 descreve os ensaios realizados no presente estudo e indica também a forma de selecionar as variações dos níveis alto e baixo para cada corrida para gerar a matriz do planejamento.

Tabela 1 – Planejamento Fatorial Fracionado das corridas cromatográficas.

		Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6
Corridas	Robustez 1	-1	-1	-1	-1	1	1
	Robustez 2	1	-1	-1	1	-1	-1
	Robustez 3	-1	1	-1	1	-1	1
	Robustez 4	1	1	-1	-1	1	-1
	Robustez 5	-1	-1	1	1	1	-1
	Robustez 6	1	-1	1	-1	-1	1
	Robustez 7	-1	1	1	-1	-1	-1
	Robustez 8	1	1	1	1	1	1

Com a finalidade de se estimar a variância dos efeitos, foram realizadas réplicas de cada uma das oito corridas. Assim sendo, o cálculo dos efeitos pode ser feito subtraindo-se a média dos resultados para as corridas de nível alto da média dos resultados para as corridas de nível baixo.

$$l = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \quad \text{Equação 13}$$

Onde y representa genericamente a resposta medida que, no presente trabalho, é o Índice de Retenção de Kovats.

No caso do planejamento em estudo, o cálculo dos fatores resulta na seguinte equação.

$$l = \frac{\bar{y}_{+1} + \bar{y}_{+2} + \bar{y}_{+3} + \bar{y}_{+4}}{4} - \frac{\bar{y}_{-1} + \bar{y}_{-2} + \bar{y}_{-3} + \bar{y}_{-4}}{4} \quad \text{Equação 14}$$

Onde \bar{y}_{+1} representa a média das replicatas da primeira linha do planejamento fatorial em que o fator avaliado apresenta nível alto. Analogamente, \bar{y}_{-1} representa a média das replicatas da primeira linha do planejamento fatorial em que o fator avaliado apresenta nível baixo e assim sucessivamente.

Assumindo-se que as medições são estatisticamente independentes e que possuem a mesma variância (s_y^2), a variância de um efeito (s_l^2) pode ser calculada por²⁵:

$$s_l^2 = \frac{s_y^2}{4} \quad \text{Equação 15}$$

Por sua vez, a variância das medidas (s_y^2) pode ser estimada com oito graus de liberdade por intermédio da variância agregada (do Inglês, *pooled*) de todas as variâncias calculadas em cada uma das condições experimentais.

$$s_y^2 = \frac{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2 + s_6^2 + s_7^2 + s_8^2}{8} \quad \text{Equação 16}$$

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do trabalho em questão foi desenvolvida no Serviço de Perícias de Laboratório e de Balística do Instituto Nacional de Criminalística do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal (SEPLAB/INC/PF), em Brasília.

Como tentativa inicial de enfrentamento do tema da identificação das Novas Substâncias Psicoativas, em 2014, previamente ao início deste projeto, o método denominado “Drogas Sintéticas” foi elaborado por Peritos Criminais Federais no SEPLAB, com base nos métodos descritos pelo Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) e era o método empregado nas análises de rotina pelo SEPLAB.

Para o desenvolvimento do método deste estudo, levou-se em consideração a disponibilidade de equipamentos nas demais Unidades Federativas do Brasil, além da dificuldade de aquisição de padrões analíticos, razão pela qual a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) por meio do Índice de Retenção de Kovats das substâncias foi selecionada.

Para aumentar a confiabilidade na identificação de substâncias utilizando CG/EM em diferentes locais, o método desenvolvido neste estudo foi validado com a utilização de mais de um equipamento de CG/EM e possui como propósito a implementação em outros laboratórios parceiros. As figuras de mérito avaliadas foram Seletividade, Robustez, Fator de Separação, Resolução, Número de Pratos Teóricos, Fator de Alargamento ou *Tailing*, Repetibilidade e Precisão Intermediária.

As figuras de mérito Resolução e Fator de Alargamento foram executadas pelo software *Chemstation* da *Agilent* em sua função *Performance Report*. O software emprega as Equações 5 e 7 para análise das variáveis, respectivamente.

Para a análise da Repetibilidade e por não haver alteração de concentrações no experimento realizado, optou-se pelo emprego de seis réplicas para sua avaliação, por meio do cálculo com a média do Índice de Retenção de Kovats, atendendo o preconizado na RDC nº. 166/2017 e na Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos do INMETRO.

A figura de mérito Precisão Intermediária foi avaliada por meio das Equações 9, 10, 11 e 12, realizando-se corridas cromatográficas em dias distintos e utilizando dois equipamentos de Cromatografia Gasosa *Agilent*, modelo 6890N acoplados à Espectrometria

de Massas *Agilent* modelo 5973 inert, denominados neste estudo de CGEM_A e CGEM_B. O primeiro cálculo da Precisão Intermediária envolveu a análise, em um mesmo equipamento, em dois dias diferentes. A segunda avaliação da Precisão Intermediária combinou corridas de dois equipamentos diferentes, em dias diferentes, com intervalo de tempo de três meses.

Para o presente estudo, optou-se por utilizar a figura de mérito Robustez como forma de avaliar as possíveis alterações efetuadas durante a implementação do método analítico por outras unidades periciais.

As diversas realidades dos centros de perícias brasileiros, por vezes não permitem a aquisição de equipamentos, colunas, amostras ou padrões analíticos dentro de determinadas especificações. Por isso, durante a análise da robustez, definiram-se fatores propensos a variações nos demais centros que utilizarão o método.

Foram selecionados seis fatores experimentais – marca e polaridade da coluna, fluxo do gás de arraste, temperatura do injetor e rampa de temperatura - considerados relevantes na resposta de cada substância em termos de índices de retenção. Para realizar um fatorial completo com seis fatores, um total de $2^6 = 64$ experimentos seriam necessários. A fim de obter uma estimativa experimental da variância dos fatores, optou-se pela implementação de um número de experimentos considerado mais razoável, por meio de um Planejamento Fatorial Fracionado com oito experimentos em duplicata, totalizando 16 experimentos, caracterizando assim, um planejamento do tipo 2^{6-3} em duplicata.

Para o presente estudo de seis fatores, as *relações geradoras* selecionadas foram **I=1234**, **I=125** e **I=136**. Isso significa afirmar que o cálculo da influência do fator 4, por exemplo, estará confundido com as interações de 3ª ordem entre os fatores 1, 2 e 3. De forma semelhante, o fator 5 estará confundido com a interação de 2ª ordem entre os fatores 1 e 2, enquanto o fator 6 estará confundido com a interação de 2ª ordem entre os fatores 1 e 3.

O menor termo das relações geradoras apresentadas acima contém três fatores e, por consequência, o planejamento implementado será de Resolução III e é representado pela notação 2_{III}^{6-3} . O conceito de Resolução de um Planejamento Fatorial é igual à menor ordem, acrescida da unidade, das interações que podem se confundir com os efeitos principais. No caso apresentado, o menor grau das interações que podem se confundir com um efeito principal é 2 e, portanto, a resolução é $2+1=3$.

5.1 Amostras utilizadas na etapa de desenvolvimento do método analítico

Para a etapa de comparação inicial entre o método “Drogas Sintéticas” com os novos métodos desenvolvidos durante este trabalho (Método01 e Método02), foram utilizados os seguintes padrões de referência certificados, que se encontravam disponíveis no SEPLAB.

- Anfetamina (fabricante Lipomed);
- MDMA (fabricante Lipomed);
- Cocaína (fabricante Inmetro);
- Heroína (fabricante Lipomed);;
- Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC) (fabricante Cerilliant);
- Metanfetamina *
- Mistura de *n*-alcanos (C₇H₁₆ a C₄₀H₈₄) (fabricante Sigma Aldrich).

*A amostra de metanfetamina utilizada foi sintetizada por Peritos Criminais Federais no SEPLAB.

Os compostos originalmente disponíveis em forma sólida foram dosados de acordo com as quantidades expostas na Tabela 2, abaixo. O solvente utilizado para todas as amostras foi o metanol.

Tabela 2 – Quantidades utilizadas para as substâncias sólidas durante a comparação entre os métodos.

Substância	Massa medida (mg)	Volume do solvente (mL)	Concentração (ppm)
Anfetamina	0,98	2,0	490
MDMA	0,50	1,0	500
Cocaína	0,50	1,0	500

Os padrões de metanfetamina, THC e da mistura de *n*-alcanos encontravam-se em solução. Para estes, a concentração final obtida foi de 200 ppm.

A solução padrão de heroína encontrava-se dissolvida em metanol com concentração de 272 ppm. Por isso, ela foi utilizada sem manipulação.

A escolha das substâncias acima relacionadas se deu por meio do pedido de colaboração do Hungarian Institute for Forensic Sciences.¹⁵

Além dos padrões analíticos, os padrões de trabalho utilizados durante o desenvolvimento do método analítico encontram-se relacionados na Tabela 3. Eles foram empregados no desenvolvimento dos Método03, Método04, Método05 e Método06, na validação do Método03 e na montagem do *Mix* de Drogas.

Padrões de trabalhos são amostras apreendidas na rotina policial da PF, que foram caracterizadas estruturalmente por técnicas analíticas independentes tais como CG/EM, CLAE-QTOF e RMN, o que os torna aptos a configurarem como referência em análises.

A seleção dos padrões de trabalho levou em conta a disponibilidade de amostras no SEPLAB e teve como objetivo incluir o maior número de classes de NSP possível, além de abranger a janela de tempos de retenção mais ampla possível no cromatograma.

Tabela 3 – Seleção de substâncias e suas medidas para etapa de aperfeiçoamento inicial do método.

Substância	Apresentação	Classe de NSP	Massa medida (mg)	Volume de Solvente (mL)	Concentração do ativo (ppm)
<i>Salvia Divinorum</i>	Vegetal	Origem vegetal	152,40	1,0	≈ 373 ¹⁴
Metiopropamina	Pó	Outras	0,60	1,5	400
5-IAI	Pó	Aminoindano	0,53	1,0	540
5-MeO-MiPT	Pó	Triptamina	0,72	1,5	480
25C-NBOMe	Pó	Feniletilaminas	0,32	1,0	320
AM-2201	Vegetal	Canabinoide sintético	50,75	1,5	Não se aplica
JWH-081	Vegetal	Canabinoide sintético	51,97	1,5	Não se aplica
Etilona	Pó	Canabinoide sintético	0,53	1,0	530
Efedrina	Cristais	Clássica	0,55	1,5	367
TFMPP macerado	Comprimido	Piperazina	32,53	1,0	Não se aplica
TFMPP lavado	Comprimido		5,81	1,0	Não se aplica

É importante destacar que a concentração média do ativo (Salvinorina A) para a amostra vegetal de *Salvia Divinorum* foi estimada com base na literatura científica¹⁴

O processo de produção dos canabinoides sintéticos, no qual o sólido ativo é dissolvido e pulverizado em uma matriz vegetal, impede o cálculo da concentração do ativo para as substâncias JWH-081 e AM-2201, baseado apenas na massa medida de matéria vegetal.

Adversidade semelhante se apresenta para o cálculo da concentração de TFMPP em seus comprimidos. O comprimido de cor rosa apreendido pela PF possui lidocaína, além da piperazina. Dessa forma, para avaliar sua possível interferência, parte de uma amostra foi lavada com acetona para retirada da lidocaína (TFMPP lavado) e parte da amostra foi diluída após maceração (TFMPP macerado).

5.2 Amostras utilizadas na mistura (*Mix*) de Drogas para o desenvolvimento e validação do método analítico

A etapa seguinte ao aperfeiçoamento inicial do método analítico foi a elaboração de uma mistura (*Mix*) de drogas para que se pudesse prosseguir com a otimização do método e com sua validação.

Os critérios de escolha das substâncias selecionadas para compor o *Mix* foram a disponibilidade, à época, de padrões de trabalho no SEPLAB e a varredura completa da janela cromatográfica do método, além da casuística de apreensões da Polícia Federal, disponível em relatório de atividades do GT.⁴ A listagem dos padrões de trabalho não quantificados das substâncias selecionadas está disposta na Tabela 4.

Tabela 4 – Seleção de substâncias e suas quantidades utilizadas para etapa de montagem do *Mix* de drogas.

Substância	Apresentação	Classe	Quantidade medida
THC	Solução 192 ppm	Droga Clássica	2 mL
AM-2201	Vegetal	Canabinoide sintético	67,55 mg
<i>Salvia Divinorum</i>	Vegetal	Origem vegetal	148,27 mg
MAM-2201	Vegetal	Canabinoide sintético	71,91 mg
JWH-081	Vegetal	Canabinoide sintético	36,25 mg
Heroína	Pó	Droga Clássica	0,59 mg

Substância	Apresentação	Classe	Quantidade medida
Anfetamina	Pó	Droga Clássica	0,45 mg
MDMA	Pó	Droga Clássica	0,98 mg
5- MAPB	Pó	Feniletilamina	0,83 mg
2-FA	Pó	Feniletilamina	0,92 mg
Cocaína	Pó	Droga Clássica	0,75 mg
U-47700	Pó	Opioide	0,60 mg
p-CPP	Pó	Piperazina	0,96 mg
o-CPP	Pó	Piperazina	1,00 mg
Metiopropamina	Pó	Outras	0,76 mg
5-MeO-MiPT	Pó	Triptamina	0,88 mg
5-IAI	Pó	Aminoindano	0,98 mg
N-etilpentilona	Pó	Catinona sintética	1,16 mg
Efedrina	Cristais	Droga Clássica	1,3 mg
25C-NBOMe	Pó	Feniletilamina	1,39 mg
Metanfetamina	Pó	Droga Clássica	0,42 mg

5.3 Equipamentos

Todas as análises foram executadas em equipamentos de cromatografia gasosa *Agilent*, modelo 6890N, com injeção automática e volume de injeção de 0,2 μ L, *liner inert Agilent* do tipo *split* acoplado a espectrômetro de massas *Agilent* modelo 5973 inert, detector do tipo quadrupolo linear.

Durante o período inicial de desenvolvimento (no qual houve a comparação entre os métodos), não havia equipamento dedicado no SEPLAB ao presente trabalho, de forma que sua escolha era baseada na disponibilidade.

Assim, as corridas com o método “Drogas Sintéticas” e com o método indicado pelo Hungarian Institute for Forensic Sciences (denominado neste trabalho de Método01) foram executadas utilizando a coluna da marca Restek Rxi-5Sil MS Crossbond ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane) de dimensões 30m x 0,25 mm x 0,25µm.

As demais análises da etapa de desenvolvimento dos métodos foram conduzidas com a coluna da marca *Agilent* HP-5 MS ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane) de dimensões 30m x 0,25 mm x 0,25µm. É importante destacar que se tratam de duas colunas de polaridades e dimensões idênticas que diferem apenas pela marca do fabricante.

Para a etapa de validação do método analítico a coluna cromatográfica utilizada foi variada, de forma a abarcar as duas marcas disponíveis (*Agilent* e *Restek*) e as duas possibilidades de polaridades: polaridade mais baixa (100% Dimetilpolisiloxano) e polaridade mais alta (equivalente a (5%-Fenil)-metilpolisiloxano).

5.4 Métodos

5.4.1. Método “Drogas Sintéticas”

Este método foi desenvolvido previamente a este trabalho por um grupo de Peritos Criminais Federais no SEPLAB.

Gás de arraste: hélio, 1,1 mL/min, fluxo constante.

Taxa de split 10:1.

Temperatura do injetor: 250 °C.

Temperatura da interface: 280 °C.

Rampa de temperatura: 12 °C/min de 100 °C até 300 °C + isoterma de 300°C por 10 min. (tempo total: 26,67 minutos).

Coluna: Restek Rxi-5Sil MS Crossbond.

Espectrômetro de massas - *mass range*: 30 – 550 *m/z*.

5.4.2 Método01¹⁵

Este método foi implementado utilizando os parâmetros fornecidos pelos peritos húngaros Tamás Csesztregi e Dávid Boros do Hungarian Institute for Forensic Sciences, conforme apresentado no *23rd annual meeting of ENFSI Drugs Working Group*.

Gás de arraste: Hélio, 1,3 mL/min, fluxo constante.

Taxa de split 40:1.

Temperatura do injetor: 300 °C.

Temperatura da interface: 280 °C.

Rampa de temperatura: 10 °C/min de 80 °C até 315 °C + isoterma de 315 °C por 5 min. (tempo total: 28,50 minutos).

Coluna: Restek Rxi-5Sil MS Crossbond.

Espectrômetro de massas - *mass range*: 35 – 500 *m/z*.

5.4.3 Método02

Para possibilitar a identificação dos sinais das substâncias MDMA e metanfetamina, a taxa de Split do Método01 foi reduzida para o Método02.

Gás de arraste: Hélio, 1,1 mL/min, fluxo constante.

Taxa de split 20:1.

Temperatura do injetor: 300 °C.

Temperatura da interface: 300 °C.

Rampa de temperatura: 10 °C/min de 80 °C até 315 °C + isoterma de 315 °C por 15 min. (tempo total: 38,50 minutos).

Coluna: *Agilent* HP-5 MS.

Espectrômetro de Massas - *mass range*: 35 – 500 *m/z*.

5.4.4 Método03

Com o objetivo de melhorar a resolução dos pares de sinais das substâncias anfetamina, 2-Fa e 5-MAPB, MDMA e de tentar separar a coeluição da metiopropamina com a metanfetamina, uma isoterma de 70°C foi inserida no início da corrida do “Método02”.

Essa escolha foi realizada em decorrência do método elaborado pelo Polícia Federal denominado “Fat Burner”, desenvolvido especificamente para identificação de moléculas similares às anfetaminas, presentes em produtos termogênicos e que eluem no início das corridas e representam um desafio em sua identificação durante a rotina pericial.

Para o método “Método03” o tempo utilizado na isoterma inicial adicionada foi de 2 minutos.

Gás de arraste: hélio, 1,1 mL/min, fluxo constante.

Taxa de split 20:1.

Temperatura do injetor: 300 °C.

Temperatura da interface: 300 °C.

Rampa de temperatura: isoterma de 70°C por 2 min + rampa de 10 °C/min de 70 °C até 315 °C + isoterma de 315 °C por 15 min. (tempo total: 41,50 minutos).

Coluna: *Agilent* HP-5 MS.

Espectrômetro de Massas - *mass range*: 35 – 500 *m/z*.

5.4.5 Método04

Para este método, uma isoterma de 70°C também foi inserida no início da corrida do “Método02”, por 5 minutos.

Gás de arraste: Hélio, 1,1 mL/min, fluxo constante.

Taxa de split 20:1.

Temperatura do injetor: 300 °C.

Temperatura da interface: 300 °C.

Rampa de temperatura: isoterma de 70°C por 5 min + rampa de 10 °C/min de 70 °C até 315 °C + isoterma de 315 °C por 15 min. (Tempo total: 44,50 minutos).

Coluna: *Agilent* HP-5 MS.

Espectrômetro de Massas - *Mass range*: 35 – 500 *m/z*.

5.4.6 Método05

Para este método, a rampa de temperatura do “Método03” foi alterada, de forma a minimizar o aquecimento. Ou seja, até 150°C, a taxa de aumento da temperatura foi reduzida de 10 °C/min para 5 °C/min, o que poderia implicar melhor separação dos sinais de menores tempos de retenção.

Gás de arraste: hélio, 1,1 mL/min, fluxo constante.

Taxa de split 20:1.

Temperatura do injetor: 300 °C.

Temperatura da interface: 300 °C.

Rampa de temperatura: 5 °C/min de 70 °C até 150 °C + 10 °C/min de 150 °C até 315 °C + isoterma de 315 °C por 15 min. (tempo total: 47,50 minutos).

Coluna: *Agilent* HP-5 MS.

Espectrômetro de Massas - *mass range*: 35 – 500 *m/z*.

5.4.7 Método06

A rampa de temperatura do “Método06” reproduz o modelo do “Método05”. No entanto, uma isoterma de 2 min a 70° foi adicionada no início da corrida.

Gás de arraste: Hélio, 1,1 mL/min, fluxo constante.

Taxa de split 20:1.

Temperatura do injetor: 300 °C.

Temperatura da interface: 300 °C.

Rampa de temperatura: isoterma de 70 °C por 2 min + 5 °C/min de 70 °C até 150 °C + 10 °C/min de 150 °C até 315 °C + isoterma de 315 °C por 15 min. (Tempo total: 49,50 minutos).

Coluna: *Agilent* HP-5 MS.

Espectrômetro de Massas - *Mass range*: 35 – 500 *m/z*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento do método analítico

Após receber solicitação formalizada no *23rd annual meeting of ENFSI Drugs Working Group* de avaliação de reprodutibilidade do método desenvolvido pelos peritos húngaros Tamás Csesztregi e Dávid Boros no Hungarian Institute for Forensic Sciences, os métodos “Drogas Sintéticas” e “Método01” foram testados com padrões analíticos certificados das substâncias anfetamina, MDMA, metanfetamina, cocaína, heroína, Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC) e mistura de *n*-alcanos.

Foi observado que o método “Método01” apresentou sinais de qualidade extremamente baixa para a metanfetamina e o MDMA, possivelmente devido à elevada taxa de Split do método (40:1), enquanto o método “Drogas Sintéticas” apresentou sinais de baixa abundância para esses compostos, conforme Figura 1.

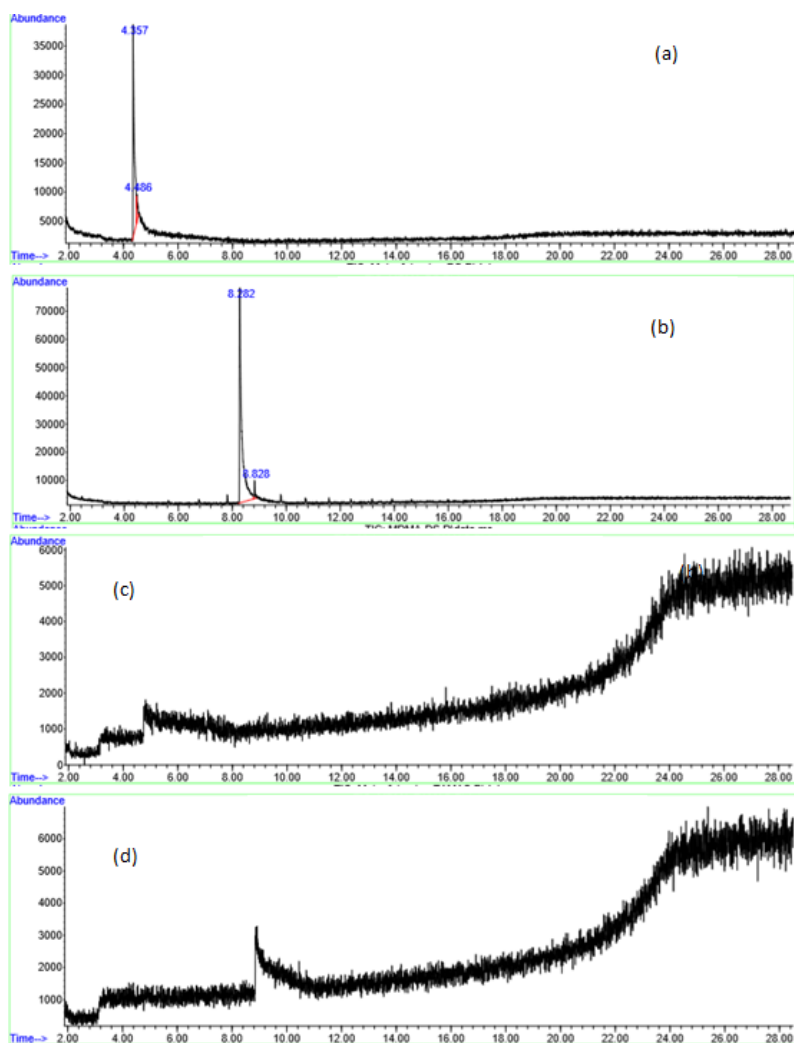


Figura 1: Cromatogramas comparativos.
(a) Amostra de metanfetamina, em metanol, com o método “Drogas Sintéticas”.
(b) Amostra de MDMA, em metanol, com o método “Drogas Sintéticas”.
(c) Amostra de metanfetamina, em metanol, utilizando o método “Método01”.
(d) Amostra de MDMA, em metanol, utilizando o método “Método01”.

Para contornar o problema apresentado, o método “Método01” teve a sua taxa de split alterada de 40:1 para 20:1. Para prosseguir com a melhoria do método e para evitar que a temperatura da interface permanecesse inferior à temperatura do injetor, seu valor foi elevado de 280 °C para 300 °C. Semelhantemente, o tempo da isoterma ao final da corrida foi ampliado de 5 minutos para 15 minutos e o fluxo do gás de arraste foi igualado àquele do método “Drogas Sintéticas”, ou seja, deixou de ser 1,3 mL/min e passou a ser 1,1 mL/min. Essas alterações deram origem ao método “Método02”.

Depois de verificar que o novo método (“Método02”) era capaz de detectar sinais para as substâncias metanfetamina e MDMA, além das demais substâncias testadas (anfetamina, cocaína, heroína, THC e mistura de *n*-alcanos), iniciou-se a etapa de avaliação dos resultados obtidos para os três métodos de forma a permitir a escolha de um método a ser aperfeiçoado.

Os cromatogramas obtidos com os três métodos para as substâncias analisadas podem ser consultados no ANEXO 1.

Com a finalidade de analisar as respostas oferecidas pelos métodos, as seguintes figuras de mérito foram verificadas:

- Fator de Separação;
- Resolução;
- Eficiência;
- Fator de alargamento ou *Tailing*;

6.1.1 Fator de Separação

Essa figura de mérito foi calculada apenas para a solução padrão de *n*-alcanos, para os cromatogramas obtidos com os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”, pois é necessário comparar dois sinais diferentes em seu cálculo e os cromatogramas dos demais padrões não apresentavam essa possibilidade, por se tratarem de picos únicos advindos de substâncias puras.

Isto posto, após contabilização dos valores para todos os pares de sinais subsequentes, o menor valor obtido, ou seja, aquele que representa o pior fator de separação para cada método foi selecionado e inserido a seguir, na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores calculados para o fator de separação para solução padrão de *n*-alcanos utilizando os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”.

Método	Menor valor de Fator de Separação	Alcanos correspondentes
Drogas Sintéticas	1,040	C ₂₅ H ₅₂ e C ₂₆ H ₅₄ C ₂₆ H ₅₄ e C ₂₇ H ₅₆
Método01	1,036	C ₂₇ H ₅₆ e C ₂₈ H ₅₈
Método02	1,025	C ₃₄ H ₇₀ e C ₃₅ H ₇₂ C ₃₅ H ₇₂ e C ₃₆ H ₇₄

É possível observar que o método “Drogas Sintéticas” apresentou o maior valor para o fator de separação, apesar de não haver diferença elevada entre os valores para os outros métodos.

6.1.2 Resolução

O cálculo da resolução, conforme Equação 5, levou em consideração os picos cromatográficos vizinhos ao pico de interesse. Por esse motivo, assim como para o fator de separação, a resolução somente foi calculada para a mistura de *n*-alcanos, onde cada pico apresentou um valor de resolução calculado.

Para comparar os métodos, o sinal cromatográfico que apresentou menor valor calculado de resolução foi selecionado para compor a Tabela 6, porquanto esse valor indica o sinal de pior resolução para determinado método.

Tabela 6 – Valores calculados de resolução para solução padrão de *n*-alcanos utilizando os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”.

Método	Menor valor de Resolução	Alcano correspondente	Número de sinais na corrida
Drogas Sintéticas	16,46	C ₂₉ H ₆₀	20
Método01	16,83	C ₂₈ H ₅₈	20
Método02	10,86	C ₃₉ H ₈₀	31

Segundo Collins e colaboradores, valores de resolução superiores a 1,5 indicam separação completa da mistura.¹⁹ Por consequência, todos os métodos foram capazes de

separar os sinais da mistura de *n*-alcanos. O método “Método01” apresentou o maior valor para a figura de mérito resolução.

6.1.3 Número de Pratos Teóricos

Para a montagem da coluna referente aos *n*-alcanos da Tabela 7, levou-se em consideração o pico de menor valor de número de pratos teóricos calculado com o objetivo de evidenciar o sinal mais crítico da corrida.

Tabela 7 – Valores calculados de número de pratos teóricos para solução padrão de *n*-alcanos e para padrões das drogas utilizando os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”.

Método	Número de Pratos Teóricos ($\times 10^5$)						
	<i>n</i> -alcanos	Anfetamina	MDMA	Metanfetamina	Cocaína	Heroína	THC
Drogas Sintéticas	1,78 (C ₁₀ H ₂₂)	1,26	4,14 x 10 ⁻³	1,37	81,5	119	116
Método01	1,20 (C ₁₀ H ₂₂)	0,489	Não detectou	Não detectou	51,2	113	109
Método02	1,78 (C ₁₁ H ₂₄)	3,90	14,1	5,46	66,0	101	106

A partir dos dados apresentados, verifica-se que os valores mais altos da figura de mérito número de pratos teóricos ocorreram para o método “Drogas Sintéticas”, para as substâncias cocaína, heroína e THC. Para as substâncias anfetamina, MDMA e metanfetamina, o método que apresentou valores mais altos de número de pratos teóricos foi o “Método02”.

Segundo Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods do FDA, o Número de Pratos Teóricos de um método deve ser superior a 2.000.²⁷ Ou seja, todos os resultados obtidos com os referidos métodos e dispostos na Tabela 7 são satisfatórios.

6.1.4 Fator de alargamento ou *Tailing*

Para a construção da coluna da Tabela 8 relacionada à mistura de *n*-alcanos foram selecionados os maiores e menores valores de *tailing* dentre todos os sinais do cromatograma, de sorte que foi avaliado quão afastado da unidade os valores calculados se encontravam.

Tabela 8 – Valores calculados de fator de alargamento ou *tailing* para solução padrão de *n*-alcanos e para padrões das drogas utilizando os métodos “Drogas Sintéticas”, “Método01” e “Método02”.

Método	<i>Tailing</i>						
	<i>n</i> -alcanos	Anfetamina	MDMA	Metanfetamina	Cocaína	Heroína	THC
Drogas Sintéticas	Maior <i>tailing</i> : 1,44 (C ₁₀ H ₂₂) Menor <i>tailing</i> : 0,95 (C ₁₄ H ₃₀)	5,41	6,19	5,48	1,13	1,30	1,06
Método01	Maior <i>tailing</i> : 1,29 (C ₁₃ H ₂₈) Menor <i>tailing</i> : 0,95 (C ₂₈ H ₅₈)	7,06	Não detectou	Não detectou	1,35	1,22	1,10
Método02	Maior <i>tailing</i> : 1,25 (C ₁₀ H ₂₂) Menor <i>tailing</i> : 0,99 (C ₃₀ H ₆₂)	1,62	1,86	1,33	0,95	1,10	0,95

Ao analisar os valores da Tabela 8, verifica-se que o “Método02” apresentou valores mais próximos à unidade, representando assim o método com os melhores resultados para a figura de mérito em questão.

6.1.5 Avaliação conjunta das figuras de mérito

Para selecionar um dos três métodos avaliados inicialmente, as figuras de mérito descritas acima foram avaliadas em conjunto.

O método “Drogas Sintéticas” apresentou os melhores resultados de **Fator de Separação** para a mistura de *n*-alcanos e de **Número de Pratos Teóricos** para as substâncias cocaína, heroína e THC. Já o “Método02” apresentou melhores valores de **Tailing** para todas as substâncias avaliadas e de **Número de Pratos Teóricos**, para as corridas que utilizaram anfetamina, metanfetamina e MDMA.

Vale ressaltar que os valores obtidos para a figura de mérito **Número de Pratos Teóricos**, em cada um dos métodos, quando analisada para as substâncias cocaína, heroína e THC, apresentaram-se com a mesma ordem de grandeza, sugerindo que as diferenças numéricas observadas são pouco significativas.

Contudo, ao se analisar a mesma figura de mérito para as substâncias anfetamina, metanfetamina e MDMA, é possível observar significativa diferença entre os valores obtidos, evidenciando melhores resultados para o “Método02”.

Assim, o “Método02” foi selecionado para a continuidade deste trabalho, por ter gerado resultados satisfatórios para a mistura de *n*-alcanos, bem como, por ter apresentado diferenças significativas na comparação entre os padrões de drogas, conforme exposto anteriormente.

6.2 Aperfeiçoamento do método analítico “Método02”

Após a seleção do método de partida “Método02”, passou-se a utilizar o *Mix* de drogas para aperfeiçoamento e validação do método.

Os cromatogramas do *Mix de drogas* e de sua sobreposição com o cromatograma da mistura padrão de *n*-alcanos, utilizando o “Método02”, estão representados no ANEXO 2.

Os Índices de Retenção de Kovats lineares calculados para as componentes do *Mix* com base na Equação 3 estão dispostas na Tabela 9.

Tabela 9 – Relação das substâncias utilizadas no *Mix* de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método02” e os Índices de Retenção de Kovats calculados.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Índice de Retenção de Kovats
Anfetamina	3,080	1123
2-FA	3,117	1127
Metiopropamina	3,647	1180
Metanfetamina	3,647	1180
Efedrina	5,786	1369
5-MAPB	7,607	1524
MDMA	7,653	1528
o-CPP	8,628	1613
5-IAIM	8,974	1644
p-CPP	9,997	1737
<i>N</i> -etilpentilona	11,727	1907
5-MeO-MIPT	14,244	2178
Cocaína	14,709	2232
U-47700	16,527	2454
THC	16,997	2514
25C-NBOME	17,660	2601
Heroína	18,256	2683
Salvinorina	21,278	3133
Salvinorina	21,950	3243
AM-2201	22,502	3335
JWH-210	23,025	3425
MAM2201	23,366	3486

Substância	Tempo de Retenção (min)	Índice de Retenção de Kovats
JWH-081	23,556	3518

É importante destacar que a amostra de AM-2201, componente do *Mix*, quando injetada de forma isolada, apresentou dois sinais: um pico referente ao AM-2201 e outro, de maior tempo de retenção, referente ao JWH-210, conforme representado na Figura 2.

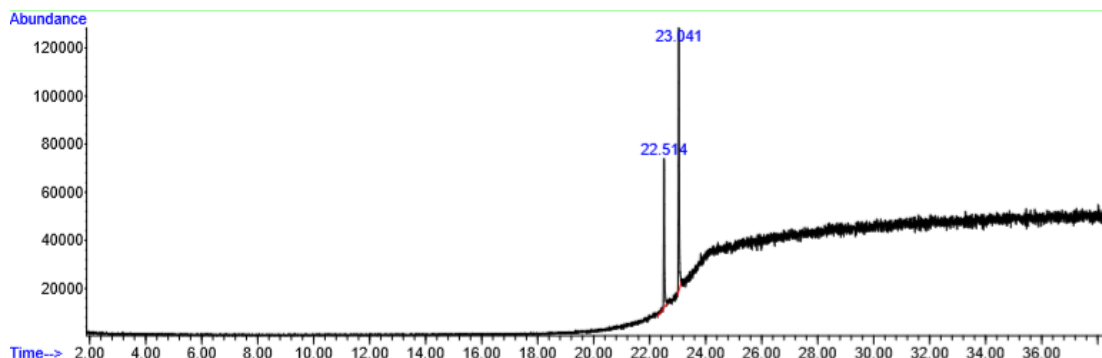


Figura 2 – Cromatograma utilizando o método “Método02” do AM2201, em metanol, evidenciando sinal de JWH-210 de tempo de retenção 23.041 minutos.

De forma semelhante, durante a análise do padrão de trabalho isolado de *Salvia Divinorum*, que também integra o *Mix*, um cromatograma com diversos sinais foi obtido, conforme Figura 3. Sabe-se que esse vegetal possui diversos tipos de ativos, como Salvinorina A – com maior atividade psicoativa – e Salvinorina B, Salvinorina C, entre outras.¹⁴

No momento da pesquisa, o SEPLAB não contava com padrões para cada um dos tipos de Salvinorinas. Por esse motivo, essas substâncias serão genericamente referidas neste trabalho como “Salvinorinas”. O agrupamento proposto não interfere nos resultados, pois o foco do estudo é avaliar a possibilidade de atribuição de Índices de Retenção de Kovats às substâncias do *Mix*.

Isto posto a análise do *Mix* de drogas possibilitou a avaliação de um total de 23 substâncias diferentes.

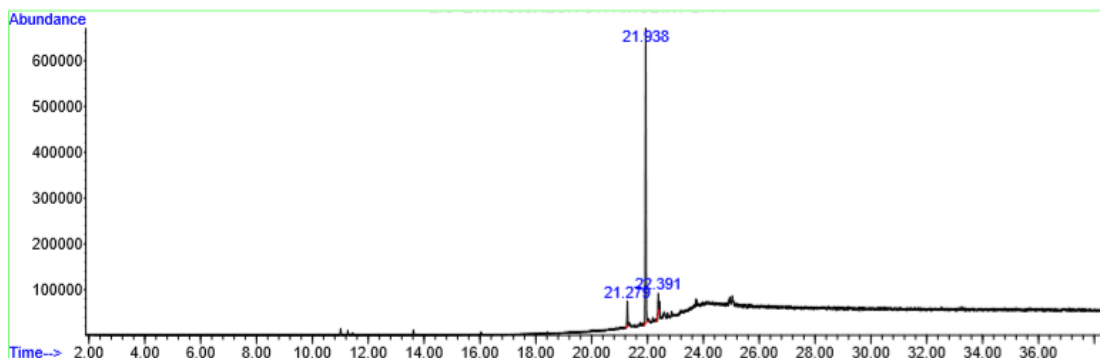


Figura 3 – Cromatograma da amostra extraída das folhas de *Salvia Divinorum* com metanol utilizando o método “Método02”.

Durante avaliação do cromatograma do *Mix* de drogas, observou-se que o “Método02” não apresentou resolução suficiente para separar totalmente ($R > 1,5$) os pares de sinais de tempos de retenção 3,080min/3,117min (anfetamina/2-FA) com $R = 1,32$ e 7,607min/7,653min (5-MAPB/MDMA) com $R = 1,24$, amplificado na Figura 4.

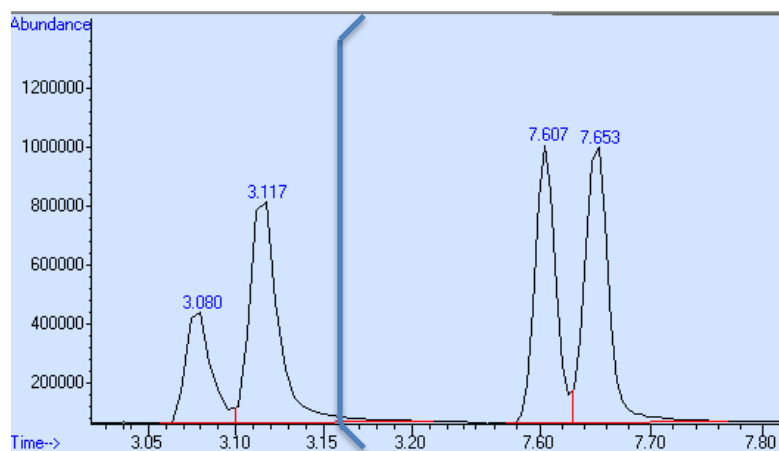


Figura 4 – Ampliações de dois momentos do cromatograma: os pares de sinais de tempos de retenção 3,080min/3,117min e 7,607min/7,653min, utilizando o método “Método02”

Outrossim, foi detectada coeluição de duas substâncias de fórmulas estruturais similares: a metiopropamina e a metanfetamina. O sinal referente às substâncias apresentou tempo de retenção de 3,647min e está indicado na Figura 5, bem como a lista das sugestões feitas pela biblioteca eletrônica e suas estruturas moleculares e o espectro de massas do referido sinal.

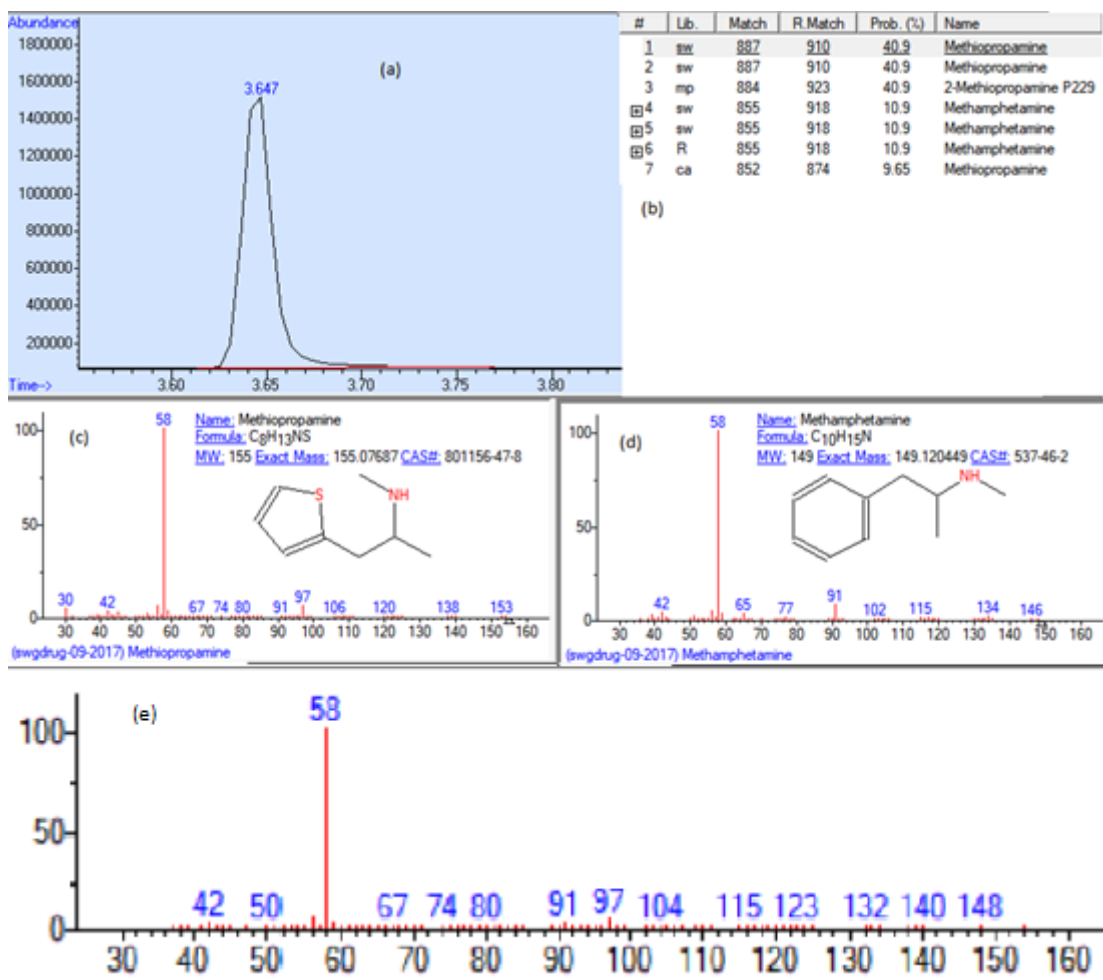


Figura 5 – Especificações da coeluição. (a) Ampliação do sinal cromatográfico indicativo da coeluição da metiopropamina e da metanfetamina. (b) Lista de sugestões de componentes gerada pelo software *Chemstation*. (c) Espectro de massas e fórmula estrutural da metiopropamina. (d) Espectro de massas e fórmula estrutural da metanfetamina. (e) Espectro de massas do sinal da coeluição.

O cálculo da resolução para os pares de sinais das substâncias anfetamina/2-FA e 5-MAPB/MDMA obtidos com o “Método02” resultou em valores de 1,32 e 1,24, respectivamente. Buscando separar o sinal da metanfetamina e metiopromamina e com o objetivo de melhor resolver os sinais iniciais da corrida, foram desenvolvidos os métodos “Método03”, “Método04”, “Método05” e “Método06”.

A Figura 6 evidencia a melhoria na resolução dos picos iniciais, agora com tempos de retenção 5,100min/5,162min (anfetamina/2-FA) e 10,529min/10,578min (5-MAPB/MDMA), antes não bem resolvidos, após implementação do novo método (“Método03”). Os novos valores calculados de resolução são 1,93 e 1,27, evidenciando melhora nos resultados, comparando-se ao método anterior.

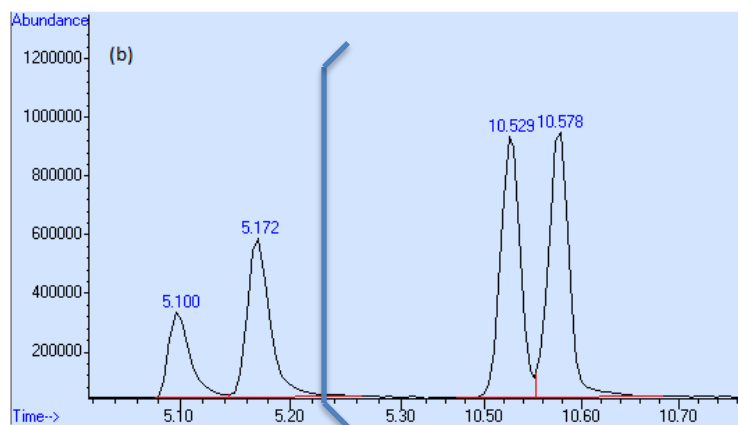


Figura 6 –Ampliações de dois momentos do cromatograma: os pares de sinais de tempos de retenção 5,100min/5,162min (anfetamina/2-FA) e 10,529min/10,578min (5-MAPB/MDMA), utilizando o método “Método03”.

No entanto, a isoterma de temperatura de 70° C não foi suficiente para separar o sinal da metiopropamina coeluída com a metanfetamina, agora com tempo de retenção de 5,934min. Apesar de a identificação dessas moléculas não poder ser realizada por meio do Índice de Retenção de Kovats, a detecção por espectrometria de massas permite a identificação de ambas as estruturas, a partir de seus padrões de fragmentação. Ainda assim, é importante salientar que a metiopropamina e a metanfetamina não são substâncias comumente encontradas em misturas apreendidas, o que torna o impacto da coeluição ainda menor.

Os cromatogramas obtidos empregando-se os métodos “Método03” e “Método04” para o *Mix* de drogas estão disponíveis no ANEXO 3.

Resultado semelhante de resolução foi obtido com o método “Método04” ($R = 1,42$ e $R = 1,29$), ou seja, não foi alcançado ganho considerável de resolução dos picos iniciais, enquanto houve aumento no tempo total da corrida. A aproximação dos sinais pode ser consultada na Figura 7. Por esse motivo, o método “Método03” foi considerado mais adequado, ao se comparar com o “Método04”.

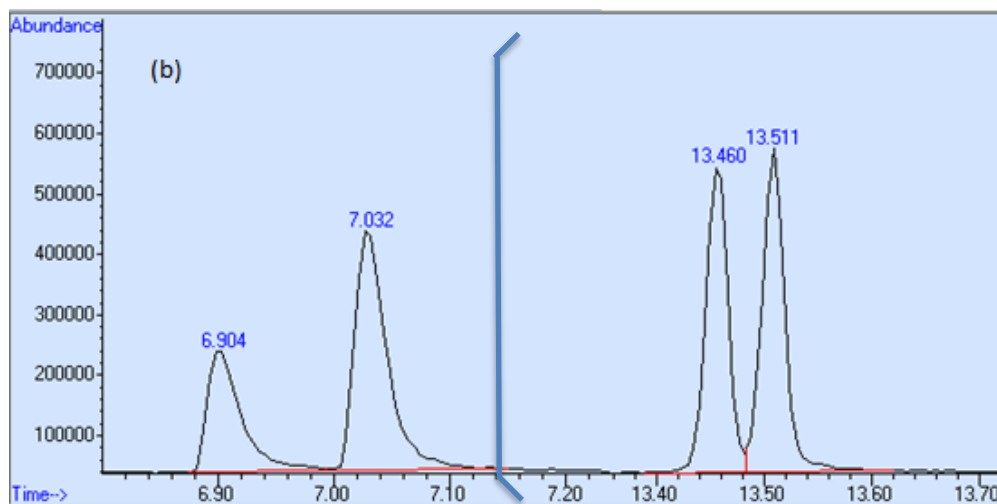


Figura 7 – Ampliações de dois momentos do cromatograma: os pares de sinais de tempos de retenção 6,904min/7,032min (anfetamina/2-FA) e 13,460min/13,511min (5-MAPB/MDMA), utilizando o método “Método04”.

A alteração da rampa de temperatura gerou os métodos “Método05” e “Método06”. No entanto, respostas análogas às obtidas com o método “Método04” foram obtidas. Ou seja, não houve melhora relevante na resolução da separação dos dois pares de picos, além de os métodos não terem solucionado a coeluição da metiopropamina e metanfetamina. Os cromatogramas obtidos com os métodos “Método05” e “Método06” para o Mix de drogas estão dispostos no ANEXO 4.

Ao comparar o tempo total do experimento, para evitar gastos de gás de arraste, de energia, dentre outros, e para reduzir o tempo de análise, a escolha pelo método “Método03” foi mantida, já que apresentou valores de Resolução superiores 1,25 para ambos os pares de sinais associado à otimização do tempo total da corrida.

Tabela 10 – Relação dos valores calculados de Resolução dos pares de substâncias anfetamina/2-FA e 5-MAPB/MDMA para os métodos avaliados.

Método	Resolução anfetamina/2-FA	Resolução 5-MAPB/MDMA	Tempo total de corrida (min)
02	1,32	1,24	38,50
03 (selecionado)	1,93	1,27	41,37
04	1,42	1,29	44,37
05	1,48	1,52	47,50
06	2,26	1,55	49,50

6.3 Utilização do método selecionado “Método03” para verificação dos Índices de Retenção de Kovats

O cromatograma da corrida da mistura de *n*-alcanos utilizando o método selecionado (“Método03”) está representado no Anexo 5, sobreposto ao cromatograma do *Mix* de drogas. Por meio do Anexo 5 e da Figura 30, é possível observar que a substância JWH-081, componente do *Mix* possui maior tempo de retenção no valor de $t_R = 26,553$, evidenciando a possibilidade de redução do tempo total do “Método03” de 41,37 min para 35,00 min, mantendo, ainda, uma margem de segurança.

A Tabela 11 lista os tempos de retenção e os Índices de Retenção de Kovats calculados com o novo método. Para sua elaboração, a função Autointegrate do software *Chemstation* foi utilizada.

Tabela 11 – Relação das substâncias utilizadas no *Mix* de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e os Índices de Retenção de Kovats calculados.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Índice de Retenção de Kovats
Anfetamina	5,100	1123
2-FA	5,172	1128
Metiopropamina Metanfetamina	5,934	1180
Efedrina	8,568	1370
5-MAPB	10,529	1526
MDMA	10,578	1539
o-CPP	11,578	1615
5-IAI	11,927	1647
p-CPP	12,952	1740
<i>N</i> -etilpentilona	14,720	1912
5-MeO-MiPT	17,219	2180
Cocaína	17,707	2238
U-47700	19,523	2460
THC	19,994	2520
25C-NBOMe	20,651	2607
Heroína	21,251	2689
Salvinorina	24,274	3142
Salvinorina	24,941	3251
AM-2201	25,497	3301

Substância	Tempo de Retenção (min)	Índice de Retenção de Kovats
JWH-210	26,021	3435
MAM-2201	26,364	3496
JWH-081	26,553	3528

6.4 Validação do método

6.4.1 Seletividade

Durante a análise do *Mix* de drogas, foi identificado apenas uma limitação de seletividade relacionada à coeluição da metiopropamina com a metanfetamina, conforme disposto na Figura 5. Apesar de a identificação das moléculas não poder ser realizada por meio do Índice de Retenção de Kovats, a detecção por espectrometria de massas permite que ambas as moléculas sejam identificadas a partir de seus padrões de fragmentação. É por esse motivo que o *software* indicou como provável *match* as duas moléculas para o sinal em questão.

Cabe destacar que a metiopropamina e a metanfetamina não são substâncias comumente encontradas em misturas apreendidas, o que torna o impacto da coeluição ainda menor.

6.4.2 Limite de Detecção

Para o presente estudo, a figura de mérito limite de detecção não pode ser estimada, pois os padrões de trabalho utilizados para o desenvolvimento e a validação do método não passaram pela etapa de quantificação. Por isso, não foi possível calcular as concentrações utilizadas para montagem do *Mix* de drogas de alguns compostos e, conseqüentemente, avaliar a menor quantidade detectável pelo método.

A ausência dessa figura de mérito não será impactante ao trabalho, por se tratar de um método qualitativo. É importante destacar que o método selecionado é capaz de operar ao se empregar as concentrações habituais de amostragem das apreensões, de forma que a ausência da informação do limite de detecção do método não acarretará em prejuízos ao analista.

6.4.3 Fator de Separação

A figura de mérito fator de separação foi calculada para o *Mix* de drogas, utilizando o “Método03”. Os valores para os pares de sinais estão representados na Tabela 12, obtidos por meio da Equação 4, utilizando os tempos de retenção brutos: $\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$.

Tabela 12 – Valores calculados para o fator de separação para o *Mix* de drogas utilizando o “Método03”.

Substância	Fator de Separação
Anfetamina / 2-FA	1,014
2-FA / Metiopropamina-Metanfetamina	1,147
Metiopropamina Metanfetamina / Efedrina	1,444
Efedrina / 5-MAPB	1,229
5-MAPB / MDMA	1,005
MDMA / o-CPP	1,095
o-CPP / 5-IAI	1,030
5-IAI / p-CPP	1,086
p-CPP / N-etilpentilona	1,137
N-etilpentilona / 5-MeO-MiPT	1,170
5-MeO-MiPT / Cocaína	1,028
Cocaína / U-47700	1,103
U-47700 / THC	1,024
THC / 25C-NBOMe	1,033
25C-NBOMe / Heroína	1,029
Heroína / Salvinorina	1,142
Salvinorina / Salvinorina	1,027
Salvinorina / Salvinorina	1,022
AM-2201 / JWH-210	1,021
JWH-210 / MAM2201	1,013
MAM2201 / JWH-081	1,007
JWH-081	-

O valor mais próximo da unidade se refere ao par de sinais MDMA e 5-MAPB, representados na Figura 8, a seguir, avaliados por sua separação desde a etapa de desenvolvimento do método.

É importante observar que, apesar da proximidade dos picos, sua separação e determinação dos tempos de retenção são possíveis. Adicionalmente, ao avaliar o fator de separação em conjunto com a resolução, é possível confirmar a separação dos sinais, conforme explanado na próxima sessão.

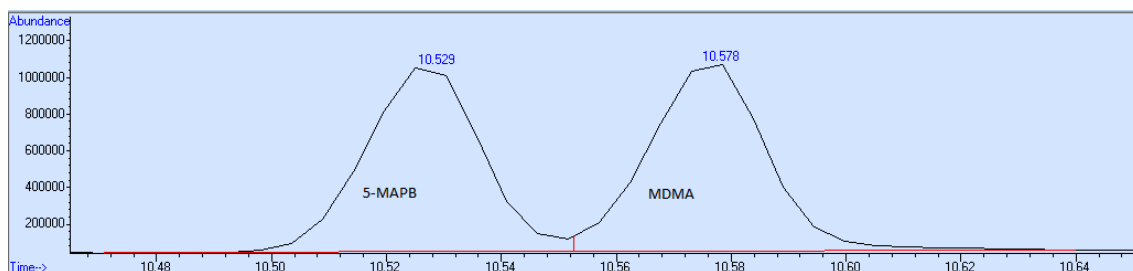


Figura 8 – Ampliações dos sinais das substâncias 5-MAPB e MDMA utilizando o “Método03”.

6.4.4 Resolução

Os valores de resolução, dispostos na Tabela 13 foram obtidos por meio da função *Performance Report* do software *Chemstation da Agilent* que utiliza a Equação 5.

Para calculá-los, os sinais ao redor do pico em análise foram levados em consideração, independentemente de o sinal adjacente ser de uma droga ou de uma substância extraída da matriz vegetal.

Tabela 13 – Relação das substâncias utilizadas no *Mix* de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e as resoluções calculadas.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Resolução
Anfetamina	5,100	-
2-FA	5,172	1,93
Metiopropamina Metanfetamina	5,934	18,93
Efedrina	8,568	63,06
5-MAPB	10,529	49,45
MDMA	10,578	1,27
o-CPP	11,578	24,76
5-IAI	11,927	7,84
p-CPP	12,952	22,45
N-etilpentilona	14,720	11,73
5-MeO-MiPT	17,219	6,35
Cocaína	17,707	10,78
U-47700	19,523	42,10
THC	19,994	10,95
25C-NBOMe	20,651	6,74
Heroína	21,251	12,97

Substância	Tempo de Retenção (min)	Resolução
Salvinorina	24,274	28,25
Salvinorina	24,941	9,84
AM-2201	25,497	1,56
JWH-210	26,021	3,57
MAM-2201	26,364	6,02
JWH-081	26,553	3,08

Segundo Collins e colaboradores, $R = 1$ indicam picos razoavelmente separados, $R = 1,25$ representam separações suficiente para métodos analíticos e $R > 1,5$ indicam separação completa. Para o “Método03” apenas a resolução referente ao sinal do MDMA apresentou valor inferior a 1,5. No entanto, conforme descrito acima, o valor calculado para a resolução do MDMA de 1,27 é satisfatório para o método em questão.

6.4.5 Número de Pratos Teóricos

Os valores de número de pratos teóricos foram calculados utilizando a Equação 6.

Tabela 14 – Relação das substâncias utilizadas no *Mix* de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e os valores de número de pratos teóricos calculados.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Número de Pratos Teóricos ($\times 10^5$)
Anfetamina	5,100	9,44
2-FA	5,172	8,84
Metiopropamina Metanfetamina	5,934	9,01
Efedrina	8,568	20,4
5-MAPB	10,529	33,5
MDMA	10,578	33,8
o-CPP	11,578	37,2
5-IAI	11,927	29,0
p-CPP	12,952	39,7
N-etilpentilona	14,720	60,2
5-MeO-MiPT	17,219	60,5
Cocaína	17,707	74,2
U-47700	19,523	97,6

Substância	Tempo de Retenção (min)	Número de Pratos Teóricos (x10 ⁵)
THC	19,994	94,6
25C-NBOMe	20,651	87,0
Heroína	21,251	99,1
Salvinorina	24,274	112
Salvinorina	24,941	86,1
AM-2201	25,497	124
JWH-210	26,021	149
MAM2201	26,364	69,5
JWH-081	26,553	110

Conforme observado na Tabela 14, todos os valores calculados para a figura de mérito número de pratos teóricos possuem valores superiores a 2×10^3 , em acordo com o preconizado pelo Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods do FDA.²⁷

6.4.6 Fator de Alargamento ou *Tailing*

Os valores de *tailing*, dispostos na Tabela 15, foram obtidos por meio da função *Performance Report* do software *Chemstation* da *Agilent* que utiliza a Equação 7.

Tabela 15 – Relação das substâncias utilizadas no *Mix* de drogas, seus tempos de retenção com o método “Método03” e os *tailing* calculados.

Substância	Tempo de Retenção (min)	<i>Tailing</i>
Anfetamina	5,100	1,46
2-FA	5,172	1,28
Metiopropamina Metanfetamina	5,934	1,09
Efedrina	8,568	1,24
5-MAPB	10,529	1,06
MDMA	10,578	1,00
o-CPP	11,578	1,03
5-IAI	11,927	1,76
p-CPP	12,952	1,06
<i>N</i> -etilpentilona	14,720	0,93
5-MeO-MiPT	17,219	1,00
Cocaína	17,707	0,95

Substância	Tempo de Retenção (min)	Tailing
U-47700	19,523	0,93
THC	19,994	0,93
25C-NBOMe	20,651	1,09
Heroína	21,251	1,01
Salvinorina	24,274	0,84
Salvinorina	24,941	0,73
AM-2201	25,497	0,94
JWH-210	26,021	0,98
MAM2201	26,364	0,60
JWH-081	26,553	0,84

A Equação 7 representa a forma de cálculo do *tailing* de cada sinal. Idealmente, t possui valor igual a 1 (um), enquanto valores de t menores que 1 (um) indicam assimetria frontal do pico que está frequentemente associada com excesso de amostra injetada ou com o uso de colunas em temperaturas abaixo do ideal. Valores de t maiores que a unidade representam picos com caudas que surgem por conta de falhas na técnica de injeção da amostra ou devido à adsorção excessiva na fase estacionária da coluna.¹⁹

Ao observar os valores calculados representados na Tabela 15 é possível verificar que resultados de t menores que a unidade ocorrem para as substâncias que eluem ao final da corrida. Sinais de substâncias com maiores tempos de retenção são frequentemente mais distorcidos que aqueles de menor t_R por estarem mais sujeitos às influências da temperatura e das interações com a coluna. No entanto, para o presente estudo, não foram detectados resultados de *tailing* com elevado desvio da unidade.

6.4.7 Precisão

6.4.7.1 Repetibilidade

A Tabela 16 a seguir ilustra os experimentos realizados para avaliação da precisão do método “Método03”.

A repetibilidade foi analisada para cada Grupo, sendo que as réplicas de cada Grupo foram realizadas pelo mesmo analista, em um mesmo dia, com a mesma amostra e no mesmo equipamento. Para cada dia de análise, ou seja, para cada batelada de injeções do *Mix* de Drogas, o analista também realizou a injeção da solução da mistura de *n*-alcanos, sob as mesmas condições do *Mix*.

Tabela 16 – Relação de experimentos realizados para avaliação da Precisão.

Equipamento	Dia	Nº réplicas	Grupo
CGEM_A	1	6	1
	2	4	2
CGEM_B	3	6	3
	4	6	4

As tabelas com os valores calculados de Índice de Retenção de Kovats médio, a variância e desvio padrão relativo, para cada um dos Grupos identificados anteriormente, bem como seus cromatogramas, estão dispostos no Anexo 6.

Segundo as Informações Suplementares do trabalho publicado por Kelly e colaboradores, o estudo que avaliou 15 NSP, divididas entre três misturas e empregando três sistemas de CG/EM diferentes, obteve desvios padrão relativos, representativos da repetibilidade, que variam de 0,06 – 0,30%.⁵

O presente estudo identificou valores de desvios padrão relativos que variam entre 0,003 – 0,027%. Portanto, os DPR obtidos com o “Método03”, dispostos no Anexo 6, apresentam-se menores que as referências da literatura.

6.4.7.2 Precisão Intermediária

A primeira avaliação da precisão intermediária comparou, separadamente, os Grupos 1 e 2 e os Grupos 3 e 4, verificando, assim, a precisão em um mesmo equipamento, porém, em dias diferentes, com intervalo de dois dias entre as corridas.

A Tabela 17 ilustra os valores médios calculados para o Índice de Retenção de Kovats de todas as medidas realizadas no CGEM_A, as variâncias, os intervalos de confiança (I.C.), e os desvios padrão relativos.

Tabela 17 – Valores calculados para a avaliação da precisão intermediária para o equipamento CGEM_A.

Substância	Índice Kovats Médio $n_1 = 6$ $n_2 = 4$	I.C. para $t_{9,95\%}$ em unidades de IRK	Variância	DPR
Anfetamina	1123	$\pm 0,8$	0,110	0,030%
2-FA	1128	$\pm 0,5$	0,053	0,020%

Substância	Índice Kovats Médio n₁ = 6 n₂ = 4	I.C. para t_{9,95%} em unidades de IRK	Variância	DPR
Metiopropamina Metanfetamina	1179	±0,2	0,007	0,007%
Efedrina	1368	±0,6	0,068	0,019%
5-MAPB	1524	±0,3	0,022	0,010%
MDMA	1528	±0,3	0,021	0,009%
o-CPP	1613	±0,4	0,039	0,012%
5-IAI	1645	±0,7	0,089	0,018%
p-CPP	1737	±0,6	0,068	0,015%
N-etilpentilona	1909	±0,6	0,060	0,013%
5-MeO-MiPT	2176	±2,0	0,818	0,042%
Cocaína	2233	±1,3	0,319	0,025%
U-47700	2454	±1,2	0,263	0,021%
THC	2515	±1,0	0,179	0,017%
25C-NBOMe	2601	±1,3	0,344	0,023%
Heroína	2682	±1,2	0,302	0,020%
Salvinorina	3131	±2,2	0,946	0,031%
Salvinorina	3237	±3,4	2,278	0,047%
AM-2201	3333	±2,4	1,156	0,032%
JWH-210	3424	±2,0	0,749	0,025%
MAM-2201	3480	±7,0	9,480	0,088%
JWH-081	3516	±4,9	4,751	0,062%

A Tabela 18, a seguir, ilustra os valores calculados para o Índice de Retenção de Kovats médio de todas as medidas realizadas no CGEM_B, os intervalos de confiança (I.C.), e os desvios padrão relativos.

Tabela 18 – Valores calculados para a avaliação da precisão intermediária para o equipamento CGEM_B.

Substância	Índice Kovats Médio n ₁ = 6 n ₂ = 6	I.C. para t _{11,95%} em unidades de IRK	Variância	DPR
Anfetamina	1125	±0,4	0,030	0,015%
2-FA	1130	±0,3	0,016	0,011%
Metiopropamina Metanfetamina	1182	±0,2	0,012	0,009%
Efedrina	1372	±0,3	0,015	0,009%
5-MAPB	1529	±0,4	0,026	0,011%
MDMA	1533	±0,3	0,022	0,010%
o-CPP	1620	±0,4	0,026	0,010%
5-IAI	1654	±0,7	0,113	0,020%
p-CPP	1746	±0,4	0,028	0,010%
N-etilpentilona	1914	±0,4	0,033	0,009%
5-MeO-MiPT	2184	±0,5	0,057	0,011%
Cocaína	2242	±0,5	0,049	0,010%
U-47700	2467	±0,5	0,057	0,010%
THC	2524	±0,5	0,056	0,009%
25C-NBOMe	2612	±0,6	0,083	0,011%
Heroína	2696	±0,6	0,068	0,010%
Salvinorina	3146	±0,7	0,104	0,010%
Salvinorina	3254	±0,8	0,139	0,011%
AM-2201	3352	±0,6	0,081	0,008%
JWH-210	3441	±0,7	0,090	0,009%
MAM-2201	3500	±1,1	0,246	0,014%
JWH-081	3532	±0,8	0,137	0,010%

A segunda avaliação da precisão intermediária comparou ambos os resultados obtidos acima, ou seja, avaliou a precisão para dois equipamentos diferentes (CGEM_A e CGEM_B) com intervalo de três meses entre as corridas de diferentes equipamentos.

Tabela 19 – Valores calculados para a avaliação da precisão intermediária que compara os equipamentos CGEM_A e CGEM_B.

Substância	Índice Kovats Médio n = 22	I.C. para $t_{21,95\%}$ em unidades de IRK	Variância	DPR
Anfetamina	1124	$\pm 0,5$	0,063	0,022%
2-FA	1129	$\pm 2,1$	1,022	0,090%
Metiopropamina Metanfetamina	1181	$\pm 2,9$	1,950	0,118%
Efedrina	1370	$\pm 4,1$	3,820	0,143%
5-MAPB	1527	$\pm 5,1$	6,001	0,160%
MDMA	1531	$\pm 4,9$	5,601	0,155%
o-CPP	1617	$\pm 7,9$	14,386	0,235%
5-IAI	1649	$\pm 9,4$	20,372	0,274%
p-CPP	1742	$\pm 9,4$	20,249	0,258%
N-etilpentilona	1912	$\pm 6,2$	8,887	0,156%
5-MeO-MiPT	2180	$\pm 8,7$	17,335	0,191%
Cocaína	2237	$\pm 9,2$	19,719	0,198%
U-47700	2460	$\pm 13,8$	43,750	0,269%
THC	2520	$\pm 9,0$	18,753	0,172%
25C-NBOMe	2607	$\pm 10,8$	26,954	0,199%
Heroína	2689	$\pm 14,5$	48,645	0,259%
Salvinorina	3138	$\pm 15,3$	53,831	0,234%
Salvinorina	3246	$\pm 17,8$	72,856	0,263%
AM-2201	3343	$\pm 19,9$	91,986	0,287%
JWH-210	3433	$\pm 17,6$	71,873	0,247%
MAM-2201	3490	$\pm 20,6$	98,063	0,284%
JWH-081	3524	$\pm 17,2$	68,516	0,235%

Kelly e colaboradores avaliaram três *Mix* de substâncias com um total de 15 drogas. O “Mix Azul” era composto por 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina, 25I-NBOMe, anfetamina, butilona e JWH-018. O “Mix Vermelho” possuía em sua constituição as substâncias 1-(3-clorofenil)piperazina, 4-fluoroanfetamina, 25C-NBOMe, benzilpiperazina e UR-144,

enquanto o “Mix Amarelo” era constituído por 5-MeO-AMT, dimetiltriptamina, MDMA, mefedrona e AH-7921.⁵

As classes das drogas empregadas no trabalho de Kelly e colaboradores são feniletilamina, drogas clássicas, canabinoides sintéticos, piperazina, triptamina, cationas sintéticas e opioides sintéticos. Ou seja, o presente estudo apreciou uma quantidade maior de classes de drogas, ampliando o trabalho de Kelly e colaboradores, ao incluir na análise uma substância de origem vegetal, uma substância classificada na categoria “outras”, e um composto da classe aminoindano. Não obstante, o total de substâncias avaliadas no presente estudo é de 23 compostos diferentes, valor superior ao total de 15 drogas estudadas por Kelly e colaboradores.

Kelly e colaboradores empregaram ainda três modelos de equipamentos de CG/EM diferentes e verificaram DPR inferiores a 0,35% entre todos os sistemas testados, o que leva em consideração diferentes dias e os diferentes equipamentos. Este valor é superior aos DPR encontrados durante a avaliação da precisão intermediária para o presente estudo, no qual os DPR variam de 0,02 – 0,29%.

6.4.8 Robustez e Estudo dos Fatores

O estudo da robustez verifica a capacidade de um método manter a resposta após pequenas variações.²³ No presente trabalho, a análise da robustez indica os limites para os quais o método foi capaz de operar, quando manipulado em diferentes contextos.

Essa escolha deve-se ao fato de que o objetivo principal do trabalho foi desenvolver um método para identificação de substâncias possível de ser inserido na rotina forense. Avaliar a possibilidade de implementação de um método nas diferentes realidades brasileiras implica analisar os fatores passíveis de mudança.

Para o estudo dessa figura de mérito, o Planejamento Fatorial Fracionado foi selecionado por ser capaz de otimizar o tempo e o número de corridas necessários para verificação das interações de alguns parâmetros pré-selecionados.

Os fatores selecionados foram aqueles que, na rotina de perícia, poderiam ser alterados propositalmente pelo analista, por uma necessidade local, ou por flutuação involuntária do equipamento.

Apesar de não atender às características convencionais de robustez, avaliar esses parâmetros é importante ao se levar em conta a necessidade de utilização do método em contextos e realidades diversos.

Dessa forma, os fatores selecionados foram:

- Marca da coluna;
- Polaridade da coluna;
- Fluxo do gás de arraste;
- Taxa de Split;
- Temperatura do injetor;
- Rampa de Temperatura.

Em seguida, dois níveis foram designados para cada um dos fatores:

- Marca da coluna: *Agilent* (nível baixo) e *Resteck* (nível alto);
- Polaridade da coluna: menor polaridade (100% Dimethylpolysiloxane) (nível baixo) e maior polaridade (equivalente a (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane) (nível alto);
- Fluxo do gás de arraste: 0,9 mL /min (nível baixo) e 1,2 mL /min (nível alto);
- Taxa de split: 10:1 (nível baixo) e 30:1 (nível alto);
- Temperatura do injetor: 280°C (nível baixo) e 300°C (nível alto);
- Rampa de Temperatura: isoterma de 65°C por 2 min + rampa de 10 °C/min de 65 °C até 310 °C + isoterma de 310 °C por 15 min (nível baixo) e isoterma de 75°C por 2 min + rampa de 10 °C/min de 75 °C até 320 °C + isoterma de 320 °C por 15 min (nível alto).

Os níveis alto e baixo para a variável fluxo do gás de arraste não são simétricos com relação ao fluxo utilizado do “Método03”, pois optou-se por testar toda a faixa de fluxo do gás de arraste que possa ser utilizada pelos métodos de rotina dos laboratórios periciais. Também é importante destacar que o nível alto do fator temperatura do injetor foi mantido idêntico ao valor empregado no “Método03”, ou seja, 300°C, com o objetivo de obedecer aos limites impostos pela fabricação do sistema e não degradar o equipamento.

Os valores calculados dos Índices de Retenção de Kovats para cada uma das corridas, sua média, variância e desvio padrão relativo, além dos cromatogramas das corridas realizadas em duplicata estão dispostos no Anexo 7. Cada corrida descrita na Tabela 1 foi realizada em duplicata de forma que, para cada condição estudada, o analista também realizou a injeção da solução da mistura de *n*-alcanos, sob as mesmas condições do *Mix*.

É importante observar que, para as condições das corridas Robustez 3, Robustez 4, Robustez 7 e Robustez 8, houve coeluição idêntica à coeluição apresentada pelo “Método03”, ou seja, as substâncias Metiopropamina e Metanfetamina coeluíram ao empregar a coluna de maior polaridade (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane.

As condições das corridas Robustez 1, Robustez 2, Robustez 5 e Robustez 6, que utilizam a coluna de menor polaridade 100% Dimethylpolysiloxane, favoreceram a coeluição das substâncias MDMA e 5-MAPB, enquanto os picos das substâncias Metiopropamina e Metanfetamina foram separados. Essa conclusão assinala que, caso o analista se depare com uma apreensão combinada de metanfetamina e metiopromaina, a coeluição é possível de ser resolvida utilizando-se uma coluna 100% Dimethylpolysiloxane.

Para a análise dos fatores, os valores de Índice de Retenção de Kovats médio, para cada condição descrita na Tabela 1, reproduzida abaixo, foram utilizados, conforme Equação 13, enquanto as variâncias, para cada condição, foram calculadas por meio da Equação 16. Estes resultados estão dispostos no Anexo 8, no qual cada tabela ilustra os valores dos efeitos para as alterações avaliadas, bem como sua Variância, e Intervalo de Confiança calculados para $t_{8,95\%}$.

Tabela 1 – Planejamento Fatorial Fracionado das corridas cromatográficas.

		Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6
Corridas	Robustez 1	-1	-1	-1	-1	1	1
	Robustez 2	1	-1	-1	1	-1	-1
	Robustez 3	-1	1	-1	1	-1	1
	Robustez 4	1	1	-1	-1	1	-1
	Robustez 5	-1	-1	1	1	1	-1
	Robustez 6	1	-1	1	-1	-1	1
	Robustez 7	-1	1	1	-1	-1	-1
	Robustez 8	1	1	1	1	1	1

Os intervalos de confiança foram utilizados na avaliação da importância de cada fator para os cálculos dos IRK. Deste modo, fatores cujos intervalos englobam o zero não são estatisticamente relevantes. Estes fatores estão representados nas tabelas do Anexo 8 pelas *substâncias assinaladas em negrito e itálico*.

Por meio das tabelas do Anexo 8, é possível observar que:

- O fator “Marca da Coluna” foi estatisticamente relevante para 21 das 23 substâncias.
- O fator “Polaridade da Coluna” foi estatisticamente relevante para todas as substâncias.
- O fator “Fluxo do Gás de Arraste” foi estatisticamente relevante para todas as substâncias.
- O fator “Taxa de Split” foi estatisticamente relevante para 13 das 23 substâncias.
- O fator “Temperatura do injetor” foi estatisticamente relevante para 21 das 23 substâncias.
- O fator “Rampa de Temperatura” foi estatisticamente relevante para 9 das 23 substâncias.

O cálculo do fator “Polaridade da coluna” revelou fatores positivos para todas as substâncias do *Mix* de drogas. Isso significa afirmar que, ao passar do nível baixo (coluna 100% Dimethylpolysiloxane)) ao nível alto (coluna (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane), há aumento nos valores médios dos Índices de Retenção de Kovats. Além disso, esse aumento é mais pronunciado para as substâncias que eluem ao final da corrida, para as quais o fator “Polaridade da coluna” apresenta valores mais altos.

O fator “Fluxo do Gás de Arraste” apresentou valores negativos para todas as substâncias do *Mix*, indicando assim a redução dos IRK médios ao se passar do nível baixo (0,9 mL /min) ao nível alto (1,2 mL /min), consoante com o esperado ao se aumentar a velocidade linear com que a amostra percorre a coluna.

O fator “Taxa de Split” aparenta ser estatisticamente relevante para as substâncias que eluem ao final da corrida, ou seja, substâncias de maior massa molecular e de maiores pontos de ebulição. Para essas substâncias, o efeito tende a ser negativo. Esse fenômeno pode ser explicado pois, ao passar do nível baixo de split (10:1) ao nível alto (30:1), se está injetando menor quantidade de amostra na coluna. No caso dessas moléculas menos voláteis, a diminuição de concentração acarreta uma menor interação com a fase estacionária da coluna, reduzindo dessa forma o tempo de retenção. Assim, a diminuição da concentração para esses compostos, ao passar para o nível alto de taxa de split, provoca redução nos tempos de retenção e, conseqüentemente, nos Índices de Retenção de Kovats, evidenciados pelo valor negativo do fator em questão.

Por meio do Anexo 8, verifica-se a baixa magnitude dos fatores “Marca da Coluna”, “Fluxo do Gás de Arraste”, “Taxa de Split”, “Temperatura do injetor” e “Rampa de Temperatura” os quais, mesmos quando estatisticamente relevantes, possuem baixos valores calculados de efeito, quando comparada ao fator “Polaridade da Coluna”. Isso significa dizer que, apesar de os fatores “Marca da Coluna”, “Fluxo do Gás de Arraste”, “Taxa de Split”, “Temperatura do injetor” e “Rampa de Temperatura” serem estatisticamente relevantes para diversas substâncias, já que seu intervalo de confiança não inclui o zero, sua baixa magnitude não acarreta em prejuízos para a identificação e cálculo do Índice de Retenção de Kovats, ao se levar em conta os baixos valores calculados de variâncias e os estreitos Intervalos de Confiança calculados para os fatores.

Essa conclusão pode ser verificada ao se comparar os valores dos Intervalos de Confiança calculados e expostos na Tabela 20, a seguir, referentes aos valores de Índice de Retenção de Kovats Globais, com aqueles representados nas tabelas do Anexo 8. Com exceção do I.C. da anfetamina, todos os I.C. das demais substâncias avaliadas na robustez são inferiores àqueles calculados para o IRK.

Isso significa dizer que a amplitude da variação dos valores de IRK oriundos das alterações dos fatores avaliados na robustez é menor que a amplitude das variações esperadas para a determinação dos valores de IRK com o método empregado, corroborando, assim, com a afirmação de que os valores calculados de efeitos não são relevantes para o cálculo dos Índices de Retenção de Kovats e para a identificação das NSP.

Por conta da magnitude do fator “Polaridade da coluna”, procedeu-se a uma blocagem, procedimento no qual se busca descontar a influência de um efeito, separado por níveis, nos demais parâmetros alterados durante a análise. É sabido que, por se tratar de um Planejamento Fatorial Fracionado de resolução III, os fatores estarão confundidos com interações de até no máximo segunda ordem, no entanto, a seleção das corridas, conforme disposto no Anexo 9, apresentou conclusões satisfatórias.

A blocagem da polaridade no nível baixo (que reuniu corridas efetuadas com a coluna 100% Dimethylpolysiloxane) apresentou melhoria de resultados, na medida em que os intervalos de confiança passaram a incluir o zero para a maior parte das substâncias. A única exceção ocorreu para o fator “Fluxo do Gás de Arraste” para o qual a blocagem da polaridade no nível baixo não proporcionou novos intervalos de confiança que contivessem o zero.

Os fatores para os quais houve influência da blocagem estão descritos abaixo.

- Para o fator “Marca da Coluna”, após a blocagem da polaridade nível baixo, os intervalos de confiança incluíram o zero para 15 substâncias;
- Para o fator “Temperatura do Injetor”, após a blocagem da polaridade nível baixo, os intervalos de confiança incluíram o zero para 15 substâncias;

A blocagem da polaridade nível alto (que reuniu corridas com coluna (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane) não apresentou melhoria de resultados para nenhum fator, na medida em que os intervalos de confiança não passaram a incluir o zero para a maior parte das substâncias. Esses resultados podem ser explicados ao se levar em consideração possíveis distribuições irregulares dos grupos fenilas que são adicionados às colunas para aumentar sua polaridade, ou seja, a coluna que possui 5% de grupos fenilas em sua composição se torna mais propensa às influências testadas.

6.5 Relação Final para os Índices de Retenção de Kovats calculados com o “Método03” validado

Após a validação do “Método03”, os valores médios de Índice de Retenção de Kovats foram calculados, levando em conta todas as corridas realizadas com o referido método. Os valores descritos na Tabela 20, ilustram os IRK médios para corridas realizadas no CGEM_A e CGEM_B, em dias diferentes, além dos valores de Variância e Intervalo de Confiança global.

Tabela 20 – Relação das substâncias componentes do *Mix* de drogas, os Índices de Retenção de Kovats Globais, suas variâncias, intervalos de confiança e DPR correspondentes, calculados para todas as corridas que empregaram o “Método03” nos equipamentos CGEM_A e CGEM_B.

Substância	Índice de Retenção de Kovats Global	Variância Global	I.C. Global para $t_{21,95\%}$	DPR Global
Anfetamina	1124	0,063	±0,5	0,02%
2-FA	1129	1,022	±2,1	0,09%
Metiopropamina Metanfetamina	1181	1,950	±2,9	0,12%
Efedrina	1370	3,820	±4,1	0,14%
5-MAPB	1527	6,001	±5,1	0,16%
MDMA	1531	5,601	±4,9	0,16%
o-CPP	1617	14,386	±7,9	0,24%

Substância	Índice de Retenção de Kovats Global	Variância Global	I.C. Global para $t_{21,95\%}$	DPR Global
5-IAI	1649	20,372	±9,4	0,27%
p-CPP	1742	20,249	±9,4	0,26%
<i>N</i> -etilpentilona	1912	8,887	±6,2	0,16%
5-MeO-MiPT	2180	17,335	±8,7	0,19%
Cocaína	2237	19,719	±9,2	0,20%
U-47700	2460	43,750	±13,8	0,27%
THC	2520	18,753	±9,0	0,17%
25C-NBOMe	2607	26,954	±10,8	0,20%
Heroína	2689	48,645	±14,5	0,26%
Salvinorina	3138	53,831	±15,3	0,23%
Salvinorina	3246	72,856	±17,8	0,26%
AM-2201	3343	91,986	±19,9	0,29%
JWH-210	3433	71,873	±17,6	0,25%
MAM-2201	3490	98,063	±20,6	0,28%
JWH-081	3524	68,516	±17,2	0,24%

Com base nos valores descritos na Tabela 20, é importante salientar que o cálculo das variâncias levando em consideração equipamentos diferentes e corridas realizadas em dias diferentes não gerou impactos elevados no Intervalo de Confiança. Para realizar a avaliação da variância descrita acima, consideraram-se as 22 corridas realizadas com o “Método03”, fornecendo, assim, valores de variância mais representativos da variabilidade experimental envolvida na implementação do método por outros laboratórios do país.

O trabalho publicado por Kelly e colaboradores indicou DPR inferiores a 0,35% entre todos os sistemas testados, valor superior aos DPR encontrados para o presente estudo que variam de 0,02 a 0,29%. Além disso, o grupo de pesquisadores precisou que a maior diferença, em unidades de Índice de Retenção, para um único composto, entre equipamentos diferentes é de 37,0 unidades de Índice de Retenção, enquanto o presente estudo definiu valores que variam na faixa de 0,5 a 20,6 unidades de Índice de Retenção.

6.6 Utilização do “Método03” em amostras apreendidas pela Polícia Federal

Com o objetivo de avaliar a resposta fornecida pelo método com amostras reais, uma amostra de comprimido contendo MDMA e uma amostra de comprimido contendo *N*-etilpentilona, ambas oriundas de apreensões da Polícia Federal Brasileira, foram respectivamente trituradas e homogeneizadas, dissolvidas em metanol e injetadas no

equipamento CGEM_A, juntamente à solução da mistura de *n*-alcanos para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats.

O IRK calculado para a amostra oriunda de apreensão de MDMA foi de 1534 unidades de Índice de Retenção de Kovats e seu valor de referência, descrito na Tabela 20 é de $1531 \pm 4,9$, indicando concordância entre os valores.

O Índice de Retenção calculado para a *N*-etilpentilona, apreendida foi de 1915 unidades de Índice de Retenção de Kovats, enquanto o valor de referência é $1912 \pm 6,2$.

A análise dos valores calculados de IRK para substâncias presentes em amostras oriundas de apreensões da PF e sua comparação aos valores tabelados, desenvolvidos pelo “Método03”, evidenciou a correspondência entre ambos os índices e a adequabilidade do método quando empregado em análises de rotina para identificação de substâncias apreendidas.

O grupo de trabalho *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs* (SWGDRUG) estabelece requisitos mínimos a serem seguidos para a identificação forense de substâncias apreendidas. Segundo a versão 7.1 de 09 de junho de 2016 do documento intitulado *SWGDRUG Recommendations*, técnicas analíticas são categorizadas em três classes (Categoria A, Categoria B e Categoria C), de acordo com seu potencial discriminatório. Técnicas de Espectrometria de Massas, que forneçam não somente informações de massa molecular, mas também padrões de fragmentação, são consideradas Categoria A, já que fornecem o mais alto nível de seletividade através de informações estruturais. A Cromatografia Gasosa é considerada uma técnica de Categoria B, quando utiliza padrões analíticos de mesma natureza química que as substâncias de interesses, a fim de reproduzir de maneira comparável o processo de eluição cromatográfica. Na ausência de padrões, a CG é rebaixada à Categoria C. De acordo com o referido guia, os requisitos mínimos para identificação de substâncias apreendidas devem empregar uma técnica de Categoria A somada à outra técnica de qualquer categoria ou, alternativamente, três técnicas das Categorias B e C, sendo que ao menos duas delas deverão ser de Categoria B.²⁸

Apesar do referido documento não se posicionar quanto ao uso de índices de retenção, é razoável supor que o emprego de um índice de Kovats, que é calculado a partir de padrões analíticos previamente caracterizados, e a utilização, em cada sequência de corridas, de uma série homóloga de alcanos balizadora de tempos de retenção, resulte na manutenção da técnica de CG como Categoria B. Dessa forma, a associação de uma técnica B (CG) a uma técnica A (EM), por meio do método desenvolvido neste estudo, resultaria suficiente para a emissão de laudos periciais com o nível de convicção requerido por parte dos Peritos Criminais.

7. CONCLUSÕES E PRÓXIMAS ETAPAS

Os objetivos deste trabalho foram alcançados na medida em que:

- Um método analítico baseado em CG/EM para identificação de NSP por meio do Índice de Retenção de Kovats, como forma de contornar a indisponibilidade comercial de padrões analíticos, foi desenvolvido.
- O método desenvolvido foi validado de forma a demonstrar sua aplicabilidade em diferentes cenários da perícia brasileira.
- Uma lista para os Índices de Retenção de Kovats, suas variâncias, intervalos de confiança e DPR para 23 substâncias foi elaborada e poderá ser disponibilizada, juntamente com o método analítico, aos demais centros de perícia para auxiliar na identificação de NSP.

Durante a validação do método, foi identificada apenas uma limitação de Seletividade, representada pela coeluição de duas substâncias que não são habitualmente disponibilizadas juntas no mercado de drogas (metiopropamina e metanfetamina), mas o método proposto, como um todo, apresentou boa seletividade.

Os Fatores de Separação calculados para o *Mix* possuem valores superiores à unidade. O valor mais próximo da unidade se refere ao par de sinais MDMA e 5-MAPB. No entanto, avaliando o fator de separação em conjunto com a resolução, foi possível confirmar a separação dos sinais, já que a análise da Resolução indicou valores superiores a 1,25 para todas as substâncias componentes do *Mix*. O estudo dos Número de Pratos Teóricos e do Fator de Alargamento ou tailing também apresentaram resultados satisfatórios.

Durante a análise da Robustez, verificou-se que o fator “Polaridade da Coluna” se apresentou como o mais relevante, não apenas por possuir intervalos de confiança que não incluem o zero, mas também devido a sua magnitude, mais relevante quando comparada aos demais efeitos. Os demais fatores avaliados apresentaram baixa magnitude revelando não serem significativos para a determinação dos Índices de Retenção de Kovats.

A bloqueagem da polaridade nível baixo apresentou melhoria de resultados, para os demais fatores, com exceção do fator “Fluxo do Gás de Arraste”, enquanto a bloqueagem da polaridade nível alto não apresentou melhoria de resultados.

Os Índices de Retenção de Kovats para as 23 substâncias do *Mix* de drogas foram calculados, sem sobreposição, com Intervalos de Confiança Globais para $t_{21,95\%}$ na faixa de 0,5 a 20,6 unidades de Índice de Retenção e DPR Globais na faixa de 0,02 a 0,29%, valores

estes inferiores ao encontrados por Kelly e colaboradores que verificaram $DPR \leq 0,35\%$ entre todos os sistemas testados, o que leva em consideração diferentes dias e diferentes equipamentos para 15 drogas diferentes.⁵

Dessa forma, o método é uma alternativa adequada para identificação de Novas Substâncias Psicoativas utilizando o Índice de Retenção de Kovats.

No contexto atual, a tabela elaborada neste estudo é capaz de ser aplicada nas rotinas de análises dos centros de perícias das Polícias Federais e Cíveis dos Estados. Assim, a relação de valores de Índices de Retenção de Kovats produzida por este estudo poderá ser atualizada pelo SEPLAB/INC e disponibilizada aos demais institutos de perícia do Brasil que poderão utilizar a tabela e suas atualizações como ferramenta na identificação de NSP.

A análise do Índice de Retenção de Kovats para amostras apreendidas pela Polícia Federal gerou valor de IRK calculados para MDMA e *N*-etilpentilona considerados iguais aos valores de referência, indicados na Tabela 20, visto que estavam dentro do intervalo de confiança medido para cada uma das substâncias o que representa a adequabilidade do método quando empregado em análises de rotina para identificação de substâncias apreendidas.

O método desenvolvido neste estudo pode ser empregado para identificação de drogas apreendidas na rotina pericial, uma vez que poderá configurar, dentro dos critérios recomendadas pela SWGDRUG, como um método que emprega uma técnica de Categoria A (Espectrometria de Massas) e outra técnica de Categoria B (Cromatografia Gasosa com uso do Índice de Retenção de Kovats), atendendo assim aos padrões mínimos para identificação de substâncias apreendidas e se suficiente para emissão de laudos periciais.

Como continuidade do presente trabalho, sugere-se a realização de testes do método desenvolvido em outros laboratórios periciais no intuito de estabelecer medidas de precisão interlaboratorial e melhor avaliar as incertezas de medição associadas à determinação dos índices de Kovats ora estabelecidos com vistas à implementação do método nas unidades laboratoriais da PF em todo Brasil. Não obstante, pretende-se testar o método utilizando colunas rápidas, além de executar a avaliação completa do Método03 substituindo a coluna empregada por uma coluna 100% Dimethylpolysiloxane.

9. REFERÊNCIAS

1. <http://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/drogas/marco-legal.html> acessado em 12 de setembro de 2018.
2. <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> acessado em 12 de setembro de 2018.
3. UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). *The Challenge of New Psychoactive Substances Global SMART Programme*. **2013**.
4. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Relatório de atividades 2017/2018: Grupo de Trabalho para Classificação de Substâncias controladas*, Brasília, **2019**.
5. Kelly, K.; Bell, S. Evaluation of the reproducibility and repeatability of GCMS retention indices and mass spectra of novel psychoactive substances. *Forensic Chemistry*, **2018**, 7, p. 10-18.
6. Baron, M. G.; Elie, M. P.; Elie, L. E. Keeping pace with NPS releases: fast GC-MS screening of legal high products. *Drug Testing and Analysis*, 25 June **2012**.
7. Peng, B.; Kuo, M. Y.; Yang, P.; Hewitt, J. T.; Boswell, P. G. A practical methodology to measure unbiased gas chromatographic retention factor vs. temperature relationships. *J Chromatogr A*, **2014**, 1374, 207-215.
8. Viegas, M. C.; Bassoli, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. *Química Nova*, **2007**, 30, p. 2031-2034.
9. Franke, J. P.; Bogusz, M.; Zeeuw, R. A. de. An overview on the standardization of chromatographic methods for screening analysis in toxicology by means of retention indices and secondary standards. *Journal of Analytical Chemistry*, **1993**, 347 (3), p. 67-72.
10. Miyagawa, H.; Nakagawa, K.; Kadokami, K. Reproducibility of Programmed-Temperature Retention Indices under Average Linear Velocity Carrier Gas Control of GC and GC-MS. *Chromatographia*, **2011**, 73 (9), p. 953-963.

11. Akutsu, M.; Sugie, Ken-ichi; Saito, K. Analysis of 62 synthetic cannabinoids by gas chromatography – mass spectrometry with photoionization. *Forensic Toxicology and Springer Japan*, **2016**.
12. Smith, J. P.; Sutcliffe, O. B.; Banks, C. E. An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs). *Royal Society of Chemistry*, **2015**.
13. Baron, M.; Elie, M.; Elie, L. An analysis of legal highs – do they contain what it says on the tin?. *Drug Test. Analysis*, **2011**, (3), 576-581.
14. Jermain, J. D.; Evans, H. K. Analyzing salvia divinorum and its active ingredient salvinorin a utilizing thin layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of forensic sciences*, **2009**, 54 (3), p. 612-6.
15. Csesztregi, T.; Boros, D. Application of gas Chromatography in the Identification of new Psychoactive Substances Update, **2017**. In 23rd annual meeting of ENFSI Drugs Working Group. HIFS. Drug Investigation Department, Hungarian Institute for Forensic Sciences.
16. Harris, D. C. *Análise química quantitativa*. 8ed. LTC: Rio de Janeiro, **2012**.
17. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de análise instrumental*. 6ed. Bookman: Porto Alegre, **2009**.
18. Kellya, K.; Brooks, S.; Bell, S. The effect of mass spectrometry tuning frequency and criteria on ion relative abundances of cathinones and cannabinoids. *Forensic Chemistry journal*, **2019**, 12, p. 58-65.
19. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. Editora Unicamp: São Paulo, **2006**.
20. Babushok, V. I.; Linstrom, P. J.; Reed, J. J.; Zenkevich, I. G.; Brown, R. L.; Mallard, W. G.; Stein, S. E. Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. *J Chromatogr A*, **2007**, 1157 (1-2), p. 414-21.
21. Watts, V. W.; Simonick, T. F. A Retention Index Library for Commonly Encountered Drugs and Metabolites Using Tri-n-alkylamines as Reference Compounds, Nitrogen-

- Phosphorus Detectors, and Dual Capillary Chromatography. *Journal of Analytical Toxicology*, 11, September/October **1987**.
22. Pavlovskii, A. A.; Károly, H.; Zenkevicha, I. G. Anomalous temperature dependence of gas chromatographic retention indices of polar compounds on non-polar stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1445, **2016**, p. 126-134.
23. Inmetro. *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. 7ª Revisão, **2018**.
24. Lopez, M. I.; Callao, M. P.; Ruisanchez, I.; Lopez, M. I. et al. Analytica Chimica Acta. A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach. *Analytica Chimica Acta*, 891, **2015**, p. 62-72.
25. Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; Neto, B. B. Statistical design - Chemometrics. First Edition. *Elsevier*, **2006**; 25, p. 412.
26. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2070-91126_Understanding.pdf. acessado em 12 de setembro de 2018
27. CDER (Center for Drug Evaluation and Research). *Reviewer Guidance; Validation of Chromatographic Methods*. November **1994**, CMC 3.
28. <http://www.swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%2007-1.pdf>. acessado em 15 de julho de 2019.

ANEXOS

ANEXO 1

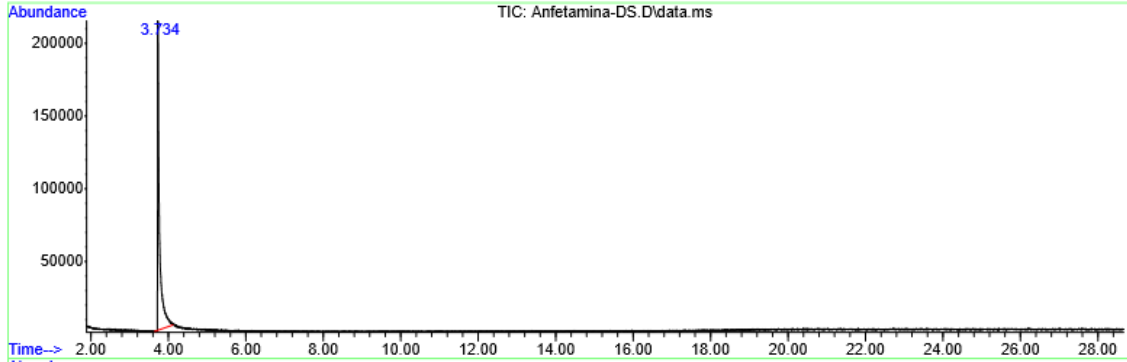


Figura 9 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância anfetamina.

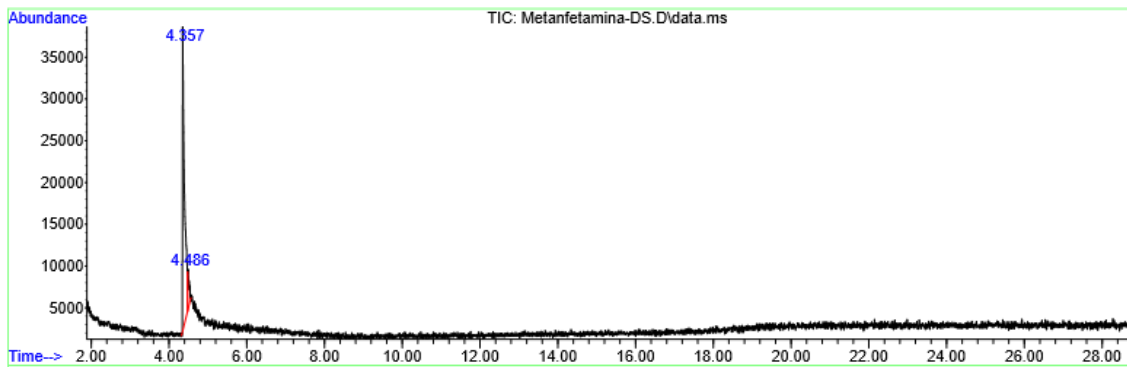


Figura 10 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância metanfetamina.

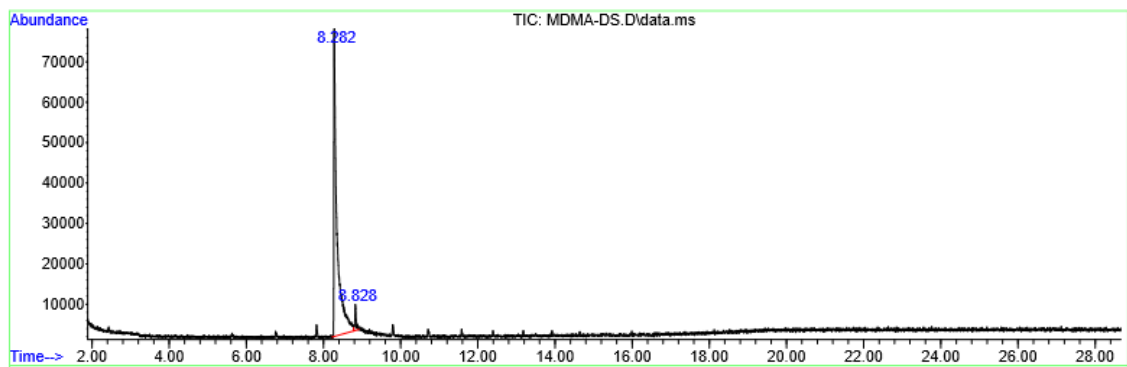


Figura 11 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância MDMA.

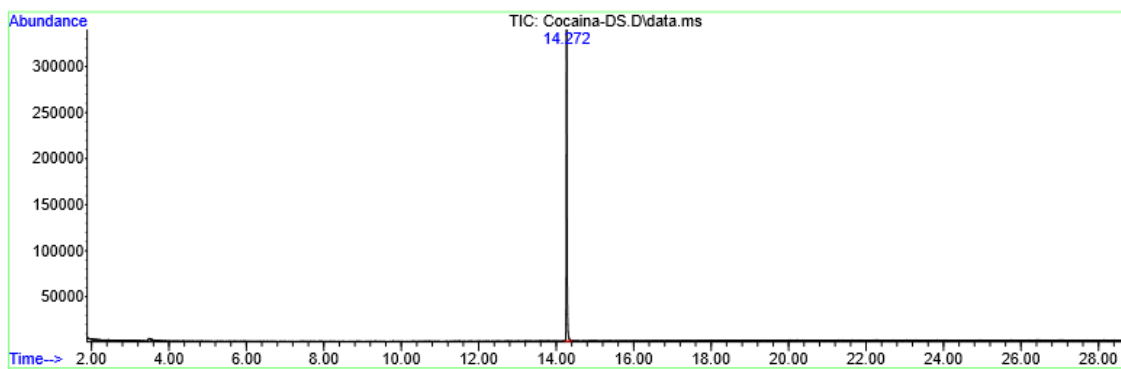


Figura 12 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância cocaína.

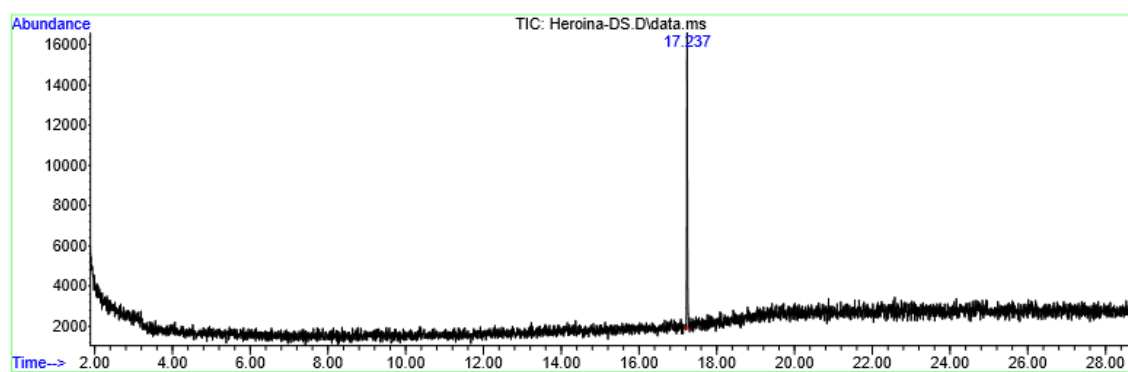


Figura 13 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância heroína.

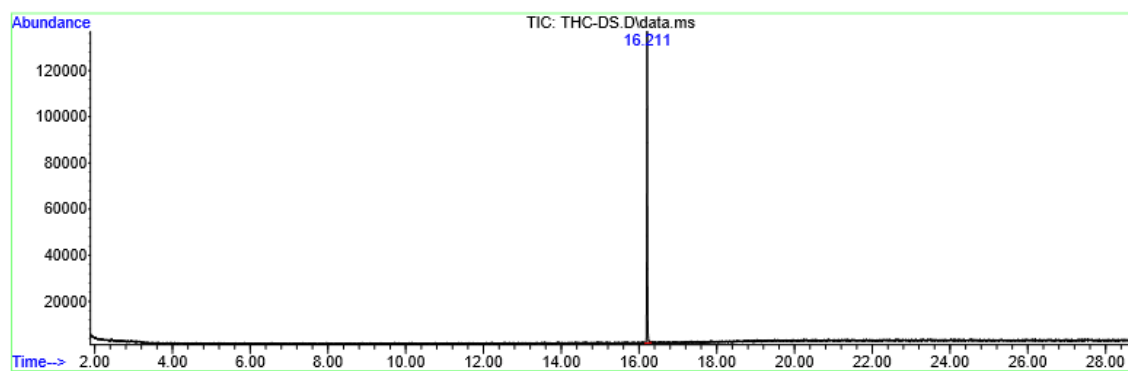


Figura 14 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da substância THC.

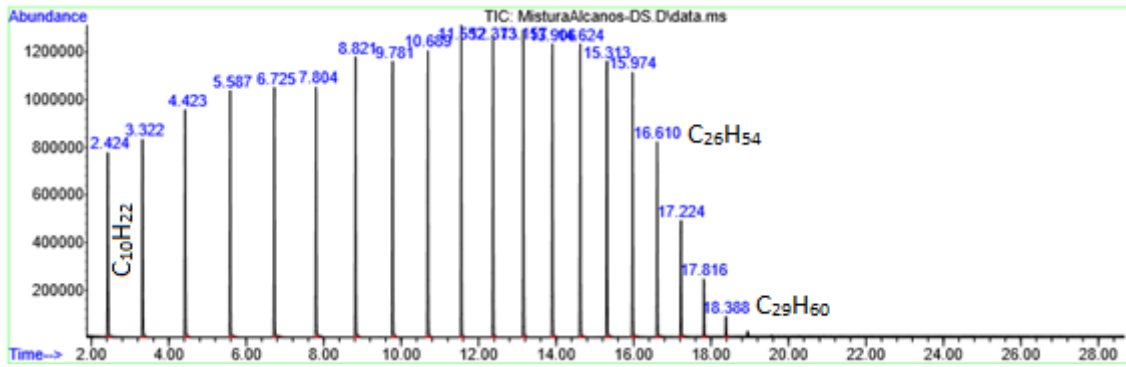


Figura 15 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Drogas Sintéticas" da mistura *n*-alcanos.

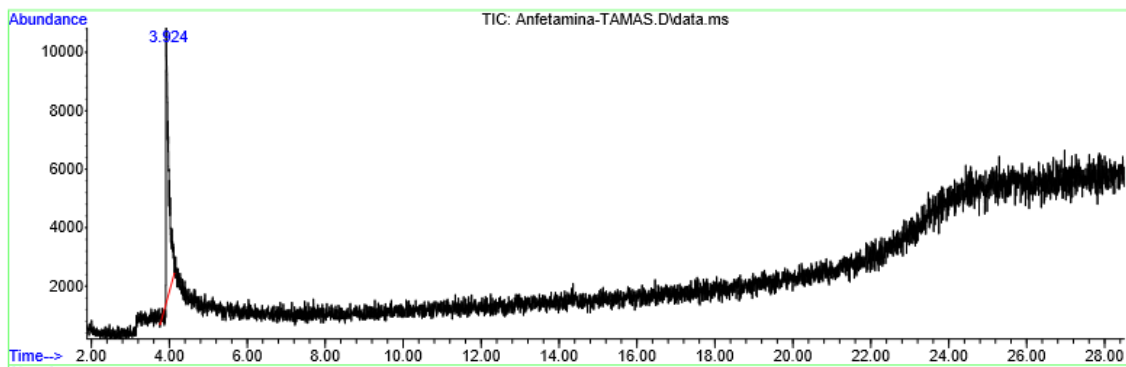


Figura 16 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância anfetamina.

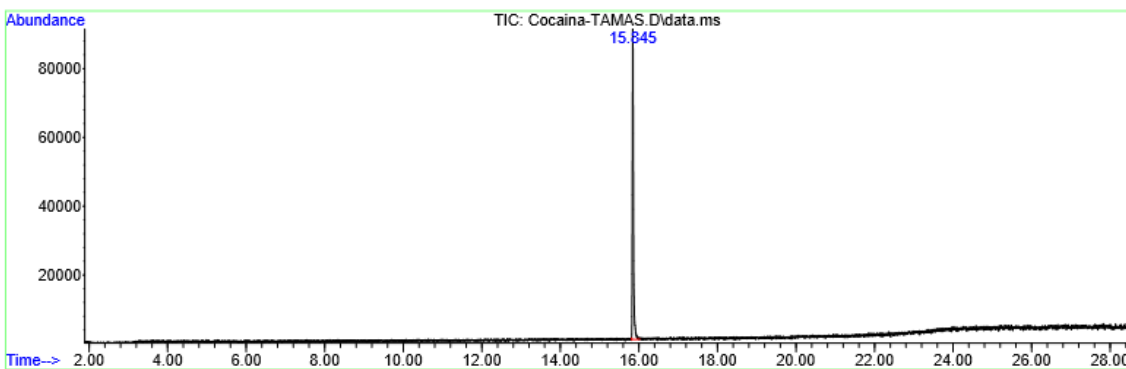


Figura 17 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância cocaína.

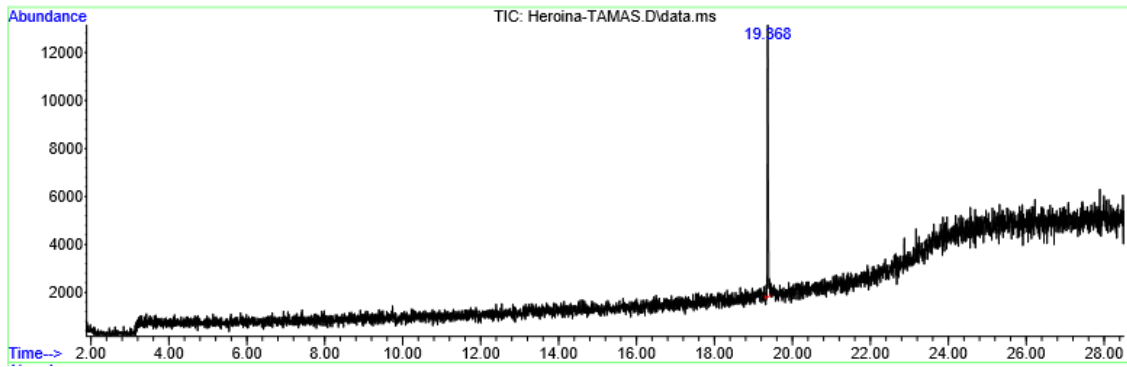


Figura 18 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância heroína.

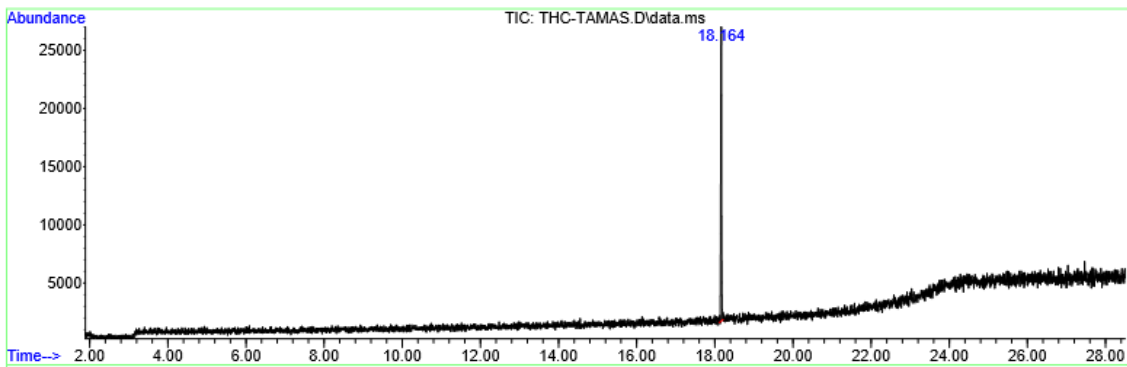


Figura 19 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da substância THC.

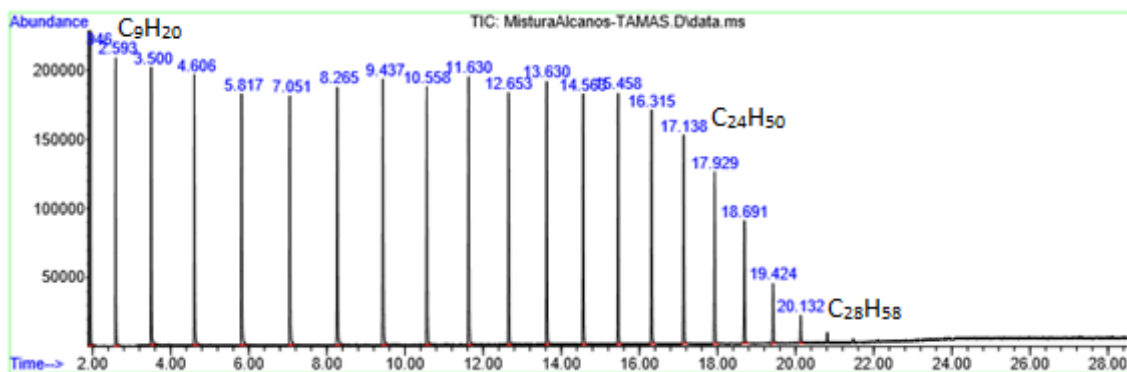


Figura 20 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método01" da mistura *n*-alcanos.

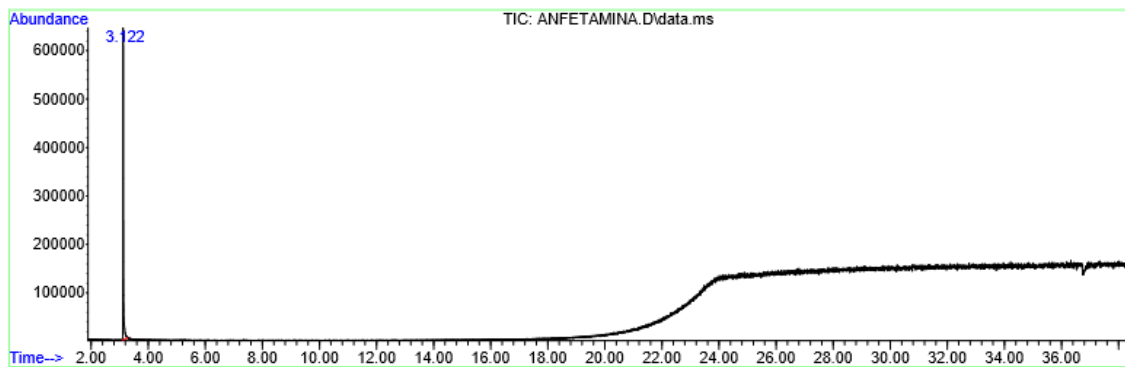


Figura 21 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância anfetamina.

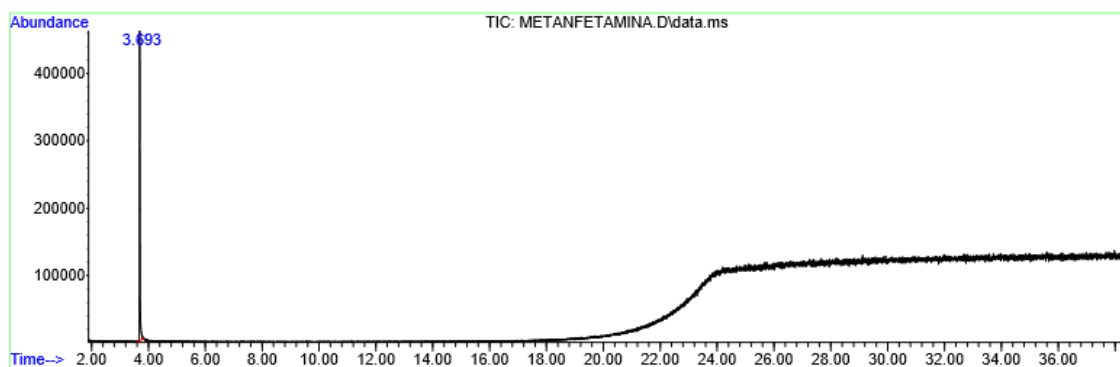


Figura 22 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância metanfetamina.

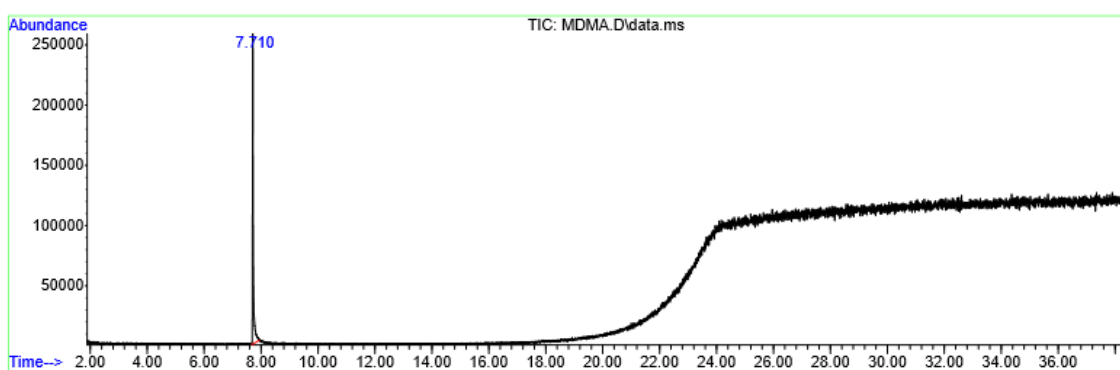


Figura 23 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância MDMA.

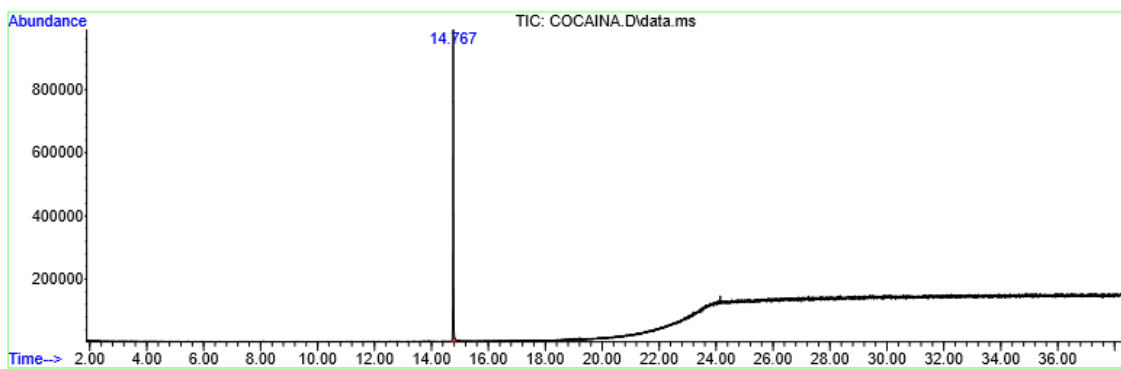


Figura 24 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância cocaína.

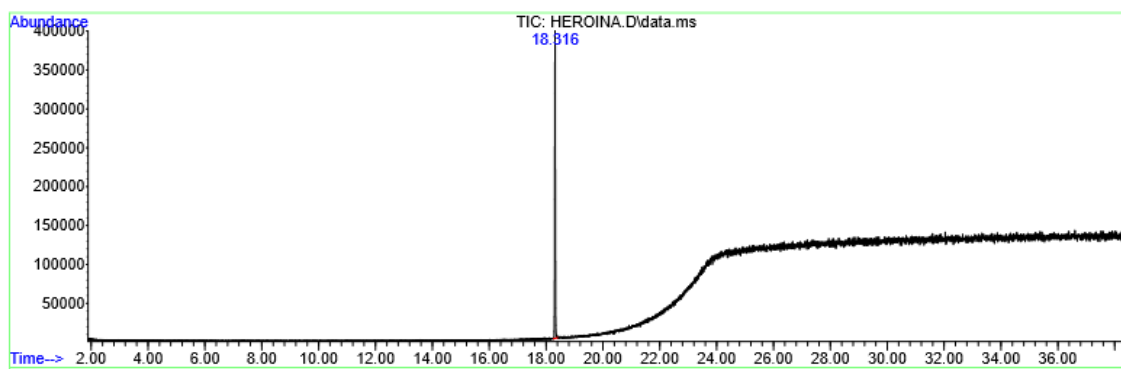


Figura 25 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância heroína.

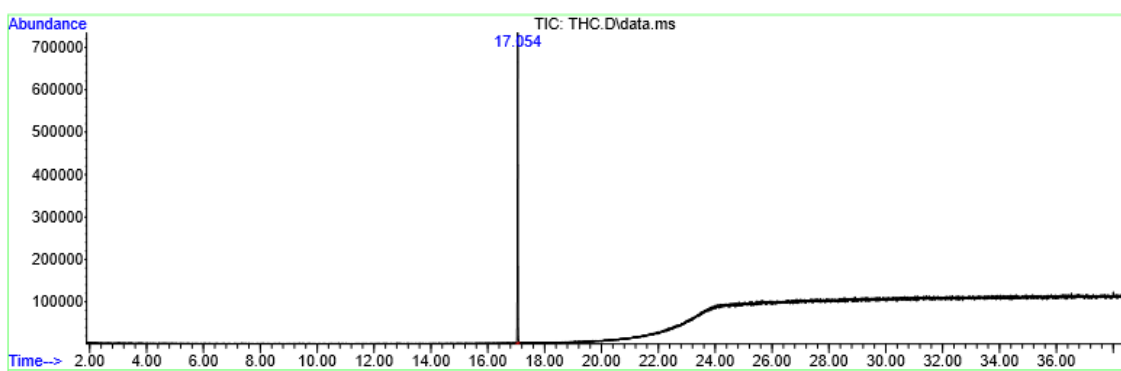


Figura 26 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da substância THC.

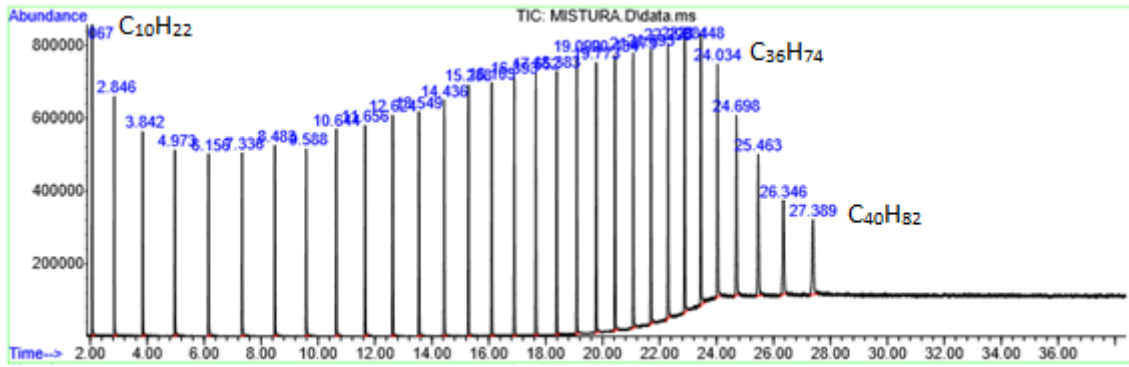


Figura 27 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" da mistura *n*-alcanos.

ANEXO 2

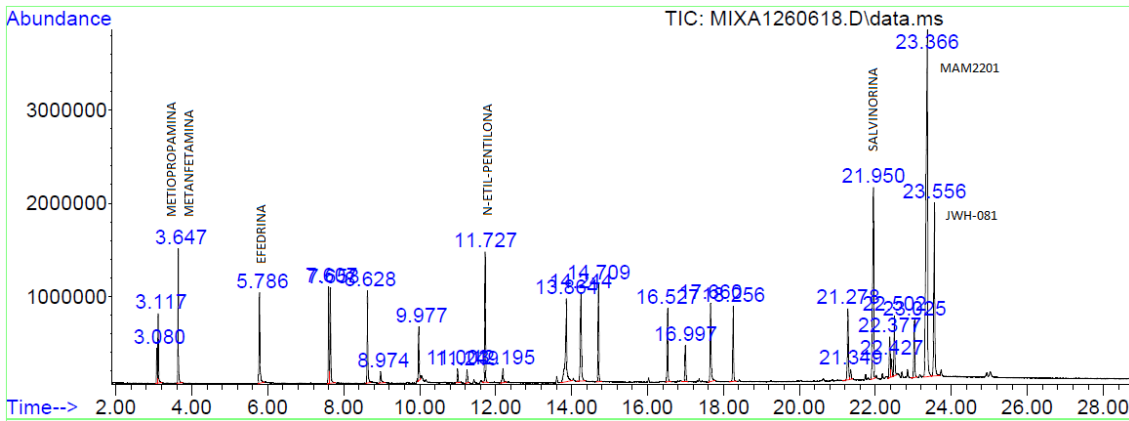


Figura 28 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" para o Mix de drogas.

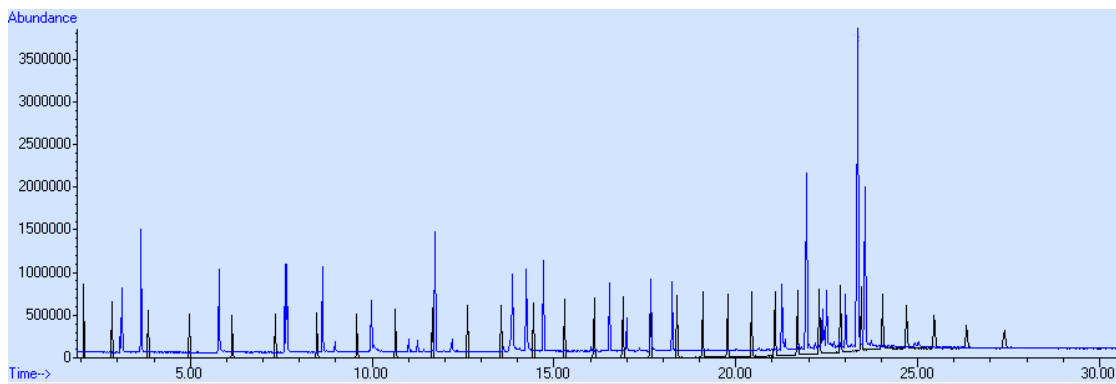


Figura 29 - Sobreposição de cromatograma obtido empregando-se o método "Método02" para o Mix de drogas (em azul) e mistura de *n*-alcanos (em preto).

ANEXO 3

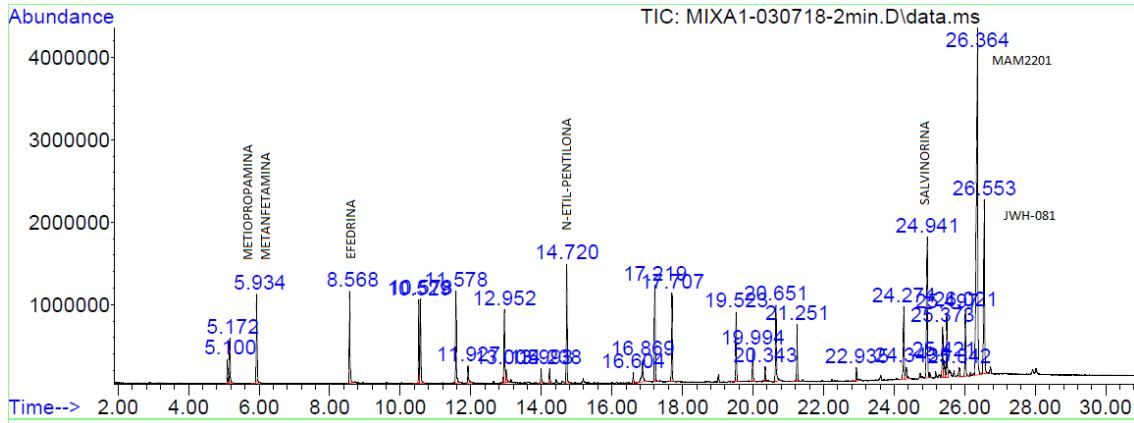


Figura 30 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método03" para o Mix de drogas.

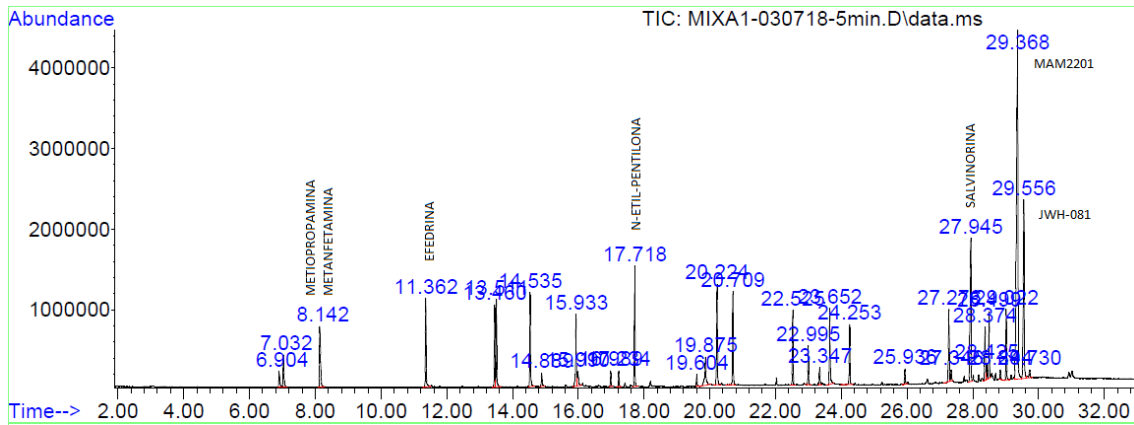


Figura 31 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método04" para o Mix de drogas.

ANEXO 4

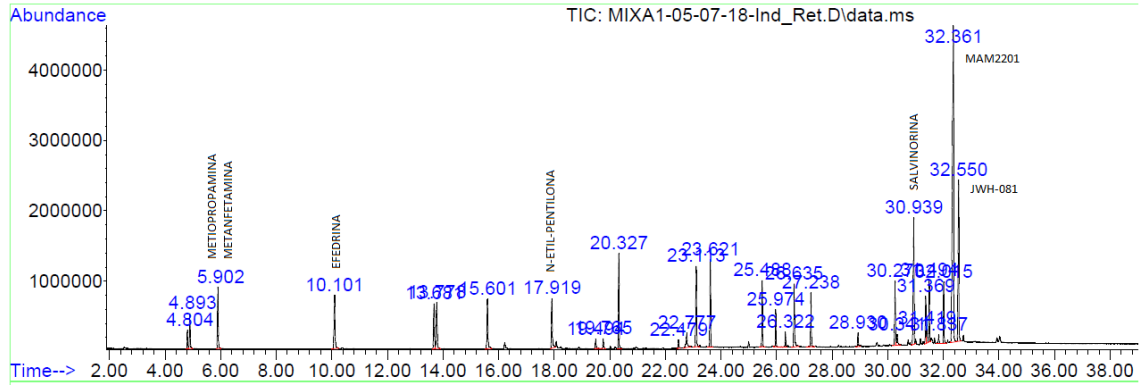


Figura 32 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método05" para o Mix de drogas.

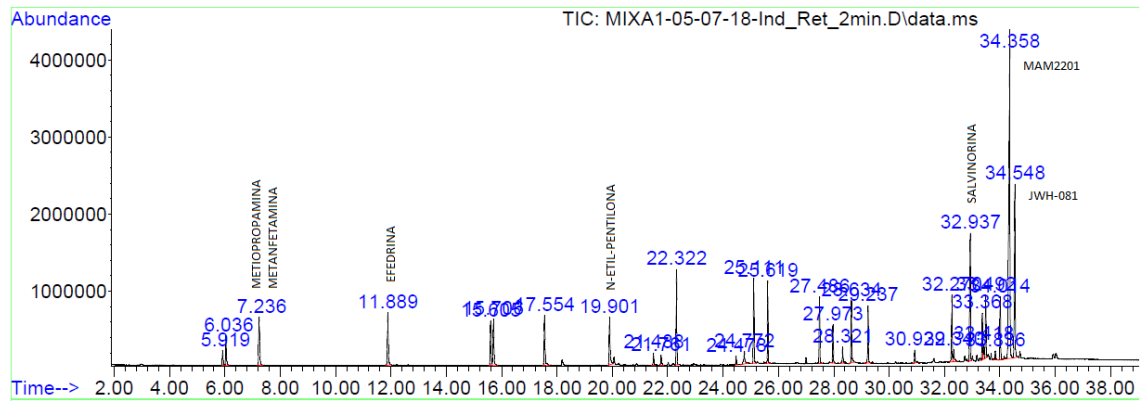


Figura 33 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método06" para o Mix de drogas.

ANEXO 5

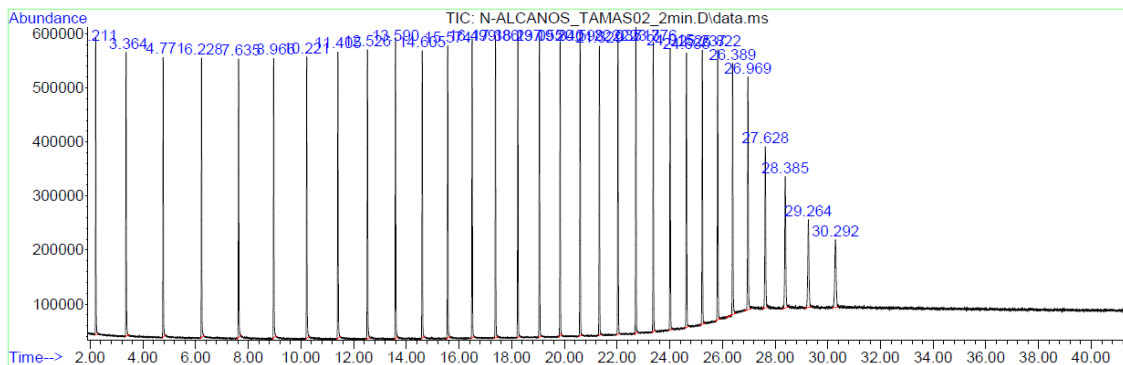


Figura 34 - Cromatograma obtido empregando-se o método "Método03" para a mistura de *n*-alcanos. O primeiro pico de $t_R = 2,211$ é referente ao C_9H_{20} enquanto o último sinal de $t_R = 30,292$ se refere ao $C_{40}H_{82}$.

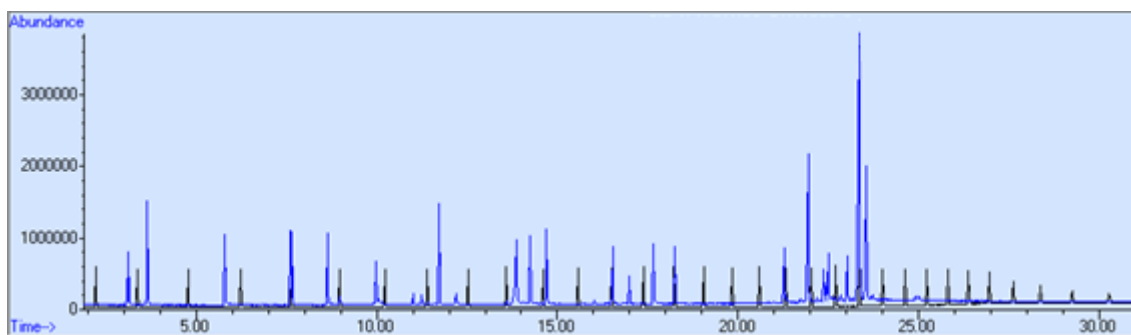


Figura 35 - Sobreposição de cromatograma obtido empregando-se o método "Método03" para o Mix de drogas (em azul) e mistura de *n*-alcanos (em preto).

ANEXO 6

Tabela 21 – Valores de Repetibilidade calculados para as corridas do Grupo 1 - Equipamento CGEM_A, Dia 1.

Substância	IRK médio (n=6)	Variância	DPR
Anfetamina	1123	0,014	0,011%
2-FA	1127	0,006	0,007%
Metiopropamina/Metanfetamina	1179	0,003	0,004%
Efedrina	1369	0,013	0,008%
5-MAPB	1524	0,012	0,007%
MDMA	1529	0,002	0,003%
o-CPP	1613	0,012	0,007%
5-IAI	1645	0,066	0,016%
p-CPP	1737	0,013	0,007%
<i>N</i> -etilpentilona	1909	0,017	0,007%
5-MeO-MiPT	2177	0,023	0,007%
Cocaína	2233	0,009	0,004%
U-47700	2454	0,017	0,005%
THC	2516	0,010	0,004%
25C-NBOMe	2602	0,036	0,007%
Heroína	2683	0,043	0,008%
Salvinorina	3132	0,092	0,010%
Salvinorina	3239	0,038	0,006%
AM-2201	3334	0,076	0,008%
JWH-210	3425	0,060	0,007%
MAM-2201	3483	0,138	0,011%
JWH-081	3518	0,084	0,008%

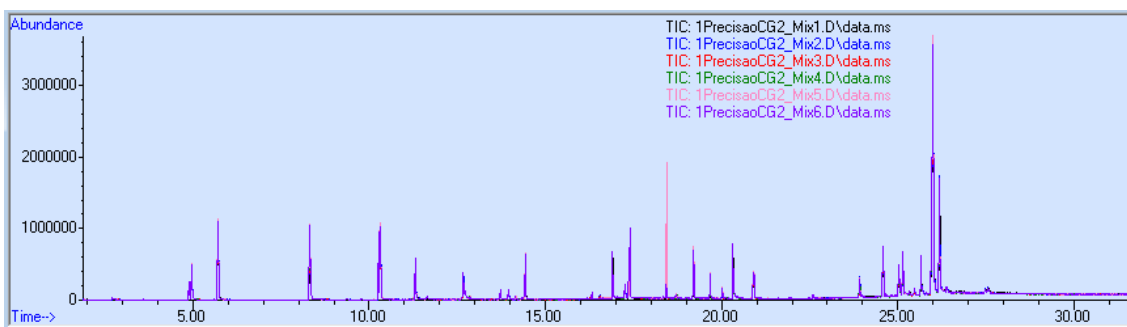


Figura 36 - Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 1 - Equipamento CGEM_A, Dia 1.

Tabela 22 – Valores de Repetibilidade calculados para as corridas do Grupo 2 - Equipamento CGEM_A, Dia 2.

Substância	IRK médio (n=4)	Variância	DPR
Anfetamina	1123	0,008	0,008%
2-FA	1128	0,002	0,004%
Metiopropamina/Metanfetamina	1179	0,002	0,003%
Efedrina	1368	0,001	0,003%
5-MAPB	1524	0,002	0,003%
MDMA	1528	0,002	0,003%
o-CPP	1613	0,005	0,005%
5-IAI	1645	0,071	0,016%
p-CPP	1737	0,002	0,003%
N-etilpentilona	1908	0,007	0,004%
5-MeO-MiPT	2175	0,004	0,003%
Cocaína	2232	0,005	0,003%
U-47700	2453	0,004	0,003%
THC	2515	0,028	0,007%
25C-NBOMe	2601	0,006	0,003%
Heroína	2682	0,005	0,003%
Salvinorina	3130	0,009	0,003%
Salvinorina	3236	0,009	0,003%
AM-2201	3332	0,039	0,006%
JWH-210	3423	0,010	0,003%
MAM-2201	3477	0,049	0,006%
JWH-081	3514	0,022	0,004%

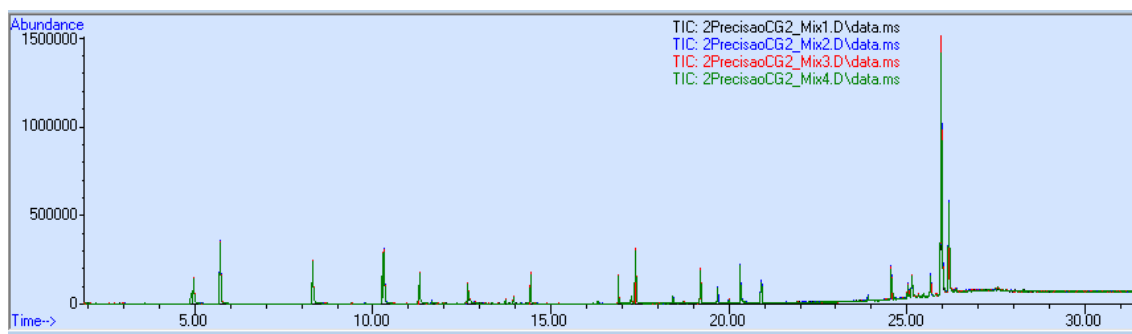


Figura 37 - Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 2 - Equipamento CGEM_A, Dia 2.

Tabela 23 – Valores de Repetibilidade calculados para as corridas do Grupo 3 - Equipamento CGEM_B, Dia 3.

Substância	IRK médio (n=6)	Variância	DPR
Anfetamina	1125	0,050	0,020%
2-FA	1130	0,025	0,014%
Metiopropamina/Metanfetamina	1182	0,021	0,012%
Efedrina	1372	0,025	0,011%
5-MAPB	1529	0,047	0,014%
MDMA	1533	0,039	0,013%
o-CPP	1620	0,042	0,013%
5-IAI	1654	0,205	0,027%
p-CPP	1746	0,047	0,012%
N-etilpentilona	1915	0,047	0,011%
5-MeO-MiPT	2184	0,070	0,012%
Cocaína	2242	0,074	0,012%
U-47700	2467	0,061	0,010%
THC	2524	0,075	0,011%
25C-NBOMe	2612	0,057	0,009%
Heroína	2696	0,085	0,011%
Salvinorina	3146	0,119	0,011%
Salvinorina	3254	0,174	0,013%
AM-2201	3352	0,146	0,011%
JWH-210	3441	0,129	0,010%
MAM-2201	3500	0,256	0,014%
JWH-081	3533	0,177	0,012%

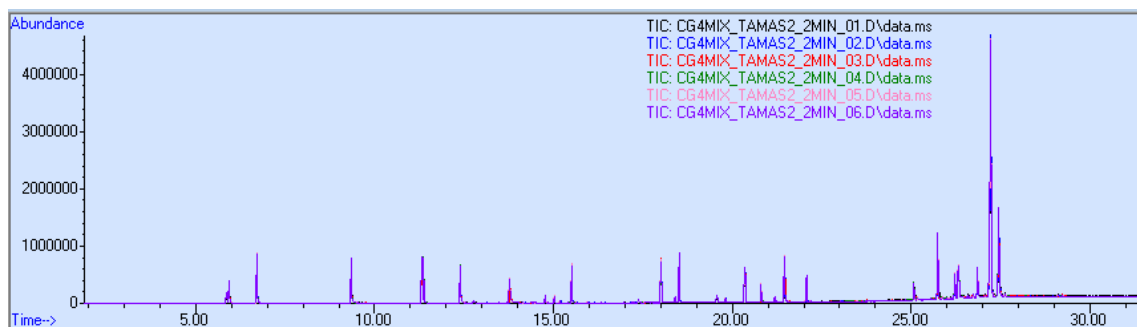


Figura 38 - Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 3 - Equipamento CGEM_B, Dia 3.

Tabela 24 – Valores de Repetibilidade calculados para as corridas do Grupo 4 - Equipamento CGEM_B, Dia 4.

Substância	IRK médio (n=6)	Variância	DPR
Anfetamina	1125	0,014	0,010%
2-FA	1130	0,011	0,009%
Metiopropamina/Metanfetamina	1182	0,006	0,007%
Efedrina	1372	0,006	0,006%
5-MAPB	1529	0,010	0,006%
MDMA	1533	0,008	0,006%
o-CPP	1620	0,012	0,007%
5-IAI	1653	0,025	0,009%
p-CPP	1746	0,013	0,006%
N-etilpentilona	1914	0,017	0,007%
5-MeO-MiPT	2184	0,039	0,009%
Cocaína	2242	0,022	0,007%
U-47700	2467	0,043	0,008%
THC	2524	0,049	0,009%
25C-NBOMe	2612	0,060	0,009%
Heroína	2696	0,063	0,009%
Salvinorina	3145	0,069	0,008%
Salvinorina	3254	0,031	0,005%
AM-2201	3352	0,031	0,005%
JWH-210	3441	0,035	0,005%
MAM-2201	3500	0,097	0,009%
JWH-081	3532	0,057	0,007%

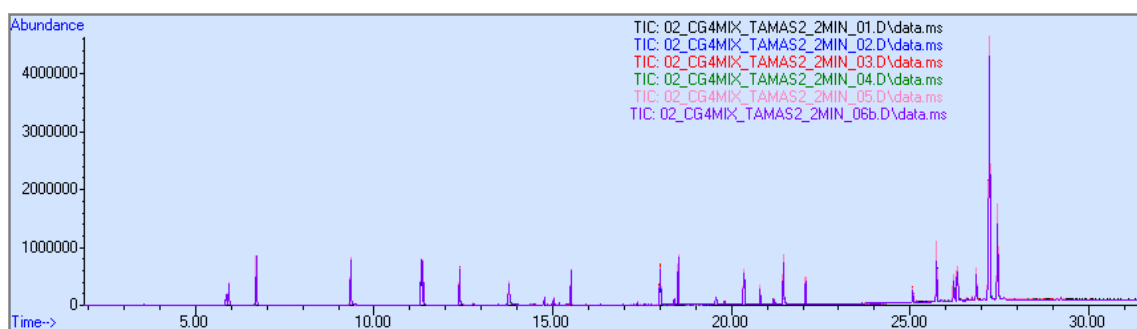


Figura 39 - Sobreposição dos cromatogramas utilizados na avaliação da Repetibilidade do Grupo 4 - Equipamento CGEM_B, Dia 4

ANEXO 7

Tabela 25 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 1.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1106	1105	1106	0,107	0,030%
2-FA	1109	1109	1109	0,055	0,052%
Metiopropamina	1164	1163	1163	0,035	0,044%
Metanfetamina	1166	1166	1166	0,079	0,054%
Efedrina	1345	1345	1345	0,011	0,029%
MAPB e MDMA	1505	1505	1505	0,014	0,027%
MAPB e MDMA	1505	1505	1505	0,014	0,027%
o-CPP	1588	1588	1588	0,014	0,026%
5-IAI	1615	1615	1615	0,035	0,032%
p-CPP	1708	1708	1708	0,017	0,025%
N-etilpentilona	1879	1879	1879	0,005	0,017%
5-MeO-MiPT	2136	2136	2136	0,000	0,000%
Cocaína	2191	2191	2191	0,000	0,000%
U-47700	2428	2428	2428	0,008	0,015%
THC	2481	2480	2481	0,032	0,020%
25C-NBOMe	2552	2552	2552	0,009	0,014%
Heroína	2629	2629	2629	0,037	0,020%

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Salvinorina	3062	3062	3062	0,012	0,013%
Salvinorina	3170	3170	3170	0,000	0,000%
AM2201	3255	3255	3255	0,011	0,012%
JWH-210	3353	3353	3353	0,000	0,000%
MAM2201	3400	3400	3400	0,000	0,000%
JWH-081	3438	3438	3438	0,007	0,010%

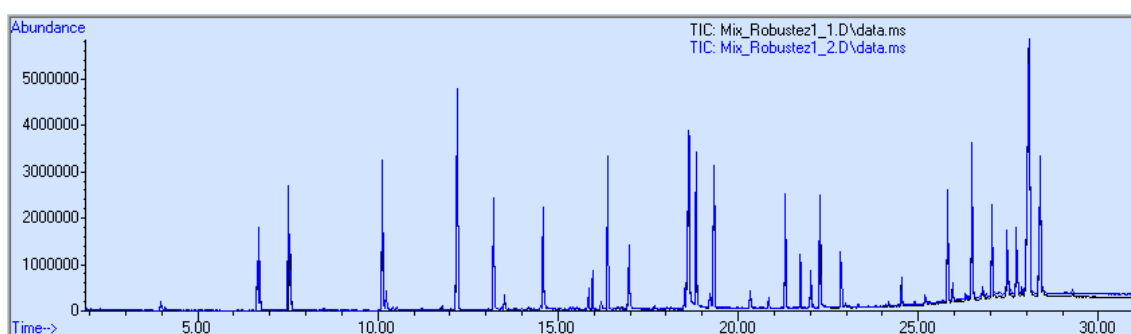


Figura 40 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 1.

Tabela 26 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 2.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1107	1106	1106	0,363	0,039%
2-FA	1110	1109	1110	0,309	0,035%
Metiopropamina	1164	1164	1164	0,363	0,037%
Metanfetamina	1168	1167	1167	0,363	0,036%
Efedrina	1346	1345	1346	0,540	0,039%
MAPB e MDMA	1506	1505	1505	0,784	0,042%
MAPB e MDMA	1506	1505	1505	0,784	0,042%
o-CPP	1590	1589	1590	0,589	0,034%
5-IAI	1617	1616	1617	0,656	0,035%
p-CPP	1710	1709	1709	0,728	0,035%
N-etilpentilona	1880	1879	1880	0,683	0,031%

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
5-MeO-MiPT	2136	2135	2135	0,504	0,024%
Cocaína	2192	2191	2192	0,623	0,025%
U-47700	2429	2427	2428	0,644	0,023%
THC	2482	2481	2481	0,644	0,023%
25C-NBOMe	2553	2552	2553	0,698	0,023%
Heroína	2630	2629	2629	0,750	0,023%
Salvinorina	3059	3058	3058	0,724	0,020%
Salvinorina	3167	3166	3166	0,736	0,019%
AM2201	3251	3250	3251	1,013	0,022%
JWH-210	3348	3347	3347	0,526	0,015%
MAM2201	3389	3388	3388	0,889	0,020%
JWH-081	3429	3428	3428	0,757	0,018%

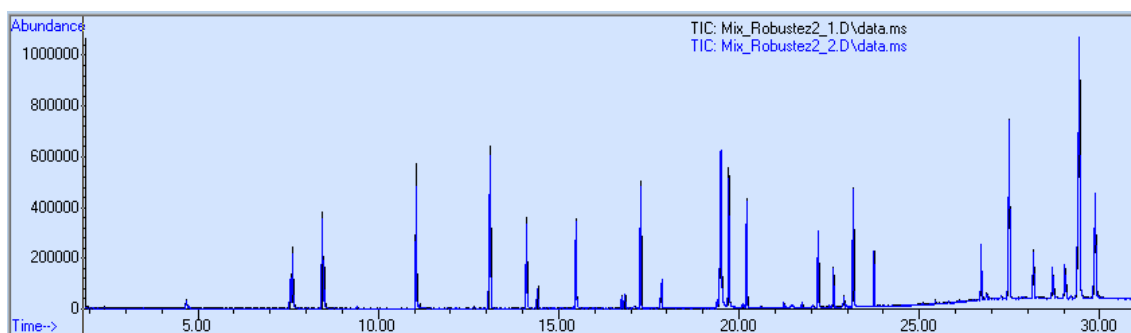


Figura 41 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 2.

Tabela 27 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 3.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1128	1126	1127	1,263	0,100%
2-FA	1131	1131	1131	0,153	0,035%
Metiopropamina e Metanfetamina	1184	1183	1184	0,060	0,021%
Metiopropamina e Metanfetamina	1184	1183	1184	0,060	0,021%
Efedrina	1374	1373	1374	0,045	0,015%

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
MAPB	1531	1531	1531	0,088	0,019%
MDMA	1535	1534	1535	0,088	0,019%
o-CPP	1623	1623	1623	0,142	0,023%
5-IAI	1661	1657	1659	7,279	0,163%
p-CPP	1750	1749	1749	0,280	0,030%
N-etilpentilona	1917	1916	1917	0,191	0,023%
5-MeO-MiPT	2186	2186	2186	0,228	0,022%
Cocaína	2245	2245	2245	0,247	0,022%
U-47700	2472	2471	2472	0,291	0,022%
THC	2528	2527	2527	0,425	0,026%
25C-NBOMe	2616	2615	2615	0,457	0,026%
Heroína	2702	2701	2701	0,490	0,026%
Salvinorina	3151	3150	3151	0,637	0,025%
Salvinorina	3261	3260	3260	0,497	0,022%
AM2201	3360	3359	3359	0,716	0,025%
JWH-210	3448	3447	3448	0,678	0,024%
MAM2201	3506	3505	3505	0,397	0,018%
JWH-081	3539	3538	3538	0,541	0,021%

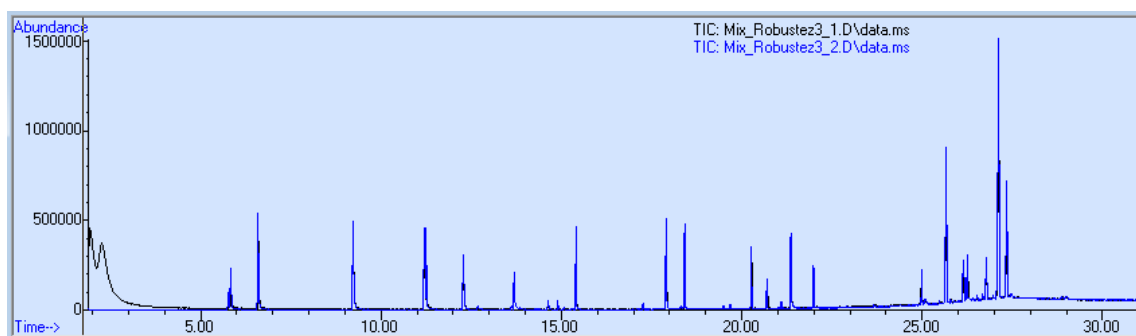


Figura 42 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 3.

Tabela 28 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 4.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1130	1130	1130	0,000	0,000%
2-FA	1134	1134	1134	0,000	0,000%
Metiopropamina e Metanfetamina	1187	1187	1187	0,002	0,004%
Metiopropamina e Metanfetamina	1187	1187	1187	0,002	0,004%
Efedrina	1379	1379	1379	0,000	0,000%
MAPB	1537	1537	1537	0,013	0,008%
MDMA	1542	1542	1542	0,003	0,004%
o-CPP	1634	1634	1634	0,004	0,004%
5-IAI	1670	1670	1670	0,004	0,004%
p-CPP	1764	1764	1764	0,000	0,000%
N-etilpentilona	1920	1919	1920	0,005	0,004%
5-MeO-MiPT	2193	2193	2193	0,000	0,000%
Cocaína	2246	2245	2245	0,026	0,007%
U-47700	2472	2472	2472	0,008	0,004%
THC	2531	2531	2531	0,000	0,000%
25C-NBOMe	2612	2612	2612	0,009	0,004%
Heroína	2694	2694	2694	0,081	0,011%
Salvinorina	3142	3142	3142	0,036	0,006%
Salvinorina	3256	3256	3256	0,062	0,008%
AM2201	3371	3370	3371	0,047	0,006%
JWH-210	3451	3451	3451	0,015	0,004%
MAM2201	3513	3513	3513	0,000	0,000%
JWH-081	3543	3543	3543	0,000	0,000%

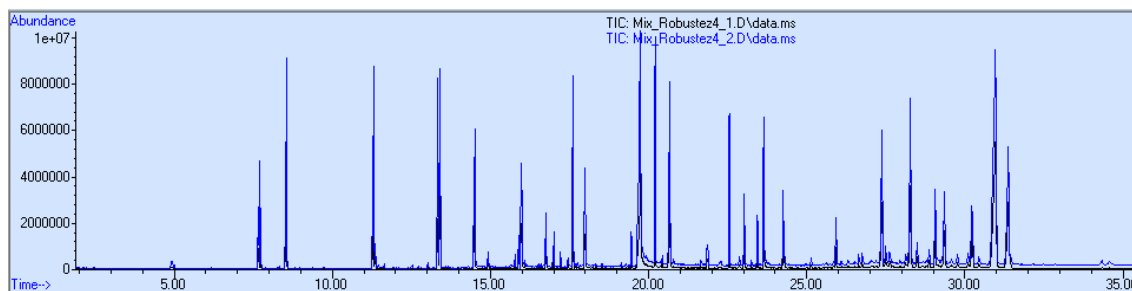


Figura 43 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 4.

Tabela 29 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 5.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1104	1104	1104	0,019	0,013%
2-FA	1108	1108	1108	0,009	0,008%
Metiopropamina	1162	1162	1162	0,009	0,008%
Metanfetamina	1165	1165	1165	0,019	0,012%
Efedrina	1344	1344	1344	0,000	0,000%
MAPB e MDMA	1503	1503	1503	0,000	0,000%
MAPB e MDMA	1503	1503	1503	0,000	0,000%
o-CPP	1586	1586	1586	0,003	0,004%
5-IAI	1612	1612	1612	0,000	0,000%
p-CPP	1706	1705	1706	0,004	0,004%
N-etilpentilona	1877	1877	1877	0,000	0,000%
5-MeO-MiPT	2132	2132	2132	0,006	0,004%
Cocaína	2188	2188	2188	0,006	0,004%
U-47700	2423	2423	2423	0,000	0,000%
THC	2478	2478	2478	0,000	0,000%
25C-NBOMe	2549	2549	2549	0,000	0,000%
Heroína	2624	2624	2624	0,009	0,004%
Salvinorina	3054	3054	3054	0,012	0,004%
Salvinorina	3160	3160	3160	0,000	0,000%
AM2201	3246	3246	3246	0,009	0,003%
JWH-210	3343	3343	3343	0,027	0,005%
MAM2201	3383	3383	3383	0,007	0,002%
JWH-081	3424	3424	3424	0,005	0,002%

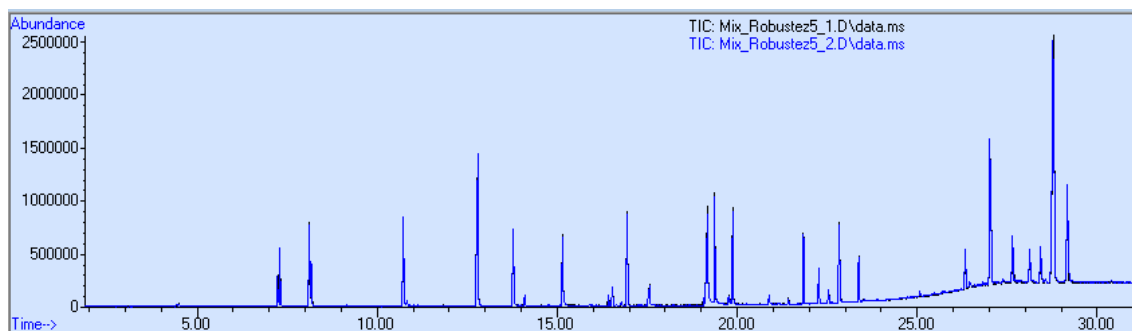


Figura 44 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 5.

Tabela 30 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 6.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1105	1105	1105	0,002	0,004%
2-FA	1109	1109	1109	0,000	0,000%
Metiopropamina	1163	1163	1163	0,000	0,000%
Metanfetamina	1166	1166	1166	0,002	0,004%
Efedrina	1345	1345	1345	0,000	0,000%
MAPB e MDMA	1504	1504	1504	0,004	0,004%
MAPB e MDMA	1504	1504	1504	0,004	0,004%
o-CPP	1586	1586	1586	0,004	0,004%
5-IAI	1612	1612	1612	0,004	0,004%
p-CPP	1706	1706	1706	0,004	0,004%
N-etilpentilona	1878	1878	1878	0,019	0,007%
5-MeO-MiPT	2134	2134	2134	0,006	0,004%
Cocaína	2189	2188	2189	0,025	0,007%
U-47700	2423	2423	2423	0,008	0,004%
THC	2478	2478	2478	0,008	0,004%
25C-NBOMe	2549	2549	2549	0,009	0,004%
Heroína	2624	2623	2624	0,009	0,004%
Salvinorina	3057	3057	3057	0,000	0,000%
Salvinorina	3166	3166	3166	0,013	0,004%
AM2201	3249	3249	3249	0,000	0,000%
JWH-210	3347	3347	3347	0,046	0,006%
MAM2201	3394	3394	3394	0,046	0,006%
JWH-081	3433	3433	3433	0,081	0,008%

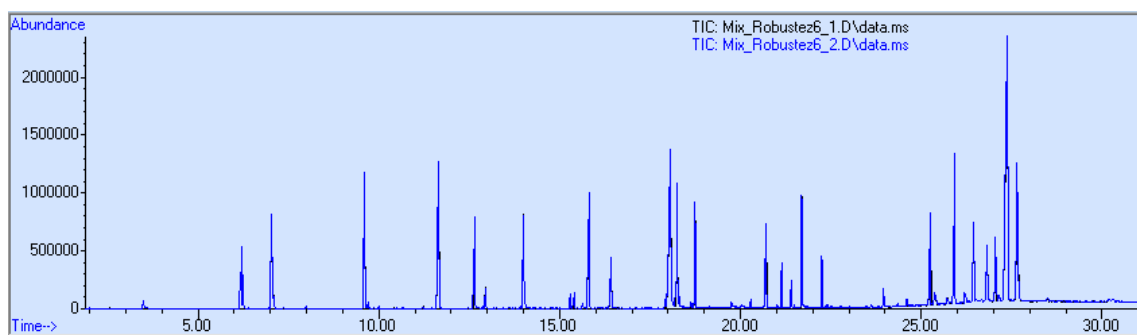


Figura 45 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 6.

Tabela 31 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 7.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1124	1124	1124	0,002	0,004%
2-FA	1129	1129	1129	0,002	0,004%
Metiopropamina e Metanfetamina	1181	1181	1181	0,000	0,000%
Metiopropamina e Metanfetamina	1181	1181	1181	0,000	0,000%
Efedrina	1372	1372	1372	0,000	0,000%
MAPB	1529	1529	1529	0,004	0,004%
MDMA	1533	1533	1533	0,000	0,000%
o-CPP	1620	1620	1620	0,000	0,000%
5-IAI	1652	1652	1652	0,016	0,008%
p-CPP	1745	1745	1745	0,004	0,004%
N-etilpentilona	1915	1915	1915	0,000	0,000%
5-MeO-MiPT	2185	2185	2185	0,000	0,000%
Cocaína	2242	2242	2242	0,000	0,000%
U-47700	2467	2467	2467	0,008	0,004%
THC	2524	2524	2524	0,000	0,000%
25C-NBOMe	2612	2612	2612	0,000	0,000%
Heroína	2696	2696	2696	0,009	0,004%
Salvinorina	3149	3148	3149	0,013	0,004%
Salvinorina	3258	3258	3258	0,014	0,004%
AM2201	3352	3352	3352	0,013	0,003%
JWH-210	3441	3441	3441	0,010	0,003%
MAM2201	3504	3504	3504	0,067	0,007%
JWH-081	3535	3535	3535	0,000	0,000%

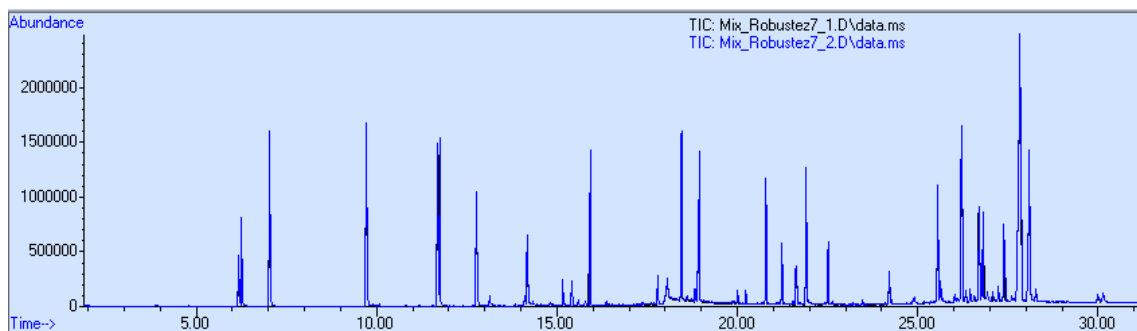


Figura 46 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 7.

Tabela 32 – Valores calculados para os Índices de Retenção de Kovats, Índice de Retenção de Kovats médio, Variância e Desvio Padrão Relativo para as duas corridas Robustez 8.

Substância	IRK para corrida A	IRK para corrida B	IRK médio	Variância	DPR
Anfetamina	1130	1130	1130	0,009	0,008%
2-FA	1133	1133	1133	0,002	0,004%
Metiopropamina e Metanfetamina	1186	1186	1186	0,009	0,008%
Metiopropamina e Metanfetamina	1186	1186	1186	0,009	0,008%
Efedrina	1377	1377	1377	0,003	0,004%
MAPB	1535	1535	1535	0,003	0,004%
MDMA	1540	1540	1540	0,013	0,008%
o-CPP	1631	1631	1631	0,015	0,008%
5-IAI	1667	1667	1667	0,015	0,007%
p-CPP	1761	1760	1761	0,017	0,007%
N-etilpentilona	1917	1917	1917	0,005	0,004%
5-MeO-MiPT	2189	2189	2189	0,006	0,004%
Cocaína	2242	2242	2242	0,007	0,004%
U-47700	2467	2466	2466	0,031	0,007%
THC	2527	2527	2527	0,008	0,004%
25C-NBOMe	2608	2608	2608	0,009	0,004%
Heroína	2689	2689	2689	0,009	0,004%
Salvinorina	3137	3136	3137	0,051	0,007%
Salvinorina	3252	3251	3252	0,013	0,004%
AM2201	3369	3369	3369	0,099	0,009%
JWH-210	3452	3452	3452	0,034	0,005%
MAM2201	3511	3511	3511	0,007	0,002%
JWH-081	3544	3544	3544	0,059	0,007%

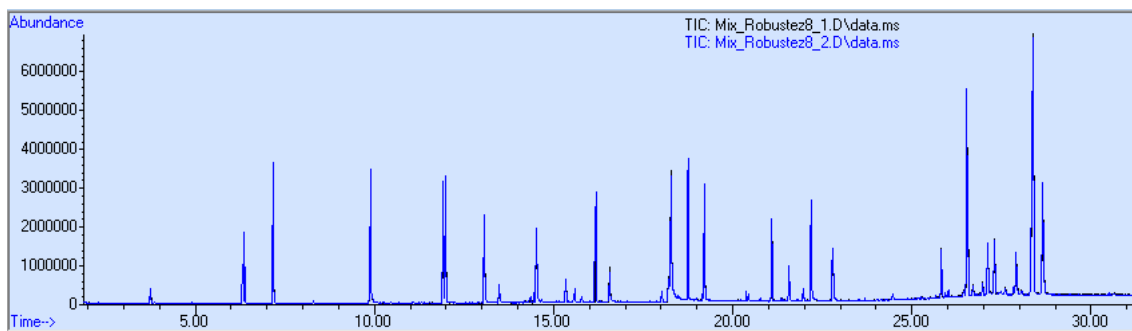


Figura 47 – Sobreposição dos cromatogramas do Mix de drogas obtidos com as condições indicadas na Tabela 1 como Robustez 8.

ANEXO 8

Tabela 33 – Valores calculados para o efeito “Marca da Coluna”, sua Variância e Intervalo de Confiança.

Substância	Efeito Marca da Coluna	Variância do Efeito	I.C. para $t_{8,95\%}$
Anfetamina	2,698	0,055	$\pm 0,542$
2-FA	2,189	0,017	$\pm 0,297$
Metiopropamina e Metanfetamina	2,336	0,015	$\pm 0,282$
Metiopropamina e Metanfetamina	2,411	0,017	$\pm 0,298$
Efedrina	2,716	0,019	$\pm 0,315$
MAPB e MDMA	3,441	0,028	$\pm 0,389$
MAPB e MDMA	3,853	0,028	$\pm 0,388$
o-CPP	5,689	0,024	$\pm 0,358$
5-IAI	7,085	0,250	$\pm 1,154$
p-CPP	7,824	0,033	$\pm 0,419$
N-etilpentilona	1,682	0,028	$\pm 0,388$
5-MeO-MiPT	2,987	0,023	$\pm 0,353$
Cocaína	0,265	0,029	$\pm 0,394$
U-47700	-0,110	0,031	$\pm 0,407$
THC	1,893	0,035	$\pm 0,431$
25C-NBOMe	-1,406	0,037	$\pm 0,445$
Heroína	-3,412	0,044	$\pm 0,482$
Salvinorina	-5,427	0,046	$\pm 0,497$
Salvinorina	-2,169	0,042	$\pm 0,471$
AM2201	6,914	0,060	$\pm 0,563$
JWH-210	3,131	0,042	$\pm 0,471$
MAM2201	3,794	0,044	$\pm 0,485$
JWH-081	3,262	0,045	$\pm 0,491$

Tabela 34 – Valores calculados para o efeito “Polaridade da Coluna”, sua Variância e Intervalo de Confiança.

Substância	Efeito Polaridade da Coluna	Variância do Efeito	I.C. para $t_{8,95\%}$
Anfetamina	22,595	0,055	±0,542
2-FA	22,858	0,017	±0,297
Metiopropamina e Metanfetamina	21,450	0,015	±0,282
Metiopropamina e Metanfetamina	18,531	0,017	±0,298
Efedrina	30,527	0,019	±0,315
MAPB e MDMA	28,976	0,028	±0,389
MAPB e MDMA	33,312	0,028	±0,388
o-CPP	39,327	0,024	±0,358
5-IAI	48,078	0,250	±1,154
p-CPP	47,573	0,033	±0,419
N-etilpentilona	38,516	0,028	±0,388
5-MeO-MiPT	53,987	0,023	±0,353
Cocaína	53,601	0,029	±0,394
U-47700	43,809	0,031	±0,407
THC	47,876	0,035	±0,431
25C-NBOMe	61,174	0,037	±0,445
Heroína	68,770	0,044	±0,482
Salvinorina	86,698	0,046	±0,497
Salvinorina	90,867	0,042	±0,471
AM2201	112,575	0,060	±0,563
JWH-210	100,525	0,042	±0,471
MAM2201	117,074	0,044	±0,485
JWH-081	109,029	0,045	±0,491

Tabela 35 – Valores calculados para o efeito “Fluxo do gás de arraste”, sua Variância e Intervalo de Confiança.

Substância	Efeito Fluxo do Gás de Arraste	Variância do Efeito	I.C. para $t_{8,95\%}$
Anfetamina	-1,634	0,055	±0,542
2-FA	-1,215	0,017	±0,297
Metiopropamina e Metanfetamina	-1,361	0,015	±0,282
Metiopropamina e Metanfetamina	-1,372	0,017	±0,298
Efedrina	-1,565	0,019	±0,315
MAPB e MDMA	-1,950	0,028	±0,389
MAPB e MDMA	-1,938	0,028	±0,388
o-CPP	-3,025	0,024	±0,358
5-IAI	-4,382	0,250	±1,154
p-CPP	-3,547	0,033	±0,419
N-etilpentilona	-2,070	0,028	±0,388
5-MeO-MiPT	-2,810	0,023	±0,353
Cocaína	-3,256	0,029	±0,394
U-47700	-5,091	0,031	±0,407
THC	-3,127	0,035	±0,431
25C-NBOMe	-3,610	0,037	±0,445
Heroína	-5,272	0,044	±0,482
Salvinorina	-4,294	0,046	±0,497
Salvinorina	-4,318	0,042	±0,471
AM2201	-4,899	0,060	±0,563
JWH-210	-3,826	0,042	±0,471
MAM2201	-3,546	0,044	±0,485
JWH-081	-2,922	0,045	±0,491

Tabela 36 – Valores calculados para o efeito “Taxa de split”, sua Variância e Intervalo de Confiança.

Substância	Efeito Taxa de Split	Variância do Efeito	I.C. para $t_{8,95\%}$
Anfetamina	0,686	0,055	±0,542
2-FA	0,384	0,017	±0,297
Metiopropamina e Metanfetamina	0,343	0,015	±0,282
Metiopropamina e Metanfetamina	0,483	0,017	±0,298
<i>Efedrina</i>	<i>-0,270</i>	<i>0,019</i>	<i>±0,315</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>-0,134</i>	<i>0,028</i>	<i>±0,389</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>-0,260</i>	<i>0,028</i>	<i>±0,388</i>
<i>o-CPP</i>	<i>0,262</i>	<i>0,024</i>	<i>±0,358</i>
5-IAI	1,364	0,250	±1,154
p-CPP	0,421	0,033	±0,419
<i>N-etilpentilona</i>	<i>-0,058</i>	<i>0,028</i>	<i>±0,388</i>
5-MeO-MiPT	-1,386	0,023	±0,353
<i>Cocaína</i>	<i>-0,283</i>	<i>0,029</i>	<i>±0,394</i>
<i>U-47700</i>	<i>0,031</i>	<i>0,031</i>	<i>±0,407</i>
<i>THC</i>	<i>0,087</i>	<i>0,035</i>	<i>±0,431</i>
<i>25C-NBOMe</i>	<i>-0,040</i>	<i>0,037</i>	<i>±0,445</i>
<i>Heroína</i>	<i>0,107</i>	<i>0,044</i>	<i>±0,482</i>
Salvinorina	-2,229	0,046	±0,497
Salvinorina	-2,676	0,042	±0,471
AM2201	-0,671	0,060	±0,563
JWH-210	-0,528	0,042	±0,471
MAM2201	-5,886	0,044	±0,485
JWH-081	-3,322	0,045	±0,491

Tabela 37 – Valores calculados para o efeito “Temperatura do injetor”, sua Variância e Intervalo de Confiança.

Substância	Efeito Temperatura do injetor	Variância do Efeito	I.C. para $t_{8,95\%}$
Anfetamina	1,690	0,055	±0,542
2-FA	1,438	0,017	±0,297
Metiopropamina e Metanfetamina	1,562	0,015	±0,282
Metiopropamina e Metanfetamina	1,487	0,017	±0,298
Efedrina	2,003	0,019	±0,315
MAPB e MDMA	2,636	0,028	±0,389
MAPB e MDMA	3,048	0,028	±0,388
o-CPP	4,905	0,024	±0,358
5-IAI	6,211	0,250	±1,154
p-CPP	7,186	0,033	±0,419
N-etilpentilona	1,002	0,028	±0,388
5-MeO-MiPT	2,643	0,023	±0,353
<i>Cocaína</i>	<i>-0,178</i>	<i>0,029</i>	<i>±0,394</i>
<i>U-47700</i>	<i>-0,042</i>	<i>0,031</i>	<i>±0,407</i>
THC	1,564	0,035	±0,431
25C-NBOMe	-1,767	0,037	±0,445
Heroína	-3,595	0,044	±0,482
Salvinorina	-4,909	0,046	±0,497
Salvinorina	-3,130	0,042	±0,471
AM2201	7,360	0,060	±0,563
JWH-210	3,930	0,042	±0,471
MAM2201	3,931	0,044	±0,485
JWH-081	3,568	0,045	±0,491

Tabela 38 – Valores calculados para o efeito “Rampa de Temperatura”, sua Variância e Intervalo de Confiança.

Substância	Efeito Rampa de Temperatura	Variância do Efeito	I.C. para $t_{8,95\%}$
Anfetamina	0,966	0,055	±0,542
2-FA	0,544	0,017	±0,297
Metiopropamina e Metanfetamina	0,438	0,015	±0,282
<i>Metiopropamina e Metanfetamina</i>	<i>0,298</i>	<i>0,017</i>	<i>±0,298</i>
<i>Efedrina</i>	<i>-0,043</i>	<i>0,019</i>	<i>±0,315</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>0,109</i>	<i>0,028</i>	<i>±0,389</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>-0,017</i>	<i>0,028</i>	<i>±0,388</i>
<i>o-CPP</i>	<i>-0,116</i>	<i>0,024</i>	<i>±0,358</i>
<i>5-IAI</i>	<i>0,700</i>	<i>0,250</i>	<i>±1,154</i>
<i>p-CPP</i>	<i>-0,124</i>	<i>0,033</i>	<i>±0,419</i>
<i>N-etilpentilona</i>	<i>-0,206</i>	<i>0,028</i>	<i>±0,388</i>
<i>5-MeO-MiPT</i>	<i>-0,236</i>	<i>0,023</i>	<i>±0,353</i>
<i>Cocaína</i>	<i>-0,195</i>	<i>0,029</i>	<i>±0,394</i>
<i>U-47700</i>	<i>-0,276</i>	<i>0,031</i>	<i>±0,407</i>
<i>THC</i>	<i>-0,123</i>	<i>0,035</i>	<i>±0,431</i>
<i>25C-NBOMe</i>	<i>-0,199</i>	<i>0,037</i>	<i>±0,445</i>
<i>Heroína</i>	<i>-0,205</i>	<i>0,044</i>	<i>±0,482</i>
Salvinorina	0,591	0,046	±0,497
Salvinorina	1,748	0,042	±0,471
AM2201	3,525	0,060	±0,563
JWH-210	4,393	0,042	±0,471
MAM2201	5,619	0,044	±0,485
JWH-081	5,704	0,045	±0,491

ANEXO 9

Tabela 39 – Seleção das corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo (menor polaridade 100% Dimethylpolysiloxane).

		Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6
Corridas	Robustez 1	-1	-1	-1	-1	1	1
	Robustez 2	1	-1	-1	1	-1	-1
	Robustez 5	-1	-1	1	1	1	-1
	Robustez 6	1	-1	1	-1	-1	1

Tabela 40 – Seleção das corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto (maior polaridade (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane).

		Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6
Corridas	Robustez 3	-1	1	-1	1	-1	1
	Robustez 4	1	1	-1	-1	1	-1
	Robustez 7	-1	1	1	-1	-1	-1
	Robustez 8	1	1	1	1	1	1

Tabela 41 – Valores calculados para o efeito “Marca da Coluna” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.

Substância	Efeito Marca da Coluna	Variância do Efeito	I.C. para $t_{4,95\%}$
Anfetamina	1,008	0,061	$\pm 0,688$
2-FA	0,751	0,047	$\pm 0,599$
Metiopropamina e Metanfetamina	0,775	0,051	$\pm 0,626$
Metiopropamina e Metanfetamina	0,923	0,058	$\pm 0,668$
<i>Efedrina</i>	<i>0,712</i>	<i>0,069</i>	<i>$\pm 0,729$</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>0,805</i>	<i>0,100</i>	<i>$\pm 0,879$</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>0,805</i>	<i>0,100</i>	<i>$\pm 0,879$</i>
o-CPP	0,784	0,076	$\pm 0,766$
5-IAI	0,874	0,087	$\pm 0,818$
<i>p-CPP</i>	<i>0,638</i>	<i>0,094</i>	<i>$\pm 0,853$</i>
<i>N-etilpentilona</i>	<i>0,680</i>	<i>0,088</i>	<i>$\pm 0,825$</i>
<i>5-MeO-MiPT</i>	<i>0,344</i>	<i>0,065</i>	<i>$\pm 0,706$</i>

Substância	Efeito Marca da Coluna	Variância do Efeito	I.C. para t_{4,95%}
<i>Cocaína</i>	<i>0,442</i>	<i>0,082</i>	<i>±0,794</i>
<i>U-47700</i>	<i>-0,069</i>	<i>0,083</i>	<i>±0,798</i>
<i>THC</i>	<i>0,329</i>	<i>0,086</i>	<i>±0,812</i>
<i>25C-NBOMe</i>	<i>0,361</i>	<i>0,089</i>	<i>±0,830</i>
<i>Heroína</i>	<i>0,183</i>	<i>0,101</i>	<i>±0,881</i>
<i>Salvinorina</i>	<i>-0,518</i>	<i>0,094</i>	<i>±0,849</i>
Salvinorina	0,960	0,094	±0,849
<i>AM2201</i>	<i>-0,446</i>	<i>0,129</i>	<i>±0,998</i>
JWH-210	-0,799	0,075	±0,759
<i>MAM2201</i>	<i>-0,136</i>	<i>0,118</i>	<i>±0,952</i>
<i>JWH-081</i>	<i>-0,306</i>	<i>0,106</i>	<i>±0,905</i>

Tabela 42 – Valores calculados para o efeito “Marca da Coluna” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.

Substância	Efeito Marca da Coluna	Variância do Efeito	I.C. para t_{4,95%}
Anfetamina	4,389	0,159	±1,108
2-FA	3,626	0,020	±0,389
Metiopropamina e Metanfetamina	3,898	0,009	±0,260
Metiopropamina e Metanfetamina	3,898	0,009	±0,260
Efedrina	4,719	0,006	±0,214
MAPB e MDMA	6,076	0,014	±0,324
MAPB e MDMA	6,901	0,013	±0,318
o-CPP	10,594	0,020	±0,393
5-IAI	13,297	0,914	±2,655
p-CPP	15,010	0,038	±0,538
N-etilpentilona	2,684	0,025	±0,440
5-MeO-MiPT	5,631	0,029	±0,475
<i>Cocaína</i>	<i>0,087</i>	<i>0,035</i>	<i>±0,520</i>
<i>U-47700</i>	<i>-0,152</i>	<i>0,042</i>	<i>±0,570</i>
THC	3,457	0,054	±0,646
25C-NBOMe	-3,173	0,059	±0,677
Heroína	-7,006	0,074	±0,754
Salvinorina	-10,336	0,092	±0,843
Salvinorina	-5,299	0,073	±0,751

Substância	Efeito Marca da Coluna	Variância do Efeito	I.C. para t _{4,95%}
AM2201	14,274	0,109	±0,918
JWH-210	7,062	0,092	±0,843
MAM2201	7,725	0,059	±0,674
JWH-081	6,829	0,075	±0,761

Tabela 43 – Valores calculados para o efeito “Fluxo do Gás de Arraste” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.

Substância	Efeito Fluxo do Gás de Arraste	Variância do Efeito	I.C. para t _{4,95%}
Anfetamina	-1,557	0,061	±0,688
2-FA	-1,300	0,047	±0,599
Metiopropamina e Metanfetamina	-1,452	0,051	±0,626
Metiopropamina e Metanfetamina	-1,475	0,058	±0,668
Efedrina	-1,579	0,069	±0,729
MAPB e MDMA	-1,904	0,100	±0,879
MAPB e MDMA	-1,904	0,100	±0,879
o-CPP	-2,912	0,076	±0,766
5-IAI	-3,543	0,087	±0,818
p-CPP	-3,251	0,094	±0,853
N-etilpentilona	-1,962	0,088	±0,825
5-MeO-MiPT	-2,861	0,065	±0,706
Cocaína	-3,238	0,082	±0,794
U-47700	-5,128	0,083	±0,798
THC	-2,928	0,086	±0,812
25C-NBOMe	-3,449	0,089	±0,830
Heroína	-5,370	0,101	±0,881
Salvinorina	-4,618	0,094	±0,849
Salvinorina	-5,179	0,094	±0,849
AM2201	-5,507	0,129	±0,998
JWH-210	-5,019	0,075	±0,759
MAM2201	-5,604	0,118	±0,952
JWH-081	-4,454	0,106	±0,905

Tabela 44 – Valores calculados para o efeito “Fluxo do Gás de Arraste” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.

Substância	Efeito Fluxo do Gás de Arraste	Variância do Efeito	I.C. para $t_{4,95\%}$
Anfetamina	-1,711	0,159	±1,108
2-FA	-1,130	0,020	±0,389
Metiopropamina e Metanfetamina	-1,270	0,009	±0,260
Metiopropamina e Metanfetamina	-1,270	0,009	±0,260
Efedrina	-1,550	0,006	±0,214
MAPB e MDMA	-1,997	0,014	±0,324
MAPB e MDMA	-1,971	0,013	±0,318
o-CPP	-3,137	0,020	±0,393
5-IAI	-5,220	0,914	±2,655
p-CPP	-3,844	0,038	±0,538
N-etilpentilona	-2,178	0,025	±0,440
5-MeO-MiPT	-2,759	0,029	±0,475
Cocaína	-3,273	0,035	±0,520
U-47700	-5,054	0,042	±0,570
THC	-3,326	0,054	±0,646
25C-NBOMe	-3,771	0,059	±0,677
Heroína	-5,173	0,074	±0,754
Salvinorina	-3,970	0,092	±0,843
Salvinorina	-3,458	0,073	±0,751
AM2201	-4,291	0,109	±0,918
JWH-210	-2,633	0,092	±0,843
MAM2201	-1,489	0,059	±0,674
JWH-081	-1,389	0,075	±0,761

Tabela 45 – Valores calculados para o efeito “Taxa de Split” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.

Substância	Efeito Taxa de Split	Variância do Efeito	I.C. para t_{4,95%}
<i>Anfetamina</i>	-0,280	0,061	±0,688
<i>2-FA</i>	-0,159	0,047	±0,599
<i>Metiopropamina e Metanfetamina</i>	-0,096	0,051	±0,626
<i>Metiopropamina e Metanfetamina</i>	0,186	0,058	±0,668
<i>Efedrina</i>	-0,227	0,069	±0,729
<i>MAPB e MDMA</i>	-0,243	0,100	±0,879
<i>MAPB e MDMA</i>	-0,243	0,100	±0,879
<i>o-CPP</i>	0,378	0,076	±0,766
<i>5-IAI</i>	0,664	0,087	±0,818
<i>p-CPP</i>	0,545	0,094	±0,853
<i>N-etilpentilona</i>	0,147	0,088	±0,825
5-MeO-MiPT	-1,150	0,065	±0,706
<i>Cocaína</i>	-0,088	0,082	±0,794
<i>U-47700</i>	0,307	0,083	±0,798
<i>THC</i>	0,210	0,086	±0,812
<i>25C-NBOMe</i>	0,158	0,089	±0,830
<i>Heroína</i>	0,312	0,101	±0,881
Salvinorina	-2,820	0,094	±0,849
Salvinorina	-4,424	0,094	±0,849
AM2201	-4,196	0,129	±0,998
JWH-210	-4,921	0,075	±0,759
MAM2201	-11,505	0,118	±0,952
JWH-081	-9,026	0,106	±0,905

Tabela 46 – Valores calculados para o efeito “Taxa de Split” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.

Substância	Efeito Taxa de Split	Variância do Efeito	I.C. para t_{4,95%}
<i>Anfetamina</i>	1,652	0,159	±1,108
2-FA	0,928	0,020	±0,389
Metiopropamina e Metanfetamina	0,781	0,009	±0,260
Metiopropamina e Metanfetamina	0,781	0,009	±0,260
Efedrina	-0,312	0,006	±0,214
MAPB e MDMA	-0,025	0,014	±0,324
MAPB e MDMA	-0,277	0,013	±0,318
o-CPP	0,146	0,020	±0,393
5-IAI	2,064	0,914	±2,655
p-CPP	0,297	0,038	±0,538
N-etilpentilona	-0,264	0,025	±0,440
5-MeO-MiPT	-1,623	0,029	±0,475
Cocaína	-0,478	0,035	±0,520
U-47700	-0,245	0,042	±0,570
THC	-0,035	0,054	±0,646
25C-NBOMe	-0,239	0,059	±0,677
Heroína	-0,099	0,074	±0,754
Salvinorina	-1,638	0,092	±0,843
Salvinorina	-0,927	0,073	±0,751
AM2201	2,853	0,109	±0,918
JWH-210	3,866	0,092	±0,843
MAM2201	-0,267	0,059	±0,674
JWH-081	2,382	0,075	±0,761

Tabela 47 – Valores calculados para o efeito “Temperatura do injetor” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.

Substância	Efeito Temperatura do injetor	Variância do Efeito	I.C. para $t_{4,95\%}$
Anfetamina	-1,008	0,061	±0,688
2-FA	-0,751	0,047	±0,599
Metiopropamina e Metanfetamina	-0,775	0,051	±0,626
Metiopropamina e Metanfetamina	-0,923	0,058	±0,668
<i>Efedrina</i>	<i>-0,712</i>	<i>0,069</i>	<i>±0,729</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>-0,805</i>	<i>0,100</i>	<i>±0,879</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>-0,805</i>	<i>0,100</i>	<i>±0,879</i>
o-CPP	-0,784	0,076	±0,766
5-IAI	-0,874	0,087	±0,818
<i>p-CPP</i>	<i>-0,638</i>	<i>0,094</i>	<i>±0,853</i>
<i>N-etilpentilona</i>	<i>-0,680</i>	<i>0,088</i>	<i>±0,825</i>
<i>5-MeO-MiPT</i>	<i>-0,344</i>	<i>0,065</i>	<i>±0,706</i>
<i>Cocaína</i>	<i>-0,442</i>	<i>0,082</i>	<i>±0,794</i>
<i>U-47700</i>	<i>0,069</i>	<i>0,083</i>	<i>±0,798</i>
<i>THC</i>	<i>-0,329</i>	<i>0,086</i>	<i>±0,812</i>
<i>25C-NBOMe</i>	<i>-0,361</i>	<i>0,089</i>	<i>±0,830</i>
<i>Heroína</i>	<i>-0,183</i>	<i>0,101</i>	<i>±0,881</i>
<i>Salvinorina</i>	<i>0,518</i>	<i>0,094</i>	<i>±0,849</i>
Salvinorina	-0,960	0,094	±0,849
<i>AM2201</i>	<i>0,446</i>	<i>0,129</i>	<i>±0,998</i>
JWH-210	0,799	0,075	±0,759
<i>MAM2201</i>	<i>0,136</i>	<i>0,118</i>	<i>±0,952</i>
<i>JWH-081</i>	<i>0,306</i>	<i>0,106</i>	<i>±0,905</i>

Tabela 48 – Valores calculados para o efeito “Temperatura do injetor” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.

Substância	Efeito Temperatura do injetor	Variância do Efeito	I.C. para $t_{4,95\%}$
Anfetamina	4,389	0,159	±1,108
2-FA	3,626	0,020	±0,389
Metiopropamina e Metanfetamina	3,898	0,009	±0,260
Metiopropamina e Metanfetamina	3,898	0,009	±0,260
Efedrina	4,719	0,006	±0,214
MAPB e MDMA	6,076	0,014	±0,324
MAPB e MDMA	6,901	0,013	±0,318
o-CPP	10,594	0,020	±0,393
5-IAI	13,297	0,914	±2,655
p-CPP	15,010	0,038	±0,538
N-etilpentilona	2,684	0,025	±0,440
5-MeO-MiPT	5,631	0,029	±0,475
<i>Cocaína</i>	<i>0,087</i>	<i>0,035</i>	<i>±0,520</i>
<i>U-47700</i>	<i>-0,152</i>	<i>0,042</i>	<i>±0,570</i>
THC	3,457	0,054	±0,646
25C-NBOMe	-3,173	0,059	±0,677
Heroína	-7,006	0,074	±0,754
Salvinorina	-10,336	0,092	±0,843
Salvinorina	-5,299	0,073	±0,751
AM2201	14,274	0,109	±0,918
JWH-210	7,062	0,092	±0,843
MAM2201	7,725	0,059	±0,674
JWH-081	6,829	0,075	±0,761

Tabela 49 – Valores calculados para o efeito “Rampa de Temperatura” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível baixo.

Substância	Efeito Rampa de Temperatura	Variância do Efeito	I.C. para t_{4,95%}
<i>Anfetamina</i>	<i>0,280</i>	<i>0,061</i>	<i>±0,688</i>
<i>2-FA</i>	<i>0,159</i>	<i>0,047</i>	<i>±0,599</i>
<i>Metiopropamina e Metanfetamina</i>	<i>0,096</i>	<i>0,051</i>	<i>±0,626</i>
<i>Metiopropamina e Metanfetamina</i>	<i>-0,186</i>	<i>0,058</i>	<i>±0,668</i>
<i>Efedrina</i>	<i>0,227</i>	<i>0,069</i>	<i>±0,729</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>0,243</i>	<i>0,100</i>	<i>±0,879</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>0,243</i>	<i>0,100</i>	<i>±0,879</i>
<i>o-CPP</i>	<i>-0,378</i>	<i>0,076</i>	<i>±0,766</i>
<i>5-IAI</i>	<i>-0,664</i>	<i>0,087</i>	<i>±0,818</i>
<i>p-CPP</i>	<i>-0,545</i>	<i>0,094</i>	<i>±0,853</i>
<i>N-etilpentilona</i>	<i>-0,147</i>	<i>0,088</i>	<i>±0,825</i>
5-MeO-MiPT	1,150	0,065	±0,706
<i>Cocaína</i>	<i>0,088</i>	<i>0,082</i>	<i>±0,794</i>
<i>U-47700</i>	<i>-0,307</i>	<i>0,083</i>	<i>±0,798</i>
<i>THC</i>	<i>-0,210</i>	<i>0,086</i>	<i>±0,812</i>
<i>25C-NBOMe</i>	<i>-0,158</i>	<i>0,089</i>	<i>±0,830</i>
<i>Heroína</i>	<i>-0,312</i>	<i>0,101</i>	<i>±0,881</i>
Salvinorina	2,820	0,094	±0,849
Salvinorina	4,424	0,094	±0,849
AM2201	4,196	0,129	±0,998
JWH-210	4,921	0,075	±0,759
MAM2201	11,505	0,118	±0,952
JWH-081	9,026	0,106	±0,905

Tabela 50 – Valores calculados para o efeito “Rampa de Temperatura” para as corridas cuja condição de “Polaridade da Coluna” se manteve no nível alto.

Substância	Efeito Rampa de Temperatura	Variância do Efeito	I.C. para t_{4,95%}
<i>Anfetamina</i>	<i>1,652</i>	<i>0,159</i>	<i>±1,108</i>
2-FA	0,928	0,020	±0,389
Metiopropamina e Metanfetamina	0,781	0,009	±0,260
Metiopropamina e Metanfetamina	0,781	0,009	±0,260
<i>Efedrina</i>	<i>-0,312</i>	<i>0,006</i>	<i>±0,214</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>-0,025</i>	<i>0,014</i>	<i>±0,324</i>
<i>MAPB e MDMA</i>	<i>-0,277</i>	<i>0,013</i>	<i>±0,318</i>
<i>o-CPP</i>	<i>0,146</i>	<i>0,020</i>	<i>±0,393</i>
<i>5-IAI</i>	<i>2,064</i>	<i>0,914</i>	<i>±2,655</i>
<i>p-CPP</i>	<i>0,297</i>	<i>0,038</i>	<i>±0,538</i>
<i>N-etilpentilona</i>	<i>-0,264</i>	<i>0,025</i>	<i>±0,440</i>
5-MeO-MiPT	-1,623	0,029	±0,475
<i>Cocaína</i>	<i>-0,478</i>	<i>0,035</i>	<i>±0,520</i>
<i>U-47700</i>	<i>-0,245</i>	<i>0,042</i>	<i>±0,570</i>
<i>THC</i>	<i>-0,035</i>	<i>0,054</i>	<i>±0,646</i>
<i>25C-NBOMe</i>	<i>-0,239</i>	<i>0,059</i>	<i>±0,677</i>
<i>Heroína</i>	<i>-0,099</i>	<i>0,074</i>	<i>±0,754</i>
Salvinorina	-1,638	0,092	±0,843
Salvinorina	-0,927	0,073	±0,751
AM2201	2,853	0,109	±0,918
JWH-210	3,866	0,092	±0,843
<i>MAM2201</i>	<i>-0,267</i>	<i>0,059</i>	<i>±0,674</i>
JWH-081	2,382	0,075	±0,761