

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DERIVADOS ANFETAMÍNICOS**

MARIA CRISTINA FRANCK

PORTO ALEGRE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DERIVADOS ANFETAMÍNICOS**

Dissertação apresentada por
Maria Cristina Franck para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 15 de agosto de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Miriam Anders Apel
Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

Profa. Dra. Ana Maria Bergold
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

F822d Franck, Maria Cristina

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para caracterização e quantificação de derivados anfetamínicos / Maria Cristina Franck – Porto Alegre : UFRGS, 2008. –xxii p., 130 p.: il., tab., graf.

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

1. Derivados anfetamínicos. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Fröhlich, Pedro Eduardo. II. Limberger, Renata Pereira. III. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Impressão realizada pela gráfica da UFRGS

Este trabalho é dedicado a minha família, André e Mariana, pelo companheirismo de todas as horas, paciência, compreensão, estímulo, amor e carinho sempre presentes, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich agradeço pelo apoio e disponibilidade na orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Renata Pereira Limberger, pela amizade, disponibilidade, confiança e incentivo.

A minha família, especialmente a minha mãe e minha sogra, pela compreensão e auxílio, fundamentais.

Ao Farmacêutico competente e *incansável* Leonardo Zanchetti Meneghini pela disponibilidade, apoio e auxílio nos testes por CLAE.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica que me acolheu, disponibilizando equipamentos e materiais.

Ao Laboratório de Farmacognosia (especialmente à professora Miriam Apel) pelos equipamentos disponibilizados.

Ao Laboratório de Perícias pela inspiração em fazer esse trabalho e pela disponibilidade dos padrões utilizados.

À Farmacêutica Adriana Santos Andrade pelas dicas e auxílio no uso dos cromatógrafos a gás.

Aos demais amigos e colegas da Faculdade de Farmácia e do Laboratório de Perícias pela convivência, amizade, auxílio e incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
2.1 Gerais	9
2.2 Específicos	9
3 REVISÃO	11
3.1 Anfetaminas	13
3.2 Anfepramona (DEP)	15
3.3 Femproporex (FEM)	17
3.4 Metilfenidato (MPH)	19
3.5 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina (DOB)	22
3.6 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina (2-CB)	25
3.7 Métodos cromatográficos	26
3.7.1 Derivatização	29
3.8 Validação de métodos analíticos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Material	35
4.1.1 Material de referência	35
4.1.2 Produtos farmacêuticos	35
4.1.3 Placebos	36
4.1.4 Equipamentos	36
4.2 CLAE/UV	37
4.2.1 Preparação da amostra	38
4.2.2 Validação do método por CLAE/UV	38
4.2.2.1 Especificidade.....	38

4.2.2.2 Linearidade	39
4.2.2.3 Limites de detecção e de quantificação	40
4.2.2.4 Precisão	41
4.2.2.5 Exatidão	41
4.2.2.6 Robustez	42
4.3 CG/DIC	43
4.3.1 Preparação da amostra	43
4.3.2 Validação do método por CG/DIC	44
4.3.2.1 Especificidade	44
4.3.2.2 Linearidade	45
4.3.3 Derivatização	46
4.4 CG/EM	47
4.4.1 Preparação da amostra	47
4.4.2 Validação do método por CG/EM	47
4.4.2.1 Especificidade	47
4.4.2.2 Linearidade	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 CLAE/UV	52
5.1.1 Validação do método por CLAE/UV	55
5.1.1.1 Especificidade	55
5.1.1.2 Linearidade	59
5.1.1.3 Limites de detecção e de quantificação	63
5.1.1.4 Precisão	63
5.1.1.5 Exatidão	64
5.1.1.6 Robustez	65
5.2 CG/DIC	66
5.2.1 Validação do método por CG/DIC	69
5.2.1.1 Especificidade	69
5.2.1.2 Linearidade	72
5.2.1.3 Limites de detecção e de quantificação	76
5.2.2 Derivatização	77
5.3 CG/EM	82
5.3.1 Validação do método por CG/EM	88
5.3.1.1 Especificidade	88
5.3.1.2 Linearidade	92

5.4 Comparação dos métodos	94
5.5 Perspectivas	96
6 CONCLUSÕES	99
7 REFERÊNCIAS	103
8 ANEXOS	115
8.1 CLAE	117
8.2 CG	127

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura geral das anfetaminas.	13
FIGURA 2. Estrutura química do DEP.....	16
FIGURA 3. Estrutura química do FEM.	18
FIGURA 4. Estrutura química do MPH.	20
FIGURA 5. Estrutura química do DOB.	23
FIGURA 6. Estrutura química do 2-CB.....	25
FIGURA 7. Estrutura química das substâncias relacionadas testadas na especificidade dos métodos.	31
FIGURA 8. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB por CLAE/UV.....	54
FIGURA 9. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas das soluções de DEP, Inibex [®] S, cápsula manipulada e placebo de Inibex [®] S	55
FIGURA 10. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas das soluções de FEM, Desobesi-m [®] e placebo de Desobesi-m [®]	56
FIGURA 11. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas das soluções de MPH, Ritalina [®] e placebo de Ritalina [®]	56
FIGURA 12. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR e da solução contendo o benzaldeído.	58
FIGURA 13. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR e da solução contendo o MDEA.	59
FIGURA 14. Representação gráfica da curva padrão do DEP por CLAE.	60
FIGURA 15. Representação gráfica da curva padrão do FEM por CLAE.	60
FIGURA 16. Representação gráfica da curva padrão do MPH por CLAE.....	61
FIGURA 17. Representação gráfica da curva padrão do 2-CB por CLAE.	62
FIGURA 18. Representação gráfica da curva padrão do DOB por CLAE.....	62
FIGURA 19. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH e DOB por CG/DIC.	67
FIGURA 20. Cromatograma da solução contendo 2-CB (1 mg/mL) por CG/DIC.	67
FIGURA 21. Cromatogramas das soluções contendo DOB e 2-CB por CG/DIC e apenas DOB na mesma concentração.	68
FIGURA 22. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB por CG/DIC.	68
FIGURA 23. Especificidade CG/DIC: cromatogramas da solução da cápsula manipulada, do Inibex [®] S e da solução placebo de Inibex [®] S.....	69
FIGURA 24. Especificidade CG/DIC: cromatogramas da solução do Desobesi-m [®] e da solução placebo de Desobesi-m [®]	70

FIGURA 25. Especificidade CG/DIC: cromatogramas da solução de Ritalina® e da solução placebo de Ritalina®	70
FIGURA 26. Especificidade CG/DIC: cromatograma de uma solução contendo DEP, MDMA, FEM e MPH.	71
FIGURA 27. Especificidade CG/DIC: cromatograma de uma solução contendo MDA, DEP, FEM e MPH.	71
FIGURA 28. Especificidade CG/DIC: cromatograma de uma solução contendo DEP, MDEA, FEM e MPH.	72
FIGURA 29. Cromatograma de uma solução contendo DEP, FEM, DFA, MPH e DOB por CG/DIC.	74
FIGURA 30. Representação gráfica da curva padrão do DEP por CG/DIC.	74
FIGURA 31. Representação gráfica da curva padrão do FEM por CG/DIC.	75
FIGURA 32. Representação gráfica da curva padrão do MPH por CG/DIC.	75
FIGURA 33. Cromatogramas da solução contendo MPH e derivatizado com ciclohexanona por CG/DIC.	79
FIGURA 34. Cromatogramas da solução contendo FEM e derivatizado com ciclohexanona por CG/DIC.	79
FIGURA 35. Cromatogramas por CG/DIC da solução contendo DEP derivatizado com etilcloroformato e com butilcloroformato.	80
FIGURA 36. Cromatogramas por CG/DIC da solução contendo FEM e derivatizado com etilcloroformato e com butilcloroformato.	81
FIGURA 37. Cromatogramas por CG/DIC da solução contendo MPH e derivatizado com etilcloroformato e com butilcloroformato.	81
FIGURA 38. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH e DOB por CG/EM.	82
FIGURA 39. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB por CG/EM.	83
FIGURA 40. Cromatogramas das soluções contendo 2-CB e DOB por CG/EM.	84
FIGURA 41. Espectro de massas do DEP.	84
FIGURA 42. Espectro de massas do FEM.	84
FIGURA 43. Espectro de massas do MPH.	85
FIGURA 44. Espectro de massas do DOB.	85
FIGURA 45. Espectro de massas do 2-CB.	85
FIGURA 46. Fragmentação principal do DEP, FEM e MPH, respectivamente.	85
FIGURA 47. Possíveis fragmentos provenientes da quebra das moléculas de DOB e 2-CB.	86
FIGURA 48. Cromatogramas de uma solução contendo FEM na concentração de 10 µg/mL em metanol no modo <i>full scan</i> e no modo <i>Selected Ion Monitoring</i>	88
FIGURA 49. Especificidade por CG/EM: cromatogramas da solução da cápsula manipulada, do Inibex®S e da solução placebo de Inibex®SL.	89

FIGURA 50. Especificidade por CG/EM: cromatogramas da solução do Desobesi-m [®] e da solução placebo de Desobesi-m [®]	89
FIGURA 51. Especificidade por CG/EM: cromatogramas da solução de Ritalina [®] e da solução placebo de Ritalina [®]	90
FIGURA 52. Especificidade por CG/EM: cromatograma da solução contendo FEM e MBDB.....	92
FIGURA 53. Especificidade por CG/EM: cromatograma da solução contendo MDA e DEP.....	92
FIGURA 54. Representação gráfica da curva padrão do FEM por CG/EM no modo <i>full scan</i>	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de DEP em materiais não-biológicos.....	17
TABELA 2. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de FEM em materiais não-biológicos.....	19
TABELA 3. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de MPH em materiais não-biológicos.....	22
TABELA 4. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de DOB em materiais não-biológicos.....	24
TABELA 5. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de 2-CB em materiais não-biológicos.....	26
TABELA 6. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de anfetaminas tipo estimulantes em materiais não-biológicos.	28
TABELA 7. Características de validação do ICH <i>versus</i> tipo de procedimento analítico.	30
TABELA 8. Identificação e procedência das SQR.	35
TABELA 9. Identificação dos produtos farmacêuticos.	36
TABELA 10. Composição dos placebos.	36
TABELA 11. Substâncias relacionadas testadas na especificidade do método por CLAE.	39
TABELA 12. Esquema utilizado para a avaliação da linearidade do método por CLAE para o DOB e o 2-CB.	40
TABELA 13. Soluções para o teste de recuperação por CLAE.	42
TABELA 14. Substâncias relacionadas testadas na especificidade do método por CG/DIC.	44
TABELA 15. Preparação da curva padrão por CG/DIC.	45
TABELA 16. Substâncias relacionadas testadas na especificidade do método por CG/EM.	48
TABELA 17. Máximos de absorção na região do UV e valores de pKa das substâncias em estudo.	53
TABELA 18. Resultados da adequabilidade do sistema desenvolvido por CLAE/UV.	55
TABELA 19. Índice de pureza dos picos cromatográficos do DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB.	57
TABELA 20. Tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CLAE/UV.	58
TABELA 21. Valores obtidos para a determinação do LD e do LQ do DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB por CLAE.	63
TABELA 22. Valores experimentais obtidos na determinação da repetibilidade e da precisão intermediária do método para Inibex [®] S (DEP), Desobesi-m [®] (FEM) e Ritalina [®] (MPH) por CLAE.	64

TABELA 23. Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método para Inibex [®] S (DEP), Desobesi-m [®] (FEM) e Ritalina [®] (MPH) por CLAE.	65
TABELA 24. Tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CG/DIC.	71
TABELA 25. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de cada solução contendo FEM por CG/DIC.	72
TABELA 26. Valores obtidos de DPR de 5 injeções de cada concentração por CG/DIC.	73
TABELA 27. Valores obtidos para a determinação do LD e do LQ do DEP, FEM e MPH por CG/DIC.	77
TABELA 28. Tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CG/EM.	91
TABELA 29. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de cada concentração do FEM por CG/EM no modo <i>full scan</i>	93
TABELA 30. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de cada solução contendo FEM em metanol por CG/EM.	93
TABELA 31. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de uma solução contendo 50 µg/mL de DEP, FEM e MPH por CG/EM no modo <i>SIM splitless</i>	94
TABELA 32. Análise comparativa dos métodos desenvolvidos.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

2-CB	4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina
ANOVA	Análise da variância
BV	Balão volumétrico
CG/DIC	Cromatografia a gás com detector de ionização de chama
CG/EM	Cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas
CLAE/UV	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DCE	Detector de captura de elétrons
DEP	Cloridrato de anfepramona (ou dietilpropiona)
DFA	Difenilamina
DNF	Detector de nitrogênio e fósforo
DOB	4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina
DPR	Desvio padrão relativo
FEM	Cloridrato de femproporex
IGP	Instituto-Geral de Perícias
LAPPS	Laboratório de Produção de Padrões Secundários
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MBDB	N-metil-3,4-metilenodioxifenil-2-butanamina
MDA	3,4-metilenodioxo-anfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxo-etilanfetamina
MDMA	3,4-metilenodioxo-metanfetamina
MPH	Cloridrato de metilfenidato
ONU	Organização das Nações Unidas
PI	Padrão interno
r	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SNC	Sistema nervoso central
SQR	Substância química de referência
λ	Comprimento de onda

RESUMO

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para caracterização e quantificação de derivados anfetamínicos

Palavras-chaves: anfepramona, femproporex, metilfenidato, 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina, 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina, CG e CLAE.

O consumo lícito e ilícito de derivados anfetamínicos tem aumentado significativamente nos últimos anos, acentuando a necessidade de métodos analíticos adequados para a determinação dessas substâncias pelos laboratórios de toxicologia forense. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos cromatográficos para a análise simultânea de anfepramona (DEP), femproporex (FEM), metilfenidato (MPH), 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina (DOB) e 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina (2-CB) em amostras não-biológicas. Foram desenvolvidos métodos de detecção por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC), de confirmação por cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas (CG/EM) e de detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV). Os derivados anfetamínicos estudados foram identificados e quantificados simultaneamente através do método CLAE/UV utilizando uma coluna C-18, comprimento de onda 206 nm e modo isocrático. DEP, FEM, MPH e DOB foram detectados simultaneamente por CG/DIC e CG/EM utilizando colunas capilares, sem derivatização e com um tempo de corrida inferior a 10 minutos. Os métodos desenvolvidos foram validados através da avaliação dos parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Os métodos desenvolvidos são de fácil execução, rápidos e adequados para a utilização na rotina laboratorial.

ABSTRACT

Development and validation of analytical methodology for characterization and quantification of amphetamine derivatives

Keywords: amfepramone, fenproporex, methylphenidate, 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine, 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine, GC and HPLC.

The consumption of both licit and illicit amphetamine derivatives has grown increasingly in recent years, emphasizing the need for analytical methods suitable for identification and quantification of these substances by forensic toxicology laboratories. This aim of this work was to develop and validate methods for the simultaneous chromatographic analysis of amfepramone (diethylpropione, DEP), fenproporex (FEM), methylphenidate (MPH), 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine (DOB), and 4-bromo-2,5 dimethoxyphenethylamine (2-CB) in non-biological samples. Methods of detection by gas chromatography with flame ionization detector, (GC/FID), confirmation by gas chromatography with mass spectrometry detection (GC/MS), and detection and quantification by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC/UV) were developed. The amphetamine derivatives studied were identified and quantified simultaneously by HPLC/UV using a RP-C18, 206 nm wavelength and isocratic conditions. DEP, FEM, MPH and DOB were detected both by GC/FID and GC/MS using capillary columns, without derivatization and running times lower than 10 minutes. The validation parameters accessed were linearity, specificity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification and robustness. The developed methods are easy to implement, fast and suitable for use in routine laboratory analysis.

No âmbito da toxicologia social, uma substância é chamada de estimulante quando é utilizada voluntariamente com a finalidade de obtenção de estados alterados de consciência caracterizados por euforia e decorrentes da estimulação do sistema nervoso central (SNC) (OGA, 2003).

O consumo de psicoestimulantes, substâncias que aumentam a atividade cerebral, é indissociável da evolução da humanidade (BARCELLOS *et al.*, 1997; SCIVOLETTO e DUARTE, 2004). Nos últimos 50 anos, tem-se notado uma utilização significativa dessas drogas na prática médica e não-médica, sendo objeto de padrões identificáveis de uso e abuso (BARCELLOS *et al.*, 1997). Entre as substâncias estimulantes, destacam-se os derivados anfetamínicos, disponíveis tanto no comércio oficial quanto no ilícito (BARCELLOS *et al.*, 1997; LIMA, 2004).

As anfetaminas e seus derivados possuem a estrutura básica da β -fenetilamina, semelhante às catecolaminas. Quimicamente, são estruturas simples, porém apresentam uma multiplicidade de efeitos biológicos, atuando como aminas simpatomiméticas (ANDRADE *et al.*, 2001; OGA, 2003; ONU, 2006). Modificações químicas na estrutura da molécula resultam em um grande número de compostos farmacologicamente ativos, dando origem às drogas de abuso conhecidas como *designer drugs*, cujo consumo está aumentando nos últimos anos (CHRISTOPHERSEN, 2000; COSTA *et al.*, 2005; MALDANER *et al.*, 2005; ONU, 2006).

De acordo com os resultados da Polícia Rodoviária Federal, houve um aumento no número de apreensões de anfetaminas nas rodovias federais de 17 em 2002 para 311 em 2003 (BRASIL, 2003a). Esse aumento está associado à utilização dos chamados “rebites”, comprimidos de femproporex (FEM), que os trabalhadores de companhias transportadoras utilizam para manter a vigília e poder atender os horários estabelecidos pelas empresas contratantes (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Segundo o relatório da Junta Internacional de Fiscalização de Entorpecentes 2006, órgão da Organização das Nações Unidas (ONU), o Brasil apresenta um consumo *per capita* de medicamentos anorexígenos 40% maior do que os EUA. Em 2005, 98,6% do femproporex e 89,5% da anfepramona foram produzidas no Brasil e a maior parte foi consumida no próprio país onde as compras

são feitas sem receita médica – ou receitadas de forma indevida – por meio, até, de remessas contrabandeadas (JIPE, 2006).

Os derivados anfetamínicos figuram entre as substâncias mais consumidas pelos jovens, ao lado dos solventes e ansiolíticos, conforme dados levantados em treze capitais brasileiras (BARCELLOS *et al.*, 1997). Na região sul, foram as substâncias mais consumidas entre os estudantes do sexo feminino (GALDURÓZ *et al.*, 2004).

Dentre as anfetaminas mais comumente prescritas estão a anfepramona (DEP) e o FEM, na forma de cloridrato (TRUJILLO *et al.*, 1999). Corroborando esses dados, de acordo com uma avaliação dos principais medicamentos anorexígenos dispensados em farmácias da região noroeste do estado do RS, no período de junho de 2003 a junho de 2004, o DEP foi o mais prescrito, com 49,6% das receitas avaliadas, seguido pela sibutramina com 24,6 % e pelo FEM com 16,8% (CAUMO *et al.*, 2005).

De acordo com as estatísticas do Laboratório de Perícias do Instituto-Geral de Perícias (IGP) do estado do Rio Grande do Sul, os compostos anfetamínicos representaram 10,9% das perícias realizadas em materiais brutos em 2004 e em 2005, esse número passou para 20,7%, registrando-se a presença, dentre outros, de DEP, FEM e metilfenidato (MPH) (FASSINA *et al.*, 2007).

Além dos compostos de uso controlado, segundo a Portaria 344/98 da ANVISA, têm-se ainda os derivados anfetamínicos de uso proscrito, como a droga sintética chamada de “cápsula do vento” ou “cápsula do medo”, cuja substância ativa é o 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB). Essa substância possui grande capacidade de induzir alucinações, mesmo em quantidades muito baixas, causando efeitos que podem durar várias horas (COSTA *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2007). Cápsulas contendo DOB já foram apreendidas em vários estados brasileiros e, recentemente, em abril de 2008, o Laboratório de Perícias recebeu uma amostra proveniente da área metropolitana de Porto Alegre com suspeita de conter esse derivado.

Outro derivado anfetamínico, de estrutura similar à do DOB, a 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina (2-CB) é uma droga psicoativa relacionada à mescalina que

foi desenvolvida como uma alternativa à dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e que também apresenta potencial para abuso. Até o momento, não há relatos de que essa substância tenha sido apreendida no Brasil, entretanto sua presença já foi detectada na Europa (Suíça e Holanda) e nos EUA (Texas, Califórnia, Arizona e Flórida) (RAGAN *et al.*, 1985; GLENNON *et al.*, 1988; DeRUITER *et al.*, 1995; GIROUD *et al.*, 1998).

O surgimento de novos derivados anfetamínicos tem obrigado as autoridades a atualizar constantemente a legislação, bem como, a adequar rapidamente os laboratórios forenses, pois a perícia deve ser capaz de analisar um grande número de substâncias de forma rápida e precisa por meio de métodos específicos para a identificação das drogas de abuso (ONU, 2006).

De acordo com o levantamento de Laboratórios Analíticos de Toxicologia Forense (BRASIL, 2004) realizado pela ANVISA/REBLAS em março de 2004, nenhum dos laboratórios da região sul participantes da pesquisa declarou estar com seus métodos de pesquisa de compostos anfetamínicos validados.

Face ao exposto e considerando a importância dos exames periciais no processo de apuração da responsabilidade penal, mais especificamente, no estabelecimento da materialidade do delito (BRASIL, 1941; BRASIL, 2006), este trabalho visa ao desenvolvimento e à validação de metodologia analítica para identificação e quantificação simultânea de DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB em materiais não-biológicos apreendidos.

2.1 Gerais

Desenvolver e validar métodos de análise simultânea de DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB por cromatografia a líquido de alta eficiência e por cromatografia a gás.

2.2 Específicos

1) Desenvolver método analítico de detecção e quantificação por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE/UV), para as substâncias em questão.

2) Desenvolver método analítico de detecção por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC), para as substâncias em questão.

3) Desenvolver método analítico de identificação por cromatografia a gás com detector de massas (CG/EM), para as substâncias em questão.

4) Validar a metodologia de acordo com a Resolução RE n.º 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003b).

5) Comparar os resultados, discutindo as vantagens e limitações dos métodos desenvolvidos para a pesquisa desses compostos anfetamínicos em materiais brutos (não-biológicos) apreendidos.

3.1 Anfetaminas

Quimicamente, a anfetamina e seus derivados são considerados aminas aromáticas, denominadas fenilalquilaminas, compostos orgânicos com apreciável basicidade (FOGLIATTO, 1998; UTRILLA, 2000; BALÍKOVÁ, 2005).

Esses compostos apresentam a estrutura básica da β -fenetilamina (FIGURA 1) formada por um anel benzênico e uma cadeia lateral de etilamina. Sua estrutura permite substituições no anel aromático, nos carbonos alfa e beta e no grupo amino terminal originando muitos derivados.

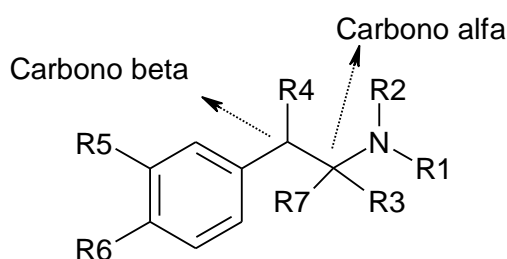


FIGURA 1. Estrutura geral das anfetaminas.

Considerando a relação estrutura atividade, a maior atividade simpatomimética ocorre quando dois átomos de carbono separam o anel benzênico do grupo amina. Em geral, quanto menor for o volume do substituinte em R1 e R2, maior será a sua seletividade α -adrenérgica; enquanto que, quanto maior for o volume desses substituintes, maior será a atividade β -adrenérgica (FOGLIATTO, 1998; KARCH, 1998; UTRILLA, 2000; GOODMAN e GILMAN, 2001; SILVA, 2002; OGA, 2003; BALÍKOVÁ, 2005).

Uma N-metilação aumenta a potência das aminas primárias, aumentando a ação broncodilatadora e o efeito anorexígeno e anulando o efeito vasopressor. Uma substituição no carbono α bloqueia a oxidação pela monoaminoxidase, prolongando a duração do efeito. Quando há uma hidroxila em R4, obtém-se uma redução na ação estimulante central possivelmente em função da diminuição da lipossolubilidade. Contudo, essa substituição aumenta a atividade agonista nos receptores α e β adrenérgicos, passando a apresentar efeitos broncodilatadores,

aumento da pressão sangüínea e da freqüência cardíaca (FOGLIATTO, 1998; KARCH, 1998; UTRILLA, 2000; GOODMAN e GILMAN, 2001; SILVA, 2002; OGA, 2003; BALÍKOVÁ, 2005).

As atividades α e β adrenérgicas dependem da presença simultânea de grupos hidroxila nas posições R5 e R6. Compostos anfetamínicos que apresentam grupamentos metoxi, dimetoxi ou trimetoxi no anel aromático possuem propriedades alucinógenas e perdem a habilidade de inibir a recaptação de norepinefrina e de liberá-la de seus sítios de ligação, passando a atuar diretamente sobre o receptor. Além disso, quando há um halogênio na posição R6, os efeitos são semelhantes aos dos agentes liberadores de serotonina (FOGLIATTO, 1998; KARCH, 1998; UTRILLA, 2000; GOODMAN e GILMAN, 2001; SILVA, 2002; OGA, 2003; BALÍKOVÁ, 2005).

As ações anorexígenas com utilidade terapêutica podem ser conseqüências de dois mecanismos diferentes: aumento da liberação de dopamina e inibição da recaptação de serotonina (GOODMAN e GILMAN, 2001; RANG *et al.*, 2004). Anfetaminas alucinógenas (como o DOB e o 2-CB) apresentam afinidade elevada pelos receptores 5-HT_{2A} (NICHOLS, 2004; VIEGAS, 2005). Além disso, esses compostos inibem a monoaminoxidase, enzima responsável pela oxidação da norepinefrina, gerando aumento da sua concentração na fenda sináptica (FOGLIATTO, 1998; CORDIOLI, 2000; BALÍKOVÁ, 2005). Os mecanismos de neurotransmissão relacionados às anfetaminas são descritos detalhadamente no trabalho de SULZER e colaboradores (2005).

Os derivados anfetamínicos aumentam a capacidade física e psíquica, provocando bem-estar, anorexia e vigília prolongada, o que possibilita o seu uso na medicina para o tratamento da narcolepsia (distúrbio caracterizado por crises de sono), catalepsia (perda súbita do tônus muscular) e obesidade. Paradoxalmente, também são utilizados no tratamento da síndrome hipercinética, doença da infância caracterizada por hiperatividade, incapacidade de concentração e alto grau de comportamento impulsivo (FOGLIATTO, 1998; RIBEIRO e MARQUES, 2002; OGA, 2003; LIMA, 2004; RANG *et al.*, 2004; BALÍKOVÁ, 2005; ONU, 2006).

Quando administrados em altas doses ou por longos períodos de tempo, essas substâncias podem apresentar elevada toxicidade, incluindo dermatoses, náuseas, vômito, psicoses, convulsões, perda de memória, insônia, alucinações, auto-escoriações, falência renal, comportamento agressivo, irritabilidade, depressão, taquicardia, hipertensão, arritmias, hipertermia, midríase, hiperatividade e rigidez muscular, podendo levar ao óbito, geralmente resultado de infarto do miocárdio ou hemorragia cerebral (DELLIOU, 1980; BUCHANAN e BROWN, 1988; FOGLIATTO, 1998; CORDIOLI, 2000; GOODMAN e GILMAN, 2001; RIBEIRO e MARQUES, 2002; RANG *et al.*, 2004; MALDANER *et al.*, 2005; MEDLEY, 2006; ONU, 2006).

As anfetaminas e seus derivados podem causar dependência e induzir lenta e progressiva tolerância, sem causar síndrome de abstinência (LIMA, 2004; RANG *et al.*, 2004). A dependência a essas substâncias está se tornando fonte crescente e alarmante de preocupação médica e social, além de aumentar a violência e a criminalidade, que estão vinculadas ao narcotráfico (BRASIL, 2002).

Atualmente, a Portaria da SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, é o instrumento sanitário legal que define as diretrizes de controle das substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial no Brasil. Segundo a RDC nº 19, de 24 de março de 2008, que atualiza o Anexo I da referida Portaria, o DEP e o FEM fazem parte da lista “B2” – Lista das substâncias psicotrópicas anorexígenas (sujeitas à notificação de receita “B”), o MPH e o 2-CB fazem parte da lista “A3” – Lista das substâncias psicotrópicas (sujeitas à notificação de receita “A”) e o DOB faz parte da lista “F2” – Lista das substâncias de uso proscrito no Brasil – Substâncias psicotrópicas (BRASIL, 2008).

3.2 Anfepramona (DEP)

O DEP (FIGURA 2) foi sintetizado em 1928 e apresenta ação anorexígena, sendo, portanto, indicado nos casos de obesidade (GOODMAN e GILMAN, 2001).

Sua fórmula molecular é $C_{13}H_{19}NO.HCl$, apresentando-se na forma de um fino pó cristalino branco ou praticamente branco. O cloridrato contém,

aproximadamente, 85% de base livre, apresenta ponto de fusão em 168°C, com decomposição, e possui elevada solubilidade em água, etanol e clorofórmio, sendo, porém, praticamente insolúvel em éter (FOGLIATTO, 1998; BUDAVARI, 2001; GALICHET *et al.*, 2004; BALÍKOVÁ, 2005; SWEETMAN, 2005).

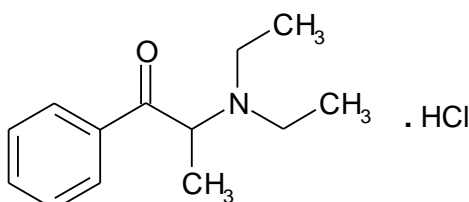


FIGURA 2. Estrutura química da anfepramona (dietilpropiona, DEP).

Esse fármaco apresenta em sua estrutura química um grupamento amina na forma terciária e um átomo de carbono quiral, sendo utilizado comercialmente como uma mistura racêmica nos medicamentos Dualid S[®], Inibex S[®], Moderine[®] e Hipofagin S[®] (MEY *et al.*, 1999).

A DL₅₀ do DEP para camundongos é 50 mg/kg (FOGLIATTO, 1998), para crianças é 200 mg e para adultos é 2 g (GALICHET *et al.*, 2004). As manifestações da intoxicação crônica com anorexígenos incluem severas dermatoses, insônia e irritabilidade.

O metabolismo do DEP envolve dois mecanismos: N-dealquilação e ceto-redução levando à formação de um álcool secundário (TESTA e BECKETT, 1972).

Medicamentos contendo DEP podem causar hipertensão pulmonar e aumentar a incidência de convulsões em alguns pacientes epiléticos. A prescrição desse fármaco deve ser criteriosa, o médico deve realizar uma avaliação risco-benefício e informar ao paciente sobre os problemas relacionados ao seu uso, incluindo a possibilidade de dependência (MEDLEY, 2006).

Os métodos analíticos encontrados para a determinação de DEP em materiais não-biológicos estão resumidos na TABELA 1.

TABELA 1. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de DEP em materiais não-biológicos.

Cromatografia	Coluna*	Fase móvel	Detecção	Referência
CLAE	C-18	Acetonitrila/metanol/carbonato de amônio 0,1% (70:10:20)	255 nm	WALTERS e WALTERS, 1977
	Chiralcel OD [®]	n-hexano/2-propanol/dietilamina (98:2:0,1)	254 nm	MEY <i>et al.</i> , 1999
	C-18	Metanol/1,12-diaminododecano 0,005 M contendo heptanosulfonato de sódio 0,02 M pH 3 (5:95)	254 nm	PIETRA <i>et al.</i> , 2001
	C-18	Perclorato de amônio 0,01 M e Metanol/tampão nitrato de amônio (90:10)	-	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	C-18	Ácido sulfúrico em água/ácido sulfúrico em acetonitrila (gradiente) e trietilamina/ácido fosfórico/água/acetonitrila pH 3,3	DAD	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	L1	Água/acetonitrila/tampão fosfato/nitrato de sódio 1 M (730:200:50:20)	254 nm	THE UNITED, 2007
CG	SE 30	Hidrogênio	DIC	TRUJILLO <i>et al.</i> , 1999
	X-1 e X-5	Hélio	EM	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	3% OV 17 e 3% A103	Nitrogênio	EM	GALICHET <i>et al.</i> , 2004

*C-18/L1 – octadecilsilano, Chiralcel OD[®] - celulose, SE-30 - metilsilicone, X-1 - 100% dimetilpolisiloxano, X-5 - 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano, 3% OV 17 – 50% fenilmetilsiloxano e 3% A103 – poliamida.

3.3 Femproporex (FEM)

O FEM (ou cianoetilanfetamina) é uma substância simpatomimética com propriedades farmacológicas similares às da anfetamina, ou seja, apresenta um elevado potencial para abuso. Da mesma forma que o DEP, apresenta ação anorexígena, sendo empregado conjuntamente às dietas emagrecedoras (BELL *et al.*, 2001; ACHÉ, 2007). Essa substância também é muito utilizada por caminhoneiros para diminuir o sono e aumentar o estado de vigília e atenção (BELL *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2001; MARIZ e SILVA, 2003).

A dose usual de FEM (FIGURA 3) varia de 20 a 25 mg/dia, sendo preconizada a administração antes da refeição (BELL *et al.*, 2001; ACHÉ, 2007).

Essa substância pode ser encontrada nos seguintes medicamentos comercializados no mercado brasileiro: Lipomax AP[®], Desobesi-M[®], Inobesin[®] e Nobese[®].

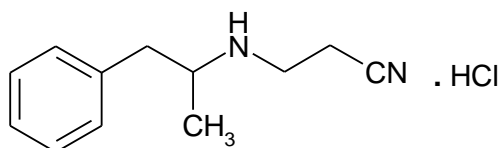


FIGURA 3. Estrutura química do femproporex (FEM).

O FEM foi sintetizado em laboratórios franceses em 1965 (FOGLIATTO, 1998; BALÍKOVÁ, 2005) e sua estrutura química é caracterizada por apenas uma substituição no anel benzênico e pela presença de um substituinte muito volumoso no grupamento amino, sendo, portanto, uma amina secundária. Estas modificações diminuem a capacidade de criar dependência, mantendo o efeito anorexígeno (UTRILLA, 2000). Além disso, essa molécula apresenta um átomo de carbono quiral, sendo comercialmente empregada na forma de um racemato (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977; BUDAVARI, 2001; GALICHET *et al.*, 2004; SWEETMAN, 2005).

A dose letal (DL₅₀) de FEM em ratos via oral na forma de racemato é de 65 mg/kg e já houve um relato de morte pelo uso dessa substância associada ao ácido gama hidroxibutírico (GHB) (BELL *et al.*, 2001).

Em torno de 30% da dose ingerida de FEM sofre biotransformação pré-sistêmica devido ao efeito de primeira passagem e à ação enzimática da flora intestinal. Um dos principais metabólitos produzidos por uma reação de N-dealquilação é a anfetamina (CODY e VALTIER, 1996; LARINI, 1999; BELL *et al.*, 2001; MARIZ e SILVA, 2003).

CODY e VALTIER (1996) relataram que o FEM pode ser detectado em amostras de urina até 25 horas após a administração e que, no entanto, a anfetamina produzida seria detectável por vários dias após o uso. Para tanto, esses pesquisadores utilizaram CG/EM empregando o anidrido heptafluorobutírico como derivatizante e a metanfetamina deuterada como padrão interno (PI).

O FEM apresenta fórmula molecular $C_{12}H_{16}N_2.HCl$ e é encontrado na forma de um pó cristalino de cor branca ou levemente amarelado solúvel em água, metanol e etanol e pouco solúvel em acetona. A faixa de fusão dessa substância varia entre 148 e 150°C (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977; BUDAVARI, 2001).

Os métodos analíticos encontrados para a determinação de FEM em materiais não-biológicos estão resumidos na TABELA 2.

A Farmacopéia Brasileira 3. ed. (1977) traz o método de volumetria em meio não-aquoso para a análise de FEM. HAUBOLD (1977) empregou a titulação com ácido perclórico para a análise de comprimidos contendo FEM e não obteve êxito na determinação do ponto de equivalência devido à interferência dos excipientes.

TABELA 2. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de FEM em materiais não-biológicos.

Cromatografia	Coluna*	Fase móvel	Deteção	Referência
CLAE	C-18	Ácido sulfúrico em água/ácido sulfúrico em acetonitrila (gradiente)	DAD	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	C-8	Tampão fosfato pH 3,8/acetonitrila (gradiente)	DAD	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
CG	SE-30	Nitrogênio	DIC	HAUBOLD, 1977
	SE-30	Hidrogênio	DIC	TRUJILLO <i>et al.</i> , 1999
	X-1 e X-5	Hélio	EM	GALICHET <i>et al.</i> , 2004

*C-18 – octadecilsilano, C-8 – octilsilano, SE-30 - metilsilicone, X-1 - 100% dimetilpolisiloxano e X-5 - 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano.

3.4 Metilfenidato (MPH)

O MPH foi sintetizado em 1944 e introduzido na terapêutica em 1956 (FOGLIATTO, 1998; BALÍKOVÁ, 2005). Atualmente, essa substância está presente nas especialidades farmacêuticas Ritalina[®], Metadate[®] e Concerta[®].

Quimicamente, o MPH (FIGURA 4) é um derivado da piperidina, cuja estrutura é caracterizada pela presença de um grupamento amínico secundário e por dois átomos de carbono quiral, sendo, portanto, passível de apresentação em quatro formas enantioméricas. Em relação à atividade terapêutica do MPH, as formas *d* e *l* *treo* são mais ativas que as formas *d* e *l* *eritro*. Dessa forma, utiliza-se uma mistura racêmica do par de enantiômeros *d* e *l* *treo* nas preparações farmacêuticas desse fármaco, sendo a forma *eritro* metilfenidato classificada como uma impureza (CHALLMAN e LIPSKY, 2000; ZHANG *et al.*, 2003; THE UNITED, 2007).

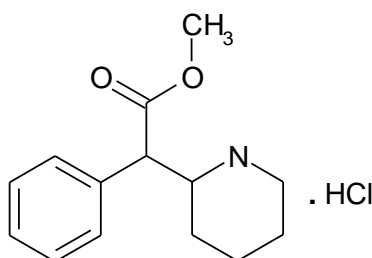


FIGURA 4. Estrutura química do metilfenidato (MPH).

O MPH é um estimulante leve do SNC, com efeitos mais notáveis nas atividades mentais que nas motoras (GOODMAN e GILMAN, 2001; NOVARTIS, 2006). Grandes doses desse fármaco produzem sinais de estimulação generalizada, podendo culminar em convulsões (GOODMAN e GILMAN, 2001).

O consumo brasileiro dessa substância foi superior a 8,5 milhões de comprimidos, de janeiro de 1998 a julho de 2001 (CARLINI *et al.*, 2003), observando-se um crescente potencial de abuso (GOODMAN e GILMAN, 2001; KOLLINS *et al.*, 2001).

A DL₅₀ do MPH, por via oral em ratos, é de 190 mg/kg e para adultos é de 2 g, contudo, já houve relatos de morte pelo uso desse medicamento na forma injetável (LEVINE *et al.*, 1986; BUDAVARI, 2001; GALICHET *et al.*, 2004). O MPH foi considerado teratogênico em coelhos, porém não apresentou esse efeito em ratos. A

carcinogenicidade do MPH ainda é desconhecida em humanos (NOVARTIS, 2006). O maior metabólito do MPH é o ácido ritalínico (ALLEN e SEDGWICK, 1984).

O MPH, na forma de base livre, apresenta faixa de fusão entre 74 e 75°C e é insolúvel em água, solúvel em etanol, acetato de etila e em éter (GALICHET *et al.*, 2004).

Já o cloridrato de MPH, que contém, aproximadamente, 87% da base livre, apresenta fórmula molecular $C_{14}H_{19}NO_2.HCl$ e encontra-se na forma de um fino pó cristalino branco, inodoro, com faixa de fusão entre 224 e 226°C, facilmente solúvel em água, etanol e metanol, sendo, entretanto, fracamente solúvel em acetona e clorofórmio (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977; BUDAVARI, 2001; GALICHET *et al.*, 2004; SWEETMAN, 2005).

Essa substância é indicada no tratamento da hiperatividade com déficit de atenção. Esse transtorno é uma síndrome que se manifesta na infância e é caracterizada por uma atividade motora excessiva, dificuldade para manter a atenção e impulsividade, gerando problemas de desempenho escolar e nas relações interpessoais (CHALLMAN e LIPSKY, 2000; GOODMAN e GILMAN, 2001; NOVARTIS, 2006). O tratamento com Ritalina[®] não é indicado em todos os casos de transtorno de déficit de atenção e deve ser considerado somente após levantamento detalhado da história e avaliação da criança (NOVARTIS, 2006).

Os efeitos adversos das medicações que contém MPH incluem insônia, tontura, sonolência, cefaléia, dor abdominal e anorexia, podendo causar supressão do crescimento (GOODMAN e GILMAN, 2001; NOVARTIS, 2006). Crianças menores de seis anos de idade não devem utilizar produtos contendo MPH (NOVARTIS, 2006).

Os métodos analíticos encontrados para a determinação de MPH em materiais não-biológicos estão resumidos na TABELA 3.

TABELA 3. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de MPH em materiais não-biológicos.

Cromatografia	Coluna*	Fase móvel	Detecção	Referência
CLAE	L10	Metanol/acetonitrila/tampão acetato (4:3:3)	210 nm	ERRAMOUSPE e JARVI, 1997; THE UNITED, 2007
	C-18	Perclorato de amônio 0,01 M e Metanol/tampão nitrato de amônio (90:10)	-	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	C-18	Ácido sulfúrico em água/ácido sulfúrico em acetonitrila (gradiente)	DAD	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	Supelcosil® LC-DP	Acetonitrila/ácido fosfórico/tampão trietilamina (25:10:5)	229 nm	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	C-8	Acetonitrila/ácido fosfórico/tampão trietilamina (60:25:15)	229 nm	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
CG	X-1 e X-5	Hélio	EM	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	3% OV 17	Nitrogênio	EM	GALICHET <i>et al.</i> , 2004

*L10 – nitrila, C-18 – octadecilsilano, Supelcosil® LC-DP - difenil, C-8 – octilsilano, X-1 - 100% dimetilpolisiloxano, X-5 - 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano e 3% OV 17 *empacotada* – 50% fenilmetilsilicone.

A Farmacopéia Brasileira 3. ed. (1977) traz o método de volumetria em meio não-aquoso para a análise de MPH.

3.5 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina (DOB)

O DOB é uma substância sintética cuja dose efetiva, por via oral, é de 2 mg para um homem de 80 kg (FOGLIATTO, 1998; BALÍKOVÁ, 2005).

Na forma de cloridrato, o DOB apresenta-se como um pó branco cristalino, com faixa de fusão entre 197 e 199°C, sendo solúvel em clorofórmio, etanol e metanol e insolúvel em éter (DELLIOU, 1983).

Os efeitos decorrentes de seu uso aparecem lentamente depois de 1-2 horas e podem durar até 36 horas. A ação alucinógena é cem vezes maior que a da mescalina e a da 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) sendo, portanto, uma das mais fortes substâncias psicotrópicas conhecidas (FOGLIATTO, 1998; KARCH, 1998; MALDANER *et al.*, 2005).

O DOB causa dilatação das pupilas e aumento na pressão sistólica, temperatura corporal e taxa dos batimentos cardíacos e. Em altas doses, pode causar problemas cardiovasculares, convulsões, desorientação, estado de pânico e comportamento violento e agressivo. A DL₅₀ do DOB em ratos é de 146-168 mg/kg dependendo do isômero (DELLIOU, 1983).

As possíveis rotas de metabolização do DOB incluem uma simples ou dupla O-desmetilação, uma desaminação oxidativa seguida por uma redução do grupamento álcool correspondente, uma hidroxilação da cadeia lateral e, por fim, uma combinação dessas várias etapas. Com exceção dos metabólitos deamino-oxo, todos os demais metabólitos parecem estar conjugados por glicuronidação ou sulfatação (EWALD *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2007).

A atividade alucinógena do DOB (FIGURA 5) é causada pela presença de uma amina primária separada da fenila por dois átomos de carbono, pela presença de grupos metoxila na posição 2 e 5 do anel aromático e por um substituinte hidrofóbico (halogênio) na posição 4, o que o torna resistente ao metabolismo oxidativo, aumentando sua estabilidade e potência (DELLIOU, 1983; GHYSEL, 2004; EWALD *et al.*, 2006).

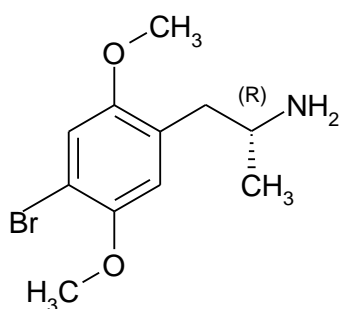


FIGURA 5. Estrutura química da 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB), em sua configuração mais ativa.

Na estrutura química do DOB há um átomo de carbono quiral, o que possibilita a existência de isômeros. O isômero R(-) do DOB é a sua forma mais ativa (DELLIOU, 1983; NIDA, 2006a). Contudo, durante a produção clandestina, muitas substâncias de abuso são sintetizadas na forma racêmica (NIDA, 2006b).

Já foi registrada uma morte por *overdose* após a ingestão de 30 mg de DOB (DELLIOU, 1980; DELLIOU, 1983).

TOENNES e colaboradores (2000) e BALÍKOVÁ (2005) relatam em seus artigos os primeiros casos documentados de intoxicação por DOB na Alemanha e na República Tcheca, respectivamente. O número de casos de intoxicação por DOB pode ser mais expressivo, pois provavelmente muitos deles permanecem desconhecidos, sem um diagnóstico preciso (VIEGAS, 2005).

Apesar de ser conhecida desde 1967, somente nos últimos anos essa substância reapareceu, inicialmente na Europa e nos EUA e, agora, no Brasil, onde foi apreendido na forma de cápsulas transparentes contendo de 1 a 3 mg da droga. O nome popular de “cápsula do vento” originou-se pelo fato de as cápsulas apresentarem uma ínfima quantidade de substância. As primeiras apreensões de DOB no Brasil ocorreram em novembro de 2004 no Balneário Camboriú (SC) e em maio de 2005 na cidade de São Paulo (VIEGAS, 2005). Em abril de 2008, foram apreendidas na região metropolitana de Porto Alegre (RS) 5 cápsulas com suspeita de conterem DOB.

Os métodos analíticos encontrados para a determinação de DOB em materiais não-biológicos estão resumidos na TABELA 4.

TABELA 4. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de DOB em materiais não-biológicos.

Cromatografia	Coluna*	Fase móvel	Detecção	Referência
CLAE	Porasil®	a) Metanol/amônia 2N/nitrato de amônio 0,1N (27:2:1)	293 nm	DELLIOU, 1983
		b) Metanol/água/etanolamina (700:300:2)		
	C-18	Tampão fosfato pH 3/metanol/trietilamina (500:250:1)	280 nm	DeRUITER <i>et al.</i> , 1995
	C-18	Tampão fosfato pH 3/acetoneitrila (85:15)	280 nm	DeRUITER <i>et al.</i> , 1998b
	-	-	EM	COSTA <i>et al.</i> , 2005
	3% OV 17	-	DIC	DELLIOU, 1983
CG	HP-1	Hélio	EM	DeRUITER <i>et al.</i> , 1995; DeRUITER <i>et al.</i> , 1998b
	X-1 e X-5	Hélio	EM	GALICHET <i>et al.</i> , 2004
	RTX-5	-	EM	MALDANER <i>et al.</i> , 2005

*Porasil® - dioxosilano, C-18 – octadecilsilano, 3% OV 17 - 50% fenilmetilsilicone, HP-1/X-1 - 100% dimetilpolisiloxano, X-5/RTX-5 - 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano.

3.6 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina (2-CB)

O 2-CB, também conhecido por Venus, Bromo, Erox e Nexus (GIROUD *et al.*, 1998; COLE *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2005; ROHANOVÁ *et al.*, 2008), é utilizado na forma de pó ou comprimido contendo de 4 a 30 mg e seu efeito inicia-se em 20 a 90 minutos, podendo durar de 4 a 8 horas. Os efeitos analgésicos causados por muitas drogas psicodélicas não são obtidos pelo uso do 2-CB, pelo contrário, há um aumento da sensibilidade como um todo. Além disso, há relatos de que se utiliza o 2-CB em conjunto com a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) de modo a obter um efeito sinérgico afrodisíaco (RAGAN *et al.*, 1985; GIROUD *et al.*, 1998; COLE *et al.*, 2002).

O 2-CB (FIGURA 6) apresenta afinidade pelos receptores de serotonina e seus efeitos variam conforme a dose ingerida: entre 5 e 10 mg o efeito é estimulante e, entre 10 e 20 mg, os efeitos são alucinógenos. Essa substância produz relaxamento, passividade, euforia, aumento da capacidade visual, auditiva, olfatória e tátil, além de intensa alucinação, promovendo uma integração sensorial e emotiva diferente do efeito causado pelo LSD (RAGAN *et al.*, 1985; GIROUD *et al.*, 1998; CARMO *et al.* 2005; ROHANOVÁ *et al.*, 2008).

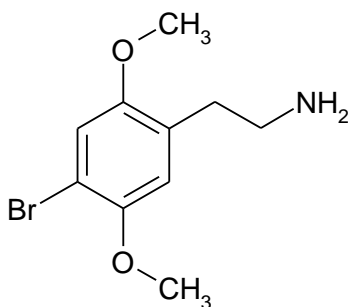


FIGURA 6. Estrutura química da 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina (2-CB).

O 2-CB é excretado na urina após três horas da ingestão na forma inalterada e também na forma dos metabólitos ácido 4-bromo-2,5-dimetoxifenilacético, ácido 4-bromo-2,5-dimetoxibenzóico e 4-bromo-5-hidroxi-2-metoxifenetilamina (COLE *et al.*, 2002; CARMO *et al.*, 2005). Os processos metabólicos do 2-CB parecem envolver reações de desaminação oxidativa,

formando o 2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-etanol (BDMPE), e demetilação (CARMO *et al.*, 2005).

Os métodos analíticos encontrados para a determinação de 2-CB em materiais não-biológicos estão resumidos na TABELA 5.

TABELA 5. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de 2-CB em materiais não-biológicos.

Cromatografia	Coluna*	Fase móvel	Detecção	Referência
CLAE	C-18	Tampão fosfato pH 3,0/metanol/trietilamina (500:250:1)	280 nm	DeRUITER <i>et al.</i> , 1995
	C-18	Tampão fosfato pH 3,0/metanol (75:25)	280 nm	DeRUITER <i>et al.</i> , 1998a
	C-18	Tampão fosfato pH 3,0/metanol/acetonitrila (75:20:5)	280 nm	DeRUITER <i>et al.</i> , 1998a
	C-8	Acetonitrila (gradiente 5-60%)/fosfato de potássio 10 mM pH 3,2	210 nm	GIROUD <i>et al.</i> , 1998; COLE <i>et al.</i> , 2002
CG	3% OV-17	-	EM	RAGAN <i>et al.</i> , 1985
	HP-1	Hélio	EM	DeRUITER <i>et al.</i> , 1995; DeRUITER <i>et al.</i> , 1998a
	HP-Ultra-2	Hélio	EM	GIROUD <i>et al.</i> , 1998

*C-18 – octadecilsilano, C-8 – octilsilano, 3% OV 17 – 50% fenilmetilsilicone, HP-1 - 100% dimetilpolisiloxano e HP-Ultra-2 – 5% difenil 95% dimetil siloxano.

3.7 Métodos cromatográficos

Cromatografia é um método físico-químico de separação onde os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma estacionária e outra móvel. Os métodos cromatográficos que empregam gases como fase móvel são chamados de cromatografia em fase gasosa e os que empregam líquidos, são chamados de cromatografia em fase líquida.

Tanto a cromatografia a gás (CG) quanto a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras farmacêuticas e biológicas (RIBANI *et al.*, 2004).

O tempo de retenção, quando comparado a um padrão nas mesmas condições, pode ser usado para confirmar uma possível identidade da substância e a área sob a curva pode ser empregada na sua quantificação (LANÇAS, 1993; ELLIOTT e HALE, 1998; KARCH, 1998).

As vantagens da CG são rapidez da análise, eficiência da separação (alta resolução), sensibilidade e necessidade de pequenas quantidades de amostra. Por outro lado, suas desvantagens incluem: limitado número de substâncias voláteis, inadequação para amostras termolábeis e, dependendo do detector, necessidade de métodos confirmatórios para a identificação das substâncias analisadas, pois diferentes compostos podem apresentar o mesmo tempo de retenção (LANÇAS, 1993; ELLIOTT e HALE, 1998; KARCH, 1998; McNAIR e MILLER, 1998).

A CG é o procedimento padrão em laboratórios forenses há décadas. O detector de ionização de chama (DIC) é o mais comum, mas pode-se trabalhar com detector de nitrogênio e fósforo (DNF), com o de captura de elétrons (DCE) e com o detector de espectrometria de massas (EM) (LANÇAS, 1993; ELLIOTT e HALE, 1998; KARCH, 1998).

O funcionamento do DIC se baseia no princípio de que a condutividade elétrica de um gás é diretamente proporcional à quantidade de partículas carregadas nele presentes. O efluente da coluna, misturado com o hidrogênio e queimado ao ar, produz uma chama que tem energia suficiente para ionizar as moléculas do soluto. Os íons assim produzidos são coletados por eletrodos, medindo-se a corrente iônica resultante. Quando apenas o gás de arraste puro passa pela chama de hidrogênio, haverá uma corrente muito pequena. Por outro lado, quando existirem na amostra vaporizada compostos orgânicos, a chama queimará estes compostos formando CO₂, água e partículas portadoras de carga, conseqüentemente, haverá um grande aumento na condutividade elétrica da chama. Água e compostos inorgânicos não apresentam sinal mensurável por esse detector (JEFFERY *et al.*, 1992; LANÇAS, 1993).

O DIC, apesar de ser um detector destrutivo, tem grande aplicabilidade, sendo quase universal na CG de compostos orgânicos; esta universalidade, associada a sua elevada sensibilidade, alta estabilidade, resposta rápida e amplo

intervalo de linearidade da resposta, faz com que seja o detector mais popular de uso corrente (JEFFERY *et al.*, 1992; LANÇAS, 1993).

No detector de espectrometria de massas (EM) os componentes da amostra são ionizados por meio de um bombardeamento de feixe de elétrons. Esse impacto eletrônico de alta energia (geralmente 70 eV) quebra a molécula formando um conjunto de fragmentos carregados positivamente que são separados de acordo com a sua massa ao atravessar um campo magnético. Se adequadamente executado, o espectro de massas pode ser usado para confirmar conclusivamente a identidade de uma substância. A maioria dos detectores de massas possui um sistema de banco de dados que armazena muitos espectros de massas, tornando-se possível confrontar-se o espectro obtido para o composto de interesse com aquele da biblioteca. A principal vantagem desse método é que a amostra não precisa estar pura e vários compostos podem ser identificados numa mesma análise. Por outro lado, uma das desvantagens é que certos isômeros apresentam o mesmo espectro de massas, dificultando a sua diferenciação (LANÇAS, 1993; ELLIOTT e HALE, 1998; KARCH, 1998).

Na CLAE não há degradação térmica nem a amostra precisa ser volátil, entretanto, há uma forte dependência da polaridade do soluto. Os detectores mais comuns acoplados à CLAE são: UV, fluorescência, eletroquímico, índice de refração, EM e arranjo de fotodiodos (DAD) (ELLIOTT e HALE, 1998; KARCH, 1998).

Nosso grupo de trabalho vem estudando vários métodos cromatográficos para a análise de compostos anfetamínicos, pois os descritos na literatura (TABELA 6) não foram capazes de detectar adequada e simultaneamente DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB.

TABELA 6. Sistemas cromatográficos utilizados para a determinação de anfetaminas tipo estimulantes em materiais não-biológicos.

Cromatografia	Coluna*	Fase móvel	Detecção	Referência
CLAE	C-18	10% acetonitrila e 90% fosfato 50 mM + trietanolamina 50 mM pH 2,2	210 nm	ONU, 2006
CG	HP-5	Hélio	DIC	ONU, 2006

*C-18 – octadecilsilano e HP-5 - 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano.

3.7.1 Derivatização

Derivatização é a transformação de um composto químico em outro com a finalidade de melhorar o perfil cromatográfico, aumentando a estabilidade térmica e a volatilidade e diminuindo a polaridade e a adsorção à coluna. Se por um lado, a derivatização resulta em um aumento no tempo de retenção (BLAU e KING, 1977; KATAOKA, 1996) e na inclusão de mais etapas no procedimento analítico, com probabilidade de mais erros (McNAIR e MILLER, 1998), por outro lado, melhora a especificidade, a precisão, a sensibilidade, a reprodutibilidade e a linearidade do método (LANÇAS, 1993; ELLIOTT e HALE, 1998; KARCH, 1998). Outra razão utilizada com frequência para derivatizar um composto é a introdução de grupos específicos para os quais detectores mais sensíveis possam ser utilizados (LANÇAS, 1993).

As reações de derivatização podem ser classificadas em: esterificação, sililação, acetilação, formação de hidrazona e de heptafluorobutiratos, alquilação e complexação (LANÇAS, 1993; McNAIR e MILLER, 1998).

3.8 Validação de métodos analíticos

Validar um sistema é dar ao mesmo validade, credibilidade, confiança. No caso de um sistema analítico, a validação objetiva assegurar o cumprimento às exigências das suas aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003b; LANÇAS, 2004).

O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados, pois, tanto a Farmacopéia Americana (USP) quanto o International Conference on Harmonisation (ICH, 2005), reconhecem que não há necessidade de se avaliar todos os parâmetros de desempenho analítico (SWARTZ e KRULL, 1998; ERMER, 2001; RIBANI *et al.*, 2004).

A TABELA 7 mostra as características de validação de acordo com os tipos de procedimento analítico, segundo as recomendações do ICH.

TABELA 7. Características de validação do ICH *versus* tipo de procedimento analítico (SWARTZ e KRULL, 1998; SHABIR, 2003; ICH, 2005).

Procedimento analítico / características	Identificação	Testes de impureza		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio-limite	
Exatidão	NÃO	SIM	NÃO	SIM
Precisão				
Repetibilidade	NÃO	SIM	NÃO	SIM
Precisão intermed.	NÃO	SIM*	NÃO	SIM*
Especificidade	SIM	SIM	SIM	SIM
L. detecção	NÃO	Em alguns	SIM	NÃO
L. Quantificação	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
Linearidade	NÃO	SIM	NÃO	SIM
Faixa de variação	NÃO	SIM	NÃO	SIM

*ou reprodutibilidade

Além dos parâmetros citados na TABELA 7, quando se emprega CLAE, outros parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico devem ser avaliados, como, fator de capacidade, repetibilidade de tempo de retenção e de área, resolução, assimetria e número de pratos teóricos da coluna (CHASIN *et al.*, 1994; RIBANI *et al.*, 2004).

A especificidade (ou seletividade) de um método analítico expressa a habilidade de avaliar de forma inequívoca a substância de interesse na presença outras substâncias ativas, excipientes, impurezas ou contaminantes (BRASIL, 2003b; LANÇAS, 2004). Esse é o principal parâmetro que deve ser avaliado nos métodos de identificação de substâncias controladas, principalmente fenetilaminas, pois há uma grande similaridade química entre os seus derivados (KARCH, 1998; UTRILLA, 2000).

A FIGURA 7 mostra as estruturas químicas das substâncias escolhidas neste trabalho para a avaliação da especificidade dos métodos. O benzaldeído poderia estar presente nas amostras como resíduo remanescente da síntese do DOB, assim como, a cafeína, por ser estimulante, poderia ser empregada como adulterante.

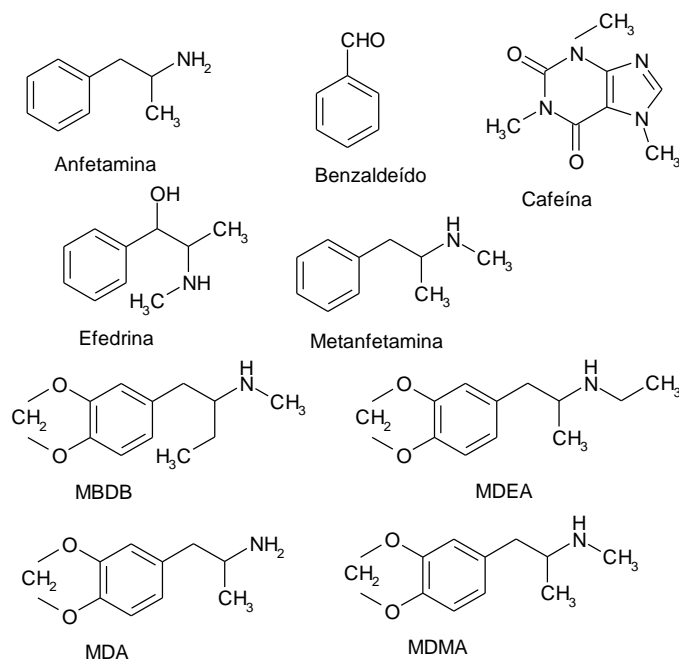


FIGURA 7. Estrutura química das substâncias relacionadas testadas na especificidade dos métodos.

A linearidade de um método analítico corresponde à sua capacidade de fornecer resultados (intensidade da resposta do detector) diretamente proporcionais à quantidade da substância analisada dentro de um intervalo de concentração definido (BRASIL, 2003b; LANÇAS, 2004; LAPACHINSKE, 2004).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de um método analítico correspondem, respectivamente, à menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada e quantificada com precisão e exatidão satisfatórias (LANÇAS, 2004).

A precisão é a medida da concordância entre os valores experimentais obtidos pela execução repetida do procedimento em uma mesma amostra e deve ser a primeira etapa no estabelecimento de um método quantitativo de análise. Esse parâmetro é avaliado pelo desvio padrão relativo (DPR) inter-dias (precisão intermediária) e intra-dia (repetibilidade) (LANÇAS, 1993).

Em análises cromatográficas faz-se necessário conhecer a repetibilidade do tempo de retenção e da área do pico. A repetibilidade do tempo de retenção é importante porque, na maioria das análises, é usada para confirmar a identidade do

composto (análise qualitativa) e a repetibilidade da área do pico, por ser um parâmetro utilizado na quantificação da substância de interesse (LANÇAS, 2004).

A exatidão de um método analítico representa a proximidade entre os resultados obtidos e um valor aceito como verdadeiro e pode ser avaliada pelo teste de recuperação, onde quantidades conhecidas são adicionadas à amostra (BRASIL, 2003b).

Embora não faça parte de alguns procedimentos de validação, a robustez deve ser também avaliada. Esse parâmetro mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores que influenciam o método, ou seja, verifica a capacidade de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações deliberadamente introduzidas nos parâmetros experimentais (BRASIL, 2003b; LANÇAS, 2004).

4.1 Material

4.1.1 Material de referência

As substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas estão descritas na TABELA 8.

TABELA 8. Identificação e procedência das SQR.

Substância	Número do lote	Procedência	Teor declarado
DEP	0602000032	Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.	98,81%
FEM	0512000032	Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.	98,69%
MPH	D0012	Novartis Pharma Brasil	100,55%
2-CB	32454-81F	Cerilliant Corporation	100,00%
DOB	-	Instituto Nacional de Criminalística - Departamento de Polícia Federal	100,00%

O DEP, FEM e o MPH, bem como todos os demais derivados anfetamínicos utilizados nos testes de especificidade, foram cedidos pelo Laboratório de Perícias do IGP-RS, através do Termo de Convênio nº 89/2007 (publicado no Diário Oficial do Estado em 19 de setembro de 2007).

O DOB foi obtido de cápsulas apreendidas pelo Departamento de Polícia Federal e identificadas pelo Instituto Nacional de Criminalística.

O 2-CB foi adquirido na forma de solução metanólica (1 mg/mL) pelo Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

A difenilamina (DFA) (Merck), que foi utilizada como PI na linearidade por CG/DIC, foi disponibilizada pelo LAPPS.

4.1.2 Produtos farmacêuticos

Os produtos farmacêuticos utilizados foram adquiridos do mercado e estão descritos na TABELA 9.

TABELA 9. Identificação dos produtos farmacêuticos.

Produto	Substância ativa	Dosagem	Número do lote	Fabricante
Inibex [®] S desintegração lenta	DEP	75 mg	06090567	Medley S.A. Indústria Farmacêutica
Cápsulas manipuladas	DEP	70 mg	-	Rede Fórmula – Laboratório de Manipulação
Desobesi-m [®]	FEM	25 mg	0701777	Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.
Ritalina [®]	MPH	10 mg	Z0056	Novartis Biociências S.A.

4.1.3 Placebos

Foram preparados placebos dos produtos Inibex[®] S desintegração lenta, Desobesi-m[®] e Ritalina[®] para a realização dos testes de especificidade do DEP, FEM e MPH, respectivamente.

A partir do peso médio das cápsulas ou comprimidos, determinou-se o conteúdo referente aos excipientes.

Esses placebos foram preparados com as matérias-primas declaradas na bulas desses produtos (TABELA 10) e as concentrações utilizadas foram calculadas a partir dos dados da literatura (KIBBE *et al.*, 2000).

TABELA 10. Composição dos placebos.

Produto	Excipientes
Inibex [®] S desintegração lenta	Celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, carbômer, hipromelose.
Desobesi-m [®]	Talco, estearato de magnésio, amido de milho, dióxido de silício coloidal, óleo de rícino e sacarose.
Ritalina [®]	Fosfato tricálcico, lactose, amido de milho, gelatina, estearato de magnésio e talco.

4.1.4 Equipamentos

O desenvolvimento analítico por CLAE foi realizado em equipamento SHIMADZU[®] modelo LC-10AD, equipado com detector SPD-M10AV_{VP} de DAD, degaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10A_{VP} e injetor manual

RHEODYNE localizado no LAPPS. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do aplicativo CLASS-VP.

A validação do método por CLAE foi realizada em equipamento SHIMADZU[®] modelo LC-20AT, equipado com detector SPD 10AV (UV/VIS), degaseificador DGU-20A₃, central de controle CBM-20AV, injetor automático Sil-20A e forno CTO 20-A localizado no LAPPS. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do aplicativo CLASS-VP.

O método de detecção por CG/DIC foi desenvolvido em equipamento PERKIN ELMER[®] modelo XL GC *Autosystem*, com injetor manual, localizado na Central Analítica 2 do PPGCF.

O método de confirmação por CG/EM foi desenvolvido no equipamento SHIMADZU[®] modelo GC17A/QP5000 equipado com quadrupolo cilíndrico GC/MS, operado a 70 eV, com ionização por impacto de elétrons e injetor manual localizado na Central Analítica 2 do PPGCF.

4.2 CLAE/UV

O desenvolvimento analítico foi baseado nos métodos cromatográficos descritos na literatura (TABELAS 1 a 6) para a determinação das substâncias isoladas, visando à obtenção de um sistema que fosse adequado à determinação simultânea das substâncias em estudo.

Após vários ensaios preliminares para a determinação simultânea do DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB, foram estabelecidas as seguintes condições analíticas:

- Coluna de fase reversa: LiChrocart[®]/LiChrospher[®], 100 RP 18 (250 x 4,0 mm, 5 µm, Merck)
- Detecção (UV): 206 nm
- Tempo de corrida: 20 minutos
- Volume de injeção: 20 µL

- Fase móvel (sistema isocrático - 0,8 mL/min): acetonitrila, metanol, ácido fosfórico 0,025% e tampão de trietilamina pH 5,0 (15:15:19:51, V/V)

A solução tampão de trietilamina pH 5,0 foi preparada pela mistura de 10,0 mL de trietilamina PA, 9,0 mL de ácido fosfórico PA e água q.s.p. 1000 mL, ajustando-se o pH até 5,0, em pHmetro, com solução diluída de trietilamina ou ácido fosfórico.

A adequabilidade do sistema foi avaliada por meio de cinco injeções de uma solução contendo todas as SQR (30 µg/mL) observando-se os seguintes parâmetros: repetibilidade de tempo de retenção e de área, número de pratos teóricos, assimetria, fator de capacidade e resolução.

4.2.1 Preparação da amostra

Após pesagem, trituração e homogeneização das amostras, foram pesadas massas correspondentes a 2 mg de cada substância em balão volumétrico (BV) de 20 mL. Adicionou-se 10 mL de metanol e, após 10 min em banho de ultrassom, diluiu-se até a marca com metanol, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL de cada analito. Após homogeneização, essa solução foi filtrada através de papel de filtro e 3,0 mL foram transferidos para um BV de 10 mL. Diluiu-se até a marca com fase móvel, obtendo-se uma concentração final de 30 µg/mL.

4.2.2 Validação do método por CLAE/UV

4.2.2.1 Especificidade

A avaliação da interferência dos excipientes das formas farmacêuticas contendo DEP, FEM e MPH por CLAE foi realizada através da análise individual dos placebos, conforme descrito no item 4.1.3.

De forma complementar, foi avaliada a interferência dos excipientes presentes (cuja composição não foi informada) em um produto contendo DEP que foi adquirido de farmácia de manipulação.

As soluções contendo as SQR, as soluções provenientes dos produtos farmacêuticos e as soluções preparadas a partir dos placebos foram injetadas separadamente para posterior análise dos cromatogramas. Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no item 4.2.1.

Além disso, foram injetadas soluções contendo outras substâncias estruturalmente relacionadas ou que poderiam estar presentes nas amostras como adulterantes, produtos remanescentes da síntese, impurezas ou para ajuste de volume (Qi *et al.*, 2006). Essas soluções foram preparadas em BV pela solubilização em metanol e diluição final em fase móvel. A TABELA 11 mostra as substâncias que foram testadas e suas respectivas concentrações.

TABELA 11. Substâncias relacionadas testadas na especificidade do método por CLAE.

Substância	Concentração (µg/mL)
3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA)	28,8
Anfetamina	33,0
Benzaldeído	31,3
Cafeína	35,6
Efedrina	36,4
MDA	28,8
MDMA	33,6
Metanfetamina	29,6
N-metil-3,4-metilenodioxifenil-2-butanamina (MBDB)	30,0

Os cromatogramas foram avaliados quanto à presença de interferentes no tempo de retenção dos analitos e quanto à pureza dos picos de DEP, Inibex[®]S, cápsula manipulada de DEP, FEM, Desobesi-m[®], MPH e Ritalina[®], através dos dados do DAD.

4.2.2.2 Linearidade

Cinco níveis de concentração foram avaliados para cada substância em três diferentes dias. A partir das três curvas obtidas, determinou-se a equação da

reta e o coeficiente de determinação (R^2) pelo método dos mínimos quadrados através do programa Microsoft® Excel 2002. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA).

Cada substância foi avaliada separadamente e cada solução foi injetada em triplicata.

A partir de uma solução contendo 100 µg/mL de DEP, FEM e MPH em metanol, foram preparadas soluções contendo 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL em fase móvel.

A partir de uma solução contendo 20 µg/mL de DOB e 2-CB em fase móvel, foram injetados, por meio do amostrador automático do cromatógrafo, volumes correspondentes às massas presentes nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, conforme a Tabela 12.

TABELA 12. Esquema utilizado para a avaliação da linearidade do método por CLAE para o DOB e o 2-CB.

Faixa de concentração (µg/mL)	10	20	30	40	50
Massa presente em 20 µL (µg)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Concentração da solução de DOB e 2-CB (µg/mL)	20	20	20	20	20
Volume de injeção correspondente à massa (µL)	10	20	30	40	50

As curvas padrão foram obtidas a partir dos valores das áreas absolutas dos picos em função das concentrações.

4.2.2.3 Limites de detecção e de quantificação

Os LD e LQ foram estabelecidos a partir dos dados obtidos das curvas padrão de cada substância, sendo determinados pelas seguintes equações:

$$LD = (DPa \times 3) / IC \quad \text{e} \quad LQ = (DPa \times 10) / IC$$

Onde:

DPa = desvio padrão médio do intercepto de três curvas padrão.

IC = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

4.2.2.4 Precisão

Cada preparação farmacêutica contendo DEP, FEM e MPH foi analisada separadamente, de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.1, e cada solução foi injetada em triplicata.

A precisão intra-dia (repetibilidade) foi avaliada pelo DPR dos resultados obtidos de seis determinações executadas pelo mesmo analista no mesmo equipamento. A precisão inter-dias (precisão intermediária) foi verificada através do DPR obtido em três diferentes dias, sendo que em dois desses dias os ensaios foram executados por um analista e no terceiro dia, por outro analista.

A concentração das amostras foi calculada através das equações abaixo:

$$C_a = (A_a \times C_{SQR}) / A_{SQR} \quad \text{e} \quad C_{\%} = (C_a \times 100) / C_T$$

Onde:

C_a = concentração da solução amostra em $\mu\text{g/mL}$.

A_a = área absoluta do pico da solução amostra.

C_{SQR} = concentração da SQR em $\mu\text{g/mL}$

A_{SQR} = área absoluta do pico da solução padrão.

$C_{\%}$ = concentração percentual da substância ativa em relação ao valor declarado.

C_T = concentração teórica da solução amostra em $\mu\text{g/mL}$.

Não foi possível avaliar a precisão para o DOB e 2-CB, como descrito no item 4.2.1, em função da indisponibilidade de amostras apreendidas no estado do RS contendo essas substâncias.

4.2.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação. Cada preparação farmacêutica contendo DEP, FEM e MPH foi avaliada separadamente.

Preparou-se uma solução padrão (a partir da SQR) e uma solução amostra (a partir das cápsulas ou comprimidos) na concentração de 100 µg/mL em metanol pela diluição de massa correspondente a 2,5 mg do fármaco, em um BV de 25 mL.

As soluções amostra acrescidas de solução padrão foram preparadas conforme a TABELA 13, sendo que as soluções denominadas F₁, F₂ e F₃ foram preparadas em triplicata.

TABELA 13. Soluções para o teste de recuperação por CLAE.

Solução	Volume de solução amostra (mL)	Volume de solução padrão adicionado (mL)	BV utilizado (mL)	Concentração final obtida (µg/mL)	Quantidade adicionada (%)
A	2,0	-	10	20	-
P	-	1,0	5	20	-
F ₁	2,0	1,0	10	30	50
F ₂	4,0	3,0	20	35	75
F ₃	1,0	1,0	5	40	100

O percentual recuperado foi calculado a partir da equação que segue:

$$R\% = [(CF - CA) / CP] \times 100$$

Onde:

R% = percentual de recuperação em relação à quantidade adicionada.

CF = concentração obtida na solução adicionada de padrão.

CA = concentração da solução amostra, sem a adição de padrão.

CP = concentração adicionada à respectiva solução.

Não foi possível avaliar a exatidão do método para o DOB e o 2-CB, pois, como já descrito anteriormente, seriam necessárias amostras contendo essas substâncias.

4.2.2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada através das seguintes alterações:

- pH da solução tampão de trietilamina da fase móvel – 4,9 e 5,1.
- Coluna cromatográfica – Phenomenex[®] Gemini Su C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m).
- Fluxo da fase móvel – 0,75 e 0,85 mL/min

A análise cromatográfica das diferentes condições analíticas foi realizada em triplicata e separadamente, ou seja, para avaliação de um parâmetro, mantiveram-se constantes os demais.

4.3 CG/DIC

O desenvolvimento analítico foi baseado nos métodos cromatográficos descritos na literatura para a determinação das substâncias isoladas e sem derivatização, visando à obtenção de um sistema que fosse adequado à determinação simultânea das substâncias em estudo.

Após vários ensaios preliminares, foram estabelecidas as seguintes condições analíticas:

- Coluna capilar: SHIMADZU CBP1 (25 x 0,22 x 0,25) preenchida com 100% dimetilpolisiloxano
- Temperatura do detector (DIC): 300 °C
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Tempo de corrida: 6 minutos
- Gás de arraste: Nitrogênio, 20 mL/min
- Volume de injeção: 3 μ L
- Atenuação: -5
- Temperatura da coluna (programação): 160 °C por 1 minuto, 12,5 °C/min até 210 °C, 210 °C por 1 minuto.

4.3.1 Preparação da amostra

Após pesagem, trituração e homogeneização das amostras, foram pesadas massas correspondentes a 10 mg de cada substância em BV de 10 mL.

Adicionou-se 5 mL de metanol e, após 10 min em banho de ultra-som, diluiu-se até a marca com metanol. Após homogeneização, essa solução (1 mg/mL) foi filtrada através de papel de filtro e injetada no equipamento.

4.3.2 Validação do método por CG/DIC

4.3.2.1 Especificidade

A avaliação da interferência dos excipientes das formas farmacêuticas contendo DEP, FEM e MPH no método por CG/DIC foi realizada através da análise individual dos placebos, conforme descrito no item 4.1.3.

De forma complementar, foi avaliada a interferência dos excipientes presentes (cuja composição não foi informada) em um produto contendo DEP que foi adquirido de farmácia de manipulação.

As soluções contendo as SQR, as soluções provenientes dos produtos farmacêuticos e as soluções preparadas a partir dos placebos foram injetadas separadamente para posterior análise dos cromatogramas. Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no item 4.3.1.

Além disso, foram injetadas soluções contendo outras substâncias estruturalmente relacionadas ou que poderiam estar presentes nas amostras como adulterantes, impurezas ou para ajuste de volume (Qi *et al.*, 2006). Essas soluções foram preparadas em BV pela diluição em metanol, obtendo-se as concentrações descritas na TABELA 14.

TABELA 14. Substâncias relacionadas testadas na especificidade do método por CG/DIC.

Substância	Concentração (mg/mL)
Anfetamina	0,66
Benzaldeído	0,31
Cafeína	0,89
Efedrina	0,91
MBDB	0,30
MDA	0,36
MDEA	0,36
MDMA	0,56
Metanfetamina	0,74

Os cromatogramas foram analisados quanto à presença de interferentes no tempo de retenção dos analitos.

4.3.2.2 Linearidade

Cinco níveis de concentração foram avaliados em dois diferentes dias utilizando a DFA como PI. A partir das duas curvas obtidas, determinou-se a equação da reta e o r pelo método dos mínimos quadrados através do programa Microsoft® Excel 2003.

As substâncias foram avaliadas simultaneamente e cada solução foi injetada em quintuplicata.

Foram pesadas massas correspondentes a 100 mg de DEP, FEM e MPH em um BV de 50 mL (MIX). Em um BV de 20 mL, foi pesada massa correspondente a 100 mg de DFA (PI). Após solubilização em metanol, com auxílio de banho de ultra-som, obtiveram-se as soluções MIX (2 mg/mL) e PI (5 mg/mL), respectivamente. Com auxílio de pipetas volumétricas, foram preparadas as soluções da curva padrão, conforme a TABELA 15.

TABELA 15. Preparação da curva padrão por CG/DIC.

Solução MIX (mL)	Solução PI (mL)*	BV (mL)	Concentração final (mg/mL)
5,0	2,0	10	1,0
11,0	4,0	20	1,1
3,0	1,0	5	1,2
13,0	4,0	20	1,3
7,0	2,0	10	1,4

*Concentração igual em todos pontos da curva: 1 mg/mL.

Cada curva padrão foi obtida a partir da razão entre a área absoluta da substância de interesse e a área do PI em função da respectiva concentração.

Considerando a faixa de concentração requerida pelo método e a pequena quantidade disponível de SQR de DOB e de 2-CB, essas substâncias não foram avaliadas na linearidade do método por CG/DIC.

4.3.2.3 Limites de detecção e de quantificação

Os LD e LQ foram estabelecidos a partir dos dados obtidos das curvas padrão de cada substância, sendo determinados pelas seguintes equações:

$$LD = (DPa \times 3) / IC \quad e \quad LQ = (DPa \times 10) / IC$$

Onde:

DPa = desvio padrão médio do intercepto de duas curvas padrão.

IC = inclinação média obtida nas duas curvas padrão.

4.3.3 Derivatização

Algumas reações de derivatização foram testadas por CG/DIC.

O FEM e o MPH foram submetidos a uma reação com cicloexanona nas seguintes condições: 200 μ L de uma solução contendo 1 mg/mL em metanol foram evaporados a 60 °C até *secura*. Logo após, adicionaram-se 25 μ L de cicloexanona, mantendo-se a 100 °C por 30 minutos. A solução obtida foi injetada no equipamento.

O DEP, FEM e MPH foram derivatizados, separadamente, com etilcloroformato e butilcloroformato, conforme descrito por BLAU e KING (1977), da seguinte maneira: 40 μ L de uma solução contendo 1 mg/mL foram transferidos para dois *vials*. Em um deles, adicionaram-se 27 μ L de etilcloroformato e no outro, 33 μ L de butilcloroformato. Em ambos, adicionou-se uma pequena quantidade de carbonato de sódio, 200 μ L de tolueno e 50 μ L de hidróxido de sódio 10%. Após 1 h a 100 °C em *via*/ fechado, a fase orgânica foi injetada.

4.4 CG/EM

Após vários ensaios preliminares, visando à obtenção de um sistema que permitisse a detecção adequada das substâncias em estudo, foram estabelecidas as seguintes condições analíticas:

- Coluna capilar: SUPELCO DB5 Simplicity-5[®] (30 x 0,25 x 0,25) preenchida com 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano
- Temperatura do detector (EM): 260 °C
- Temperatura do injetor: 285 °C
- Tempo de corrida: 7,5 minutos
- Aquisição dos dados: a partir de 2,5 minutos no modo *full scan*
- Gás de arraste: Hélio
- Razão de divisão (*split ratio*): 1:75
- Volume de injeção: 3 µL
- Temperatura da coluna (isotérmica): 190 °C

4.4.1 Preparação da amostra

Após pesagem, trituração e homogeneização das amostras, foram pesadas massas correspondentes a 10 mg de cada substância em BV de 10 mL. Adicionaram-se 5 mL de metanol e, após 10 min em banho de ultra-som, diluiu-se até a marca com metanol (1 mg/mL). Após homogeneização, essa solução foi filtrada através de papel de filtro e 5,0 mL foram transferidos para BV de 20 mL, diluindo-se até a marca com metanol (250 µg/mL).

4.4.2 Validação do método por CG/EM

4.4.2.1 Especificidade

A avaliação da interferência dos excipientes das formas farmacêuticas contendo DEP, FEM e MPH no método por CG/EM foi realizada através da análise individual dos placebos, conforme descrito no item 4.1.3.

De forma complementar, foi avaliada a interferência dos excipientes presentes (cuja composição não foi informada) em um produto contendo DEP que foi adquirido de farmácia de manipulação.

As soluções contendo as SQR, as soluções provenientes dos produtos farmacêuticos e as soluções preparadas a partir dos placebos foram injetadas separadamente para posterior análise dos cromatogramas. Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no item 4.4.1.

Além disso, foram injetadas soluções contendo outras substâncias estruturalmente relacionadas ou que poderiam estar presentes nas amostras como adulterantes, impurezas ou para ajuste de volume (Qi *et al.*, 2006). Essas soluções foram preparadas em BV pela diluição em metanol, conforme a TABELA 16.

TABELA 16. Substâncias relacionadas testadas na especificidade do método por CG/EM.

Substância	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Anfetamina	264
Benzaldeído	313
Cafeína	356
Efedrina	273
MBDB	300
MDA	360
MDEA	360
MDMA	224
Metanfetamina	296

Os cromatogramas foram avaliados quanto à presença de interferentes no tempo de retenção dos analitos.

4.4.2.2 Linearidade

Cinco níveis de concentração do FEM foram avaliados em um dia. A partir da curva obtida, determinou-se a equação da reta e o r pelo método dos mínimos quadrados através do programa Microsoft[®] Excel 2003.

A partir de uma solução contendo 100 µg/mL de FEM em metanol, foram preparadas soluções contendo 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL em metanol. Cada solução foi injetada em triplicata.

A curva padrão foi obtida a partir dos valores das áreas absolutas dos picos em função das concentrações.

Com a crescente demanda de amostras apreendidas, bem como o surgimento de novos compostos anfetamínicos, os métodos analíticos empregados em análises de rotina devem ser capazes de determinar o máximo possível de analitos simultaneamente, com relativa facilidade operacional, reduzindo assim custo e tempo de análise.

Os laboratórios de toxicologia forense possuem equipamentos diversos, conforme a disponibilidade de cada Estado. Assim, é importante dispor de técnicas diferentes de análise e comparar os resultados obtidos.

Nesse sentido, este trabalho buscou desenvolver métodos cromatográficos por CLAE/UV, CG/DIC e CG/EM, que fossem relativamente simples, que utilizassem poucos reagentes e solventes e que pudessem detectar simultaneamente DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB em amostras não biológicas, visto que nenhum dos métodos encontrados na revisão bibliográfica foi desenvolvido para esta combinação de substâncias.

5.1 CLAE/UV

Para estabelecer o método analítico por CLAE/UV e suas condições cromatográficas, foram necessários diversos ensaios preliminares os quais foram baseados nos métodos descritos na literatura para as substâncias em separado (TABELAS 1 a 6).

Nos testes efetuados foram avaliados diferentes parâmetros, entre eles: composição e fluxo da fase móvel, pH da solução tampão, concentração das amostras, comprimento de onda (λ) em relação à intensidade dos picos e à estabilidade da linha de base, colunas cromatográficas e temperatura de análise, onde se observou a resolução entre os picos e o tempo total da análise.

O λ de 206 nm foi definido a partir da avaliação dos máximos de absorção das cinco substâncias na região do UV (TABELA 17). Apesar de ser uma região onde o ruído da linha de base é maior, apenas nesse λ todas as substâncias absorvem e foi possível detectar simultaneamente DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB.

TABELA 17. Comprimentos de onda relativos aos máximos de absorção na região do UV, em solução metanólica, e valores de pKa das substâncias em estudo.

Substância	λ (nm)	pKa*
DEP	207,8 e 249,6	7,60
FEM	207,2 e fracamente em 252,2, 258,0 e 263,8	7,70
MPH	206,2 e fracamente em 251,8, 257,8 e 264,1	8,90
2-CB	205,2, 225,0 e 293,8	8,80
DOB	212,0 e 296,6	8,80

*Calculado pelo programa ALOGPS v. 2.1 disponível em www.vcclab.org.

As cinco substâncias estudadas são classificadas como bases fracas, conforme os valores de constante de dissociação (pKa) descritos na TABELA 16. Dessa forma, em pH 5,0, todas elas se encontram na forma ionizada (protonada), mais hidrofílica e polar, sendo fortemente atraídas pelos grupamentos silanóis inativos da fase estacionária de uma coluna de fase reversa.

Uma forma de minimizar esse problema, mesmo empregando colunas protegidas (*endcapped*), é utilizar trietilamina na fase móvel, pois ela funciona como um competidor dinâmico pelos sítios silanóis da coluna, evitando um tempo de retenção excessivo e a formação de picos assimétricos (LINDSAY, 1992).

A coluna de separação utilizada, aliada à composição qualitativa e quantitativa da fase móvel e aos demais parâmetros do método, proporcionaram uma boa separação cromatográfica, o que permitiu detectar nitidamente as cinco substâncias, conforme pode ser visto na FIGURA 8. A ordem de eluição foi: DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB.

Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por DeRUITER e colaboradores (1995), ou seja, amins não bromadas apresentam um tempo de retenção menor do que amins bromadas e a presença de uma metila na posição α da cadeia lateral faz com que a substância elua em um tempo maior.

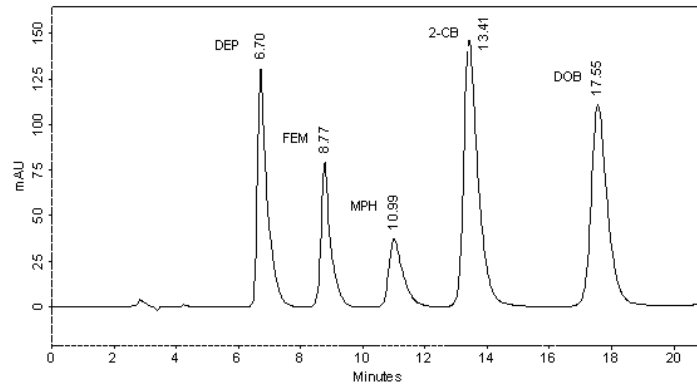


FIGURA 8. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB (SQR) em fase móvel (30 $\mu\text{g/mL}$): acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 μm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

A verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico visa a garantir que as condições estão adequadas à aplicação pretendida, utilizando-se para isto os parâmetros repetibilidade, número de pratos teóricos, assimetria, fator de capacidade e resolução (CDER, 1994).

A repetibilidade de injeções e de áreas indica o desempenho do equipamento (injetor, bomba, coluna, condições ambientais e tempo em que as amostras são analisadas). O número de pratos teóricos (N) avalia a eficiência da coluna, sendo influenciado pela posição do pico, tamanho das partículas da coluna, fluxo da fase móvel e massa molecular do analito. A assimetria (ou fator de cauda, T) influencia a determinação do início e fim do pico e, por consequência, na área obtida. O fator de capacidade (k') avalia onde o pico de interesse está localizado em relação aos compostos não retidos (volume "morto"). A resolução é a medida do quanto dois picos estão afastados um do outro, sendo que esse parâmetro é essencial para métodos quantitativos (CDER, 1994).

Os resultados dos testes de adequabilidade do sistema desenvolvido estão descritos na TABELA 18 e os critérios para aceitação foram os preconizados pelo CDER (1994).

TABELA 18. Resultados da adequabilidade do sistema desenvolvido por CLAE/UV nas condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250x4,0 mm, 5 µm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 µL.

Substância*	Tempo de retenção (min) / DPR (≤ 1)	Área absoluta / DPR (≤ 1)	Número de pratos teóricos (> 2000)	Assimetria (≤ 2)	Fator capacidade (> 2)	Resolução (> 2)
DEP	6,70 / 0,07	2823584 / 0,25	2983	1,98	3,19	9,69
FEM	8,77 / 0,10	1630887 / 0,42	5651	1,60	4,48	4,31
MPH	10,99 / 1,00	1122881 / 0,84	3092	1,59	5,87	3,54
2-CB	13,41 / 0,50	4569173 / 0,48	4445	1,53	7,39	3,04
DOB	17,55 / 0,52	3896946 / 0,81	5877	1,35	9,98	4,81

*Concentração 30 µg/mL em fase móvel

Valores referentes à média de 5 injeções e limites de aceitação conforme CDER (1994).

DPR – desvio padrão relativo

5.1.1 Validação do método por CLAE/UV

5.1.1.1 Especificidade

A avaliação da especificidade do método por CLAE foi realizada de acordo com o item 4.2.2.1.

A FIGURA 9 apresenta a sobreposição dos cromatogramas das soluções de DEP (SQR), do Inibex® S, da cápsula manipulada e do placebo de Inibex® S.

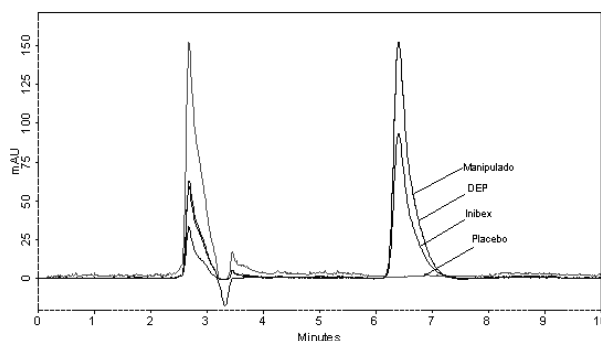


FIGURA 9. Especificidade: sobreposição dos cromatogramas das soluções de DEP SQR, Inibex® S, cápsula manipulada e placebo de Inibex® S em metanol (30 µg/mL). Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 µm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 µL.

A FIGURA 10 apresenta a sobreposição dos cromatogramas das soluções de FEM (SQR), do Desobesi-m[®] e do placebo de Desobesi-m[®].

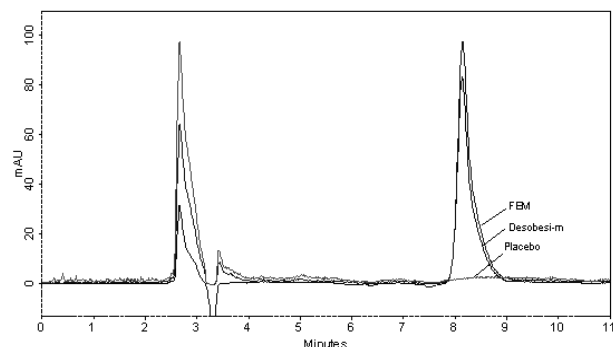


FIGURA 10. Especificidade: sobreposição dos cromatogramas das soluções de FEM SQR, Desobesi-m[®] e placebo de Desobesi-m[®] em metanol (30 µg/mL). Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 µm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 µL.

A FIGURA 11 apresenta a sobreposição dos cromatogramas das soluções de MPH (SQR), da Ritalina[®] e do placebo de Ritalina[®].

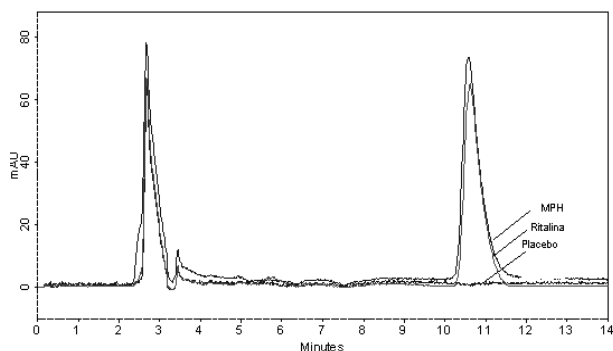


FIGURA 11. Especificidade: sobreposição dos cromatogramas das soluções de MPH SQR, Ritalina[®] e placebo de Ritalina[®] em metanol (30 µg/mL). Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 µm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 µL.

Os resultados obtidos demonstraram a ausência de qualquer pico interferente proveniente dos componentes da matriz no tempo de retenção do DEP, FEM e MPH.

A especificidade de um método analítico pode ser avaliada também pela determinação da pureza do pico cromatográfico através do DAD (BRASIL, 2003b).

A pureza total de um pico cromatográfico é calculada por comparação de todos os espectros desse pico com o espectro do ápice, considerado o espectro de referência. Quanto mais próximo de 1,0 for o índice de similaridade, mais puro é o pico (SHIMADZU, 2001).

A pureza dos picos cromatográficos obtidos está descrita na TABELA 19 e indica que os mesmos referem-se apenas às substâncias de interesse, sem interferentes.

Para a avaliação de possíveis interferentes foram selecionadas algumas substâncias (FIGURA 7) estruturalmente relacionadas, que apresentassem ação estimulante, ou, ainda, que fossem produtos remanescentes da síntese (Qi *et al.*, 2006).

TABELA 19. Índice de pureza dos picos cromatográficos do DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB, em metanol (30 µg/mL), fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C18 Merck (250x4,0 mm, 5 µm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 µL .

Solução	Índice de pureza do pico
DEP SQR	0,999928
Inibex [®] S	0,999839
Cápsula manipulada contendo DEP	0,999924
FEM SQR	0,999999
Desobesi-m [®]	0,999998
MPH SQR	0,999997
Ritalina [®]	0,999997
2-CB SQR	0,999564
DOB SQR	0,999984

A TABELA 20 mostra os tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CLAE/UV.

TABELA 20. Tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CLAE/UV, em ordem de eluição.

Substância	Tempo de retenção (min)
Efedrina	4,13
Anfetamina	4,90
MDA	4,94
Cafeína	5,47
MDMA	5,54
Metanfetamina	5,60
MDEA	6,45
DEP	6,70
MBDB	7,76
FEM	8,77
MPH	10,99
2-CB	13,41
DOB	17,55
Benzaldeído	18,89

A FIGURA 12 apresenta a sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco substâncias e da solução contendo o benzaldeído (possível produto remanescente da síntese do DOB).

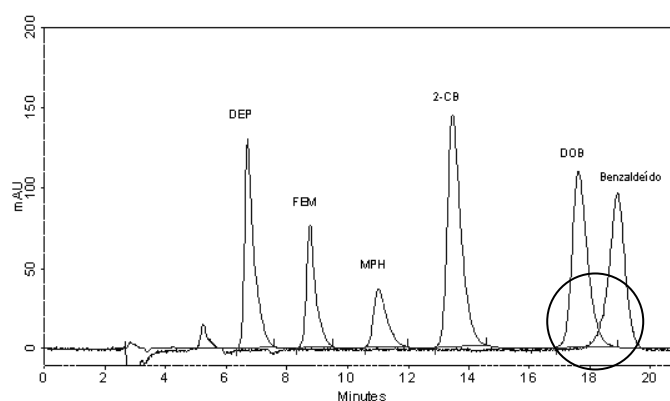


FIGURA 12. Especificidade: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e da solução contendo o benzaldeído (31,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em metanol (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

Como se pode observar, não houve uma boa resolução entre os picos do DOB e do benzaldeído. Contudo, observa-se que é a região basal dos picos que coincide no caso do DOB e do benzaldeído. Dessa forma, pode-se esperar que uma menor concentração de benzaldeído não interfira na determinação do DOB, visto

que um pico menor apresenta, conseqüentemente, uma base menor, o que pode permitir uma adequada resolução entre essas substâncias.

A FIGURA 13 apresenta a sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco substâncias e da solução contendo o MDEA.

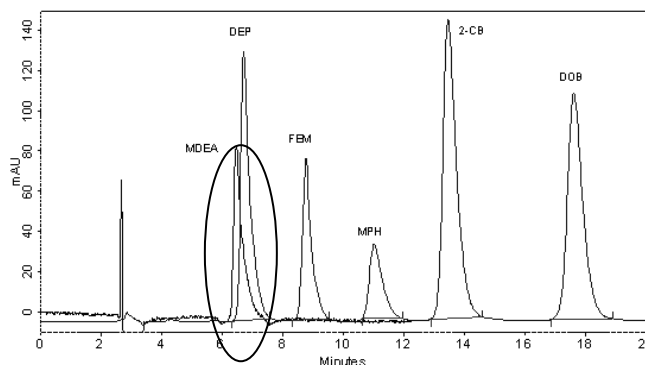


FIGURA 13. Especificidade: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33,0 $\mu\text{g/mL}$) e da solução contendo o MDEA (28,8 $\mu\text{g/mL}$) em metanol (MDEA= 3,4-metilenodioxi-etilamfetamina DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

De acordo com o resultado obtido, verifica-se que os tempos de retenção do DEP e do MDEA são muito próximos, impossibilitando a utilização do método desenvolvido por CLAE na diferenciação dessas substâncias. Entretanto, uma análise diferencial do DEP com relação ao MDEA poderia ser feita através do emprego do método por CG, pois houve uma boa resolução entre os picos desses compostos.

As FIGURAS 55 a 61 (ANEXO 8.1) apresentam a sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo as cinco substâncias e cada uma das substâncias relacionadas: anfetamina, metanfetamina, efedrina, cafeína, MDA, MDMA e MBDB, respectivamente. Os resultados obtidos demonstram que o método é específico e não sofre interferência dessas substâncias.

5.1.1.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método por CLAE/UV foi realizada de acordo com o item 4.2.2.2.

A TABELA 33 (ANEXO 8.1) apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão do DEP, representada na FIGURA 14.

A ANOVA dos resultados por CLAE (TABELA 34) (ANEXO 8.1) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O R^2 ($r=0,99975$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do DEP.

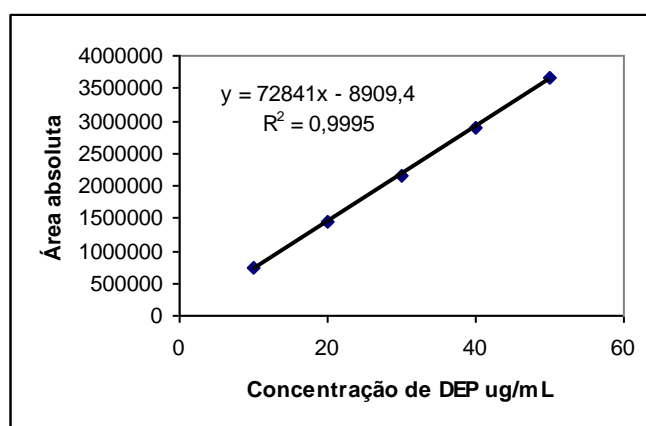


FIGURA 14. Representação gráfica da curva padrão média do DEP SQR por CLAE.

A TABELA 35 (ANEXO 8.1) apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão do FEM, representada na FIGURA 15.

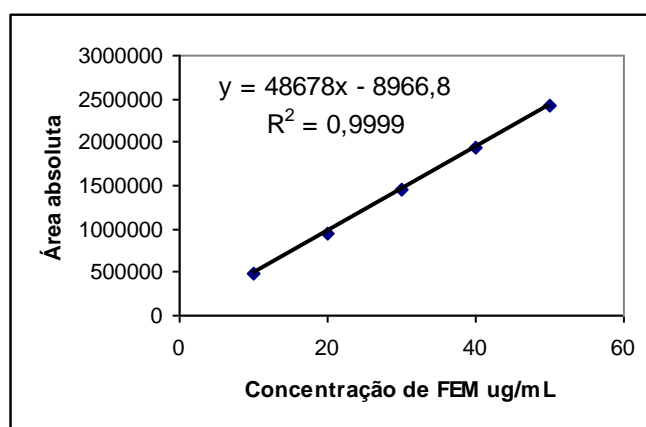


FIGURA 15. Representação gráfica da curva padrão média do FEM SQR por CLAE.

A ANOVA dos resultados por CLAE (TABELA 36) (ANEXO 8.1) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O R^2 ($r=0,99995$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do FEM.

A TABELA 37 (ANEXO 8.1) apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão do MPH, representada na FIGURA 16.

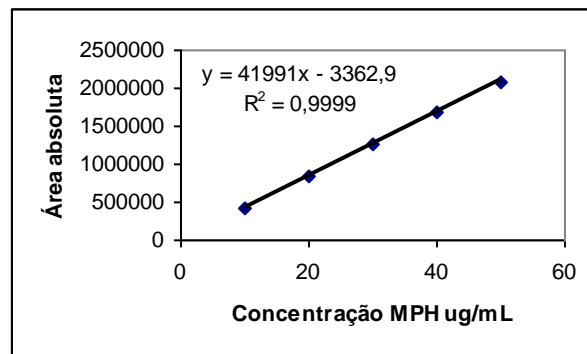


FIGURA 16. Representação gráfica da curva padrão média do MPH SQR por CLAE.

A ANOVA dos resultados por CLAE (TABELA 38) (ANEXO 8.1) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O R^2 ($r=0,99995$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do MPH.

A TABELA 39 (ANEXO 8.1) apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão do 2-CB, representada na FIGURA 17.

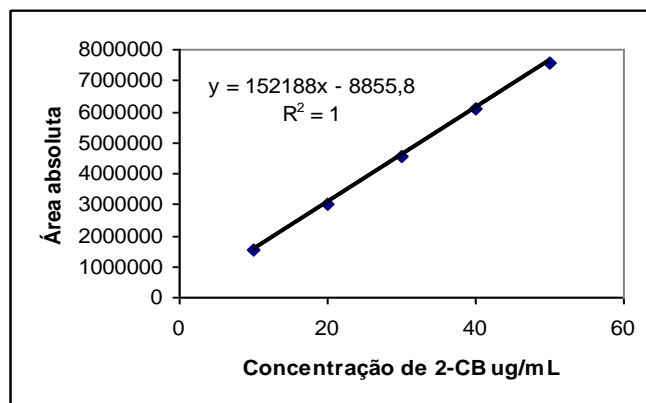


FIGURA 17. Representação gráfica da curva padrão média do 2-CB SQR por CLAE.

A ANOVA dos resultados por CLAE (TABELA 40) (ANEXO 8.1) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O R^2 ($r=1,00000$) está de acordo com as especificações e indica correlação excelente entre as áreas absolutas e a concentração do 2-CB.

A TABELA 41 (ANEXO 8.1) apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão do DOB, representada na FIGURA 18.

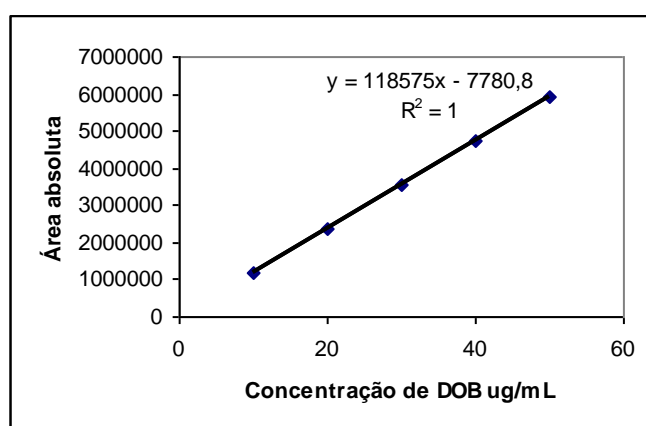


FIGURA 18. Representação gráfica da curva padrão média do DOB SQR por CLAE.

A ANOVA dos resultados por CLAE (TABELA 42) (ANEXO 8.1) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O R^2 ($r=1,00000$) está de acordo com as especificações e indica correlação excelente entre as áreas absolutas e a concentração do DOB.

5.1.1.3 Limites de detecção e de quantificação

A determinação dos LD e LQ do método por CLAE foi realizada de acordo com o item 4.2.2.3.

Os valores obtidos para a determinação dos limites de detecção e de quantificação do DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB através do método por CLAE podem ser observados na TABELA 21.

TABELA 21. Valores obtidos para a determinação do LD e do LQ do DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB por CLAE.

Substância	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
DEP	0,48	1,61
FEM	0,65	2,18
MPH	1,10	3,66
2-CB	0,14	0,47
DOB	0,30	1,00

5.1.1.4 Precisão

A avaliação da precisão do método por CLAE foi realizada de acordo com o item 4.2.2.4.

Os resultados da determinação do teor de DEP, FEM e MPH nas preparações farmacêuticas através de CLAE encontram-se na TABELA 22. Os resultados obtidos demonstraram que o método desenvolvido é preciso, tendo em vista que os DPR intra e inter-dias foram inferiores a 2,0 (SHABIR, 2003).

TABELA 22. Valores experimentais obtidos na determinação da repetibilidade e da precisão intermediária do método para Inibex[®] S (DEP), Desobesi-m[®] (FEM) e Ritalina[®] (MPH) por CLAE.

Produto	Teor (%)* / DPR intra-dia			Teor médio (%) ± e.p.m.**	DPR inter-dias**
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
Inibex [®] S	95,57 / 0,77	92,70 / 0,93	94,35 / 1,90	94,21 ± 0,39	1,77
Desobesi-m [®]	95,69 / 0,99	94,86 / 0,65	95,64 / 1,35	95,39 ± 0,24	1,06
Ritalina [®]	89,21 / 0,34	89,39 / 0,45	86,08 / 0,69	88,23 ± 0,38	1,84

* cada valor corresponde à média de seis ensaios completos.

** corresponde aos resultados das 18 determinações

Um analista realizou os ensaios nos dias 1 e 2 e outro analista no dia 3.

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

Os resultados da determinação do teor de MPH no medicamento Ritalina[®] foram confirmados pela aplicação do método farmacopéico (THE UNITED, 2007) demonstrando que o lote utilizado realmente se encontra fora da especificação de 93 a 107%.

5.1.1.5 Exatidão

A avaliação da exatidão do método por CLAE/UV foi realizada de acordo com o item 4.2.2.5.

Na TABELA 23 encontram-se os resultados experimentais obtidos para a determinação da exatidão pelo teste de recuperação do método por CLAE/UV para o DEP, FEM e MPH. Pelos resultados obtidos ficou demonstrado que o método desenvolvido mostrou-se exato, levando-se em consideração os DPR obtidos e as condições experimentais avaliadas.

TABELA 23. Valores experimentais obtidos na determinação da exatidão do método para Inibex[®] S (DEP), Desobesi-m[®] (FEM) e Ritalina[®] (MPH) por CLAE.

Produto	Solução	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração média encontrada (µg/mL)*	Recuperação (%)	DPR	Média (%)
Inibex [®] S	F ₁	10	10,24	102,38	0,29	102,61
	F ₂	15	15,31	102,07	0,88	
	F ₃	20	20,68	103,40	1,31	
Desobesi-m [®]	F ₁	10	9,90	99,02	0,55	98,72
	F ₂	15	14,75	98,31	0,44	
	F ₃	20	19,77	98,83	0,58	
Ritalina [®]	F ₁	10	10,33	103,35	0,25	102,79
	F ₂	15	15,45	102,98	0,34	
	F ₃	20	20,41	102,05	0,33	

* cada valor refere-se à média de três amostras analisadas, sendo que cada solução foi injetada em triplicata.

DPR – desvio padrão relativo

A exatidão também poderia ter sido inferida, pois o método mostrou-se preciso, linear e específico para o DEP, FEM e MPH (ICH, 2005).

5.1.1.6 Robustez

A avaliação da robustez do método por CLAE/UV foi realizada de acordo com o item 4.2.2.6 e os resultados obtidos foram comparados aos descritos na TABELA 18.

As FIGURAS 62 e 63 (ANEXO 8.1) apresentam os cromatogramas obtidos com pH, respectivamente, de 4,9 e 5,1 da solução tampão de trietilamina da fase móvel e a TABELA 43 (ANEXO 8.1) mostra os resultados dos parâmetros cromatográficos avaliados.

O pH de 4,9 causou uma aproximação do DEP com relação ao FEM, porém essa diminuição na diferença do tempo de retenção não comprometeu a resolução entre essas duas substâncias. Os demais parâmetros cromatográficos permaneceram dentro das especificações. A alteração no pH da solução tampão de trietilamina para 5,1 causou um aumento nos tempos de retenção de todas as substâncias.

Substituindo a coluna Merck® por uma coluna Phenomenex® Gemini Su C18 110A 250 x 4,6 mm 5 µm, conforme a FIGURA 64 (ANEXO 8.1), há uma aproximação do MPH em relação ao FEM, mantendo ainda uma resolução adequada. Entretanto, há também um aumento da assimetria do pico do DEP de forma a ultrapassar a especificação de, no máximo, 2, conforme o CDER (1994).

Uma lenta transferência de massa pode explicar a assimetria do pico, assim como os fenômenos de adsorção e desorção envolvidos (PÁPAI e PAP, 2002) e a forma de empacotamento da sílica.

As FIGURAS 65 e 66 (ANEXO 8.1) apresentam os cromatogramas obtidos, respectivamente, com o fluxo de 0,75 e 0,85 mL/min e os resultados dos parâmetros cromatográficos avaliados estão descritos na TABELA 44 (ANEXO 8.1) .

O fluxo de 0,75 mL/min aumentou o tempo de retenção de todas as substâncias, mantendo semelhantes os demais parâmetros. O fluxo de 0,85 mL/min, por outro lado, diminuiu os tempos de retenção, apresentando resultados muito semelhantes aos da condição 0,80 mL/min definida no método.

Embora os tempos de retenção tenham sofrido algumas modificações em função das alterações propositais realizadas no método, os perfis cromatográficos obtidos não sofreram maiores modificações. Dessa forma, é possível afirmar que o método proposto apresenta robustez quanto aos parâmetros avaliados, com exceção da coluna cromatográfica.

5.2 CG/DIC

Diversas análises preliminares foram executadas, avaliando-se a programação de temperatura do forno, ajustes de atenuação, variações no volume de injeção e no fluxo dos gases (razão de *split*), concentração das amostras, temperatura do injetor e do detector, intensidade das respostas obtidas, simetria dos picos e a separação entre eles.

Após a definição dos melhores parâmetros, com a coluna capilar utilizada, foi obtida uma boa resolução cromatográfica, permitindo a detecção de DEP, FEM, MPH e DOB, conforme pode ser visto na FIGURA 19.

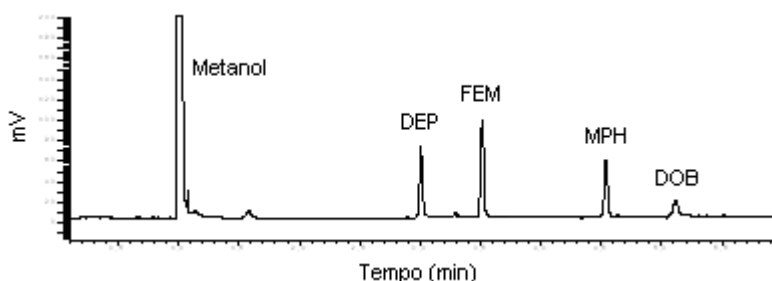


FIGURA 19. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH e DOB (SQR) em metanol (1 mg/mL), coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μ L.

A substância 2-CB, na concentração de 1 mg/mL, não apresentou resposta satisfatória nas condições cromatográficas testadas, como pode ser observado na FIGURA 20, apresentando um sinal de intensidade muito baixa, próximo ao ruído da linha de base do equipamento.

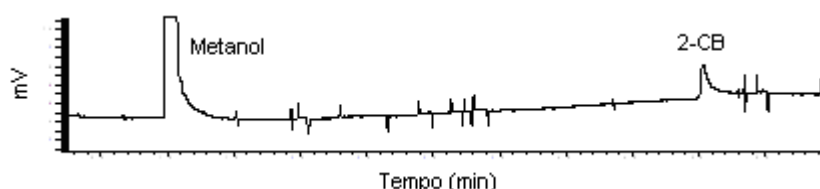


FIGURA 20. Cromatograma da solução contendo 2-CB (SQR) em metanol (1 mg/mL), coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μ L.

Além disso, o tempo de retenção do 2-CB ficou muito próximo ao tempo de retenção do DOB. Conforme se observa na FIGURA 21, há uma deformidade na região ascendente do pico do DOB, correspondente ao pico do 2-CB parcialmente encoberto, não permitindo uma resolução adequada entre essas substâncias.

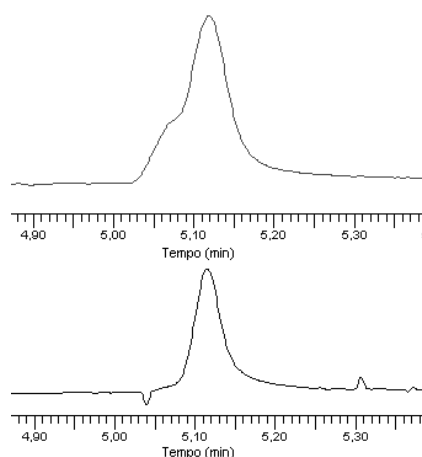


FIGURA 21. Cromatogramas das soluções contendo (1 mg/mL) de DOB e de 2-CB SQR em metanol (superior) e da solução contendo apenas DOB na mesma concentração (inferior).

A intensidade dos picos do DOB e do 2-CB foi muito inferior a dos demais derivados anfetamínicos testados (FIGURA 22).

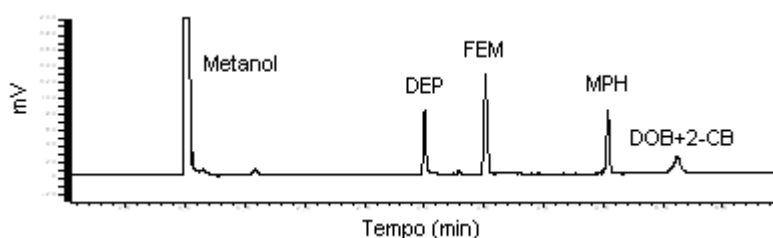


FIGURA 22. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB (SQR) em metanol (1 mg/mL), coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 $^{\circ}$ C (1 min) 12,5 $^{\circ}$ C/min 210 $^{\circ}$ C (1 min), detector 300 $^{\circ}$ C, injetor 280 $^{\circ}$ C e volume de injeção 3 μ L.

Provavelmente, derivatizando essas substâncias com TFAA (anidrido trifluoracético) (CARMO *et al.*, 2005), BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida) (ONU, 2006) ou, ainda, anidrido acético / ácido acético / piridina (ROHANOVÁ *et al.*, 2008) melhores resultados poderiam ser obtidos. Além disso, poderia ser utilizado o DCE, pois esse detector é muito sensível a compostos halogenados (JEFFERY *et al.* 1992, KATAOKA, 1996).

5.2.1 Validação do método por CG/DIC

5.2.1.1 Especificidade

A avaliação da especificidade do método por CG/DIC foi realizada de acordo com o item 4.3.2.1.

As FIGURAS 23 a 25 apresentam os cromatogramas das soluções preparadas a partir dos produtos farmacêuticos e a partir dos placebos de Inibex[®] S, Desobesi-m[®] e Ritalina[®], respectivamente. A FIGURA 23 mostra ainda o cromatograma de uma solução preparada a partir de cápsulas contendo DEP obtidas de uma farmácia de manipulação. Como pode ser observado, não há interferência de nenhum excipiente dos produtos testados no método desenvolvido.

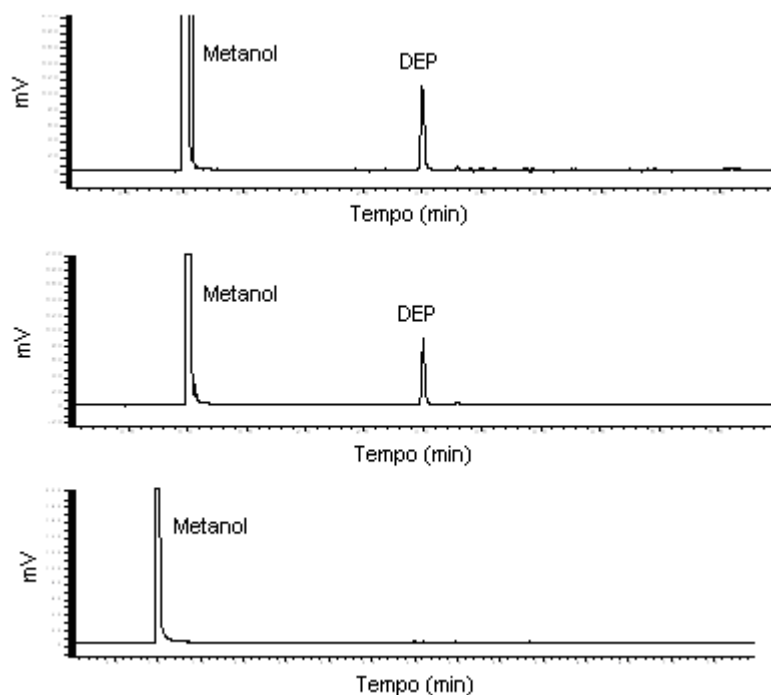


FIGURA 23. Especificidade: cromatogramas da solução da cápsula manipulada, do Inibex[®]S e da solução placebo de Inibex[®]S em metanol, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 $^{\circ}$ C (1 min) 12,5 $^{\circ}$ C/min 210 $^{\circ}$ C (1 min), detector 300 $^{\circ}$ C, injetor 280 $^{\circ}$ C e volume de injeção 3 μ L.

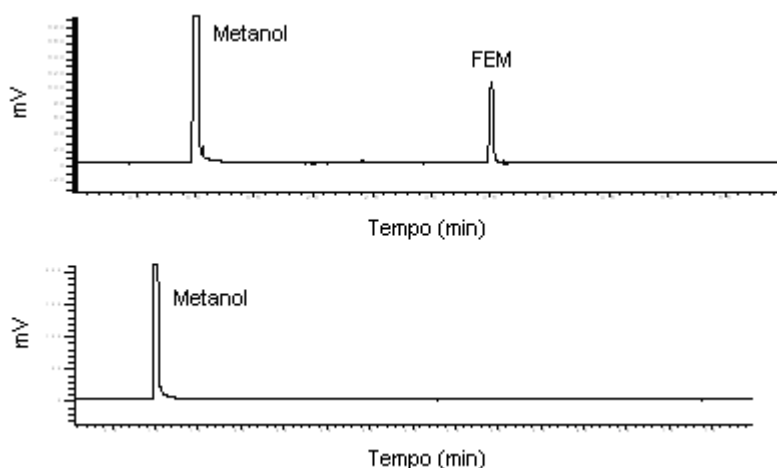


FIGURA 24. Especificidade: cromatogramas da solução do Desobesi-m[®] e da solução placebo de Desobesi-m[®] em metanol, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μ L.

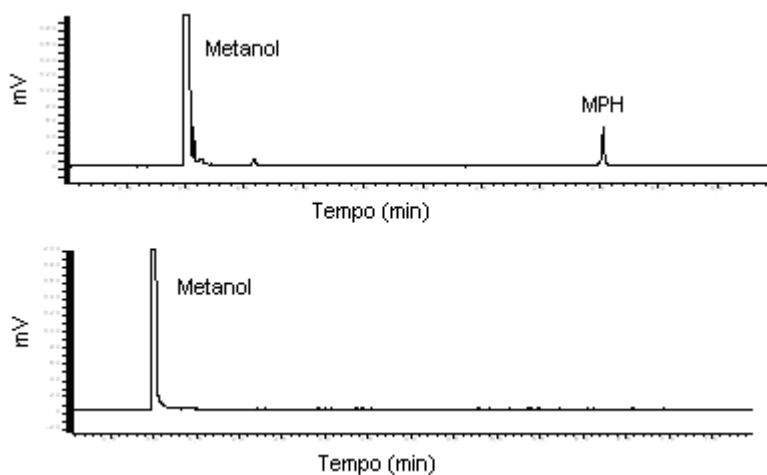


FIGURA 25. Especificidade: cromatogramas da solução de Ritalina[®] e da solução placebo de Ritalina[®] em metanol, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5°C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μ L.

Para a avaliação de outros possíveis interferentes nas amostras foram selecionadas substâncias (FIGURA 7) que apresentassem ação estimulante, que fossem estruturalmente relacionadas aos derivados anfetamínicos estudados ou, ainda, que pudessem ser produtos remanescentes da síntese.

A TABELA 24 mostra os tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CG/DIC.

TABELA 24. Tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CG/DIC, em ordem de eluição.

Substância	Tempo de retenção (min)
Benzaldeído	1,44
Anfetamina	1,51
Metanfetamina	1,64
Efedrina	2,29
MDA	2,81
DEP	3,00
MDMA	3,13
MDEA	3,43
FEM	3,51
MBDB	3,71
MPH	4,52
Cafeína	5,07
DOB	5,08
2-CB	5,03

Apesar da proximidade do tempo de retenção do DEP com relação ao do MDMA e ao do MDA, há uma boa resolução entre essas substâncias, como pode ser observado nas FIGURAS 26 e 27, respectivamente.

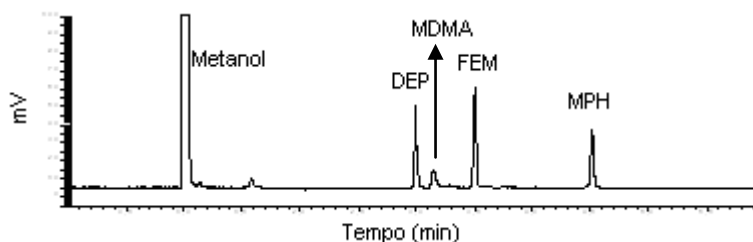


FIGURA 26. Especificidade: cromatograma de uma solução contendo DEP, MDMA, FEM e MPH em metanol.

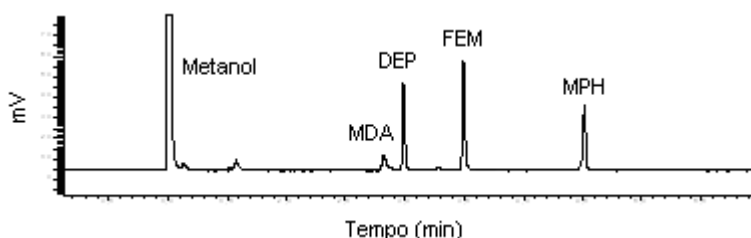


FIGURA 27. Especificidade: cromatograma de uma solução contendo MDA, DEP, FEM e MPH em metanol.

O MDEA e o FEM apresentaram tempos de retenção muito próximos, porém, ainda, distinguíveis, conforme a FIGURA 28.

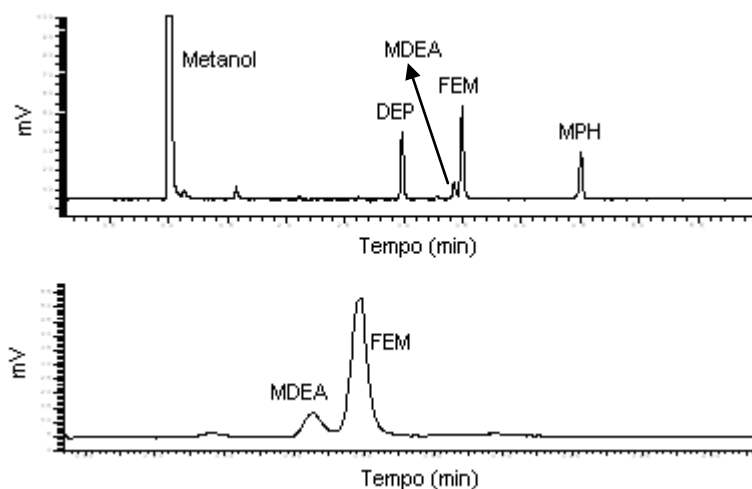


FIGURA 28. Especificidade: cromatograma de uma solução contendo DEP, MDEA, FEM e MPH em metanol. A região ampliada corresponde aos picos do MDEA e do FEM.

As FIGURAS 67 a 72 (ANEXO 8.2) apresentam os cromatogramas das soluções contendo as substâncias relacionadas: efedrina, benzaldeído, anfetamina, metanfetamina, cafeína e MBDB, respectivamente.

Pelos tempos de retenção obtidos é possível observar que não há interferência da efedrina, do MDMA, do benzaldeído, da anfetamina, do MDEA, do MDA, da metanfetamina e do MBDB no método desenvolvido para a detecção de DEP, FEM, MPH e DOB. Entretanto, a cafeína e o 2-CB, como já descrito, não podem ser diferenciados do DOB pelo DIC, nas condições experimentais testadas.

5.2.1.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método por CG/DIC foi realizada de acordo com o item 4.3.2.2.

Preliminarmente, foi realizada uma avaliação do DPR entre as injeções de 3 soluções contendo FEM. Os resultados podem ser vistos na TABELA 25.

TABELA 25. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de cada solução contendo FEM em metanol por CG/DIC.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	10	70	250
DPR	18,69	25,86	15,32

Considerando que o limite máximo de DPR especificado na legislação (BRASIL, 2003b) é 5,0, os resultados encontrados foram insatisfatórios.

Visando a tentar reduzir esses valores de DPR, buscou-se uma substância que pudesse ser utilizada como PI. A utilização de padronização interna minimiza o efeito das flutuações no sistema de injeção, na vazão do gás de arraste, na temperatura da coluna e do detector sendo usualmente empregada em métodos por CG (LANÇAS, 1993; CDER, 1994; LANÇAS, 2004). As exigências para um PI incluem não interferência no resultado, eluição em tempo próximo ao da substância a ser analisada e similaridade química e/ou estrutural (LANÇAS, 2004).

Dessa forma, a efedrina e a DFA foram testadas. Inicialmente, testou-se a efedrina, porém o seu comportamento nas condições estabelecidas foi instável, optando-se pela DFA, cujas áreas absolutas e simetria do pico foram mais reprodutíveis.

No intuito de se verificar, também, o efeito da concentração no DPR obtido, soluções contendo maiores concentrações de DEP, FEM e MPH, na presença de DFA, foram testadas. Os resultados encontram-se na TABELA 26.

TABELA 26. Valores obtidos de DPR de 5 injeções de cada concentração por CG/DIC.

Concentração (mg/mL)		1,0	1,1	1,2	1,3	1,4
DEP	Áreas absolutas	5,03	3,02	6,84	4,40	5,12
	Áreas relativas ao PI	1,19	1,93	2,32	3,10	1,82
FEM	Áreas absolutas	2,39	5,27	8,09	4,69	5,88
	Áreas relativas ao PI	4,71	4,12	4,15	3,36	3,09
MPH	Áreas absolutas	3,61	6,50	6,63	6,48	5,80
	Áreas relativas ao PI	7,20	6,52	4,45	5,34	3,18

Os resultados obtidos demonstraram que o aumento da concentração das amostras aliado à presença do PI diminuiu a maioria dos valores de DPR intra-dia. O MPH, mesmo na presença de PI, apresentou alguns valores acima de 5,0.

Na FIGURA 29 pode-se observar o cromatograma obtido a partir de uma solução contendo 1 mg/mL de, em ordem de eluição, DEP, FEM, DFA (PI), MPH e DOB.

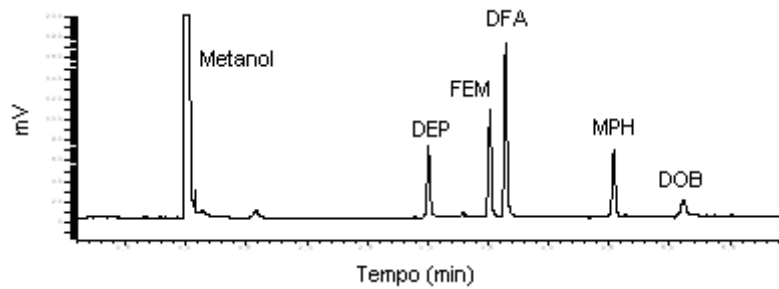


FIGURA 29. Cromatograma de uma solução contendo 1 mg/mL em metanol de DEP, FEM, DFA, MPH e DOB. Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 $^{\circ}$ C (1 min) 12,5 $^{\circ}$ C/min 210 $^{\circ}$ C, detector 300 $^{\circ}$ C, injetor 280 $^{\circ}$ C, atenuação -5 e volume de injeção 3 μ L.

Vários testes foram efetuados até que se obtivesse uma boa correlação entre as concentrações e as razões das áreas (da substância de interesse em relação ao PI). A dificuldade na obtenção de curvas lineares por CG pode indicar problemas de adsorção (GROB e BARRY, 2004).

A TABELA 45 (ANEXO 8.2) apresenta os valores obtidos da razão entre a área absoluta do pico do DEP e a área absoluta do pico do PI para cada concentração da curva padrão, representada na FIGURA 30.

O R^2 ($r=0,9992$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as razões das áreas e a concentração do DEP, porém um valor de DPR inter-dias ficou acima de 5,0.

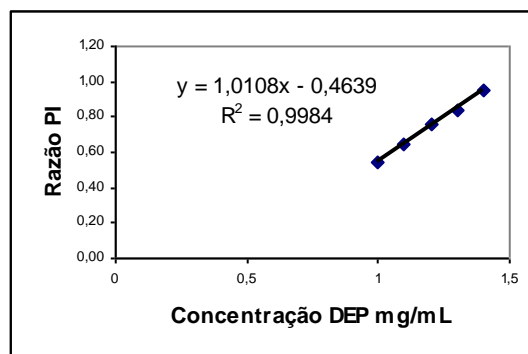


FIGURA 30. Representação gráfica da curva padrão média do DEP SQR por CG/DIC.

A TABELA 46 (ANEXO 8.2) apresenta os valores obtidos da razão entre a área absoluta do pico do FEM e a área absoluta do pico do PI para cada concentração da curva padrão, representada na FIGURA 31.

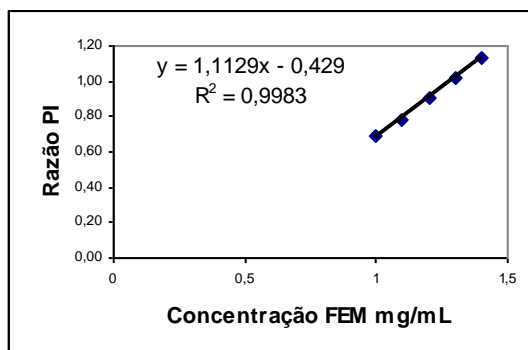


FIGURA 31. Representação gráfica da curva padrão média do FEM SQR por CG/DIC.

O R^2 ($r=0,9991$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as razões das áreas e a concentração do FEM, porém alguns valores de DPR intra-dia e inter-dias ficaram acima de 5,0.

A TABELA 47 (ANEXO 8.2) apresenta os valores obtidos da razão entre a área absoluta do pico do MPH e a área absoluta do pico do PI para cada concentração da curva padrão, representada na FIGURA 32.

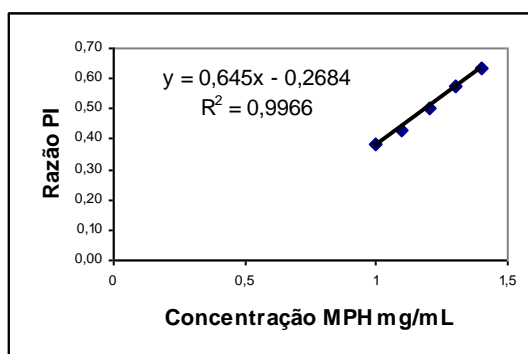


FIGURA 32. Representação gráfica da curva padrão média do MPH SQR por CG/DIC.

O R^2 ($r=0,9983$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as razões das áreas e a concentração do MPH, porém o DPR intra-dia e inter-dias apresentou valores acima de 5,0.

Conforme já descrito, a regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quanto à validação de procedimentos analíticos (BRASIL, 2003b), estabelece uma variação aceitável de DPR de, no máximo, 5,0. Como os resultados obtidos foram superiores a 5,0, optou-se por não prosseguir na avaliação da linearidade (dia 3), bem como, na avaliação dos demais parâmetros para testes quantitativos.

Avaliando os dados obtidos em 2 dias, já foi possível observar que o método desenvolvido apresenta uma variação maior quando aplicado à análise de MPH do que quando utilizado para o DEP e o FEM.

Como as substâncias foram avaliadas simultaneamente e os resultados obtidos para o DEP e FEM foram mais satisfatórios, podem-se eliminar as variações decorrentes da injeção manual ou de possíveis vazamentos no septo nos resultados encontrados para o MPH. Esses resultados poderiam ser melhores através do uso de outro detector, pois LEVINE e colaboradores (1986) desenvolveram um método para análise de MPH em amostras biológicas sem derivatização por CG/DNF ou então, ainda, como descrito por ALLEN e SEDGWICK (1984) por meio de uma reação de derivatização por metilação. Outra opção, poderia ser o uso do detector de massas no modo *Selected Ion Monitoring (SIM)*.

Além disso, KATAOKA (1996) afirma em seu trabalho que aminas primárias tendem a adsorver mais à coluna que aminas secundárias e terciárias. De fato, os picos do DOB e do 2-CB (aminas primárias) foram os que apresentaram maior cauda e menor resposta ao detector, bem como, o MPH (amina secundária) foi a substância que menos reproduziu os resultados na avaliação da linearidade do método.

5.2.1.3 Limites de detecção e de quantificação

A determinação dos LD e LQ do método por CG/DIC foi realizada de acordo com o item 4.3.2.3.

Os valores obtidos para os LD e LQ para o DEP, FEM e MPH através do método por CG/DIC podem ser observados na TABELA 27.

TABELA 27. Valores obtidos para a determinação do LD e do LQ do DEP, FEM e MPH por CG/DIC.

Substância	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)
DEP	0,21	0,71
FEM	0,29	0,96
MPH	0,18	0,60

HUIZER e colaboradores (2001) relataram que o sinal gerado pelo DIC é proporcional à massa de carbono da molécula, mas que alguns grupos funcionais, como aminas, produzem sinais muito baixos. De acordo com o esperado, os resultados obtidos indicaram que o método apresenta uma baixa sensibilidade, com valores elevados de LD e de LQ.

Existem duas formas de se determinar o LD e o LQ: o método estatístico e o método empírico (ou experimental), onde se analisa uma série de amostras contendo concentrações decrescentes do fármaco até a obtenção da menor concentração que satisfaça os critérios pré-estabelecidos.

ARMBRUSTER e colaboradores (1994) analisaram algumas substâncias de interesse forense por CG/EM e compararam os resultados obtidos de LD pelos dois métodos. Eles obtiveram valores maiores pelo método empírico e concluíram que esse método fornece resultados mais adequados por serem obtidos nas condições experimentais do laboratório. Entretanto, se a curva padrão for obtida com vários pontos próximos à origem, a inclinação da curva na região de baixas concentrações, o intercepto e a imprecisão associados serão melhor definidos e o método estatístico pode fornecer resultados satisfatórios.

5.2.2 Derivatização

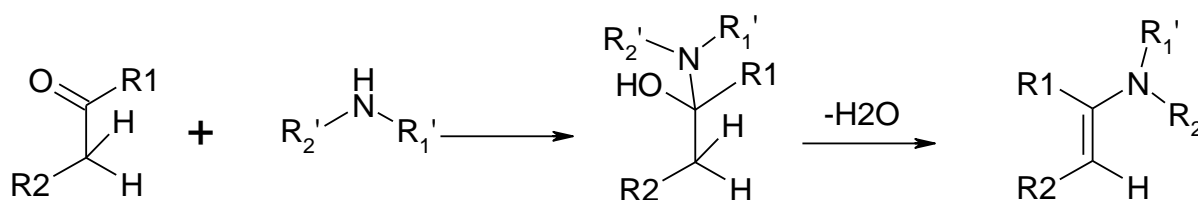
A avaliação de alguns reagentes derivatizantes foi realizada conforme o item 4.3.3, pois, de acordo com a literatura, a maioria dos compostos anfetamínicos apresenta melhores resultados na forma derivatizada (LANÇAS, 1993; McNAIR e MILLER, 1998).

Embora esses derivados anfetamínicos sejam suficientemente voláteis para análise direta por CG, os grupos polares –NH podem adsorver na coluna cromatográfica, pela tendência a formar pontes de hidrogênio, o que dificulta a sua eluição da coluna gerando picos com cauda, dificuldade de detecção de concentrações muito baixas ou, ainda, levando à formação de artefatos (LANÇAS, 1993; KATAOKA, 1996; McNAIR e MILLER, 1998; McAVOY *et al.*, 1999).

Baseando-se em alguns resultados satisfatórios obtidos em outras pesquisas com derivados anfetamínicos, testou-se a ciclohexanona como um reagente derivatizante para o FEM e o MPH.

A eficiência do procedimento de derivatização depende do tipo de amostra, da estrutura química, do tempo e da temperatura da reação, da natureza dos reagentes e solventes, das características do meio reacional e do sistema de detecção empregado (HERNÁNDEZ e FALCÓ, 2000a; SHAREEF *et al.*, 2006).

O ESQUEMA 1 mostra a reação entre aminas secundárias (FEM e MPH) e compostos carbonílicos, formando enaminas (EL-HAJ *et al.*, 2003).



ESQUEMA 1

O cromatograma obtido, FIGURA 33, mostra um pico além do pico do MPH, sugerindo a produção de apenas um derivado. Entretanto, na FIGURA 34 pode-se observar que o pico correspondente ao FEM sobrepõe-se a um pico, provavelmente, o do excesso de ciclohexanona, caracterizando uma co-eluição indesejada por dificultar o acompanhamento do progresso da reação. Essa limitação poderia ser corrigida pelo uso do detector de massas no modo *SIM*, selecionando-se alguns íons correspondentes apenas ao produto formado.

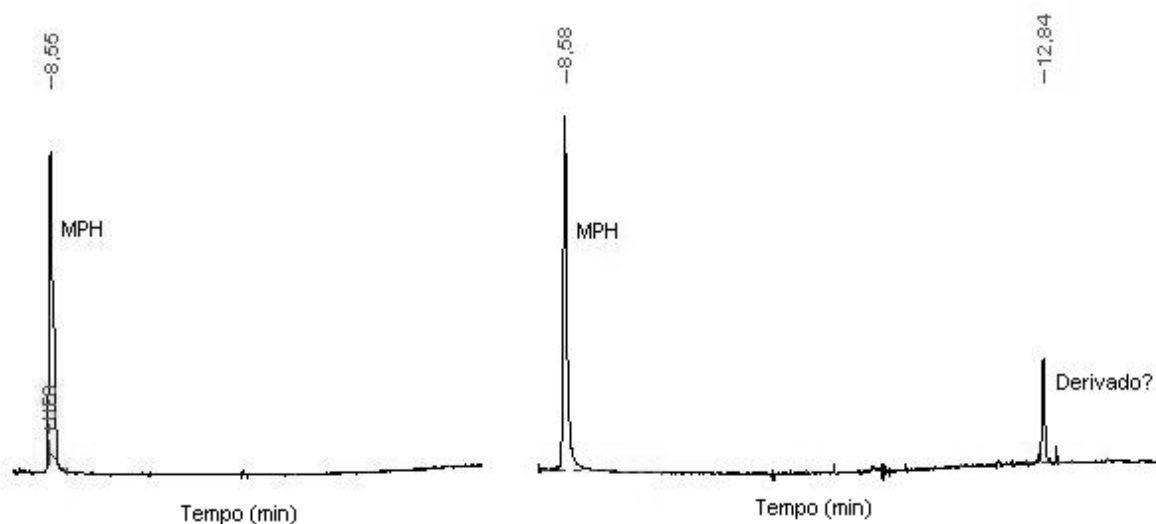


FIGURA 33. Cromatogramas da solução contendo MPH 1 mg/mL e MPH derivatizado com ciclohexanona, respectivamente, em metanol nas condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 80 °C (3 min), 40 °C/min 220 °C (4 min), 40 °C/min 280 °C (2 min), detector 260 °C e injetor 225 °C.

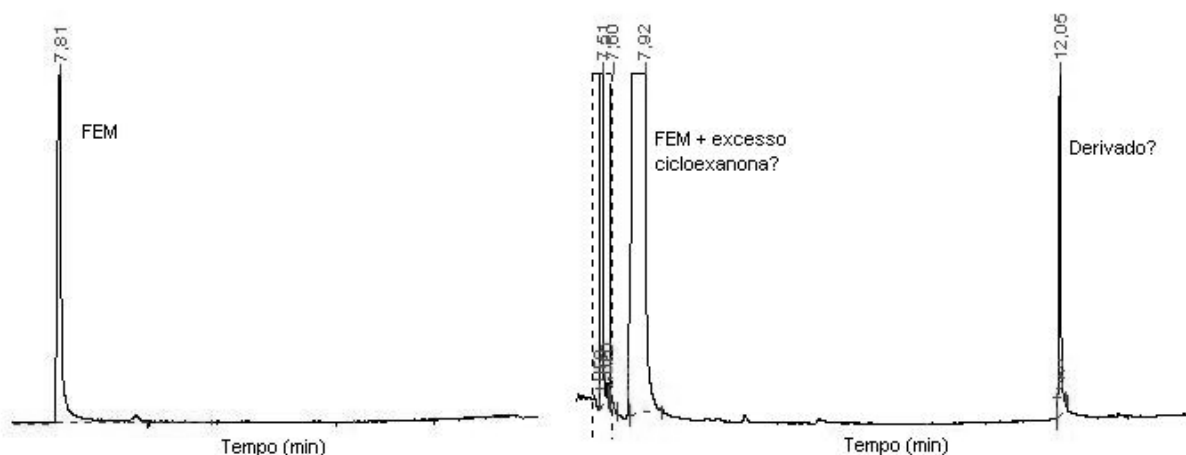
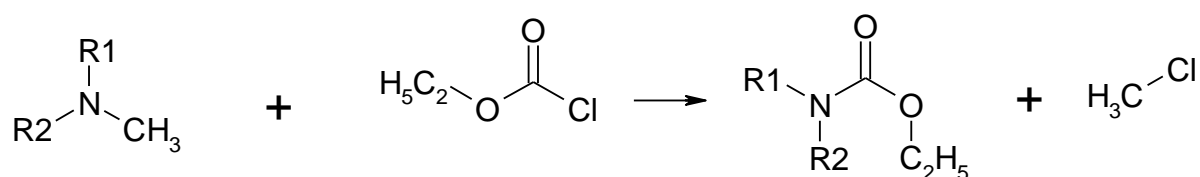


FIGURA 34. Cromatogramas da solução contendo FEM 1 mg/mL e FEM derivatizado com ciclohexanona, respectivamente, nas condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 80 °C (3 min), 40 °C/min 220 °C (4 min), 40 °C/min 280 °C (2 min), detector 260 °C e injetor 225 °C.

Vários outros reagentes são usados na derivatização de compostos anfetamínicos, porém, a maioria deles apresenta maior dificuldade para reagir com aminas terciárias, como é o caso do DEP. Como o propósito desse trabalho era desenvolver um sistema que fosse adequado à análise simultânea de DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB, havia a necessidade de se testar reagentes capazes de derivatizar o DEP (pior condição) e de produzir resultados satisfatórios com o DIC.

Reações de acilação podem ser usadas para derivatizar aminas terciárias, resultando na formação de trifluoracetofenonas, cujos níveis de detecção são baixos pelo DCE (BLAU e KING, 1977).

Cloroformatos podem ser usados na derivatização de aminas terciárias devido a uma reação de dealquilação, onde um dos grupamentos ligados ao nitrogênio é substituído, formando um carbamato (ESQUEMA 2), detectável tanto pelo DCE quanto pelo DIC (BLAU e KING, 1977; NICHOLSON, 1978; KATAOKA, 1996; HERNÁNDEZ e FALCÓ, 2000b).



ESQUEMA 2

A presença de carbonato de sódio ou outra base como a trimetilamina ou diisopropiletilamina é importante por funcionar como um catalisador reduzindo o tempo de reação (BLAU e KING, 1977; NICHOLSON, 1978; KATAOKA, 1996).

A FIGURA 35 mostra os cromatogramas obtidos após a reação do DEP com o etilcloroformato e butilcloroformato, respectivamente.

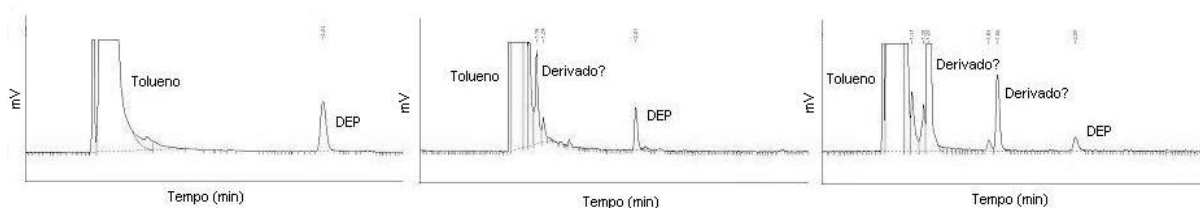


FIGURA 35. Cromatogramas da solução contendo DEP 1 mg/mL, DEP derivatizado com etilcloroformato e com butilcloroformato, respectivamente, nas condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μm , 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 190 $^{\circ}\text{C}$ (4 min), detector 260 $^{\circ}\text{C}$, injetor 285 $^{\circ}\text{C}$, atenuação -6.

O cromatograma obtido após derivatização com etilcloroformato mostrou o pico do DEP ainda muito intenso (área DEP antes da reação 89166 e após reação com o etilcloroformato 40117) e com o butilcloroformato (área após reação 27973),

indicando que não houve a reação completa nas condições testadas. Além disso, houve o aparecimento de mais de um pico e em tempos de retenção muito próximos ao do tolueno.

O mesmo procedimento foi aplicado ao FEM e ao MPH. Com o reagente etilcloroformato, se observou o surgimento de apenas um pico simultaneamente ao desaparecimento dos picos originais, conforme as FIGURAS 36 e 37, respectivamente, demonstrando que as condições utilizadas foram suficientes para a reação completa.

Na presença de butilcloroformato também se observou o desaparecimento do pico original de FEM e de MPH e o surgimento de um pico, provavelmente, do derivado formado, porém, surgiram mais dois picos de baixa intensidade em tempos de retenção próximos ao do tolueno.

A formação de um único derivado é essencial para se obter maior sensibilidade e condições adequadas para quantificação.

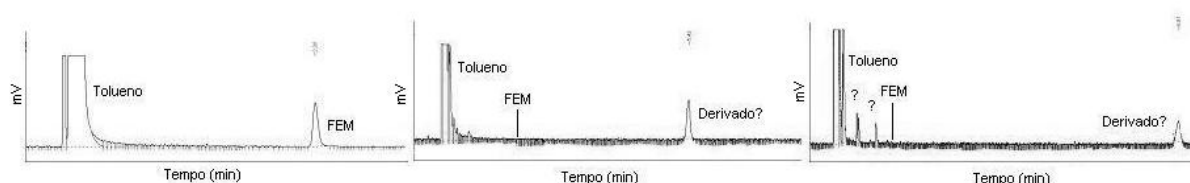


FIGURA 36. Cromatogramas da solução contendo FEM 1 mg/mL, FEM derivatizado com etilcloroformato e com butilcloroformato, respectivamente, nas condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 190 °C (4 min), detector 260 °C, injetor 285 °C, atenuação -6.

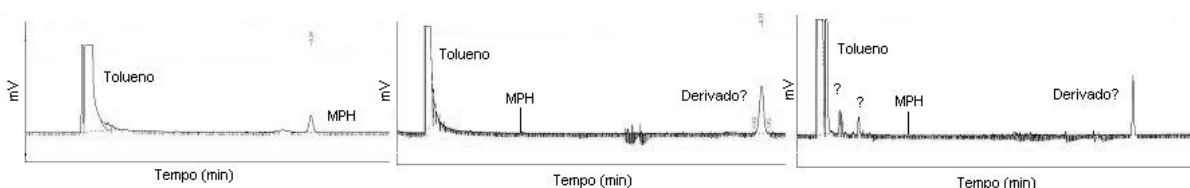


FIGURA 37. Cromatogramas da solução contendo MPH 1 mg/mL, MPH derivatizado com etilcloroformato e com butilcloroformato, respectivamente, nas condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 190 °C (4 min), detector 260 °C, injetor 285 °C, atenuação -6.

A velocidade da reação dos cloroformatos com aminas terciárias é muito menor do que com aminas primárias e secundárias (HERNÁNDEZ e FALCÓ, 2000b; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Além disso, compostos que possuem substituintes

maiores que N,N-dimetil, como por exemplo, N,N-dietil, apresentam uma velocidade da reação de formação do carbamato menor (NICHOLSON, 1978).

De acordo com os resultados obtidos, seriam necessários mais testes, contudo, considerando que a praticidade, o custo e o tempo de análise são muito importantes na rotina de um laboratório forense, concluiu-se que essa técnica de derivatização não seria viável para o objetivo proposto.

5.3 CG/EM

Para o estabelecimento do método analítico foram avaliadas diversas condições cromatográficas. Nessas análises preliminares foram testados diferentes parâmetros, entre eles: programação de temperatura da coluna, ajustes de integração (*slope*), variações no volume de injeção e na razão de divisão das amostras (*split*), concentração das amostras, temperatura do injetor e da interface, modo *full scan* e *SIM*.

A simetria dos picos e os baixos tempos de retenção foram determinantes na escolha da temperatura da coluna e dos demais parâmetros do método, o que proporcionou uma adequada separação das substâncias e permitiu a identificação simultânea de DEP, FEM, MPH e DOB, conforme pode ser visto na FIGURA 38.

Uma vantagem de se usar um método isotérmico é a rapidez da análise. Quando é necessário analisar várias amostras, o que é comum em laboratórios de toxicologia forense, o tempo para resfriamento da coluna passa a ser significativo.

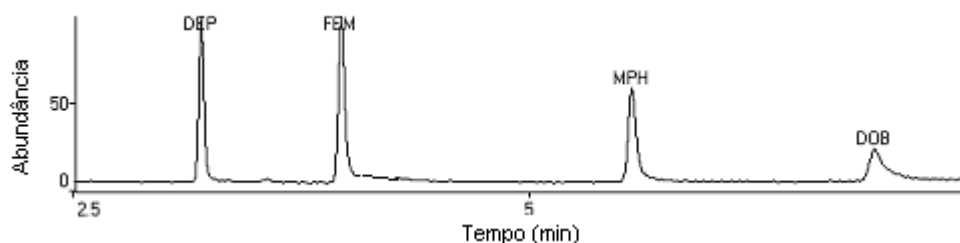


FIGURA 38. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH e DOB (SQR), respectivamente, em metanol (250 $\mu\text{g/mL}$), coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5@ 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μm film 190 $^{\circ}\text{C}$ (7,5 min), detector 260 $^{\circ}\text{C}$, injetor 285 $^{\circ}\text{C}$, *split* 1:75, *slope* 8000 e volume de injeção 3 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

A substância 2-CB apresentou um pico de intensidade baixa e coincidente ao DOB no tempo de retenção. Vários programas de temperatura do forno, inclusive com rampas de aquecimento, foram testados sem êxito na separação dessas substâncias. Nesses testes os tempos de retenção foram maiores, os picos produzidos foram mais largos e, ainda, não houve um aumento significativo na intensidade das respostas.

A FIGURA 39 mostra o cromatograma obtido pela análise de uma solução contendo DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB onde se pode observar que a área do pico do DOB aumentou devido à co-eluição do 2-CB.

A similaridade estrutural do 2-CB em relação ao DOB pode ter sido a causa da dificuldade na separação dessas substâncias na coluna testada.

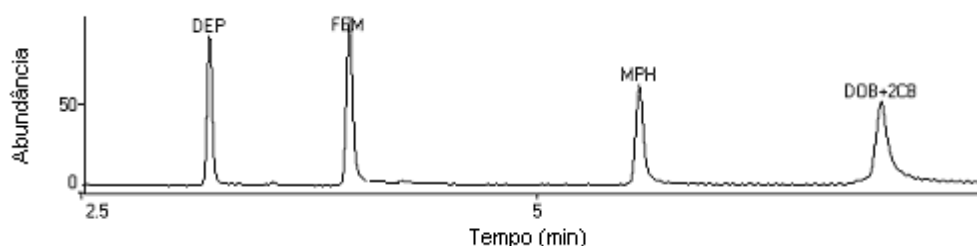


FIGURA 39. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB (SQR), respectivamente, em metanol (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5@ 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μm film 190 $^{\circ}\text{C}$ (7,5 min), detector 260 $^{\circ}\text{C}$, injetor 285 $^{\circ}\text{C}$, *split* 1:75, *slope* 8000 e volume de injeção 3 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina e 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina).

Além disso, observou-se que a intensidade do pico obtido a partir de uma solução contendo 2-CB foi inferior à obtida a partir do DOB, na mesma concentração, como pode ser visto na FIGURA 40.

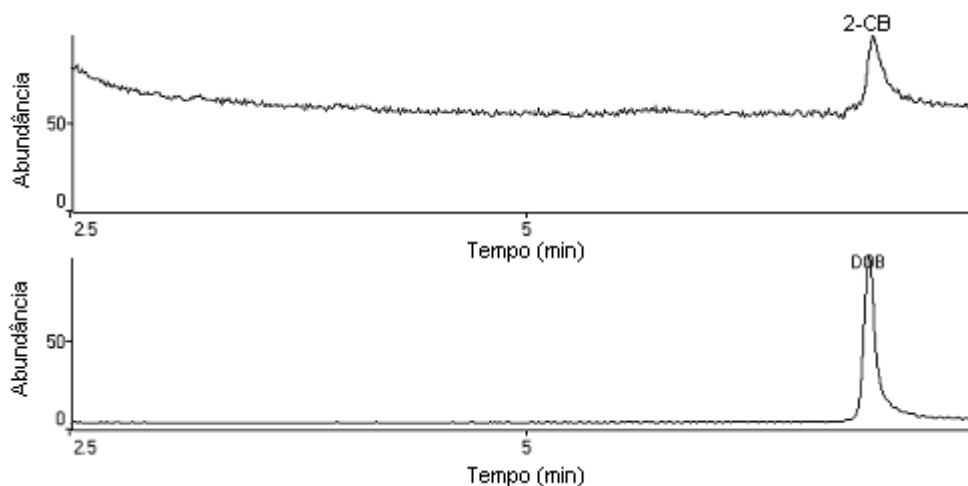


FIGURA 40. Cromatogramas das soluções contendo 2-CB e DOB (SQR), respectivamente, em metanol (1 mg/mL), coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5® 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μ m film 190 $^{\circ}$ C (7,5 min), detector 260 $^{\circ}$ C, injetor 285 $^{\circ}$ C, *split* 1:75, *slope* 8000 e volume de injeção 3 μ L.

Tanto o DOB, quanto o 2-CB, apresentaram variações no perfil cromatográfico a cada injeção efetuada nas mesmas condições experimentais, demonstrando que essa técnica não é a mais indicada para a determinação dessas substâncias não derivatizadas.

As FIGURAS 41 a 45 mostram os espectros de massas do DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB, respectivamente.

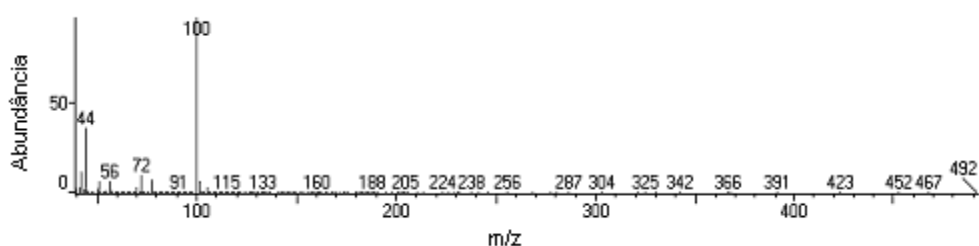


FIGURA 41. Espectro de massas do DEP.

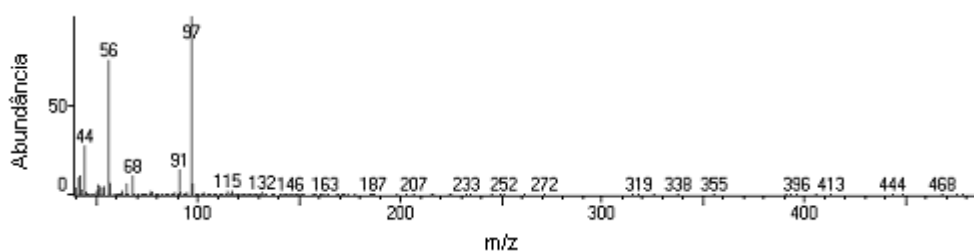


FIGURA 42. Espectro de massas do FEM.

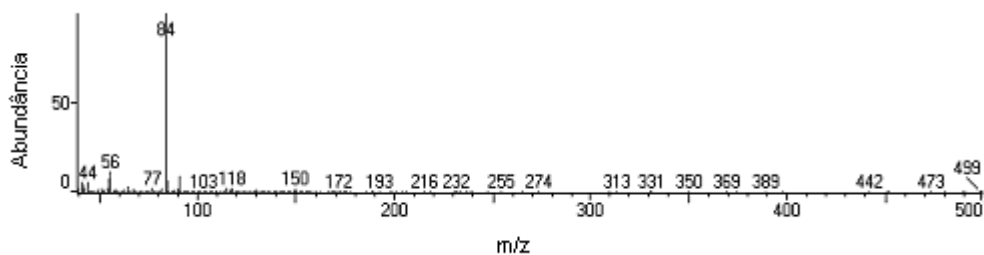


FIGURA 43. Espectro de massas do MPH.

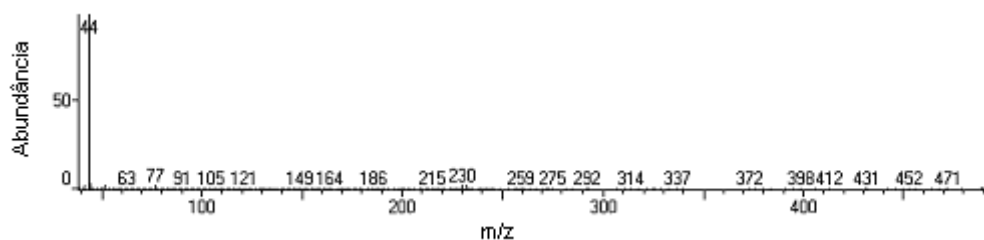


FIGURA 44. Espectro de massas do DOB.

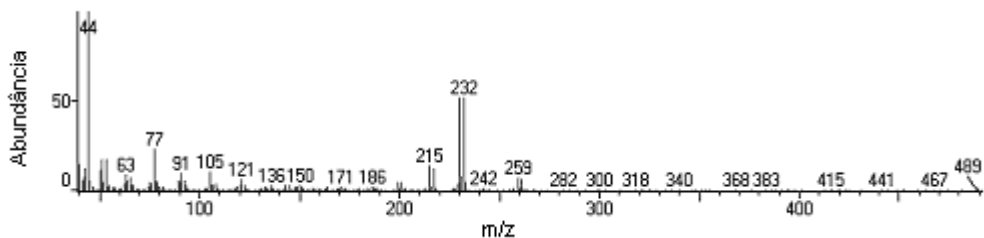


FIGURA 45. Espectro de massas do 2-CB.

A FIGURA 46 mostra as propostas de fragmentação das moléculas de DEP, FEM e MPH.

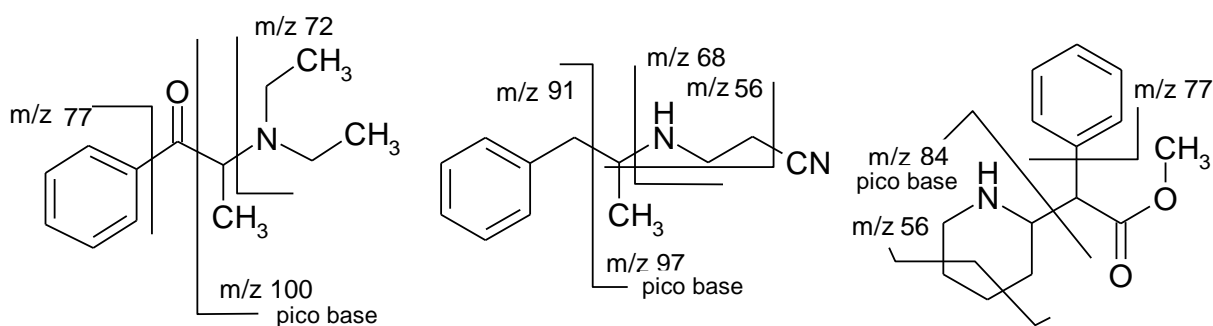


FIGURA 46. Proposta para a fragmentação principal do DEP, FEM e MPH, respectivamente.

O espectro de massas do DOB (FIGURA 44) apresenta a seguinte fragmentação iônica (m/z): 44 (pico base), 77, 91, 105, 215/217, 230/232 e 273. Os

picos 230/232 são relativos ao íon $C_9H_{10}BrO_2$, resultante da fissão da ligação alfa e a expulsão do C_2H_6N (DeRUITER *et al.*, 1998b).

Como descrito na literatura, no espectro de massas do 2-CB (FIGURA 45) pode-se observar o íon molecular de razão m/z 259/261 e os fragmentos contendo bromo que são facilmente identificados pela proximidade da razão isotópica do Br^{79} e Br^{81} apresentando os seguintes fragmentos de razão m/z 201/203, 215/217 e 230/232 (RAGAN *et al.*, 1985; GIROUD *et al.*, 1998; COLE *et al.*, 2002).

As possíveis estruturas químicas referentes aos fragmentos obtidos podem ser vistas na FIGURA 47.

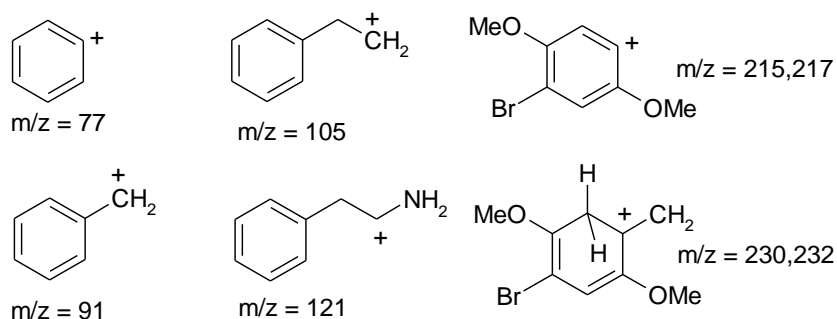


FIGURA 47. Possíveis fragmentos provenientes da quebra das moléculas de DOB e 2-CB (DeRUITER *et al.*, 1995; GIROUD *et al.*, 1998).

Comparando os espectros de massas do DOB e do 2-CB se observa uma grande similaridade no padrão de fragmentação. Os espectros de massa de derivados bromo-dimetoxianfetamínicos variam somente na intensidade do íon molecular relativo ao pico base, impossibilitando o uso da CG/EM como um método definitivo de identificação dessas substâncias (DELLIOU, 1983).

As dimetoxianfetaminas apresentam espectro de massas muito similares (fragmento de razão m/z 44 que corresponde ao íon imina $CH_3CH=NH_2^+$, comum a todos 1-fenil-2-aminopropanos), sendo necessário outros métodos, como o CLAE e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton, para diferenciar compostos isômeros de posição (DeRUITER *et al.*, 1998b; COLE *et al.*, 2002).

Os derivados dimetoxianfetamínicos que apresentam o grupamento Br na posição orto em relação à cadeia lateral alquilamina mostram no espectro de

massas o fragmento de razão m/z 194. Já outros isômeros (como o DOB), não apresentam esse fragmento. Os derivados dimetoxifenetilamínicos (como o 2-CB) que apresentam o grupamento Br na posição orto em relação à cadeia lateral alquilamina mostram no espectro de massas o fragmento de razão m/z 180. Como o 2-CB não perde o bromo do íon molecular, não apresenta o fragmento de razão m/z 180 no espectro de massas (DeRUITER *et al.*, 1998a; DeRUITER *et al.*, 1998b).

É muito importante a identificação estrutural de compostos de forma inequívoca, pois existem 16 formas possíveis de isômeros dimetoxianfetamínicos monobromados no anel aromático. O espectro de massas, devido aos dois isótopos do bromo, permite o reconhecimento e a distinção desses compostos, entretanto, não define em qual posição do anel aromático há esse halogênio (BAILEY *et al.*, 1976).

Sendo assim, não foi possível diferenciar o DOB do 2-CB sem derivatização por CG/EM nas condições experimentais testadas.

Em geral, os espectros de massas dos derivados anfetamínicos apresentam fragmentos de baixa massa, comuns a várias aminas. O procedimento de derivatização aumenta o peso molecular dessas substâncias, gerando a produção de íons de massa maior e, conseqüentemente, mais específicos.

O modo *Selected Ion Monitoring (SIM)* melhorou o limite de detecção do método, como pode ser observado na FIGURA 48. Esse recurso do equipamento permite a seleção de íons característicos da substância de interesse, o que aumenta a seletividade da detecção. Por outro lado, aquelas substâncias que não apresentam os fragmentos selecionados não são detectadas pelo método. Esse modo de detecção é vantajoso nos casos onde se deseja detectar uma substância em específico, não em métodos para triagem de amostras.

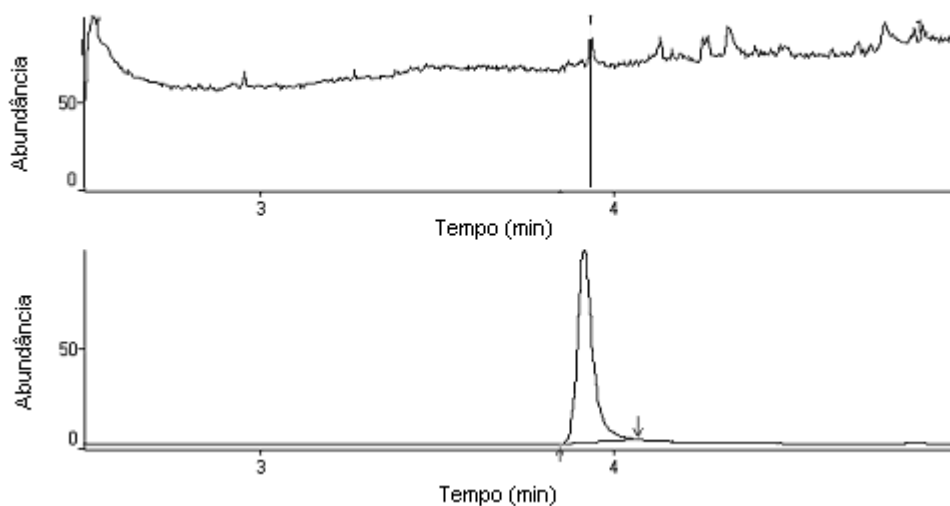


FIGURA 48. Cromatogramas de uma solução contendo FEM na concentração de 10 µg/mL em metanol no modo *full scan* e no modo *Selected Ion Monitoring (SIM)*, respectivamente.

5.3.1 Validação do método por CG/EM

5.3.1.1 Especificidade

A avaliação da especificidade do método por CG/EM foi realizada de acordo com o item 4.4.2.1.

As FIGURAS 49 a 51 apresentam os cromatogramas das soluções preparadas a partir dos produtos farmacêuticos e a partir dos placebos de Inibex[®] S, Desobesi-m[®] e Ritalina[®], respectivamente. A FIGURA 49 mostra ainda o cromatograma de uma solução preparada a partir de cápsulas contendo DEP obtidas de uma farmácia de manipulação.

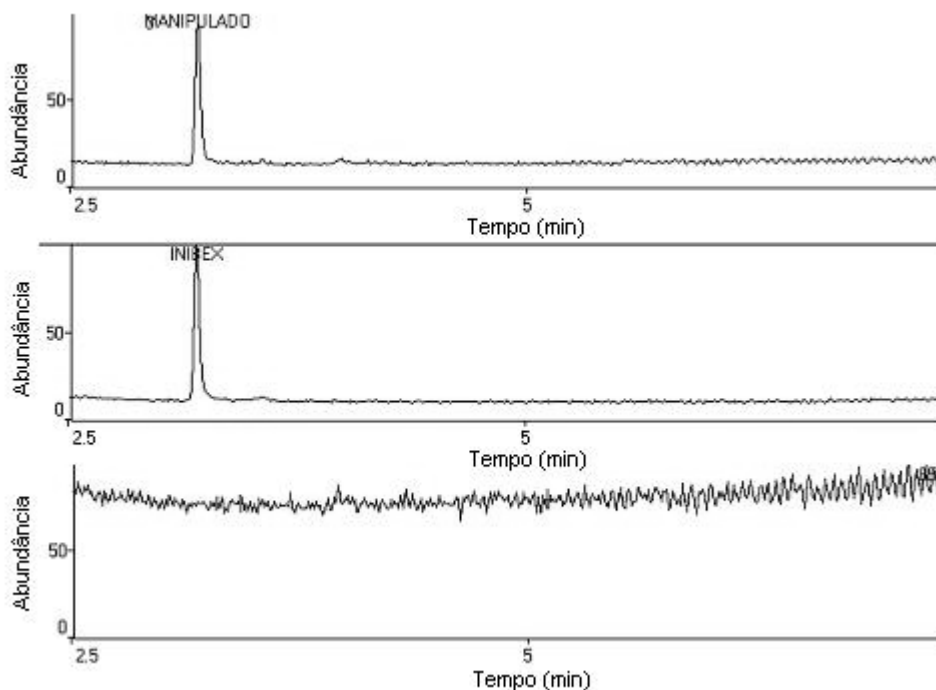


FIGURA 49. Especificidade: cromatogramas da solução da cápsula manipulada, do Inibex[®]S e da solução placebo de Inibex[®]S em metanol, respectivamente. Condições cromatográficas: : coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5[®] 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μ m film 190 $^{\circ}$ C (7,5 min), detector 260 $^{\circ}$ C, injetor 285 $^{\circ}$ C, *split* 1:75 e volume de injeção 3 μ L.

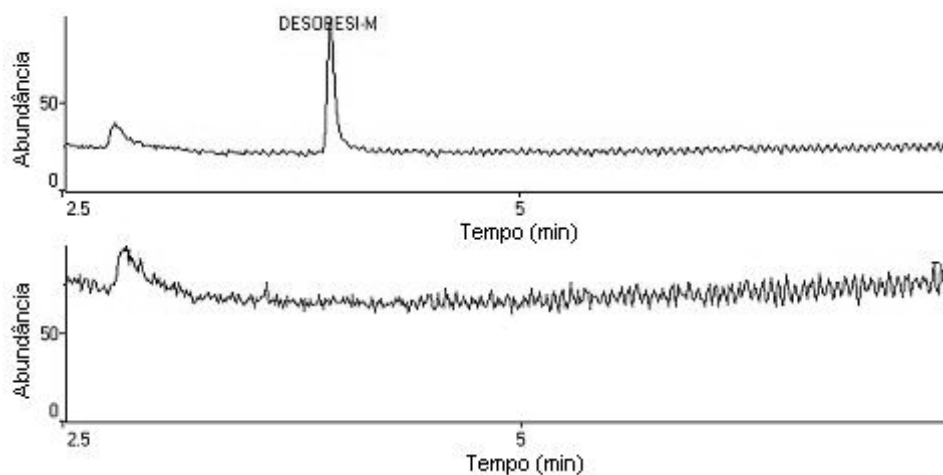


FIGURA 50. Especificidade: cromatogramas da solução do Desobesi-m[®] e da solução placebo de Desobesi-m[®] em metanol, respectivamente. Condições cromatográficas: : coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5[®] 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μ m film 190 $^{\circ}$ C (7,5 min), detector 260 $^{\circ}$ C, injetor 285 $^{\circ}$ C, *split* 1:75 e volume de injeção 3 μ L.

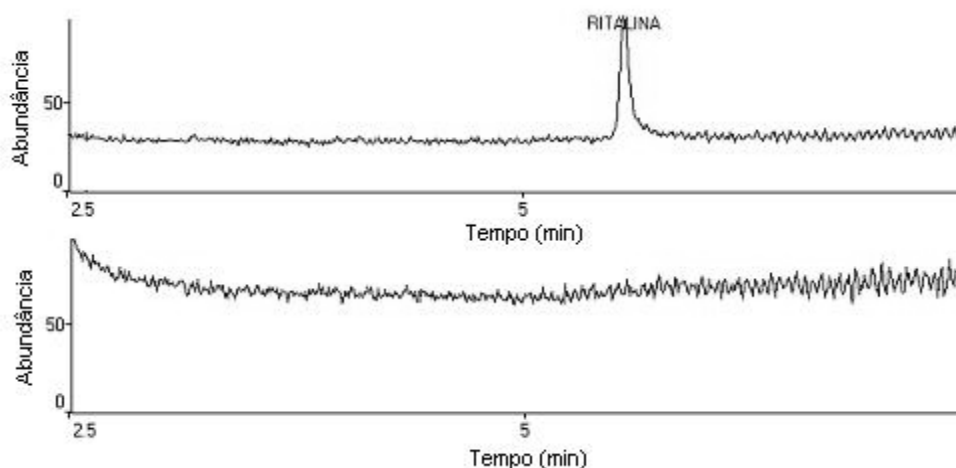


FIGURA 51. Especificidade: cromatogramas da solução de Ritalina[®] e da solução placebo de Ritalina[®] em metanol, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5[®] 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μ m film 190 °C (7,5 min), detector 260 °C, injetor 285 °C, *split* 1:75 e volume de injeção 3 μ L.

Os resultados obtidos demonstraram a ausência de qualquer pico interferente proveniente dos componentes da matriz no tempo de retenção do DEP, FEM e MPH, respectivamente.

Para a avaliação de possíveis interferentes nas amostras foram selecionadas substâncias (FIGURA 7) que apresentassem ação estimulante, que fossem estruturalmente relacionadas aos derivados anfetamínicos estudados ou, ainda, que pudessem ser produtos remanescentes da síntese.

A TABELA 28 mostra os tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CG/EM.

A anfetamina, a metanfetamina e o benzaldeído não foram detectados. Provavelmente, o tempo de retenção dessas substâncias foi inferior a 2,5 min, tempo definido no método para o início da aquisição dos dados.

TABELA 28. Tempos de retenção obtidos na especificidade do método por CG/EM, em ordem de eluição.

Substância	Tempo de retenção (min)
Anfetamina	-
Benzaldeído	-
Metanfetamina	-
Efedrina	2,58
MDA	3,08
DEP	3,19
MDMA	3,38
MDEA	3,72
FEM	3,96
MBDB	4,13
MPH	5,56
2-CB	6,88
DOB	6,90
Cafeína	7,47

As FIGURAS 73 a 76 (ANEXO 8.2) apresentam os cromatogramas das soluções contendo as substâncias relacionadas: efedrina, cafeína, DEP / MDMA e MDEA / FEM, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram não haver coincidência de tempo de retenção entre os picos das substâncias relacionadas efedrina, cafeína, MDMA e MDEA e as substâncias de interesse, indicando ausência de interferência dessas substâncias no método desenvolvido.

As FIGURAS 52 e 53 apresentam os cromatogramas das soluções contendo FEM / MBDB e MDA / DEP, respectivamente. Como se pode observar, os tempos de retenção do MBDB e do MDA estão muito próximos aos tempos de retenção do FEM e DEP, respectivamente, não havendo uma adequada separação entre eles.

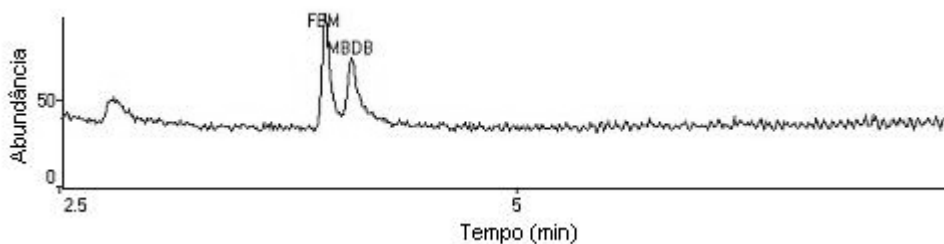


FIGURA 52. Especificidade: cromatograma da solução contendo FEM e MBDB em metanol (50 e 150 µg/mL, respectivamente).

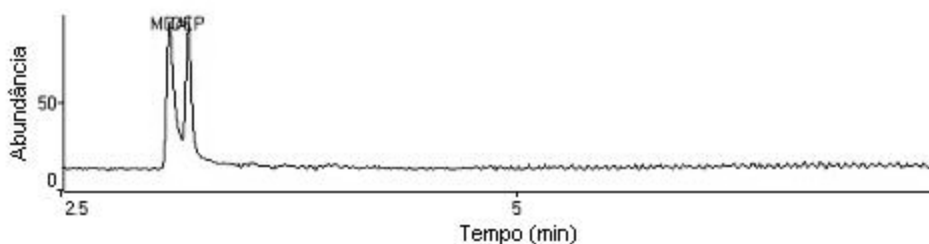


FIGURA 53. Especificidade: cromatograma da solução contendo MDA e DEP em metanol (180 e 50 µg/mL, respectivamente).

5.3.1.2 Linearidade

Conforme descrito no item 4.4.2.2, foi realizada uma avaliação preliminar da linearidade do método por CG/EM no modo *full scan* a partir de uma solução contendo FEM e os resultados podem ser vistos na FIGURA 54 e na TABELA 29.

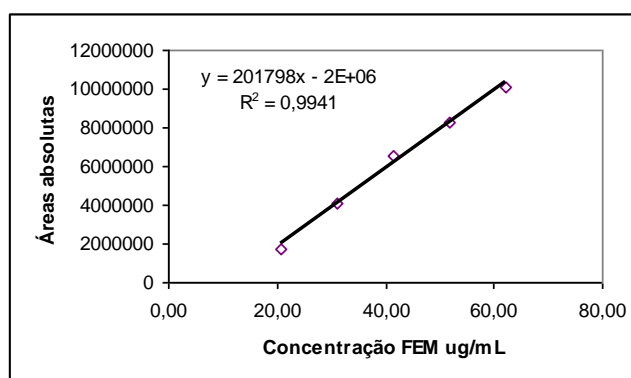


FIGURA 54. Representação gráfica da curva padrão do FEM SQR por CG/EM no modo *full scan*.

TABELA 29. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de cada concentração do FEM por CG/EM no modo *full scan*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	20	30	40	50	60
DPR	24,91	25,01	30,03	19,91	9,41

O R^2 ($r=0,9970$) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do FEM.

Entretanto, os valores de DPR intra-dia ficaram acima de 5,0 indicando haver uma grande variação entre as injeções de uma mesma solução, efetuadas pelo mesmo analista e nas mesmas condições experimentais.

Visando a, ainda, verificar a influência da concentração da amostra e do modo de detecção empregado, foram injetadas soluções contendo 10, 70 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de FEM no modo *full scan* e no modo *SIM*. Os resultados estão descritos na TABELA 30.

TABELA 30. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de cada solução contendo FEM em metanol por CG/EM.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	10	70	250
<i>Full scan</i>	1,47	31,91	23,05
<i>SIM</i>	23,79	9,80	18,43

No intuito de se verificar a influência da forma de injeção de amostras (*split*) nos resultados de DPR, foi injetado 1 μL de uma solução contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de DEP, FEM e MPH no modo *SIM splitless*, utilizando a temperatura de 260 °C no injetor. Os resultados estão descritos na TABELA 31.

TABELA 31. Valores obtidos de DPR das áreas absolutas de 3 injeções de uma solução contendo 50 µg/mL de DEP, FEM e MPH em metanol por CG/EM no modo *SIM splitless*.

	m/z	DPR
DEP	100	12,37
FEM	97	23,10
MPH	84	24,21

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que existe uma grande variação nos valores de DPR encontrados, não havendo uma relação entre a concentração da substância, nem com relação ao sistema de detecção ou injeção.

O uso de padronização interna e/ou a utilização de reações de derivatização poderiam ser testados com o objetivo de tentar reduzir esses desvios.

5.4 Comparação dos métodos

Os métodos analíticos propostos fundamentam-se, basicamente, na dissolução de uma pequena quantidade da amostra em metanol, posterior diluição em fase móvel (CLAE) ou em metanol (CG) e injeção, oferecendo muita praticidade, simplicidade, rapidez e, relativamente, baixo custo.

Todo sistema analítico apresenta limitações. O importante em um método analítico é conhecer essas limitações e assegurar que o sistema apresente o desempenho esperado (LANÇAS, 2004).

Um resumo dos resultados obtidos pelos três métodos desenvolvidos pode ser observado na TABELA 32.

A CG, apesar de ser amplamente utilizada em laboratórios de toxicologia forense, não permitiu uma análise simultânea satisfatória de DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB nas condições avaliadas. Tanto utilizando o DIC quanto o EM, não foi possível diferenciar satisfatoriamente o DOB do 2-CB.

TABELA 32. Análise comparativa dos métodos desenvolvidos.

	CLAE/UV	CG/DIC	CG/EM
Detecção simultânea de DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB	Sim	Não (2-CB)	Não (2-CB)
Concentração amostras ($\mu\text{g/mL}$)	30	1000	250
Especificidade ¹			
Anfetamina	Sim	Sim	Sim
Benzaldeído	Sim	Sim	Sim
Cafeína	Sim	Não	Sim
Efedrina	Sim	Sim	Sim
MBDB	Sim	Sim	Não
MDA	Sim	Sim	Não
MDEA	Não	Sim	Sim
MDMA	Sim	Sim	Sim
Metanfetamina	Sim	Sim	Sim
Placebos	Sim	Sim	Sim
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	10 a 50	1000 a 1400	20 a 60
Coefic. de determinação médio ²	0,9998	0,9978	0,9941 ³
DPR intra-dia médio ²	0,20	3,91	21,85
DPR inter-dias médio ²	1,30	6,71	-
LD médio ($\mu\text{g/mL}$) ²	0,74	226,67	-
LQ médio ($\mu\text{g/mL}$) ²	2,48	756,67	-
Tempo de análise (min)	20,0	6,0	7,5
Melhor aplicação	Análise qualitativa e quantitativa	Análise qualitativa	Análise confirmatória

¹Sim corresponde a não interferência no método. ²Corresponde à média do DEP, FEM e MPH. ³Corresponde ao valor da curva padrão do FEM.

O método desenvolvido por CLAE/UV mostrou-se mais adequado à análise qualitativa e quantitativa dessas substâncias simultaneamente, pois, sem a necessidade de utilização de PI, apresentou LD e LQ menores, concentração das amostras menor, maior reprodutibilidade dos resultados e melhor sensibilidade. A sensibilidade de um método pode ser avaliada pela inclinação da reta na curva padrão. Quanto maior for o ângulo de inclinação, mais sensível será o método, ou seja, maior capacidade ele terá de discriminar concentrações próximas dos analitos (LANÇAS, 2004).

Além disso, CLAE equipado com DAD, permite a detecção em múltiplos λ o que fornece informações a respeito do espectro na região do UV de cada substância eluída da coluna, auxiliando na sua identificação, o que não é possível com o DIC.

O método desenvolvido por CG/EM apresentou algumas vantagens com relação ao CG/DIC, como a necessidade de menores concentrações das amostras e

a capacidade de identificar substâncias pela comparação direta com os espectros de massas disponíveis na espectroteca do equipamento.

Com relação à especificidade, apenas o MDEA (CLAE/UV), a cafeína (CG/DIC), o MBDB e o MDA (CG/EM) não apresentaram resultados satisfatórios. Contudo, essas substâncias podem ser diferenciadas dos analitos de interesse pela aplicação sucessiva dos diferentes métodos desenvolvidos.

5.5 Perspectivas

Considerando que o DEP é uma amina terciária e que os resultados obtidos na sua análise por CG/DIC foram os melhores dentre as substâncias testadas, sugere-se a continuidade da validação e o estabelecimento do método desenvolvido para a detecção dessa substância.

Com relação ao FEM, MPH, 2-CB e DOB, que são aminas primárias ou secundárias, poderiam ser testados vários outros reagentes para a derivatização objetivando melhorar o desempenho da análise por CG. Esse procedimento, apesar de ser mais trabalhoso, demorado e dispendioso, poderia aumentar a sensibilidade do método, sua reprodutibilidade e, ainda, proporcionar uma eluição distinta para o 2-CB e o DOB. Além disso, vários reagentes de derivatização são também utilizados em determinações quirais por permitirem a separação de enantiômeros, o que é de grande utilidade na avaliação das propriedades farmacológicas e toxicológicas de derivados anfetamínicos.

LAPACHINSKE (2004) desenvolveu um método com boa sensibilidade para análise MDMA por CG/DNF, obtendo valores de DPR de, no máximo, 5,4. Isso demonstra que esse detector pode ser mais adequado que o DIC para a pesquisa de DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB, visto serem todos esses compostos nitrogenados.

CONCHEIRO e colaboradores (2005) desenvolveram um método por CLAE com detecção por fluorescência para determinação de MDMA, MDA, MDEA e MBDB em saliva. Dessa forma, por serem derivados anfetamínicos análogos, poder-se-ia também testar esse método para a determinação simultânea de DEP, FEM,

MPH, 2-CB e DOB no intuito de diversificar ainda mais as opções de análise desses derivados em amostras apreendidas.

O método desenvolvido e validado por CLAE/UV demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto para a análise quantitativa simultânea de DEP, FEM e MPH nos produtos farmacêuticos testados;

O método desenvolvido e validado por CLAE/UV demonstrou ser específico, linear e robusto para detecção simultânea de DOB e 2-CB;

O método desenvolvido por CG/DIC demonstrou ser específico para DEP, FEM, MPH e DOB e, ainda, linear para detecção simultânea de DEP, FEM e MPH;

O método desenvolvido por CG/EM demonstrou ser específico para a caracterização simultânea de DEP, FEM, MPH e DOB;

O método de escolha para a diferenciação de DOB e 2-CB é o CLAE/UV;

Os métodos cromatográficos desenvolvidos são complementares e, com as suas respectivas limitações, podem ser utilizados na rotina de laboratórios de toxicologia forense para a análise de DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB em materiais não-biológicos.

ACHÉ. Desobesi-m[®]. Guarulhos-SP, 2007. 1 f. Bula.

ALLEN H.W.; SEDGWICK, B. Detection of ritalinic acid in urine by thin-layer chromatography and gas chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v.8, p.61-62, 1984.

ANDRADE F.A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, 2001. 368 p.

ARMBRUSTER, D.A.; TILLMAN, M.D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, v.40, n.7, p.1233-1238, 1994.

BAILEY, K.; GAGNÉ, D.R.; PIKE, R.K. Investigation and identification of the bromination products of dimethoxyamphetamines. **Journal of the AOAC**, v.59, n.5, p.1162-1169, 1976.

BALÍKOVÁ, M. Nonfatal and fatal DOB (2,5-dimethoxy-4-bromamphetamine) overdose. **Forensic Science International**, v.153, p.85-91, 2005.

BARCELLOS, A.P.; PAGGI, A.P.; SILVA, D.B.; CAMPAGNOLO, M.I.; DIETERICH, M.D.D.; SANTOS, R.L.R.; FERREIRA, J. Padrão de consumo de anfetaminas entre universitários de Porto Alegre. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v.19, n.3, p.161-169, 1997.

BELL, R.R.; CROOKHAM, S.B.; DUNN, W.A.; GRATES, K.M.; REIBER, T.M. A contemporaneous finding of femproporex in a polydrug suicide. **Journal of Analytical Toxicology**, v.25, p.652-656, 2001.

BLAU, K.; KING, G.S. **Handbook of derivatives for chromatography**. London: Heyden, 1977. 577 p.

BRASIL. Decreto-Lei n.º 3.689, de 03 de outubro de 1941. Código de Processo Penal. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Rio de Janeiro, RJ, 13 out. 1941. Disponível em: <<https://www.planalto.gov.br/>>. Acesso em: 13.06.2008.

BRASIL. Decreto n.º 4.345, de 26 de agosto de 2002. Política Nacional Antidrogas. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 26 ago. 2002. Disponível em: <<https://www.planalto.gov.br/>>. Acesso em: 13.06.2008.

BRASIL. Ministério da Justiça. Balanço Geral da União 2003a. **Segurança Rodovias**. Disponível em: <<http://www.presidencia.gov.br/cgu/bgu2003/Volumel/V9%20-%20MJ.pdf>>. Acesso em: 16.05.2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.º 899, de 29 de maio de 2003b. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 15.06.2008b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. **Levantamento de Laboratórios Analíticos de Toxicologia Forense**. Março, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/pesquisa_toxicologia_forense.pdf> Acesso em: 15.06.2008.

BRASIL. Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 24 ago. 2006. Disponível em: <<https://www.planalto.gov.br/>>. Acesso em: 09.02.2008.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n.º 19, de 24 de março de 2008. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 25 mar. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 29.04.2008.

BUCHANAN, J.F.; BROWN, C.R. "Designer drugs": A problem in clinical toxicology. **Medical Toxicology and Adverse Drug Experience**, v.3, n.1, p.1-17, 1988.

BUDAVARI, S. (Ed). **The Merck Index**. 13. ed. Rahway, N. J.: Merck, 2001.

CARLINI, E.A.; NAPPO, S.A.; NOGUEIRA, V.; NAYLOR, F.G.M. Metilfenidato: influência da notificação de receita A (cor amarela) sobre a prática de prescrição por médicos brasileiros. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.30, n.1, 2003.

CARMO, H.; HENGSTLER, J.G.; BOER, D.; RINGEL, M.; REMIÃO, F.; CARVALHO, F.; FERNANDES, E.; REYS, L.A.; OESCH, F.; BASTOS, M.L. Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human. **Toxicology**, v.206, p.75-89, 2005.

CAUMO, K.; GOELZER, F.D.; STEFANON, E.B.C. Avaliação dos principais anorexígenos dispensados em drogarias da região noroeste do RS. Anais do IV Pharma RS. **Revista Afargs**, n.21, 2005.

CDER: CENTER FOR DRUG EVALUATION E RESEARCH. Reviewer guidance for validation of chromatographic methods, 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3_rev.pdf>. Acesso em: 24.06.2008.

CHALLMAN, T.D.; LIPSKY, J.J. Methylphenidate: its pharmacology and uses. **Mayo Clinic Proceedings**, v.75, p.711-721, 2000.

CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, 1994.

CHRISTOPHERSEN, A.S. Amphetamine designer drugs: an overview and epidemiology. **Toxicology Letters**, v.112-113, p.127-131, 2000.

CODY, J.T.; VALTIER, S. Detection of amphetamine following administration of femproporex. **Journal of Analytical Toxicology**, v.20, p.425-431, 1996.

COLE, M.D.; LEA, C.; OXLEY, N. 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): a review of the public domain literature. **Science & Justice**, v.42, n.4, p.223-224, 2002.

CONCHEIRO, M.; CASTRO, A.; QUINTELA, O.; RIVADULLA, M.L.; CRUZ, A. Determination of MDMA, MDA, MDEA and MBDB in oral fluid using high performance liquid chromatography with native fluorescence detection. **Forensic Science International**, v. 150, p.221-226, 2005.

CORDIOLI, A.V. **Psicofármacos: consulta rápida**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 556 p.

COSTA, J.L.; MICKE, G.A.; ROMANO, R.L.; WANG, A.Y.; KAYO, L.M.; NEGRINI, O.N. Identificação química de 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB), em material apreendido no estado de São Paulo. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Recife. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.18, supl., 2005. Resumo.

COSTA, J.L.; WANG, A.Y.; MICKE, G.A., MALDANER, A.O., ROMANO, R.L.; JUNIOR, H.A.M.; NETO, O.N.; TAVARES, M.F.M. Chemical identification of 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB). **Forensic Science International**, v.173, n.2-3, p.130-136, 2007.

DELLIOU, D. Bromo-DMA: new hallucinogenic drug. **The Medical Journal of Australia**, v.26, p.83, 1980.

DELLIOU, D. 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine: psychoactivity, toxic effects and analytical methods. **Forensic Science International**, v.21, p.259-267, 1983.

DeRUITER, J.; CLARK, C.R.; NOGGLE, F.T. LC and GC-MS Analysis of 4-Bromo-2,5-Dimethoxyphenethylamine (Nexus) and 2-Propanamine and 2-Butanamine Analogues. **Journal of Chromatographic Science**, v.33, p.583-590, 1995.

DeRUITER J.; CLARK, C.R.; NOGGLE, F.T. Gas chromatographic-mass spectrometric and high-performance liquid chromatographic analyses of the bromination products of the regioisomeric dimethoxyphenethylamines: differentiation of nexus from five positional isomers. **Journal of Chromatographic Science**, v.36, p.23-28, 1998a.

DeRUITER J.; HOLSTON, P.; CLARK, C.R.; NOGGLE, F.T. Liquid chromatographic and mass spectral methods of identification for regioisomeric dimethoxyamphetamines and brominated dimethoxyamphetamines. **Journal of Chromatographic Science**, v.36, p.73-79, 1998b.

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

ELLIOTT, S.P.; HALE, K.A. Applications of a HPLC-DAD drug-screening system based on retention indices and UV spectra. **Journal of Analytical Toxicology**, v.22, p.279-289, 1998.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, n.5, p.755-767, 2001.

ERRAMOUSPE, J.; JARVI, E.J. Effect on dissolution from halving methylphenidate extended – release tablets. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.31, p.1123-1126, 1997.

EWALD, A.H.; FRITSCHI, G.; BORK, W.; MAURER, H. Designer drugs 2,5-dimethoxy-4-bromo-amphetamine (DOB) and 2,5-dimethoxy-4-bromo-methamphetamine (MDOB): studies on their metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques. **Journal of Mass Spectrometry**, v.41, p.487-498, 2006.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977.

FASSINA, V.; FRANCK, M.C.; LASCHUK, E.F.; LEITE, F.P.; SCHUCK, C.A.; SCOLMEISTER, D.; SILVA, S.M. Avaliação dos resultados obtidos nos exames toxicológicos realizados pelo laboratório de perícias durante o ano de 2005. **Revista do IGP**, n. 3, p. 26-34, 2007.

FOGLIATTO, M.R. **Ecstasy – aspectos gerais da MDMA e outras anfetaminas de anel substituído**. Porto Alegre, 1998. 58 p.

GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; FONSECA, A.M.; CARLINI, E.A. **V Levantamento nacional sobre o uso de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras, 2004**. Secretaria Nacional Antidrogas e Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. Disponível em: <<http://obid.senad.gov.br/OBID/Portal/index.jsp?ildPessoaJuridica=1>>. Acesso em: 20.01.2006.

GALICHET, L.Y.; MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. (Ed.) **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3. ed., London: Pharmaceutical Press, 2004.

GHYSEL, M.H. Amphétamines et dérivé. **Toxicologie Patologie**, v.1, p.13-20, 2004.

GIROUD, C.; AUGSBURGER, L.; RIVIER, L.; MANGIN, P.; SADEGHIPOUR, F.; VARESEO, E.; VEUTHEY, J.L. 2C-B: A New Psychoactive Phenylethylamine Recently Discovered in Ecstasy Tablets Sold on the Swiss Black Market. **Journal of Analytical Toxicology**, v.22, n.5, p.345-354, 1998.

GLENNON, R.A.; TITELER, M.; LYON, R.A. A preliminary investigation of the psychoactive agent 4-Bromo-2,5-Dimethoxyphenethylamine: A potential drug of abuse. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** v.30, n.3, p.597-601, 1988.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10th. Ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 2148 p.

GROB, R.L.; BARRY, E.F. **Modern practice of gas chromatography**. 4th. Ed. New York: John Wiley, 2004. 1036 p.

HAUBOLD, A. **Controle de qualidade de comprimidos – Contribuição ao estudo do controle de qualidade de comprimidos contendo cloridrato de femproporex**. Porto Alegre, 1977. 89 p.

HERNÁNDEZ, R.H.; FALCÓ, P.C. Derivatization of ephedrine with o-phthaldialdehyde for liquid chromatography after treatment with sodium hypochlorite. **Journal of Chromatography A**, v.893, p.69-80, 2000a.

HERNÁNDEZ, R.H.; FALCÓ, P.C. Derivatization of tertiary amphetamines with 9-fluor enylmethyl chloroformate for liquid chromatography: determination of N-methylephedrine. **The Analyst**, v. 125, p.1071-1076, 2000b.

HERNÁNDEZ, R.H.; PERICÁS, C.C.; ANDRÉS, J.V.; FALCÓ, P.C. An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1104, p.40-46, 2006.

HUIZER, H.; MEER, A.J.P.V.D.; EGMOND, H.V. Quantitation of amphetamine-type compounds for which no reference compound is available: the validation of a theoretical model. **Science & Justice**, v.41, n.3. p.185-192, 2001.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005. Disponível em: <www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 30.06.2008.

JEFFERY, G.H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel – Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Ltc, 1992. 712 p.

JIPE. Nações Unidas: Escritório contra drogas e crime, International Narcotics Control Board. **Relatório anual 2006**. Disponível em: <www.unodc.org/pdf/india/publications/incb_2006/english_press_kit_2006.pdf>. Acesso em: 24.06.2008.

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

KATAOKA, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v.733, p.19-34, 1996.

KIBBE, A.H.; WADE, A.; WELLER, P.J. (eds) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3rd ed, Washington London: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, 2000, 665p.

KOLLINS, S.H.; MACDONALD, E.K.; RUSH, C. Assessing the abuse potential of methylphenidate in nonhuman and human subjects – A review. **Pharmacology, Biochemistry e Behavior**, v.68, p.611-627, 2001.

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

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 46 p.

LAPACHINSKE, S. F. **Quantificação de MDMA em amostras de ecstasy por cromatografia em fase gasosa (GC/NPD)**. São Paulo, 2004. 92 p.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1999. 230 p.

LEVINE, B.; CAPLAN, Y.H.; KAUFFMAN, G. Fatality resulting from methylphenidate overdose. **Journal of Analytical Toxicology**, v.10, p.209-210, 1986.

LIMA, D.R.A. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004. 2215 p.

LINDSAY, S. **High Performance Liquid Chromatography: analytical chemistry by open learning**. London: ACOL Thames Polytechnic, 1992. 337 p.

MALDANER, A.O., TALHAVINI, M., CAMARGO, M.A. “Cápsulas do vento”: Identificação e caracterização de 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB). In: **28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, 2005. Resumo.

MARIZ, S.R.; SILVA, O.A. Identificação de anfetamina em amostras de cabelo por imunofluorescência polarizada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.1, p.55-61, 2003.

McAVOY, Y.; COLE, M.D.; GUENIAT, O. Análisis of amphetamines by supercritical fluid chromatography, high-performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary zone electrophoresis; a preliminary comparison. **Forensic Science International**, v.102, p.13-22, 1999.

McNAIR, H.M.; MILLER, J.M. **Basic Gas Chromatography**. New York: John Wiley & Sons, INC. 1998. 200 p.

MEDLEY. Inibex[®] S. Campinas-SP, 2006. 1 f. Bula.

MEY, B.; PAULUS, H.; LAMPARTER, E.; BLASCHKE, G. Enantioseparation of amfepramone (rac-diethylpropion): preparative separation of the enantiomers and enantioselective analysis. **Chirality**, v.11, p.772-780, 1999.

NICHOLS, D.E. Hallucinogens. **Pharmacological & Therapeutics**, v.101, p.131-181, 2004.

NICHOLSON, J.D. Derivative formation in the quantitative gas-chromatographic analysis of pharmaceuticals - Part II. **The Analyst**, v.103, n.1224, p.193-222, 1978.

NIDA. **Quantitative structure activity relationships of analgesics, narcotic antagonists and hallucinogens**. Research 22. US Department of Health, Education, and Welfare: National Institute on Drug Abuse. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/pdf/monographs/22.pdf>> Acesso em: 18.08.2006a.

NIDA. **Ecstasy: What we know and don't know about MDMA – A scientific review**. US Department of Health, Education, and Welfare: National Institute on Drug Abuse. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/PDF/MDMAConf.pdf>> Acesso em: 18.08.2006b.

NOVARTIS. Ritalina[®]. Taboão da Serra-SP, 2006. 1 f. Bula.

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

ONU. United Nations Office on Drugs and Crime. **Recommended methods for the identification and analysis of amphetamine, methamphetamine and their ring-substituted analogues in seized materials**. New York, 2006.

PÁPAI, Z.; PAP, T.L. Analysis of peak asymmetry in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.953, p.31-38, 2002.

PIETRA, A.M. Di; GOTTI, R.; BORRELLO, E.D.; POMPONIO, R.; CAVRINI, V. Analysis of amphetamine and congeners in illicit samples by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Toxicology**, v.25, p.99–105, 2001.

QI, Y.; EVANS, I.D.; McCLUSKEY, A. Australian federal police seizures of illicit crystalline methamphetamine ("ice") 1998-2002: impurity analysis. **Forensic Science International**, v.164, p.201-210, 2006.

RAGAN, F.A.; HITE, S.A.; SAMUELS, M.S.; GAREY, R.E. 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine: identification of a new street drug. **Journal of Analytical Toxicology**, v.9, n.2, p.91-93, 1985.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, M; MARQUES, A.C.P.R. Abuso e dependência: Anfetamina. Projeto Diretrizes. **Associação Brasileira de Psiquiatria**, 2002.

ROHANOVÁ M.; PÁLENÍČEK, T.; BALÍKOVÁ, M. Disposition of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and its metabolite 4-bromo-2-hydroxy-5-

methoxyphenethylamine in rats after subcutaneous administration. **Toxicology Letters**, v.178, p.29-36, 2008.

SCIVOLETTO, S.; DUARTE, C.E. **Atualização de conhecimentos sobre redução da demanda de drogas**. Curso à distância, SENAD, 2004.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v.987, p.57-66, 2003.

SHIMADZU: Manual Shimadzu CLASS-VP™. Chromatography Data System. Instruction Manual. Version 6.1. Kyoto: Shimadzu Scientific, 2001.

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

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

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

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, São Paulo, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

SWEETMAN, S.C. (Ed.) **Martindale: The complete drug reference**. 34. ed., London: Pharmaceutical Press, 2005. 2756 p.

TEIXEIRA, S.F.; RODRIGUES, J.D.; CAVALCANTE, B.S.; FERNANDES, A.L.; FERREIRA, S.S.A.; FIGUEIREDO, D.B.; PASTOR, E.R.F.; SACRAMENTO, M.O.; DI PIETRO, G. Uso do femproporex por caminhoneiros no estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.14, n.2, p. 74, suplemento, 2001.

TESTA B.; BECKETT, A.H. Studies on the metabolism of diethylpropion. **Journal of Chromatography**, v.71, p.39-54, 1972.

THE UNITED States Pharmacopeia. 30. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2007.

TOENNES, S.W.; OHLMEIER, M.; SCHMIDT, K.; KAUERT, G. Explanation of a nuclear neurological syndrome by toxicologic investigation. **Deutsche medizinische Wochenschrift**, v.125, n.30, p.900-992, 2000.

TRUJILLO, L.M.; CHAVES, M.A.; AKATUKA, A.S.; IHA, M.H. Análise por cromatografia gasosa de anfetaminas e benzodiazepínicos em formulações para emagrecimento. Estudo I: Determinação de dietilpropiona e femproporex. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.58, n.1, p.91-96, 1999.

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

VIEGAS, C.M. **Efeitos e implicações relacionadas ao uso do 2,5-dimetoxi-4-bromanfetamina (DOB)**. Porto Alegre, 2005. 29 p.

WALTERS, M.J.; WALTERS, S.M. High-performance liquid chromatographic determination of diethylpropion hydrochloride in tablets: isolation and identification of two decomposition products. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.66, n.2, p.198-201, 1977.

ZHANG, J.; DENG, Y.; FANG, J.; MCKAY, G. Enantioselective analysis of ritalinic acids in biological samples by using a protein-based chiral stationary phase. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.11, p.1881-1884, 2003.

8.1 CLAE

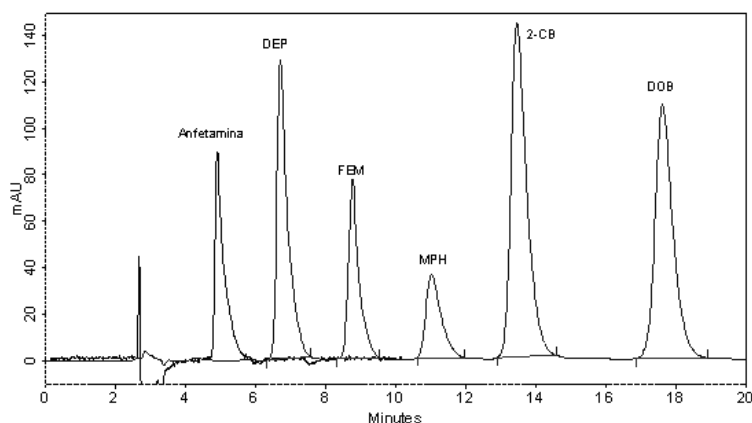


FIGURA 55. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR e da solução contendo a anfetamina em metanol (33 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%:tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250 x 4,0 x 5), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

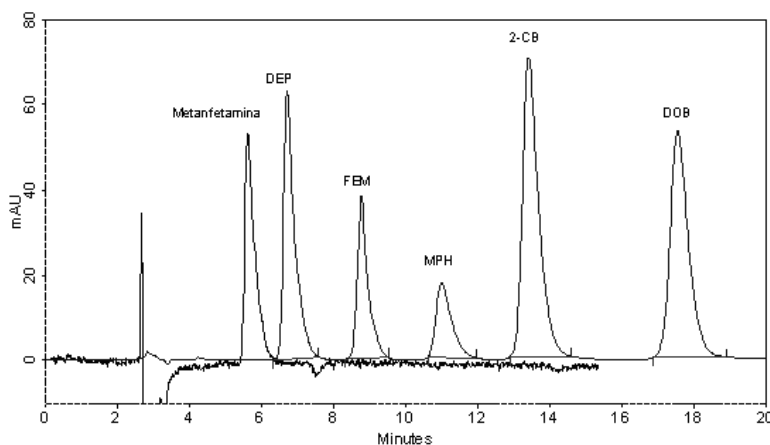


FIGURA 56. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e da solução contendo a metanfetamina (29,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%:tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250 x 4,0 x 5), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

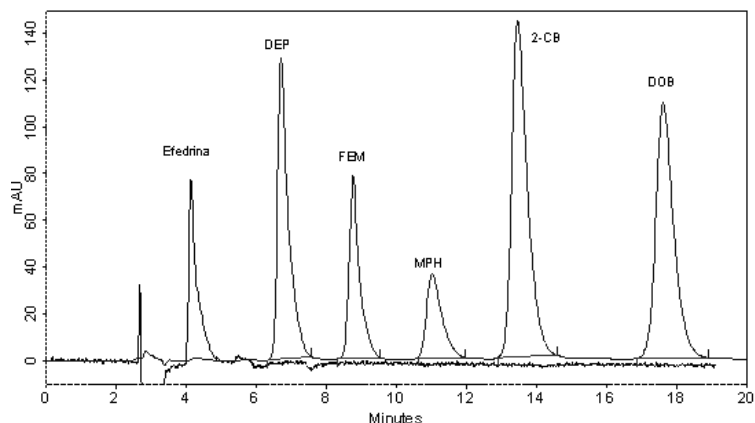


FIGURA 57. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33 $\mu\text{g/mL}$) e da solução contendo a efedrina (36,4 $\mu\text{g/mL}$) em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%:tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250 x 4,0 x 5), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

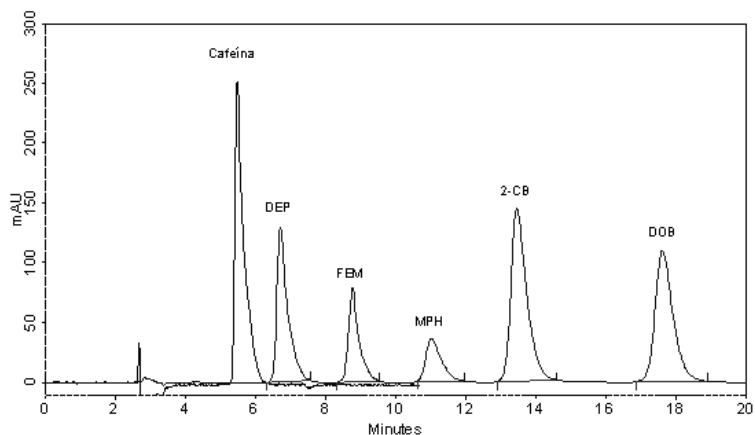


FIGURA 58. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33 $\mu\text{g/mL}$) e da solução contendo a cafeína (35,6 $\mu\text{g/mL}$) em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%:tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250 x 4,0 x 5), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

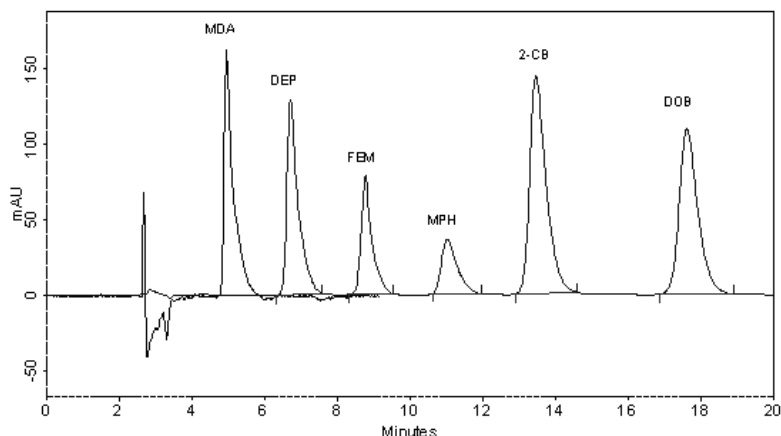


FIGURA 59. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33 $\mu\text{g/mL}$) e da solução contendo o MDA (28,8 $\mu\text{g/mL}$) em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%:tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250 x 4,0 x 5), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (MDA= 3,4-metilenodioxi-anfetamina, DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

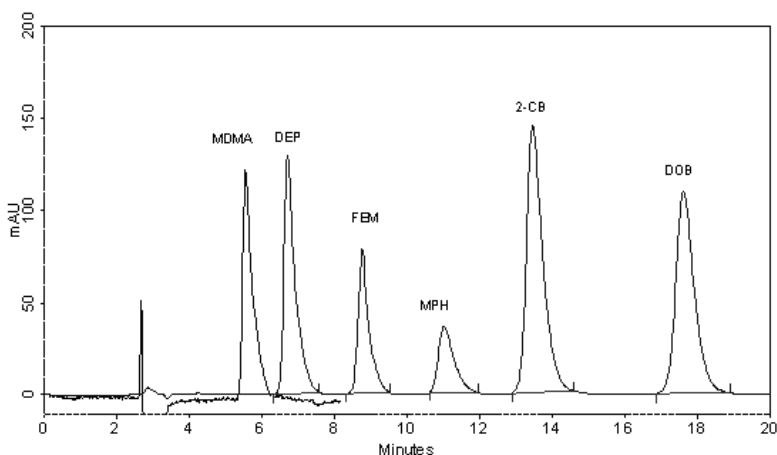


FIGURA 60. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33 $\mu\text{g/mL}$) e da solução contendo o MDMA (33,6 $\mu\text{g/mL}$) em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%:tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250 x 4,0 x 5), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (MDMA= 3,4-metilenodioxi-metanfetamina, DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

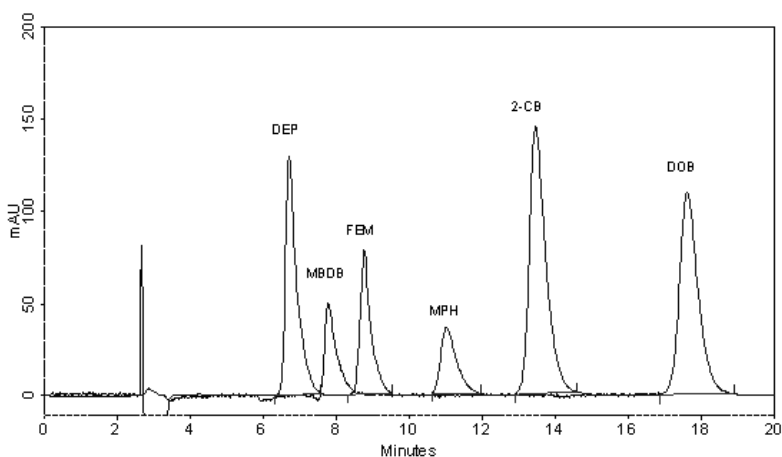


FIGURA 61. Especificidade CLAE/UV: sobreposição dos cromatogramas da solução contendo as cinco SQR (33 $\mu\text{g/mL}$) e da solução contendo o MBDB (30 $\mu\text{g/mL}$) em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%:tampão de trietilamina pH 5 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C18 Merck (250 x 4,0 x 5), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, MBDB= N-metil-3,4-metilenodioxifenil-2-butanamina, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

TABELA 33. Valores obtidos de área absoluta para a curva padrão do DEP SQR por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas* / DPR			Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
10	733370 /	731959 /	731971 /	732433 \pm 468	0,11
	0,52	0,12	0,28		
20	1454655 /	1478029 /	1449184 /	1460623 \pm 8845	1,05
	0,12	0,37	0,30		
30	2175448 /	2139308 /	2113721 /	2142826 \pm 17906	1,45
	0,09	0,28	0,36		
40	2924074 /	2898510 /	2823035 /	2881873 \pm 30330	1,82
	0,16	0,24	0,19		
50	3630170 /	3709188 /	3652230 /	3663863 \pm 23540	1,11
	0,15	0,21	0,23		

* Resultado de três determinações

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

TABELA 34. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do DEP SQR por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	1,59262E+13	3,98156E+12	3542,67	3,48*
Regressão linear	1	1,59175E+13	1,59175E+13	14162,88	4,96*
Desvio da linearidade	3	8751158973	2917052991	2,59	3,71
DENTRO (resíduo)	10	11238868053	1123886805		
Total	14	1,59375E+13			

* significativo para $p < 0,05$

TABELA 35. Valores obtidos de área absoluta para a curva padrão do FEM SQR por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas* / DPR			Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
10	485808 / 0,23	4900625 / 0,05	484827 / 0,10	487087 \pm 1792	0,64
20	944322 / 0,18	969237 / 0,07	954549 / 0,09	956036 \pm 7231	1,31
30	1440363 / 0,04	1469974 / 0,12	1417958 / 0,03	1442765 \pm 15064	1,81
40	1932811 / 0,08	1976320 / 0,22	1922656 / 0,04	1943929 \pm 16459	1,47
50	2424252 / 0,13	2474058 / 0,26	2382797 / 0,09	2427036 \pm 26382	1,88

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

TABELA 36. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do FEM SQR por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	7,10943E+12	1,77736E+12	2371,15	3,48*
Regressão linear	1	7,10862E+12	7,10862E+12	9483,51	4,96*
Desvio da linearidade	3	813318340	271106113,3	0,36	3,71
DENTRO (resíduo)	10	7495768732	749576873,2		
Total	14	7,11693E+12			

* significativo para $p < 0,05$

TABELA 37. Valores obtidos de área absoluta para a curva padrão do MPH SQR por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas* / DPR			Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
10	412118 / 0,09	416953 / 0,24	418752 / 0,43	415941 \pm 1981	0,82
20	813821 / 0,04	831584 / 0,08	844376 / 0,08	829927 \pm 8859	1,85
30	1259554 / 0,02	1262599 / 0,04	1273845 / 1,63	1265333 \pm 4346	0,59
40	1661838 / 0,45	1661257 / 0,06	1717968 / 0,11	1680354 \pm 18808	1,94
50	2088910 / 0,01	2056344 / 0,15	2125573 / 0,33	2090276 \pm 19996	1,66

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

TABELA 38. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do MPH SQR por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	5,29025E+12	1,32256E+12	2578,43	3,48*
Regressão linear	1	5,28972E+12	5,28972E+12	10312,71	4,96*
Desvio da linearidade	3	524873134,5	174957711,5	0,34	3,71
DENTRO (resíduo)	10	5129325745	512932574,5		
Total	14	5,29538E+12			

* significativo para $p < 0,05$

TABELA 39. Valores obtidos de área absoluta para a curva padrão do 2-CB SQR por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas* / DPR			Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
10	1520778 / 0,23	1509094 / 0,15	1509972 / 0,39	1513281 \pm 3757	0,43
20	3038121 / 0,17	3020256 / 0,09	3048071 / 0,25	3035483 \pm 8137	0,46
30	4542545 / 0,12	4530434 / 0,08	4588330 / 0,06	4553770 \pm 17631	0,67
40	6090417 / 0,18	6048809 / 0,14	6106468 / 0,29	6081898 \pm 17181	0,49
50	7596287 / 0,19	7562265 / 0,38	7639844 / 0,08	7599465 \pm 22452	0,51

* Resultado de três determinações

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

TABELA 40. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do 2-CB SQR por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	6,94835E+13	1,73709E+13	24320,23	3,48*
Regressão linear	1	6,94834E+13	6,94834E+13	97280,82	4,96*
Desvio da linearidade	3	63334469,15	21111489,72	0,03	3,71
DENTRO (resíduo)	10	7142560825	714256082,5		
Total	14	6,94906E+13			

* significativo para $p < 0,05$

TABELA 41. Valores obtidos de área absoluta para a curva padrão do DOB SQR por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas* / DPR			Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
10	1171438 / 0,16	1176541 / 0,23	1155119 / 0,87	1167699 \pm 6460	0,96
20	2375885 / 0,28	2363347 / 0,09	2367966 / 0,50	2369066 \pm 3661	0,27
30	3582115 / 0,17	3546653 / 0,07	3549813 / 0,67	3559527 \pm 11331	0,55
40	4764281 / 0,33	4729047 / 0,04	4727040 / 0,66	4740123 \pm 12093	0,44
50	5959142 / 0,08	5894592 / 0,13	5879013 / 0,08	5910916 \pm 24529	0,72

* Resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

TABELA 42. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do DOB SQR por CLAE.

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	4,21811E+13	1,05453E+13	18869,34	3,48*
Regressão linear	1	4,218E+13	4,218E+13	75475,44	4,96*
Desvio da linearidade	3	1081034933	360344977,6	0,64	3,71
DENTRO (resíduo)	10	5588574787	558857478,7		
Total	14	4,21867E+13			

* significativo para $p < 0,05$

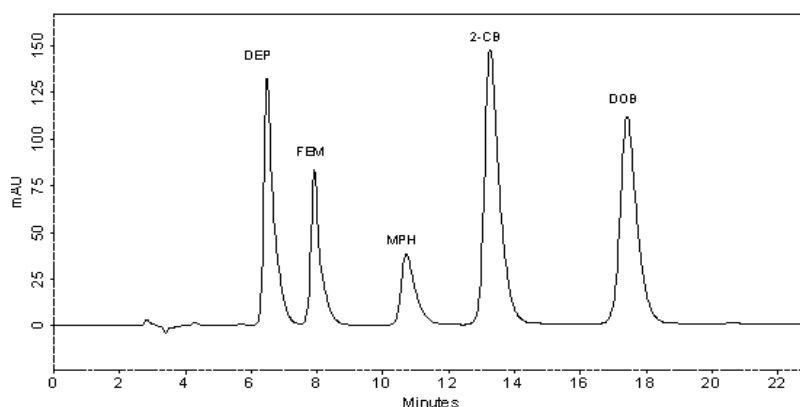


FIGURA 62. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB (SQR) em fase móvel (30 $\mu\text{g/mL}$): acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 4,9 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart[®]/LiChrospher[®] C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 μm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

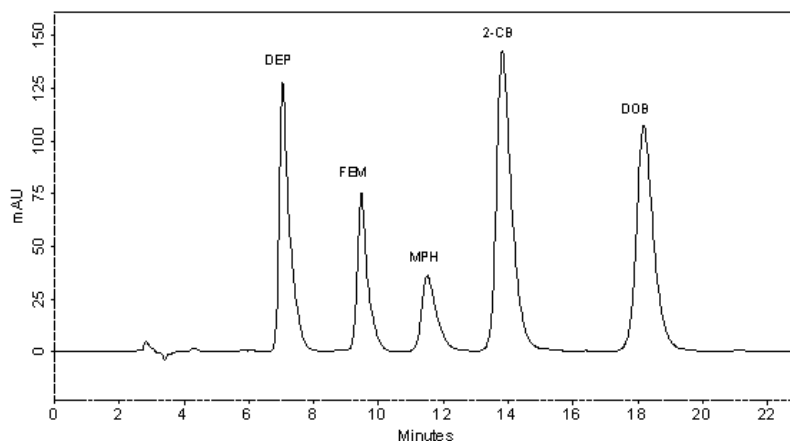


FIGURA 63. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB (SQR) em fase móvel (30 µg/mL): acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5,1 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 µm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 µL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

TABELA 43. Robustez do método por CLAE - avaliação da influência do pH da solução tampão de trietilamina da fase móvel em solução contendo 30 µg/mL de cada SQR.

Substância	pH	Tempo de retenção (min) / DPR (≤ 1)	Área absoluta / DPR (≤ 1)	Número de pratos teóricos (> 2000)	Assimetria (≤ 2)	Fator capacidade (> 2)	Resolução (> 2)
DEP	4,9	6,47 / 0,06	2770377 / 0,31	3014	1,95	3,05	10,51
	5,1	7,04 / 0,08	2792267 / 0,11	3146	1,88	3,40	10,52
FEM	4,9	7,92 / 0,01	1607381 / 0,08	5549	1,68	3,95	3,23
	5,1	9,47 / 0,06	1589676 / 0,42	5879	1,57	4,92	4,88
MPH	4,9	10,70 / 0,22	1111537 / 0,83	3257	1,58	5,69	4,74
	5,1	11,49 / 0,09	1071695 / 0,11	3296	1,51	6,18	3,13
2-CB	4,9	13,25 / 0,35	4580421 / 0,26	4451	1,50	7,27	3,30
	5,1	13,80 / 0,11	4520470 / 0,15	4518	1,46	7,63	2,86
DOB	4,9	17,41 / 0,33	3928099 / 0,45	5814	1,31	9,89	4,87
	5,1	18,16 / 0,11	3902361 / 0,08	5912	1,29	10,35	4,94

Valores referentes à média de 3 injeções e limites de aceitação conforme CDER (1994). DPR – desvio padrão relativo.

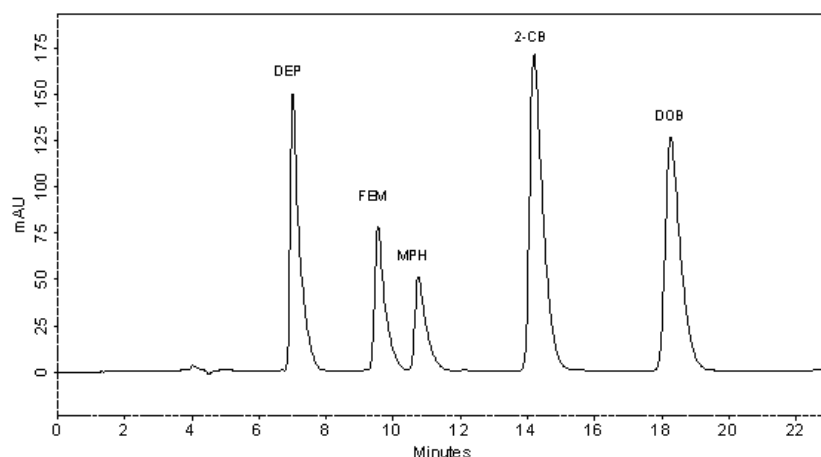


FIGURA 64. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, 2-CB e DOB (SQR) em fase móvel (30 $\mu\text{g/mL}$): acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5,0 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,8 mL/min, coluna Phenomenex® Gemini Su C18 110A 250 x 4,6 mm 5 μm , detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

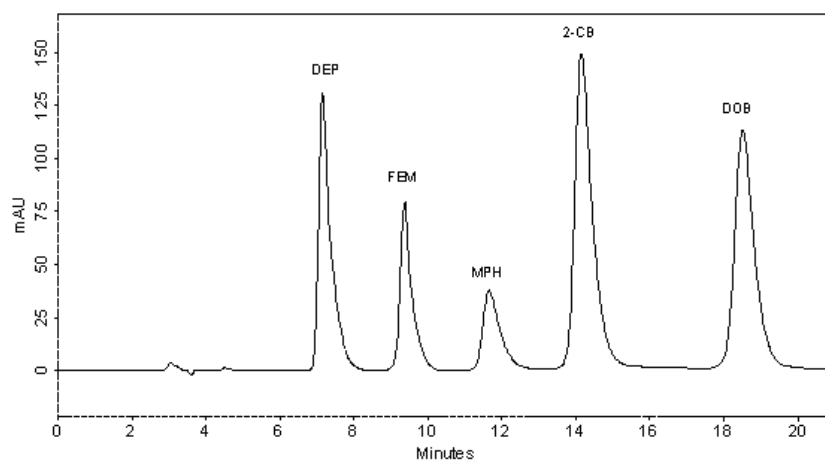


FIGURA 65. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB (SQR) em fase móvel (30 $\mu\text{g/mL}$): acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5,0 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,75 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 μm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 μL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

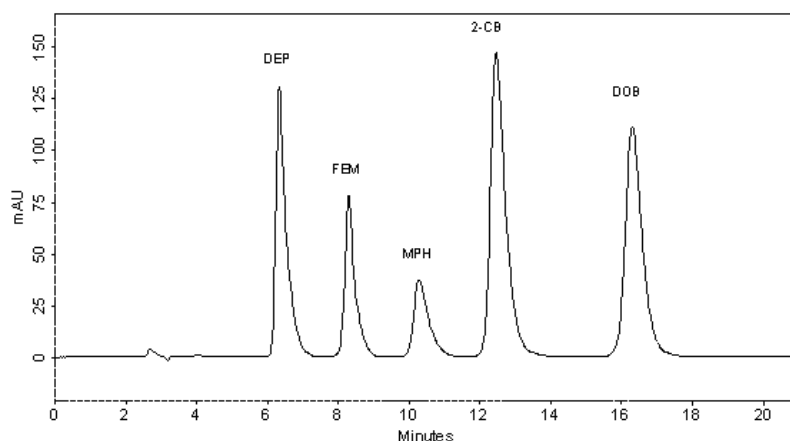


FIGURA 66. Cromatograma da solução contendo DEP, FEM, MPH, DOB e 2-CB (SQR) em fase móvel (30 µg/mL): acetonitrila:metanol:ácido fosfórico 0,025%: tampão de trietilamina pH 5,0 (15:15:19:51 V/V), fluxo 0,85 mL/min, coluna LiChrocart®/LiChrospher® C₁₈ Merck (250x4,0 mm, 5 µm), detecção em 206 nm e volume de injeção 20 µL (DEP= anfepramona, FEM= femproporex, MPH= metilfenidato, 2-CB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-fenetilamina e DOB= 4-bromo-2,5-dimetoxi-anfetamina).

TABELA 44. Robustez do método por CLAE - avaliação do fluxo da fase móvel em solução contendo 30 µg/mL de cada SQR.

Substância	Fluxo	Tempo de retenção (min) / DPR (≤ 1)	Área absoluta / DPR (≤ 1)	Número de pratos teóricos (> 2000)	Assimetria (≤ 2)	Fator capacidade (> 2)	Resolução (> 2)
DEP	0,75	7,14 / 0,00	2980808 / 0,02	3067	1,98	3,46	10,08
	0,85	6,32 / 0,00	2657793 / 0,08	2994	1,96	2,95	9,27
FEM	0,75	9,36 / 0,06	1742439 / 0,56	5811	1,61	4,85	4,41
	0,85	8,28 / 0,07	1537811 / 0,07	5623	1,60	4,18	4,34
MPH	0,75	11,64 / 0,09	1196270 / 1,16	3149	1,57	6,28	3,45
	0,85	10,27 / 0,00	1053251 / 0,52	3148	1,57	5,42	3,38
2-CB	0,75	14,12 / 0,08	4887325 / 0,10	4494	1,54	7,83	2,97
	0,85	12,44 / 0,05	4315430 / 0,06	4457	1,52	6,77	2,94
DOB	0,75	18,49 / 0,14	4161712 / 0,81	5976	1,34	10,56	4,85
	0,85	16,29 / 0,06	3697925 / 0,23	5808	1,34	9,18	4,80

Valores referentes à média de 3 injeções e limites de aceitação conforme CDER (1994). DPR – desvio padrão relativo.

8.2 CG

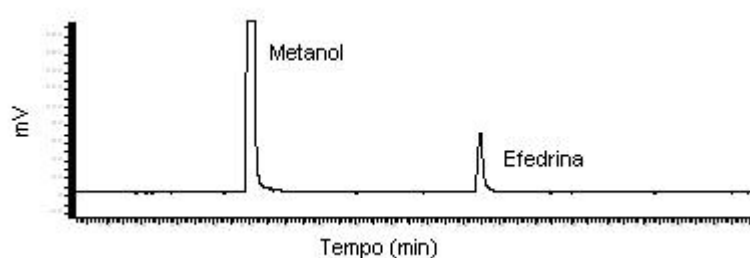


FIGURA 67. Especificidade CG/DIC: cromatograma da solução de efedrina em metanol (0,91 mg/mL). Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μm , 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μL .

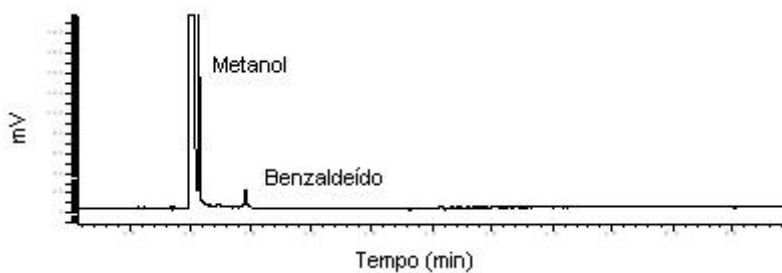


FIGURA 68. Especificidade CG/DIC: cromatograma da solução de benzaldeído em metanol (0,31 mg/mL). Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μm , 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μL .

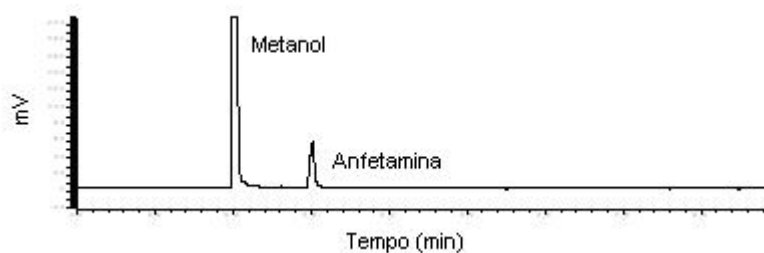


FIGURA 69. Especificidade CG/DIC: cromatograma da solução de anfetamina em metanol (0,66 mg/mL). Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μm , 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μL .

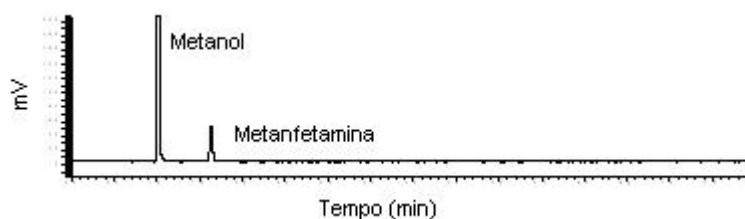


FIGURA 70. Especificidade CG/DIC: cromatograma da solução de metanfetamina em metanol (0,74 mg/mL). Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μ L.

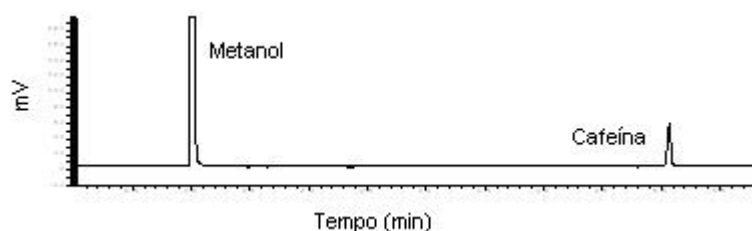


FIGURA 71. Especificidade CG/DIC: cromatograma da solução de cafeína em metanol (0,89 mg/mL). Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μ L.

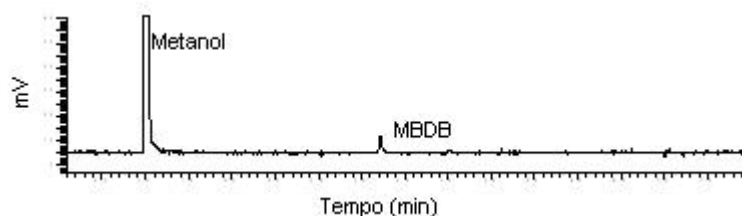


FIGURA 72. Especificidade CG/DIC: cromatograma da solução de MBDB em metanol (0,30 mg/mL). Condições cromatográficas: coluna SHIMADZU CBP1 M25 025 não polar (25 m, 0,25 μ m, 0,22 mm ID e 0,33 mm OD) 160 °C (1 min) 12,5 °C/min 210 °C (1 min), detector 300 °C, injetor 280 °C e volume de injeção 3 μ L.

TABELA 45. Valores obtidos da razão das áreas de DEP/DFA para a curva padrão por CG/DIC.

Concentração (mg/mL)	Razão* / DPR		Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2		
1,0	0,57 / 2,15	0,52 / 1,19	0,54 \pm 0,03	6,83
1,1	0,67 / 0,85	0,63 / 1,93	0,65 \pm 0,02	4,40
1,2	0,77 / 0,75	0,75 / 2,32	0,76 \pm 0,01	1,89
1,3	0,86 / 0,61	0,83 / 3,10	0,84 \pm 0,02	2,66
1,4	0,95 / 1,42	0,95 / 1,82	0,95 \pm 0,00	0,12

*Média dos valores obtidos por meio de cinco injeções.

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

TABELA 46. Valores obtidos da razão das áreas de FEM/DFA para a curva padrão por CG/DIC.

Concentração (mg/mL)	Razão* / DPR		Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2		
1,0	0,71 / 5,56	0,67 / 4,71	0,69 \pm 0,02	4,74
1,1	0,79 / 4,19	0,78 / 4,12	0,78 \pm 0,01	1,19
1,2	0,92 / 4,04	0,90 / 4,15	0,91 \pm 0,01	1,18
1,3	1,08 / 8,00	0,96 / 3,36	1,02 \pm 0,06	8,07
1,4	1,16 / 1,31	1,10 / 3,09	1,13 \pm 0,03	3,92

*Média dos valores obtidos por meio de cinco injeções.

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

TABELA 47. Valores obtidos da razão das áreas de MPH/DFA para a curva padrão por CG/DIC.

Concentração (mg/mL)	Razão* / DPR		Média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	Dia 1	Dia 2		
1,0	0,42 / 7,00	0,34 / 7,20	0,38 \pm 0,04	14,81
1,1	0,47 / 4,11	0,40 / 6,52	0,43 \pm 0,03	11,19
1,2	0,54 / 5,60	0,47 / 4,45	0,50 \pm 0,04	10,06
1,3	0,65 / 11,67	0,50 / 5,34	0,58 \pm 0,07	17,90
1,4	0,69 / 3,76	0,58 / 3,18	0,63 \pm 0,05	11,62

*Média dos valores obtidos por meio de cinco injeções.

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

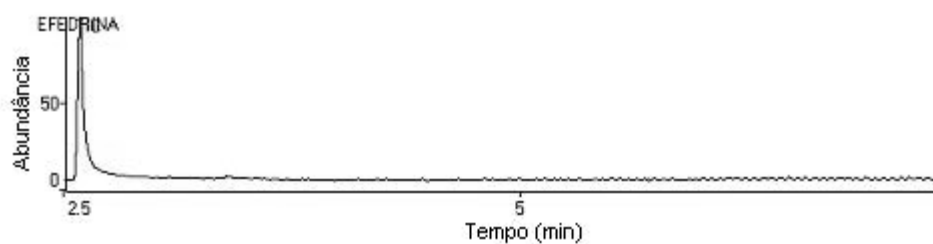


FIGURA 73. Especificidade CG/EM: cromatograma da solução de efedrina em metanol (273 μ g/mL). Condições cromatográficas: coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5@ 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μ m film 190 $^{\circ}$ C (7,5 min), detector 260 $^{\circ}$ C, injetor 285 $^{\circ}$ C, split 1:75, slope 8000 e volume de injeção 3 μ L.

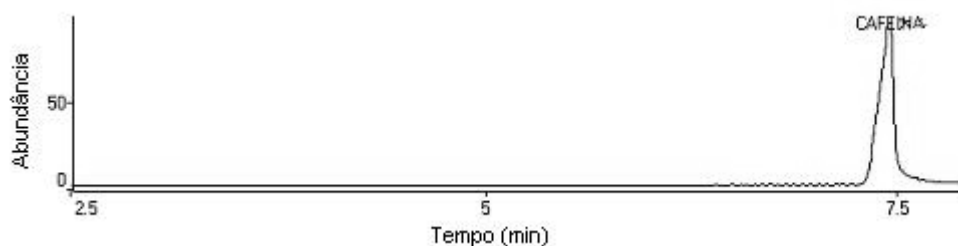


FIGURA 74. Especificidade CG/EM: cromatograma da solução de cafeína em metanol (356 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Condições cromatográficas: coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5@ 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μm film 190 $^{\circ}\text{C}$ (7,5 min), detector 260 $^{\circ}\text{C}$, injetor 285 $^{\circ}\text{C}$, split 1:75, slope 8000 e volume de injeção 3 μL .

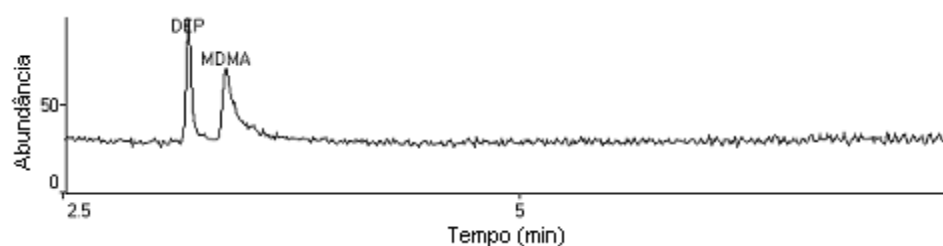


FIGURA 75. Especificidade CG/EM: cromatograma da solução contendo DEP e MDMA em metanol (50 e 112 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). Condições cromatográficas: coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5@ 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μm film 190 $^{\circ}\text{C}$ (7,5 min), detector 260 $^{\circ}\text{C}$, injetor 285 $^{\circ}\text{C}$, split 1:75, slope 8000 e volume de injeção 3 μL .

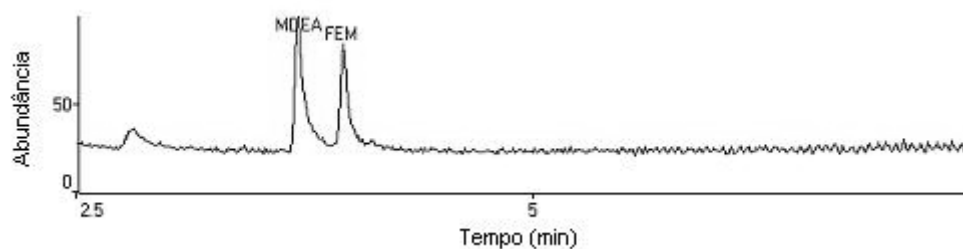


FIGURA 76. Especificidade CG/EM: cromatograma da solução contendo MDEA e FEM em metanol (180 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). Condições cromatográficas: coluna SUPELCO DB5 Simplicity-5@ 30 m, 0,25 mm ID e 0,25 μm film 190 $^{\circ}\text{C}$ (7,5 min), detector 260 $^{\circ}\text{C}$, injetor 285 $^{\circ}\text{C}$, split 1:75, slope 8000 e volume de injeção 3 μL .