

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

NATHÁLIA SIQUEIRA ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE 3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA (MDMA)
EM COMPRIMIDOS DE *ECSTASY* POR CROMATOGRAFIA GASOSA E
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

**BRASÍLIA- DF
2016**

NATHÁLIA SIQUERIA ALMEIDA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE 3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA (MDMA) EM
COMPRIMIDOS DE *ECSTASY* POR CROMATOGRAFIA GASOSA E
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Dissertação apresentada à Universidade de
Brasília, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Química,
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Aline Lima de
Oliveira

Coorientador Dr. Adriano Otávio Maldaner

BRASÍLIA – DF

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Nathália Siqueira Almeida**, matrícula nº **14/0106481**, intitulada ***“Desenvolvimento e Validação de Metodologias para Quantificação de 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA) em Comprimidos de Ecstasy por Cromatografia Gasosa e Ressonância Magnética Nuclear”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 29 de janeiro de 2016.

Profª Drª Aline Lima de Oliveira
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Luciano Morais Lião
Membro Titular (IQ/UFG)

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga
Membro Titular (IQ/UnB)

Profª Drª Ana Cristi Basile Dias
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 29 de janeiro de 2016.

**Dedico este trabalho aos meus pais, Ângelo e Sônia,
que acreditaram em mim e me apoiaram nas minhas
decisões.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Aline Lima de Oliveira, por me receber como aluna de braços abertos, pela atenção e confiança depositadas em mim e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu coorientador, perito Adriano Maldaner, pela paciência, conselhos e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento desse projeto.

Ao doutorando Luiz Eduardo pela parceria, apoio e dicas, essenciais para as análises, interpretação de dados e entendimento sobre o RMN.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo carinho e amor incondicional.

Ao Patrick que, mesmo distante, esteve sempre presente, me apoiando ao longo de todo o percurso.

À Paula Álvares pela companhia e bom humor que tornaram a vida em Brasília mais agradável.

Aos meus amigos de Belo Horizonte pela amizade e pelos momentos de descontração.

A Universidade de Brasília (UnB), ao Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal (INC/PF) e à FINEP/CT-INFRA pelo apoio financeiro e pela disponibilidade dos laboratórios, equipamentos, materiais e amostras utilizadas nesse projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>ECSTASY</i>	1
1.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	4
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVOS GERAIS	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 MATERIAIS	11
3.1 VIDRARIA.....	11
3.2 PADRÕES E REAGENTES	11
3.3 EQUIPAMENTOS	13
3.4 AMOSTRAGEM	14
4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE MDMA POR CG-DIC	15
4.1 INTRODUÇÃO	15
4.2 MÉTODOS.....	16
4.2.1 Condições cromatográficas	16
4.2.2 Preparo da solução de padrão interno	17
4.2.3 Homogeneização das amostras reais	17
4.2.4 Curva analítica	18
4.2.5 Figuras de mérito	18
4.2.5.1 <i>Seletividade</i>	18
4.2.5.2 <i>Precisão</i>	19

4.2.5.3	<i>Exatidão</i>	20
4.2.5.4	<i>Robustez</i>	21
4.2.5.5	<i>Estabilidade</i>	22
4.2.5.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	23
4.2.5.7	<i>Estimativa da incerteza de medição</i>	24
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.3.1	Curva analítica	25
4.3.2	Figuras de mérito	27
4.3.2.1	<i>Seletividade</i>	27
4.3.2.2	<i>Precisão</i>	29
4.3.2.3	<i>Exatidão</i>	30
4.3.2.4	<i>Robustez</i>	31
4.3.2.5	<i>Estabilidade</i>	33
4.3.2.6	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	34
4.3.2.7	<i>Estimativa da incerteza de medição</i>	35
5	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR RMN de ¹H	37
5.1	INTRODUÇÃO	37
5.2	MÉTODOS	39
5.2.1	Condições de aquisição	40
5.2.2	Processamento	41
5.2.3	Cálculo da pureza	41
5.2.4	Preparo da solução de D₂O	42
5.2.5	Quantificação de Ácido Maleico de grau HPLC	42
5.2.6	Figuras de mérito	43
5.2.6.1	<i>Linearidade</i>	43
5.2.6.2	<i>Precisão</i>	44
5.2.6.3	<i>Exatidão</i>	44
5.2.6.4	<i>Robustez</i>	45
5.2.6.5	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	46
5.2.6.6	<i>Estabilidade</i>	47
5.2.6.7	<i>Estimativa da incerteza de medição</i>	47
5.2.7	Quantificação de MDMA.HCl padrão	47
5.2.7.1	<i>Seletividade</i>	48

5.2.7.2	<i>Exatidão</i>	48
5.2.7.3	<i>Precisão</i>	49
5.2.7.4	<i>Estabilidade</i>	49
5.2.7.5	<i>Estimativa da incerteza de medição para o MDMA.HCl</i>	49
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.3.1	Quantificação de Ácido Maleico de grau HPLC	50
5.3.2	Figuras de mérito	50
5.3.2.1	<i>Linearidade</i>	50
5.3.2.2	<i>Precisão</i>	52
5.3.2.3	<i>Exatidão</i>	53
5.3.2.4	<i>Robustez</i>	54
5.3.2.5	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	56
5.3.2.6	<i>Estabilidade</i>	57
5.3.2.7	<i>Estimativa da incerteza de medição</i>	57
5.3.3	Quantificação de MDMA.HCl padrão	59
5.3.3.1	<i>Seletividade</i>	61
5.3.3.2	<i>Precisão</i>	62
5.3.3.3	<i>Exatidão</i>	63
5.3.3.4	<i>Estabilidade</i>	63
5.3.3.5	<i>Estimativa da incerteza de medição para o MDMA.HCl</i>	63
6	CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MDMA EM COMPRIMIDOS DE ECSTASY	67
6.1	INTRODUÇÃO	67
6.2	MÉTODOS	69
6.2.1	Caracterização dos comprimidos	69
6.2.2	Análise das amostras reais por CG-DIC	70
6.2.3	Análise das amostras reais por RMN de ¹H	70
6.2.4	Comparação dos métodos	71
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	72
6.3.1	Caracterização dos comprimidos	72
6.3.2	Análise das amostras reais por CG-DIC	78
6.3.3	Agrupamento de amostras	82
6.3.4	Análise das amostras reais por RMN de ¹H	83
6.3.5	Comparação dos métodos	84

7 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
APÊNDICE A.....	97
APÊNDICE B.....	107
APÊNDICE C.....	110
APÊNDICE D.....	113
APÊNDICE E.....	114
APÊNDICE F.....	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de algumas das substâncias ativas que podem ser encontradas em comprimidos de <i>ecstasy</i>	2
Figura 2 - Esquema de síntese do MDMA a partir do PMK, pelo método de aminação reductiva.....	3
Figura 3 – Esquema da síntese de MDMA a partir do safrol pelo método de bromação.....	4
Figura 4 - Gráfico da curva analítica do MDMA.HCl	26
Figura 5 – Gráfico de resíduos da curva analítica do MDMA.HCl.....	27
Figura 6 – Cromatogramas das soluções A, B e C da seletividade	28
Figura 7 – Gráfico com os valores de erros relativos.....	31
Figura 8 - Teste de linearidade (RMN)	51
Figura 9 – Gráfico de resíduos da curva obtida para a linearidade do método (RMN)	52
Figura 10 – Erros relativos encontrados para a exatidão do método (RMN).....	54
Figura 11 – Gráfico com fator versus valores de efeito calculados pela robustez (RMN)	56
Figura 12 - Estrutura molecular e espectro de RMN de ¹ H do MDMA.HCl padrão, com identificação dos hidrogênios da molécula, em D ₂ O, contendo ácido maleico (6,4 ppm)	60
Figura 13 – Espectros de RMN de ¹ H dos possíveis adulterantes e da solução de seletividade	62
Figura 14 - Apreensões de <i>ecstasy</i> na América do Sul, América Central e Caribe, por país, 2008-2012.....	67
Figura 15 - Mapa das principais apreensões de MDMA por estado do Brasil, realizadas pela Polícia Federal, em 2014	68
Figura 16 – Logotipos das amostras de comprimidos de <i>ecstasy</i>	72
Figura 17 – Mapa com a porcentagem do número de comprimidos apreendidos por estado .	74
Figura 18 - Gráfico da quantidade de lotes em uma mesma faixa de massa média dos comprimidos	74
Figura 19 – Espectro de FTIR/ATR de amostra padrão de celulose.....	75
Figura 20 – Teste de Cloreto: 1. Amostras solubilizadas em água. 2. Amostras ao final do teste.....	78
Figura 21 – Quantidade de lotes em uma mesma faixa de massa de MDMA.HCl por comprimido.....	80

Figura 22 – Cromatogramas das amostras 3781/11 B, 2949/12 e 1959/12	81
Figura 23 – Cromatogramas das amostras 798/13, 835/13 e 843/13	82
Figura 24 – Gráfico da comparação dos métodos pela pureza das amostras	85
Figura 25 – Resíduos do gráfico de comparação entre CG-DIC e RMN de ^1H	86
Figura 26 – Pureza média das amostras e incerteza do respectivo método. Amostras discrepantes (8, 35 e 37) destacadas.	87
Figura 27 – Espectros de RMN de ^1H do padrão de MDMA.HCl e da amostra 2696/12	90
Figura 28 – Cromatogramas do padrão de MDMA e da amostra 2696/12.....	91
Figura 29 - Diagrama de Ishikawa: contribuições na incerteza na determinação da pureza de uma amostra contendo MDMA.....	98
Figura 30 – <i>Outlier</i> precisão intermediária (ensaio C), nível alto – CG-DIC.....	107
Figura 31 – <i>Outlier</i> repetitividade do método e exatidão, nível baixo – RMN de ^1H	107
Figura 32 – <i>Outlier</i> precisão intermediária (analistas diferentes), nível baixo – RMN de ^1H	108
Figura 33 – <i>Outlier</i> quantificação de MDMA, amostra 1839/12 A.....	108
Figura 34 – <i>Outlier</i> quantificação de MDMA, amostra 2626/12.....	109
Figura 35 - Diagrama de Ishikawa: contribuições na incerteza do RMN.....	111
Figura 36 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H do MDMA.HCl padrão, com identificação dos hidrogênios da molécula, em D_2O , contendo ácido maleico (AM) e TSP (0,0 ppm).....	113
Figura 37 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da aminopirina em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm).....	114
Figura 38 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da anfetamina em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm).....	115
Figura 39 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da cafeína em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm).....	116
Figura 40 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da procaína em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm).....	117
Figura 41 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da sacarose em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm).....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros e ensaios utilizados na robustez (CG-DIC)	21
Tabela 2 – Seletividade do método ao MDMA.HCl (CG-DIC).....	29
Tabela 3 – Repetitividade do equipamento para MDMA.HCl (CG-DIC).....	30
Tabela 4 – Repetitividade do método (Intradia) para MDMA.HCl (CG-DIC)	30
Tabela 5 – Precisão intermediária para MDMA.HCl (CG-DIC) – Ensaio A (mesmo analista, dias diferentes, mesmo equipamento); B (mesmo analista, mesmo dia, equipamentos diferentes) e C (analistas diferentes, mesmo dia, mesmo equipamento)	30
Tabela 6 – Coeficiente de variação da concentração média de MDMA.HCl para cada ensaio de robustez - Teste A (CG-DIC)	32
Tabela 7 – Resultado da robustez - Teste A (CG-DIC).....	32
Tabela 8 – Coeficiente de variação da robustez - Teste B para MDMA.HCl (CG-DIC).....	33
Tabela 9 – Estabilidade das soluções de MDMA.HCl (CG-DIC).....	34
Tabela 10 – Relação sinal/ruído e cálculos para LD e LQ (CG-DIC).....	34
Tabela 11 – Valores de LD e LQ calculados pela extrapolação da curva (CG-DIC).....	35
Tabela 12 – Valores das incertezas de cada componente e suas contribuições (CG-DIC)	36
Tabela 13 - Incerteza expandida (CG-DIC) de 3 amostras hipotéticas	36
Tabela 14 - Parâmetros de aquisição de espectros de RMN de ¹ H (Bruker).....	40
Tabela 15 - Padrões utilizados nas análises por RMN	42
Tabela 16 - Fatores a serem estudados na robustez e seus respectivos níveis (RMN).....	45
Tabela 17 - Fatores e níveis utilizados em cada ensaio da robustez (RMN).....	46
Tabela 18 – Repetitividade do método (RMN)	53
Tabela 19 – Precisão intermediária (RMN).....	53
Tabela 20 - Resultado da quantificação do DMS em cada ensaio da robustez (RMN).....	55
Tabela 21 – Cálculo dos efeitos dos fatores avaliados na robustez (RMN)	56
Tabela 22 – Erros relativos calculados para a estabilidade das soluções de AM e DMS (RMN)	57
Tabela 23 - Componentes da incerteza e respectivos valores de incerteza padrão (RMN).....	58
Tabela 24 – Valores das incertezas de cada componente e suas contribuições (RMN).....	58
Tabela 25 – Exatidão do padrão de MDMA.HCl (RMN)	63
Tabela 26 - Componentes da incerteza e respectivos valores de incerteza padrão (RMN/MDMA)	64

Tabela 27 – Valores das incertezas de cada componente e suas contribuições (RMN/MDMA)	65
Tabela 28 - Incerteza expandida para 95 % de IC (RMN/MDMA) de 3 amostras hipotéticas	65
Tabela 29 – Comprimidos apreendidos em cada estado	73
Tabela 30 – Caracterização físico-química dos comprimidos de <i>ecstasy</i>	76
Tabela 31 – Pureza das amostras determinada por CG-DIC.....	79
Tabela 32 – Agrupamento de lotes de comprimidos similares	83
Tabela 33 – Amostras com resultados distantes na quantificação pelos dois métodos	88
Tabela 34 – Resultado do teste T pareado	89
Tabela 35 - Legenda e valores dos componentes da Equação 14	97
Tabela 36 – Componentes de incerteza do CG-DIC.....	99
Tabela 37 - Legenda e valores dos componentes da Equação 34	110
Tabela 38 – Valores de pureza média e CV das replicatas das amostras.....	119

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

μ	Incerteza padrão combinada
a	Inclinação da curva analítica
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Al/Hg	Amálgama de alumínio e mercúrio
AM	cido maleico
AQ	Tempo de aquisição
b	Intercepto da curva analítica com o eixo y
BBFO	<i>Broadband observe</i>
CLAE-DF	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
CG	Cromatografia gasosa
CV	Coeficiente de variação
DNP	Detector de nitrogênio e fósforo
D1	<i>Delay</i> de relaxação
D ₂ O	xido de deutério
DE	<i>Delay</i> de pr-aquisição
DIC	Detector por ionização em chama
Diltiazem.HCl	Cloridrato de diltiazem
DMS	Dimetilsulfona
DOSY	<i>Diffusion ordered spectroscopy</i>
DPR	Desvio padrão relativo
DS	<i>Dummy scans</i>
EM	Espectrmetro de massas
ER	Erro relativo
FID	<i>Free induction decay</i>
FTIR-ATR	<i>Attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy</i>

FW	Largura do filtro
FWHH	<i>Frequency width at half height</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Hidroxizina.2HCl	Dicloridrato de hidroxizina
IC	Intervalo de confiança
INC	Instituto Nacional de Criminalística
IQ	Instituto de Química
ISO/IEC	<i>International Organization of Standardization (ISO) em conjunto com a International Electrotechnical Commission (IEC)</i>
k'	Fator de retenção médio
k _{95%}	Fator de abrangência
Lb	<i>Line broadening</i>
LD	Limite de detecção
Levamisol.HCl	Cloridrato de levamisol
Lidocaína.HCl.H ₂ O	Cloridrato de lidocaína monohidratado
LQ	Limite de quantificação
MAOA	Monoaminoxidase A
MAOB	Monoaminoxidase B
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDA.HCl	Cloridrato de 3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxietilamfetamina
MDEA.HCl	Cloridrato de 3,4-metilenodioxietilamfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetamfetamina
MDMA.HCl	Cloridrato de 3,4-metilenodioximetamfetamina
Mefedrona.HCl	Cloridrato de mefedrona
MM	Massa molecular
MRC	Material de referência certificado
NaBH ₄	Borohidreto de sódio

NaCNBH ₃	Cianoborohidreto de sódio
NBR	Norma brasileira
NOE	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
NS	Número de <i>scans</i>
P1	Largura do pulso a 90°
PF	Polícia Federal
PI	Padrão interno
PLW1	Potência do pulso a 90°
PMK	Piperonilmetilcetona
POP	Procedimento operacional padrão
Procaína.HCl	Cloridrato de procaína
R ²	Coefficiente de determinação
RG	Ganho do detector
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
Rs	Resolução
RSD	<i>Relative standard deviation</i>
s	Desvio padrão
s ²	Variância
SEPLAB	Serviço de Perícias de Laboratório e Balística
SW	Largura da janela
T ₁	Tempo de relaxação longitudinal
TD	Número de pontos – FID
Temp	Temperatura
TFMPP	1-m-(trifluorometilfenil)piperazina
TMS	Tetrametilsilano
t _r	Tempo de retenção
TSP-d ₄	3-trimetilsilil-propionato-d ₄ de sódio

U_{amostra}

\bar{x}

Incerteza expandida

Valor médio

RESUMO

A validação de um método analítico é essencial para demonstrar que ele é adequado para um determinado uso e para garantir a qualidade e a confiabilidade estatística das medidas, dos cálculos envolvidos no processamento dos dados e dos resultados experimentais obtidos. Para que um novo método possa ser incorporado nas operações de rotina de um laboratório, devem ser apresentadas evidências objetivas e rastreáveis de que requisitos específicos, denominados figuras de mérito, estão sendo atendidos. No caso da identificação e quantificação de drogas de abuso, a maioria dos processos de validação envolve métodos analíticos que exigem o uso do padrão certificado do analito. Essa é uma grande dificuldade no Brasil, uma vez que o acesso a padrões certificados de drogas de abuso é ainda muito restrito. No presente projeto, comprimidos de *ecstasy*, contendo o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), apreendidos pela Polícia Federal, foram caracterizados e tiveram seu princípio ativo quantificado por dois métodos para a construção do perfil químico da droga. A cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC), utilizada rotineiramente em laboratórios forenses, foi utilizada como método de referência para avaliação da ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), que é um método ainda pouco utilizado. Os dois métodos foram validados, atendendo todos os requisitos do sistema de gestão da qualidade do laboratório central de química forense da Polícia Federal, obtendo resultados considerados adequados para linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, limites de detecção e quantificação e estimativa da incerteza de medição. As amostras de *ecstasy* analisadas no trabalho correspondem a 25 apreensões da Polícia Federal, em 6 estados brasileiros, de 2011 a 2013, e foram divididas em 39 lotes. A análise por CG-DIC demonstrou que a pureza das amostras variou de 10,5 % a 77,0 % e alguns adulterantes foram identificados em 15 % dos lotes. Apesar dos resultados quantitativos dos dois métodos terem sido equivalentes, o RMN de ^1H se mostrou mais eficiente e versátil ao realizar tanto a identificação inequívoca quanto a quantificação do analito em uma mesma análise, uma vez que dispensa o uso de padrão do analito e a construção de curvas analíticas.

Palavras-chave: *Ecstasy*. MDMA. CG-DIC. RMN. Validação.

ABSTRACT

The validation of an analytical method is essential to demonstrate that it is suitable for a particular use and to ensure the quality and statistical reliability of the measures, the calculations involved in the data processing and the experimental results obtained. In order to incorporate a new method into the routine operations of a laboratory, must be presented objective and traceable evidences that specific requirements, called figures of merit, are being attended. Regarding identification and quantification of drugs of abuse, most of validation processes involve analytical methods that require the use of the analyte's standard. Since the access to standards of drugs of abuse in Brazil is still very restricted, it brings a major difficulty to the validation process. In this project, ecstasy tablets containing 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), seized by the Federal Police, have been characterized and had the active ingredient quantified by two methods to achieve chemical profiling information. The gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) method, routinely used in forensic laboratories, was used as reference for evaluating the proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) method, which is yet barely used. Both methods have been validated, complying with all requirements of the forensic chemistry central lab of Federal Police quality system, with suitable results for linearity, precision, accuracy, robustness, selectivity, limits of detection and quantification and estimation of measurement uncertainty. The ecstasy samples analyzed in this work correspond to 25 Federal Police seizures, performed between 2011 and 2013, in 6 Brazilian states, and were divided into 39 batches. GC-FID analysis showed that sample purity ranged from 10.5 % to 77.0 % and some contaminants have been identified in 15 % of the batches. Despite quantitative results of both methods were equivalent, the $^1\text{H-NMR}$ was more efficient and versatile to accomplish unambiguous identification and quantification of the analyte in a single analysis, since it doesn't require the use of analyte's standard and the construction of calibration curves.

Keywords: Ecstasy. MDMA. GC-FID. NMR. Validation.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas de 2014 do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC), estima-se que 5,2 % da população mundial de 15 a 64 anos tenham usado drogas ilícitas pelo menos uma vez no ano de 2011, principalmente substâncias pertencentes aos grupos canabinoides, opioides, cocaínicos ou anfetamínicos. Dentre os anfetamínicos, grupo de substâncias composto pela anfetamina e seus derivados, destacam-se a metanfetamina e os comprimidos conhecidos como *ecstasy*.^{1,2}

1.1 ECSTASY

O *ecstasy* é comercializado principalmente na forma de comprimidos de produção ilícita que variam em formatos, dimensões, cores e logotipos. O 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) é a substância ativa mais comumente encontrada nesses comprimidos e é geralmente utilizado na forma de sal cloridrato (MDMA.HCl), que tem aparência de um pó de cor branca a bege. Outras substâncias ativas análogas, tais como 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), metanfetamina e anfetamina, também podem ser encontradas (Figura 1). Também é observada esporadicamente a adição de substâncias de outras classes químicas, como piperazinas ou catinonas, reforçando o caráter imprevisível relacionado com esta atividade não regulada e ilícita. Os fármacos estimulantes cafeína e efedrina são adulterantes comuns e dentre os principais excipientes (substâncias utilizadas principalmente para aumentar o volume e com isso facilitar o manuseio e a compressão do pó) encontrados nos comprimidos de *ecstasy* estão a lactose, a celulose, o talco e a sacarose. A presença de outras substâncias e a ingestão associada a outras drogas, como o álcool, pode favorecer o aumento dos efeitos fisiopatológicos.^{2,3,4,5,6,7,8}

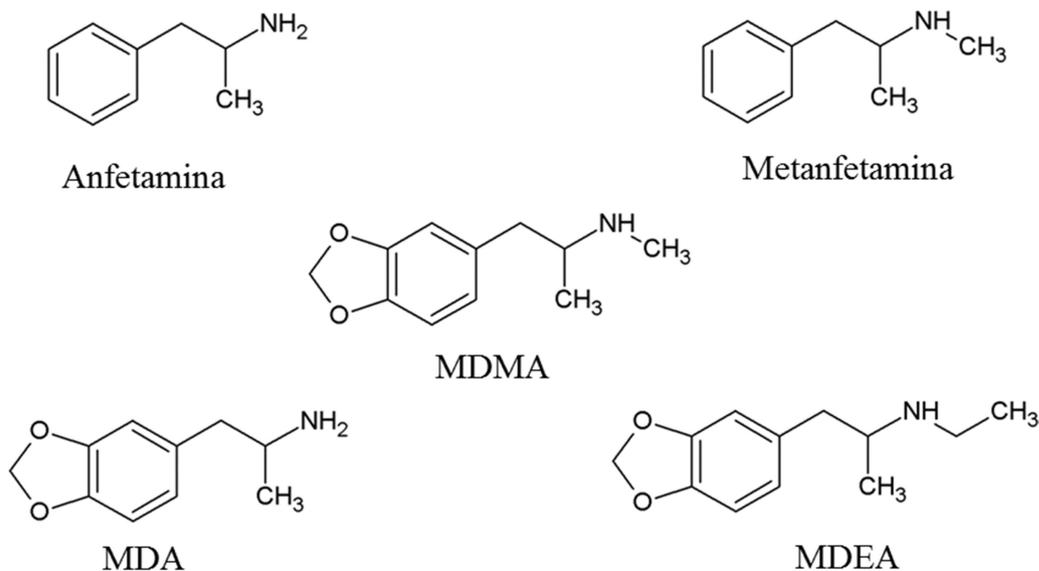


Figura 1 - Estruturas químicas de algumas das substâncias ativas que podem ser encontradas em comprimidos de *ecstasy*

Os efeitos imediatos, após administração oral de uma concentração típica, que varia entre 50 e 150 mg de MDMA por comprimido, se iniciam entre 20 e 60 minutos e podem durar de 3 a 5 horas. A enzima principal responsável pelo metabolismo é a CYP2D6, do sistema hepático do citocromo P-450. Pode ocorrer persistência de efeitos tardios por um ou dois dias após o uso da droga, devido ao tempo de meia-vida plasmática em humanos do MDMA, que é de aproximadamente 8 horas. Logo, são necessários cerca de 40 horas para a eliminação de 95 % da concentração plasmática.³

O MDMA pertence ao grupo das feniletilaminas e atua como estimulante do sistema nervoso central, principalmente na via serotoninérgica. Além disso, é responsável pela inibição das enzimas monoaminoxidase A (MAOA) e monoaminoxidase B (MAOB), gerando um aumento da concentração sináptica de serotonina, dopamina e norepinefrina. Outras vias também são afetadas, como a neurotransmissão da acetilcolina, da histamina e do ácido gama-aminobutírico (GABA), pela afinidade da droga pelos transportadores ou interação direta com os receptores desses neurotransmissores.^{2,3,4,5}

Essa droga pode produzir alteração do humor, da cognição, do sono e da memória e, por isso, pode gerar sensações de euforia, ânimo e aumento da comunicação, o que justifica seu consumo associado a festas e *raves*. Em doses excessivas também pode causar alucinações e desencadear uma série de efeitos adversos, como desidratação intensa, falta de

apetite, esgotamento físico e mental. Alguns efeitos são mais comuns após uso crônico, como depressão, ansiedade, hepatotoxicidade e problemas cardíacos. As características físicas e psicológicas do usuário, assim como a dose, frequência e duração do uso, influenciam, de forma direta, nos efeitos causados pela droga.^{2,3,4,5,9}

A síntese do MDMA pode ocorrer por vários processos químicos, mas os dois precursores mais citados na literatura são o piperonilmetilcetona (PMK) e o safrol. O PMK deve passar por uma aminação redutiva com metilamina, que pode ser feita por uma diversidade de agentes redutores, sendo os mais empregados o borohidreto de sódio (NaBH_4) a baixa temperatura, o cianoborohidreto de sódio (NaCNBH_3) ou um redutor de caráter metálico composto por uma amálgama de alumínio e mercúrio (Al/Hg). Um esquema das equações químicas de aminação redutiva do PMK para formar o MDMA encontra-se na Figura 2.³

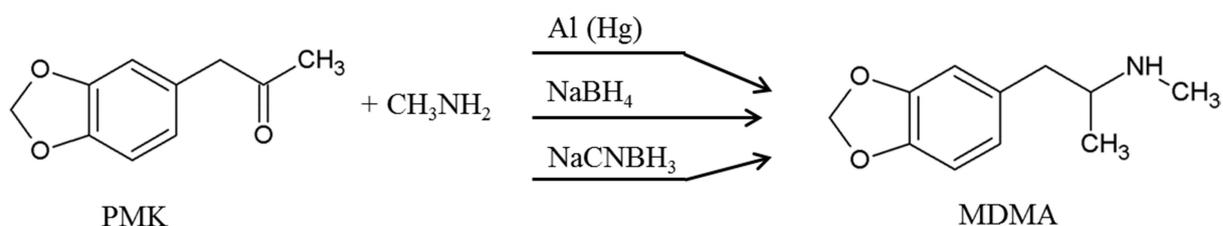


Figura 2 - Esquema de síntese do MDMA a partir do PMK, pelo método de aminação redutiva

O safrol também já apresenta em sua estrutura o grupo fenilmetilenodioxo e sua conversão a MDMA passa pela formação de um intermediário. O intermediário MDPBP é formado pela bromação do safrol, que depois sofre uma reação de substituição nucleofílica com metilamina para formar o MDMA. O esquema de síntese do MDMA a partir do safrol está na Figura 3.³

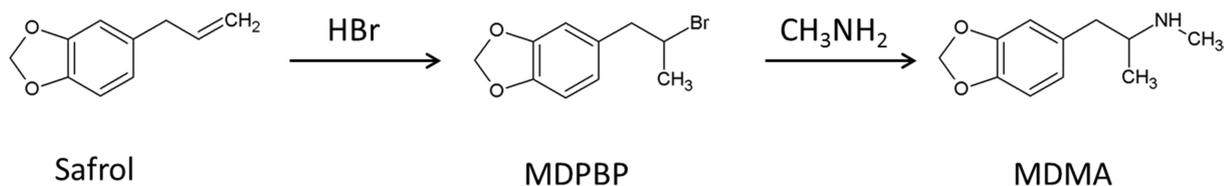


Figura 3 – Esquema da síntese de MDMA a partir do safrol pelo método de bromação

A análise das impurezas presentes nos comprimidos pode indicar qual via sintética foi utilizada. Não se espera que ocorra etapas elaboradas de purificação durante a produção dos comprimidos, já que essa é ilegal e clandestina, e por isso é provável que se encontrem analitos que possam ser correlacionados com o método utilizado na síntese do MDMA. Essa análise pode ser feita por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM), por exemplo. Essas informações também podem ser utilizadas para correlacionar apreensões, mapear rotas de tráfico e de distribuição dessas drogas.³

Várias técnicas analíticas podem ser utilizadas para a identificação e quantificação de MDMA em comprimidos de *ecstasy*. A cromatografia gasosa (CG) é uma das técnicas mais utilizadas e pode estar acoplada a diversos detectores para essa análise, como à espectrometria de massas (EM), ao detector por ionização em chama (DIC) e ao detector de nitrogênio e fósforo (DNP). A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF) é outro tipo de cromatografia que também pode ser empregado. A determinação da pureza de comprimidos de *ecstasy* também pode ser feita por métodos que não envolvem uma etapa de separação, como por ressonância magnética nuclear (RMN).^{3,4,5,9,25}

1.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Uma boa técnica analítica, e em especial para aplicações forenses, deve ser simples e de rápida execução, gerando resultados confiáveis, além de atender as exigências normativas. Para demonstrar que um método é adequado e garantir a qualidade das medidas e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento este deve ser submetido ao processo de validação. Validação é o termo utilizado quando se apresentam

evidências objetivas, e rastreáveis, de que os requisitos específicos para um determinado uso de um método são atendidos. A confirmação que o método pode ser inserido nas operações de rotina de um laboratório e a definição do seu alcance são feitas quando alguns parâmetros qualitativos e quantitativos, conhecidos como figuras de mérito, são determinados. Dentre as figuras de mérito descritas na literatura especializada e que se aplicam à validação de análises químicas forenses estão: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, robustez e estimativa da incerteza da medição.^{5,10,11,12}

A linearidade expressa à habilidade do método em gerar uma resposta analítica diretamente proporcional à concentração do analito na amostra. Uma das formas de demonstrar a linearidade de um método é pela construção de uma curva analítica, a partir da aplicação da regressão linear, determinada pelo método dos quadrados mínimos, em um gráfico da resposta do método pela concentração do analito. A partir da equação da reta obtida, calculam-se os resíduos, que devem apresentar perfil aleatório e não ter valores discrepantes, e o coeficiente de determinação (R^2), que é uma medida descritiva da proporção da variação de y que pode ser explicada por variações em x , segundo o modelo de regressão linear simples. Quanto mais próximo de 1 estiver o R^2 , melhor será o grau de explicação da variação de y em termos da variável x . Alternativamente, pode-se realizar a análise da variância na regressão.^{10,11,12,13}

A matriz de uma amostra pode conter componentes que interferem no desempenho do método. A capacidade de um método de separar e identificar, de forma inequívoca, um analito é demonstrada pelo estudo da sua seletividade, também chamada de especificidade. A avaliação da seletividade leva em conta os componentes que podem fazer parte da matriz do analito de interesse, como outros componentes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação. Outras figuras de mérito, como a linearidade, a exatidão e a precisão, dependem da garantia da seletividade, caso contrário seus resultados não são confiáveis. Por isso, a seletividade deve ser um dos primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método analítico.^{11,13}

Os experimentos mais utilizados na avaliação da seletividade envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, que irão simular a matriz com e sem o analito de interesse, ou com amostras reais com e sem o analito. A capacidade de identificação do analito de interesse na presença da matriz deve ser demonstrada pela não identificação de interferências no sinal do analito de interesse. Quando eventuais interferentes ou a matriz sem o analito não

se encontram disponíveis durante a validação, sugere-se a avaliação de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meios de variações nas condições de análise. O método de adição de padrão também é uma alternativa.^{11,13}

A precisão demonstra o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas. As três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, que são avaliadas ao longo da faixa de trabalho e são usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente da variação. O coeficiente de variação (CV), sinônimo de desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como RSD, do inglês *relative standard deviation*, é usualmente expresso em porcentagem e é calculado segundo a equação a seguir:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

em que s é o desvio padrão e \bar{x} é o valor médio da medida.^{10,11}

A repetitividade avalia a dispersão dos resultados obtidos, em um curto período de tempo, sob as mesmas condições de medição e pode ser determinada por meio da análise de padrão, material de referência ou pela adição do analito a branco da amostra. A repetitividade do equipamento, também chamada de precisão instrumental, é a medida do CV após análises consecutivas de uma mesma solução no método proposto. Já a repetitividade do método é a análise de uma mesma amostra, nas mesmas condições: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo equipamento e mesmo método, em preparações diferentes, sucessivas e em um curto intervalo de tempo.^{11,12,13,14}

A precisão intermediária avalia a variabilidade dos resultados dentro de um laboratório. Nessa análise, algumas condições definidas são variadas e as análises podem ser divididas por ensaios, em que cada ensaio apresenta a variação de uma condição, como diferentes dias, equipamentos ou operadores. O resultado é expresso pelo coeficiente de variação de cada um dos ensaios e o objetivo é verificar se, em um mesmo laboratório, o método fornecerá, estatisticamente, o mesmo resultado apesar das alterações realizadas.^{13,15}

A reprodutibilidade é resultado de um estudo colaborativo entre laboratórios. A mesma amostra é preparada e analisada, seguindo o mesmo método, em dois laboratórios diferentes, por operadores diferentes, em equipamentos diferentes. Essa comparação interlaboratorial é importante principalmente quando a validação do método tem como

objetivo a inclusão do mesmo em guias de padronização de procedimentos analíticos, como na farmacopéia.^{11,13}

A exatidão é definida como o grau de concordância entre resultados individuais obtidos experimentalmente e o valor de referência. A avaliação da exatidão pode ser feita por diversos métodos, como pelo uso de material de referência certificado (MRC) ou padrão certificado, comparação entre métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. O certificado de um MRC é um documento com o valor de concentração do analito e a incerteza associada e com garantias da estabilidade e rastreabilidade do mesmo. Através dos resultados da exatidão é possível observar erros sistemáticos e aleatórios.^{11,13}

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por um método analítico. Para a determinação da concentração mínima de analito que o método consegue quantificar calcula-se o limite de quantificação (LQ). Esses limites podem ser calculados por três métodos diferentes: o visual, o da relação sinal/ruído e o baseado nos parâmetros da curva analítica. O LQ utiliza valores maiores na base de cálculos em todos os métodos, para que a quantificação seja confiável.^{10,13,14,16}

O método visual utiliza soluções contendo baixas concentrações conhecidas da espécie de interesse. A menor concentração que pode ser detectada visualmente e que seja distinta do sinal do ruído é considerada como LD, enquanto o LQ corresponde a menor concentração que pode ser quantificada de acordo com os limites de exatidão e precisão definidos para o método. A relação sinal/ruído é a comparação entre a altura do sinal do analito em uma concentração baixa conhecida e a altura do sinal do ruído, de forma que o analito possa ser facilmente identificado. Considera-se aceitável que o LD tenha uma relação sinal/ruído de 3:1 e o LQ, de 10:1. Os métodos visual e da relação sinal/ruído geram resultados rapidamente, porém baseiam-se em parâmetros qualitativos, enquanto o método que se baseia nos parâmetros da curva analítica utiliza valores quantitativos e cálculos estatísticos.^{10,13,14,16}

Para o cálculo do LD e LQ a partir dos parâmetros da curva analítica, calcula-se o desvio padrão da resposta, que pode ser estimado do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação. *Softwares* como Microsoft Excel[®] ou Microcal Origin[®] podem calcular os parâmetros da curva e fornecer a estimativa do desvio padrão da resposta. Para a determinação do LD, a razão do desvio padrão da resposta pelo

coeficiente angular da curva analítica deve ser multiplicada por 3, enquanto o LQ é determinado pela multiplicação dessa mesma razão por 10.^{13,16}

A robustez mede a sensibilidade do método frente a pequenas, mas deliberadas, variações de parâmetros associados ao método. As mudanças aplicadas refletem alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outro laboratório. Em um método por cromatografia gasosa, avalia-se a robustez, por exemplo, pela variação de parâmetros como volume de injeção, programação da temperatura, natureza do gás de arraste, etc. Uma maneira muito utilizada para determinar a robustez é através do teste de Youden. Esse teste permite, além de avaliar a robustez do método, identificar a influência de cada uma das variações nos resultados finais. Esse teste consiste na análise multivariada de sete variáveis que podem influenciar o método. Cada variável é modificada para mais e para menos do valor utilizado no método original. Um total de oito experimentos são realizados e o efeito de cada variável é analisado.^{11,12,16,17}

A incerteza de medição é o parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, ou seja, a grandeza que se pretende medir. O resultado de uma medição é, em geral, apenas uma aproximação do valor do mensurando, logo, só é completo quando acompanhado pela incerteza. A incerteza não pode ser confundida com o erro de uma medição e, de forma geral, não pode ser usada para corrigir o resultado, sendo apenas uma indicação quantitativa da qualidade da medição. A incerteza assume a forma de uma faixa e pode ser aplicada a todas as determinações, quando estimada para um procedimento analítico e um tipo definido de amostra. Além disso, é indispensável para que os resultados de uma medição possam ser comparados entre si ou com valores de referências fornecidos por um certificado, por exemplo.¹⁸

A medição química geralmente depende de uma combinação de etapas, sendo todas elas possíveis fontes de incerteza. Como exemplo de fontes de incertezas têm-se a amostragem, efeitos de matriz e interferências, condições ambientais, incertezas de massas e de equipamentos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, variação aleatória. É necessário determinar a contribuição quantitativa de cada uma dessas fontes para que se tenha uma estimativa completa e confiável, por isso a estimativa da incerteza de uma medição química pode se tornar, na prática, uma tarefa muito complexa.¹⁸

O Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, referenciado pela norma ISO/IEC 17.025, preconiza o método clássico, ou *bottom-up*, como a abordagem a ser seguida no cálculo da estimativa da incerteza. Esse método envolve 4 etapas. Primeiramente, faz-se a especificação do mensurando, em que se define o que se está medindo e sua relação com as grandezas de entrada. Na segunda etapa, identificam-se todas as possíveis fontes de incerteza, pelo diagrama de Ishikawa, incluindo as fontes relacionadas diretamente com o mensurando, descritas na etapa anterior, quanto às fontes externas. Na etapa seguinte, estimam-se as incertezas associadas de cada uma das fontes identificadas. Na quarta, e última etapa, as incertezas associadas, expressas como desvio padrão, são somadas para a obtenção da incerteza padrão combinada. Para o cálculo da incerteza expandida utiliza-se um fator de abrangência apropriado.^{12,18}

A estabilidade de soluções não é uma figura de mérito do método, mas é importante ser estudada para garantir resultados confiáveis e reproduzíveis. O estudo da estabilidade das soluções das amostras e dos padrões deve ser feito em relação às condições de temperatura e tempo de armazenagem. Em caso de soluções pouco estáveis a temperatura ambiente, a diminuição da temperatura, como armazenamento em freezer, pode aumentar o tempo útil da solução. Em relação ao tempo, é desejável que as soluções sejam estáveis por dias ou meses, mas há alguns casos em que as soluções devem ser preparadas a cada vez que as amostras forem analisadas. Determinando-se a estabilidade das soluções, e a forma ideal de estocagem, o processo de validação pode ser otimizado.¹⁶

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto tem como objetivo desenvolver e validar os métodos de quantificação de MDMA em comprimidos por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Além disso, pretende-se caracterizar e quantificar amostras reais de comprimidos de *ecstasy* apreendidos pela Polícia Federal e avaliar o desempenho dos métodos validados na determinação do teor de MDMA nessas amostras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método de quantificação de MDMA por CG-DIC para inserção nas rotinas de análises da Polícia Federal.
- Desenvolver e validar um método de quantificação por RMN de ^1H para análises de drogas de abuso.
- Demonstrar a aplicação do método de quantificação por RMN de ^1H para MDMA.
- Caracterizar e quantificar comprimidos de *ecstasy*, contendo MDMA, apreendidos pela Polícia Federal.
- Avaliar possíveis correlações entre diferentes lotes de comprimidos.
- Comparar os resultados das quantificações das amostras reais por CG-DIC e RMN de ^1H .

3 MATERIAIS

3.1 VIDRARIA

- Almofariz e pistilo
- Balões volumétricos calibrados de 10 mL e 2 L
- Balão de fundo redondo
- Béquer de 50 mL
- Dispensador com capacidade para 10 mL
- *Erlenmeyers* de vidro de 50 mL
- Frasco de 2 L
- Frascos de vidro âmbar para descarte de solventes clorados
- *Vials* de 2 mL para amostrador automático com tampa de crimpagem com septo
- Tubos de RMN Wilmad® 600 MHz *economy* 5 mm ou Norell Select Series™ 600 MHz 5 mm

3.2 PADRÕES E REAGENTES

- Ácido Maleico: Sigma-Aldrich, > 99,0 % (grau HPLC)
- Ácido Maleico: Sigma-Aldrich, 99,99 %
- Aminopirina: Sigma-Aldrich, 99,1 %
- Anfetamina.HCl: Lipomed, 99,9%
- Benzocaína: Sigma, 99,9 %

- Cafeína: Acros Organics, 98,5 %
- Celulose microcristalina: Merck, >95%
- Clorofórmio P.A.: Tedia Brazil, grau HPLC
- Dietilamina P.A.: Sigma
- Diltiazem.HCl: Sigma, > 99 %
- Dimetilsulfona: Sigma-Aldrich, 99,73 %
- Dipentilftalato (Padrão interno): Acros Organics, 97,0 %
- Fenacetina: TCI-EP, 99,9 %
- Hidroxizina.2HCl: Sigma, ≥ 98 %
- Levamisol.HCl: Sigma, > 99 %
- Lidocaína.HCl.H₂O: Sigma, ≥ 97 %
- MDA.HCl: NMI, 99,5 %
- MDEA.HCl: Lipomed, 99,6 %
- MDMA.HCl: NMI, 99,6 %
- Mefedrona.HCl: LGC, 99,9 %
- Óxido de deutério: Sigma-Aldrich, 99,9 %
- Paracetamol: Tylenol®
- Procaína.HCl: Sigma, ≥ 97 %
- Sacarose: Merck, >95%
- TFMPP: Padrão de trabalho SEPLAB/PF
- TSP-d₄: Sigma-Aldrich, 98 %

3.3 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica: XP 205, Mettler Toledo, 0,01 mg.
- Centrífugas: Q-222-B, Quimis[®] e CR4i, Jouan, Thermo Electron Corporation[®].
- CG-DIC: Cromatógrafo gasoso Agilent Technologies[®] 6890N com detector de ionização em chama, colunas RXI-1MS ou DB-1MS Agilent Technologies[®], 25 m x 0,2 mm x 0,33 µm, injetor do tipo *split/splitless* e amostrador automático para líquidos Agilent Technologies[®] série 7693A com seringa de 10 µL. Os gases utilizados, da IBG, foram: ar sintético grau 5.0, gás hélio grau 5.0; gás hidrogênio grau 5.0; gás nitrogênio grau 5.0. O cromatógrafo foi acoplado a uma estação de trabalho com os *softwares* MSD ChemStation e Enhanced Data Analysis, ambos da Agilent Technologies[®], instalados para controle do sistema e análise de dados respectivamente.
- CG-EM: Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando cromatógrafo Agilent Technologies 6890N, detector seletivo de massas (operando a 70 eV) Agilent Technologies 5973 Inert, injetor automático Agilent Technologies 7693A Series e coluna Rxi-1MS.
- Digitalizador: VSC40, Foster+Freeman Video Spectral Comparator.
- FTIR-ATR: Espectrofotômetro de infravermelho (FTIR-ATR, do inglês *attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy*) iS10, Thermo Nicolet, com acessório de ATR Smart iTR diamante, 16 *scans*, resolução 4 cm⁻¹, espectro 4000-525 cm⁻¹. A estação de trabalho que estava conectada ao FTIR-ATR continha o *software* OMNIC 8 da Termo Fischer Scientific[®], para análise dos espectros adquiridos.
- Pipeta automática P5000 e P100: Gilson[®].
- RMN: Ressonância magnética nuclear Bruker Avance III HD, operando em campo magnético de 14 T e à frequência de ¹H de 600 MHz e equipado com sonda do tipo *broadband observe* (BBFO) 5 mm, situado no laboratório de RMN, no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília. Os espectros adquiridos foram processados utilizando-se o *software* Topspin 3.2 da Bruker[®].
- Rotaevaporador: Buchi[®].

- Ultrassom: 1510 Branson[®].
- Vórtex: Denley Vibromix, Thermo Electron Corporation[®].

3.4 AMOSTRAGEM

A partir de um conjunto de 148.268 comprimidos de *ecstasy*, contendo MDMA, apreendidos de 2011 a 2013 pela Polícia Federal em diversos pontos do país, foram encaminhados 682 comprimidos ao Instituto Nacional de Criminalística (INC) em Brasília, para análises do Projeto PeQui (Perfil Químico das Drogas), que foram separados em lotes para análise quantitativa de um comprimido de cada lote pelos métodos validados.

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE MDMA POR CG-DIC

4.1 INTRODUÇÃO

Na análise forense de drogas preconiza-se o uso de pelo menos duas técnicas analíticas distintas para a identificação inequívoca da substância. Geralmente, a droga é submetida a um teste preliminar, ou teste de triagem, que é simples e rápido, porém de baixa especificidade e pode apresentar resultados falso-positivos. Por isso, quando uma droga apresenta resultado positivo na triagem, dois métodos, mais específicos e com maior poder de discriminação, devem ser utilizados para a confirmação do resultado e a partir deles obtém-se o resultado definitivo. As técnicas de triagem comumente utilizadas nos laboratórios forenses são imunoenaios e testes colorimétricos, enquanto as técnicas usadas na análise confirmatória são cromatografia gasosa ou líquida de alta eficiência e espectrometria de massas.^{5,19,20}

A cromatografia gasosa (CG) é um método físico-químico empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação quantitativa de componentes químicos em misturas complexas. Os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte, denominado gás de arraste, que não interage com as moléculas do analito e cuja função é transportar o analito através da coluna. O controle da temperatura da coluna é um fator determinante para a separação dos analitos e obtenção de resultados precisos e reprodutíveis. A temperatura ótima depende dos pontos de ebulição dos componentes da amostra e do grau de separação que se almeja, uma vez que os tempos de retenção dependem das forças de interação dos analitos com a fase estacionária e das temperaturas de ebulição dos componentes da amostra.^{6,21,22,23}

Um dos detectores mais utilizados nos laboratórios forenses é o detector por ionização em chama (DIC) por ser aplicado com sucesso para a maioria dos compostos orgânicos. A técnica de CG-DIC baseia-se na comparação entre tempos de retenção do analito e do seu material de referência. Portanto, essa análise depende da disponibilidade de uma quantidade

suficiente de material de referência (padrão) dos analitos a serem determinados, tanto para a efetiva identificação por comparação de tempos de retenção, quanto para a construção das curvas analíticas, quando o objetivo é, também, quantificar.^{5,6,13,14}

Neste capítulo serão apresentados os métodos, resultados e discussões referentes à validação do método de quantificação de MDMA por CG-DIC.

4.2 MÉTODOS

A metodologia empregada teve como referência o método validado de determinação do teor de cocaína utilizado pelo laboratório de química forense da Polícia Federal em Brasília (SEPLAB/INC).¹⁵ Os parâmetros de aceitação utilizados nas figuras de mérito foram baseados, principalmente, no Procedimento Operacional Padrão (POP) do INC de validação de métodos de análises cromatográficas quantitativas e em bibliografia especializada. Um teste estatístico, teste de Grubbs, foi aplicado com o uso do *software* Minitab[®] em todos os conjuntos de análises para a identificação de *outliers*.¹¹

Em todas as análises uma solução estoque de padrão interno foi utilizada e 10 mL dessa solução foram dispensados diretamente sobre a amostra ou sobre o padrão de MDMA.HCl. As amostras reais com os registros 913/13 e 3267/13 foram usadas na análise de algumas figuras de mérito, como precisão, para suprir a baixa disponibilidade do padrão certificado de MDMA.HCl.

Um branco, solução com apenas clorofórmio, foi analisado no início, a cada cinco análises e ao final de todas as sequências de injeção no CG-DIC, para garantir que não tenha ocorrido *carry over* e assim evitar interferências.

4.2.1 Condições cromatográficas

Com injetor mantido a 280 °C, foi injetado 1 µL de amostra, com razão de *split* de 50:1. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. O forno foi

programado para se manter a temperatura inicial de 150 °C por 2 minutos, seguido de uma rampa de aquecimento de 30 °C/min até atingir 315 °C (mantida por 4,5 minutos), sendo o tempo total da análise de 12 minutos. O detector por ionização em chama foi mantido a 320 °C, com fluxo de hidrogênio (H₂) de 35,0 mL/min, fluxo de ar de 350,0 mL/min e fluxo de nitrogênio de 35,0 mL/min.

4.2.2 Preparo da solução de padrão interno

Aproximadamente 1024,00 mg de dipentilftalato (padrão interno) foram pesados em béquer, solubilizado em clorofórmio e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 2 L. O béquer foi lavado 5 vezes com clorofórmio e as soluções foram transferidas para o mesmo balão volumétrico. Após acrescentar aproximadamente 1 L de clorofórmio, 4 mL de dietilamina foi adicionada a esse balão, com o auxílio de uma pipeta automática, e o volume foi completado com clorofórmio. A solução de padrão interno (PI) foi então transferida para um frasco de 2 L, no qual foi colocado um dispensador de 10 mL.

A solução de PI foi conservada sob refrigeração por até 3 meses a partir da preparação, prazo no qual a estabilidade já foi demonstrada por estudos feitos por peritos do INC. Sempre que necessário, uma nova solução era preparada e a concentração anotada para ser posteriormente usada nos cálculos de concentração relativa.

4.2.3 Homogeneização das amostras reais

Cerca de 150 comprimidos da amostra de registro 3267/13 foram pulverizados e homogeneizados por 1 minuto com o auxílio de almofariz e pistilo. O pó foi então transferido para um balão de fundo redondo que foi conectado a um sistema de rotação, utilizando-se o rotaevaporador, por 5min. O pó foi devolvido a um almofariz e o procedimento homogeneização/rotação foi repetido mais 5 vezes. O pó obtido foi dividido em partes iguais e acondicionado em tubos plásticos. O mesmo método foi realizado com cerca de 40 comprimidos da amostra de registro 913/13.

4.2.4 Curva analítica

A linearidade foi demonstrada pela construção de uma curva analítica com valores de área relativa (Área MDMA.HCl/Área PI) versus concentração relativa (Concentração de MDMA.HCl/Concentração de PI). Foram preparadas, em triplicata, soluções com o padrão de MDMA.HCl em solução de padrão interno, em nove níveis de concentração, na faixa de 0,02 a 0,90 mg/mL. A média de cada ponto foi plotada em um gráfico e uma reta foi obtida pela aplicação da regressão linear pelo método dos quadrados mínimos, excluindo-se a origem como um dos pontos da curva.^{10,13,14}

A avaliação da linearidade foi feita pelo valor do coeficiente de determinação (R^2) que, para atender os critérios de aceitação do POP de validação do SEPLAB/INC, deve ser maior que 0,998 e pelo coeficiente de variação (CV) das replicatas de cada ponto de concentração, que deve ser igual ou inferior a 5 %.¹³

Os erros aleatórios e possíveis *outliers* foram avaliados pela construção de um gráfico de resíduos. Os resíduos foram calculados conforme a equação abaixo:

$$\text{Resíduos} = Y_{\text{curva}} - Y_{\text{exp}} \quad (2)$$

onde Y_{curva} é o valor da área relativa estimado pela curva analítica em cada ponto de concentração de MDMA.HCl e Y_{exp} é o valor da área relativa média obtida experimentalmente, ou seja, a partir dos cromatogramas, referente à mesma concentração. A distribuição dos resíduos no gráfico deve ser aleatória, não apresentando curvaturas ou tendências.¹⁰

4.2.5 Figuras de mérito

4.2.5.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada analisando-se três soluções: solução A contendo substâncias análogas ao MDMA (MDEA e MDA), mefedrona, paracetamol; solução B com

outros possíveis adulterantes (caféina, benzocaína, diltiazem, fenacetina, hidroxizina, levamisol, lidocaína, procaína e aminopirina) e solução C contendo anfetamina, além de MDEA e mefedrona. Todas as três soluções continham também, o padrão de MDMA e dipentilftalato, padrão interno do método. Cada analito foi analisado isoladamente para que os picos dos mesmos pudessem ser identificados também nos cromatogramas das misturas e para a identificação de eventuais interferências no sinal do MDMA. A escolha das substâncias a serem pesquisadas como possíveis interferentes foi feita após consulta à literatura e disponibilidade no laboratório.^{3,4,5}

O fator de retenção (k'), que é a medida do tempo de retenção (t_r) do analito sobre o tempo de retenção do solvente, foi calculado para o MDMA e, para a metodologia proposta, deve ser maior que 2. A resolução (R_s), que é a medida da separação entre dois picos, deve ser maior que 1,5 para o MDMA e é calculada conforme a equação abaixo:

$$R_s = \frac{\Delta t_r}{\frac{(w_a + w_b)}{2}} \quad (3)$$

onde Δt_r é a distância entre o centro de dois picos consecutivos e w é a largura das bases desses picos.^{11,16}

4.2.5.2 Precisão

Os testes de precisão foram realizados em três experimentos diferentes: repetitividade do equipamento, repetitividade do método e precisão intermediária. Nos dois últimos testes, amostras reais e homogêneas contendo MDMA.HCl foram usadas sem prejuízo para a análise dos resultados.

A repetitividade do equipamento foi avaliada analisando-se três soluções, cada uma em um nível de concentração de MDMA.HCl (baixo, médio, alto). Cada solução foi injetada seis vezes no CG e os valores dos coeficientes de variação para cada nível de concentração foram avaliados, devendo ser igual ou inferior a 5 %.¹⁶

A repetitividade do método foi avaliada a partir dos coeficientes de variação de amostras contendo MDMA.HCl. Seis replicatas para cada nível de concentração (baixo,

médio, alto) foram preparadas e analisadas por um mesmo analista, em um mesmo dia, no mesmo equipamento e em um mesmo laboratório, totalizando 18 preparações. O CV para cada nível de concentração deve ser igual ou inferior a 10 %.^{11,15,16}

A precisão intermediária foi avaliada através da análise de amostras contendo MDMA.HCl em três ensaios independentes: a) mesmo analista, dias diferentes, mesmo equipamento; b) mesmo analista, mesmo dia, equipamentos diferentes; c) analistas diferentes, mesmo dia, mesmo equipamento. Em cada ensaio, foram preparadas seis replicatas das soluções contendo MDMA.HCl para cada condição, em três níveis de concentração (baixo, médio, alto). A avaliação foi feita pelo coeficiente de variação, que deve ser inferior a 10 % para cada nível de concentração em todos os ensaios realizados.^{11,16}

4.2.5.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através da preparação de misturas contendo o analito de interesse, MDMA.HCl padrão, e celulose, matriz semelhante à encontrada em amostras reais, em 3 níveis de concentração (baixo, médio, alto), dentro da faixa linear do método. O MDMA.HCl e a celulose foram pesados diretamente em um mesmo *erlenmeyer* e as massas individuais foram somadas, para simular a massa de uma amostra, sendo o resultado considerado como massa total. Para cada nível de concentração foram preparadas três soluções.^{11,15,16}

Os valores de área relativa calculados a partir dos cromatogramas foram usados no cálculo das concentrações de MDMA.HCl, a partir da equação da reta. Esses valores e a massa total foram usados no cálculo da pureza experimental. A pureza dada pelo certificado do MDMA.HCl padrão ($P_{\text{certificado}}$) foi utilizada, juntamente das massas pesadas, no cálculo da pureza de referência ($P_{\text{referência}}$), conforme a equação abaixo:

$$P_{\text{referência}} = \frac{\text{massa MDMA padrão} \times P_{\text{certificado}}}{\text{massa total}} \quad (4)$$

O erro relativo (ER), expresso em porcentagem, deve ser inferior a $\pm 10\%$ para cada solução e foi calculado conforme a equação a seguir:^{11,16}

$$ER \% = \frac{P_{prefer\hat{e}ncia} - P_{experimental}}{P_{prefer\hat{e}ncia}} \times 100 \quad (5)$$

4.2.5.4 Robustez

A robustez foi avaliada em dois testes separados. No teste A, analisou-se uma solução, preparada em triplicata, contendo MDMA.HCl padrão e interferentes que possuem tempo de retenção no método próximo ao do MDMA.HCl (MDEA.HCl, MDA.HCl, mefedrona.HCl, cafeína e paracetamol). Foram realizadas variações controladas no método proposto em cinco parâmetros críticos para a cromatografia gasosa, através de um planejamento fatorial fracionado, baseado na abordagem de Youden, que resultou em 8 ensaios. No experimento variou-se, para mais e para menos, fluxo/vazão do gás de arraste, temperaturas do injetor e do forno de colunas, razão do *split* do injetor e volume de amostra injetado, conforme descrito na Tabela 1.^{11,16,17}

Tabela 1 - Parâmetros e ensaios utilizados na robustez (CG-DIC)

Parâmetro	Original		Ensaio com variações controladas						
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Fluxo (mL min ⁻¹)	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	1,1	1,1	1,1	1,1
T _{injetor} (°C)	280	285	285	275	275	285	285	275	275
T _{forno} (°C)	150	155	145	155	145	155	145	155	145
Razão Split	50	55	55	45	45	45	45	55	55
V _{injeção} (µL)	1,0	1,1	0,9	1,1	0,9	0,9	1,1	0,9	1,1

O efeito das variações de cada parâmetro foi estimado calculando-se o erro relativo da concentração média de MDMA.HCl da triplicata nas 4 análises em que o parâmetro estava em

uma mesma condição ($C_{\text{experimental}}$) com a concentração de referência ($C_{\text{referência}}$), concentração média obtida pelas soluções injetadas nos parâmetros originais do método. O erro relativo não deve ser superior a $\pm 10\%$ e foi calculado segundo a equação abaixo:

$$ER \% = \frac{C_{\text{referencia}} - C_{\text{experimental}}}{C_{\text{referência}}} \times 100 \quad (6)$$

Além disso, os coeficientes de variação para as concentrações média de MDMA.HCl das replicatas em cada ensaio deve ser inferior a 10% e a resolução cromatográfica média (R_s média), maior que 2,0 para o MDMA em todos os ensaios.^{16,17}

Um segundo teste de robustez, teste B, foi realizado para avaliar o uso de dispensador ou de balão volumétrico calibrado na etapa de dissolução da amostra. Uma mesma amostra contendo MDMA.HCl foi analisada seguindo o método com balão volumétrico e com o dispensador na medida do volume da solução de PI adicionado à amostra. Foram preparadas seis replicatas para cada método, totalizando-se 12 soluções. A pureza da amostra obtida com o uso do dispensador não pode ter erro relativo superior a 10% em relação àquela obtida com o balão volumétrico para que o método seja considerado robusto em relação ao uso do dispensador. Os coeficientes de variação para as concentrações média de MDMA.HCl nas replicatas em cada ensaio deve ser inferior a 10% .

4.2.5.5 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada pela preparação de soluções de MDMA.HCl, em duplicada, em concentrações baixa, média e alta, dentro da faixa linear do método. As soluções foram analisadas após períodos de tempos considerados adequados aos propósitos do método. Para análise da estabilidade em temperatura ambiente, as soluções foram mantidas sobre a bancada e analisadas no dia da preparação e após 2 semanas. Outras frações das soluções foram mantidas em congelador, à temperatura de $-15\text{ }^\circ\text{C}$, e também analisadas no dia do preparo e após 3, 14, 30 e 60 dias. As soluções são consideradas estáveis quando o erro relativo da pureza média do MDMA.HCl obtida após o período avaliado (P_n) não for superior a $\pm 5\%$ em

relação ao valor calculado no dia do preparo (P1) para todos os níveis de concentração.^{5,16} O cálculo do erro relativo foi feito conforme a equação abaixo:

$$ER \% = \frac{P_1 - P_n}{P_1} \times 100 \quad (7)$$

4.2.5.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados por extrapolação da curva analítica. Os cálculos foram feitos conforme as equações a seguir:

$$LD = 3 \times \frac{s_b}{a} \quad (8)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s_b}{a} \quad (9)$$

onde s_b é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e a é a inclinação da curva analítica.

Uma avaliação experimental dos limites também foi realizada através de diluições sucessivas de uma solução de MDMA.HCl. Foram analisadas três soluções para cada nível de concentração e o CV das mesmas deve ser inferior a 10 % para o LQ. Outra maneira de se determinar o LD e o LQ é pela avaliação da relação sinal/ruído, que deve ser superior a 3 para LD e a 10 para LQ.^{13,14,16}

4.2.5.7 Estimativa da incerteza de medição

A incerteza de medição do método foi estimada utilizando a abordagem *bottom-up*, ou método clássico, que pode ser dividida em 4 etapas: especificação do mensurando; identificação das fontes de incerteza; quantificação das incertezas de cada fontes e cálculo da incerteza padrão combinada e da incerteza expandida, conforme descrito, em detalhes, no Apêndice A.^{12,18}

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O CG-DIC foi o equipamento escolhido para o desenvolvimento e validação de uma metodologia quantitativa para MDMA por estar presente na maioria dos laboratórios forenses e por ser uma técnica comumente utilizada nas análises de drogas de abuso, de fácil operação e que fornece resultados reconhecidamente satisfatórios em procedimentos legais. O método de análise quantitativa para MDMA se baseou em um método já utilizado no Projeto PeQui da Polícia Federal para a quantificação da cocaína. A validação feita neste trabalho teve o objetivo de ampliar a aplicação do referido método, ajustando-o no que fosse necessário para aplicação na quantificação de MDMA, e, assim, facilitar a implementação da análise na rotina do laboratório de química forense do INC. Poucas mudanças foram necessárias e ocorreram no preparo de amostra, uma vez que a maioria das amostras de cocaína analisada no INC apresenta alta pureza, realidade que não se aplica aos comprimidos de *ecstasy*. A solução de padrão interno tem pH básico, devido à dietilamina adicionada à solução, garantindo que os analitos estejam na sua forma de base livre e sejam adequadamente vaporizados no injetor na quantificação por CG-DIC.

Verificou-se que as análises de precisão, de estabilidade e até mesmo de robustez podem ser feitas com amostras reais contendo MDMA, uma vez que os resultados são comparados entre si, avaliando-se o coeficiente de variação encontrado para cada figura de mérito, ou seja, os resultados não precisam ser confrontados com um valor de referência, previamente definido. O principal cuidado ao utilizar amostras reais é garantir que sejam homogêneas, motivo pelo qual neste estudo foi realizado um procedimento exaustivo de

pulverização e mistura nestas amostras. Dessa forma, o MDMA padrão adquirido com tanta dificuldade pode ser poupado para as análises que exijam obrigatoriamente o uso de um material certificado. Além disso, a aplicação de alguns testes em amostras reais aumenta a confiabilidade nos resultados, uma vez que os comprimidos de *ecstasy* não apresentam alta pureza e podem apresentar efeitos de matriz.

4.3.1 Curva analítica

Conforme apresentado na Figura 4, o método se mostrou capaz de manter a resposta de área relativa diretamente proporcional à concentração de MDMA.HCl, podendo ser considerado um método linear em toda faixa de concentração estudada. Os coeficientes de variação obtidos foram menores que 2,0 % em todos os pontos e o coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99987, valores dentro dos limites de aceitação. No gráfico (Figura 4) os valores de concentração relativa foram utilizados no eixo x, pois essa é a forma utilizada no laboratório da PF. Uma alternativa seria apresentar os valores de concentração do MDMA no eixo x e adicionar um fator de correção para normalizar o resultado de acordo com a concentração do padrão de cada nova solução de padrão interno preparada.

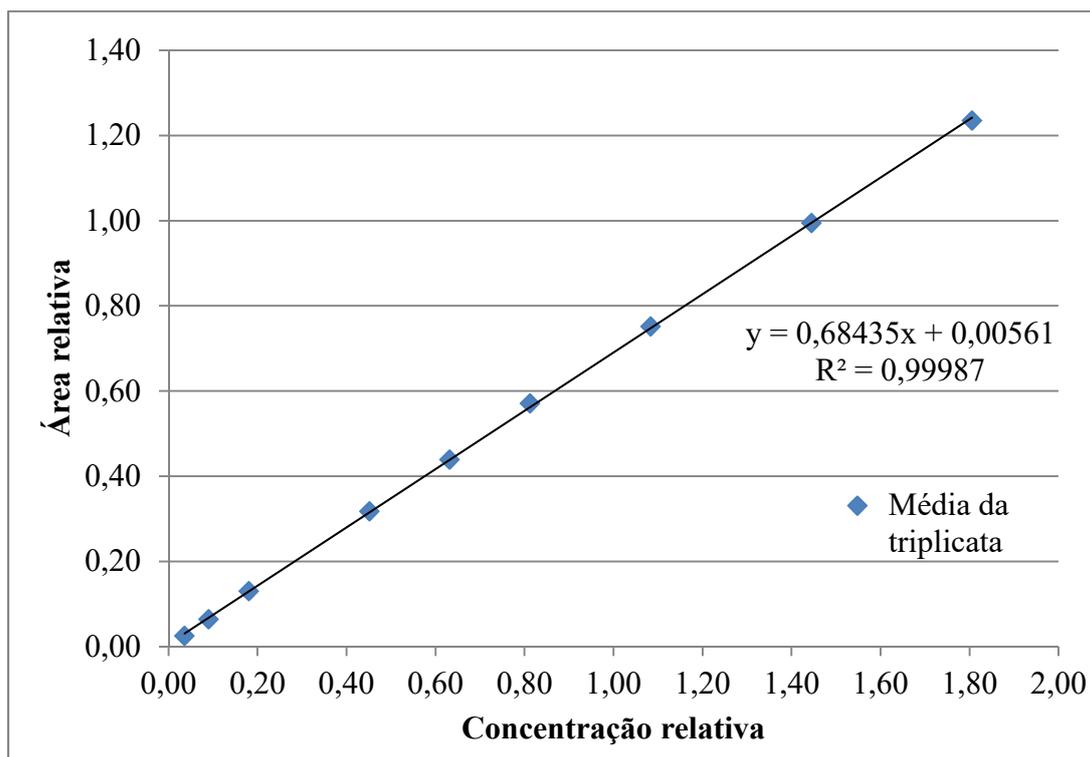


Figura 4 - Gráfico da curva analítica do MDMA.HCl

No gráfico de resíduos versus concentração de MDMA.HCl (Figura 5) nota-se uma leve curvatura negativa para os pontos de concentração médios e uma positiva para pontos de concentração baixos e altos. Porém, como os valores de resíduos tiveram variações menores que 0,01, a discreta tendência curvilínea observada não influenciou significativamente o método e pode ser consequência da avaliação de poucos pontos ao longo da curva analítica ou da injeção sequencial dos pontos feita no CG-DIC.

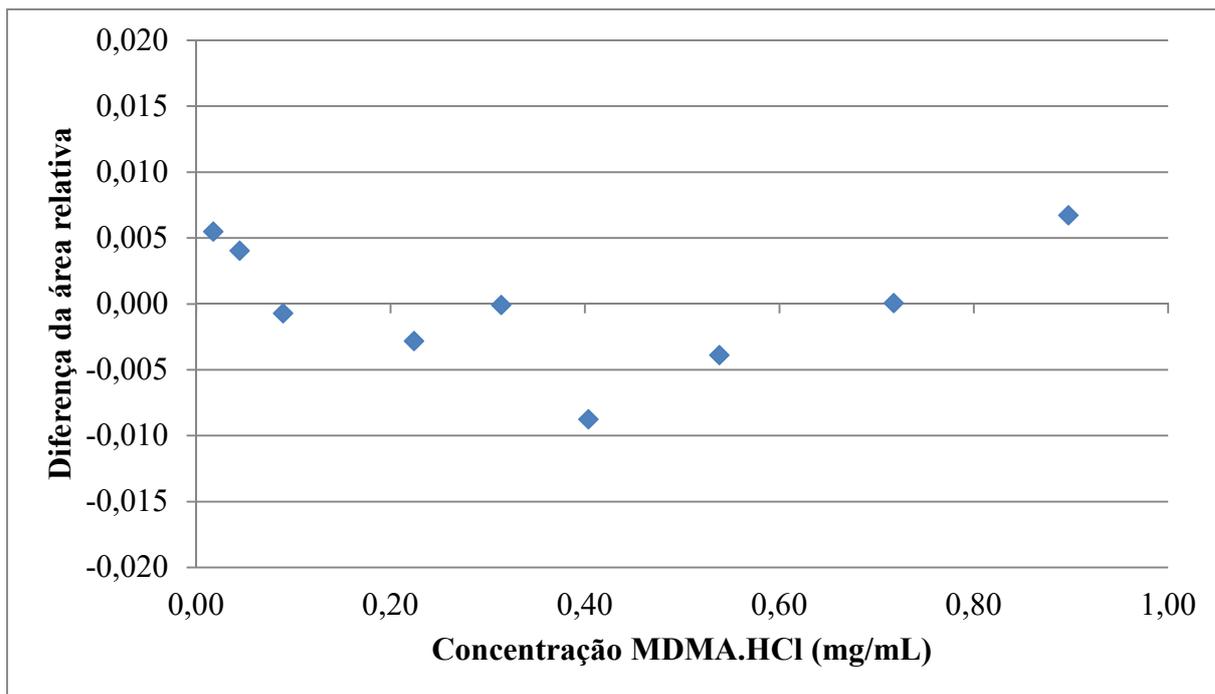


Figura 5 – Gráfico de resíduos da curva analítica do MDMA.HCl

4.3.2 Figuras de mérito

4.3.2.1 Seletividade

A análise dos cromatogramas obtidos mostra que o método é seletivo para o MDMA, uma vez que não foram observados interferentes na sua zona de eluição oriundos de brancos, padrão interno, matriz e nem de possíveis adulterantes. Diversas substâncias proscritas que podem ser encontradas nos comprimidos de *ecstasy*, como a anfetamina, seus análogos (MDEA, MDA) e outros estimulantes (mefedrona), foram testadas. Da mesma forma, adulterantes, como fármacos estimulantes (caféina), analgésicos (aminopirina, paracetamol, fenacetina), anestésicos (benzocaína, lidocaína, procaína) e outras substâncias utilizadas na terapêutica (diltiazem, hidroxizina, levamisol), podem ser utilizadas em um contexto de fabricação ilícita do *ecstasy* e também foram analisadas para demonstrar a adequada seletividade do método em separá-los do MDMA. A Figura 6 apresenta os cromatogramas, no intervalo de 2 a 8 minutos, das três soluções analisadas. O fator de retenção foi maior que 2 para o MDMA no método proposto e a resolução foi maior que 1,5 para o MDMA,

considerando os analitos que eluíram antes (MDA e mefedrona) e logo após ao MDMA (MDEA e o benzocaína), demonstrando uma boa separação do método a esse analito (Tabela 2). Nenhum adulterante eluiu próximo ao padrão interno (dipentilftalato), não interferindo no cálculo da área relativa.

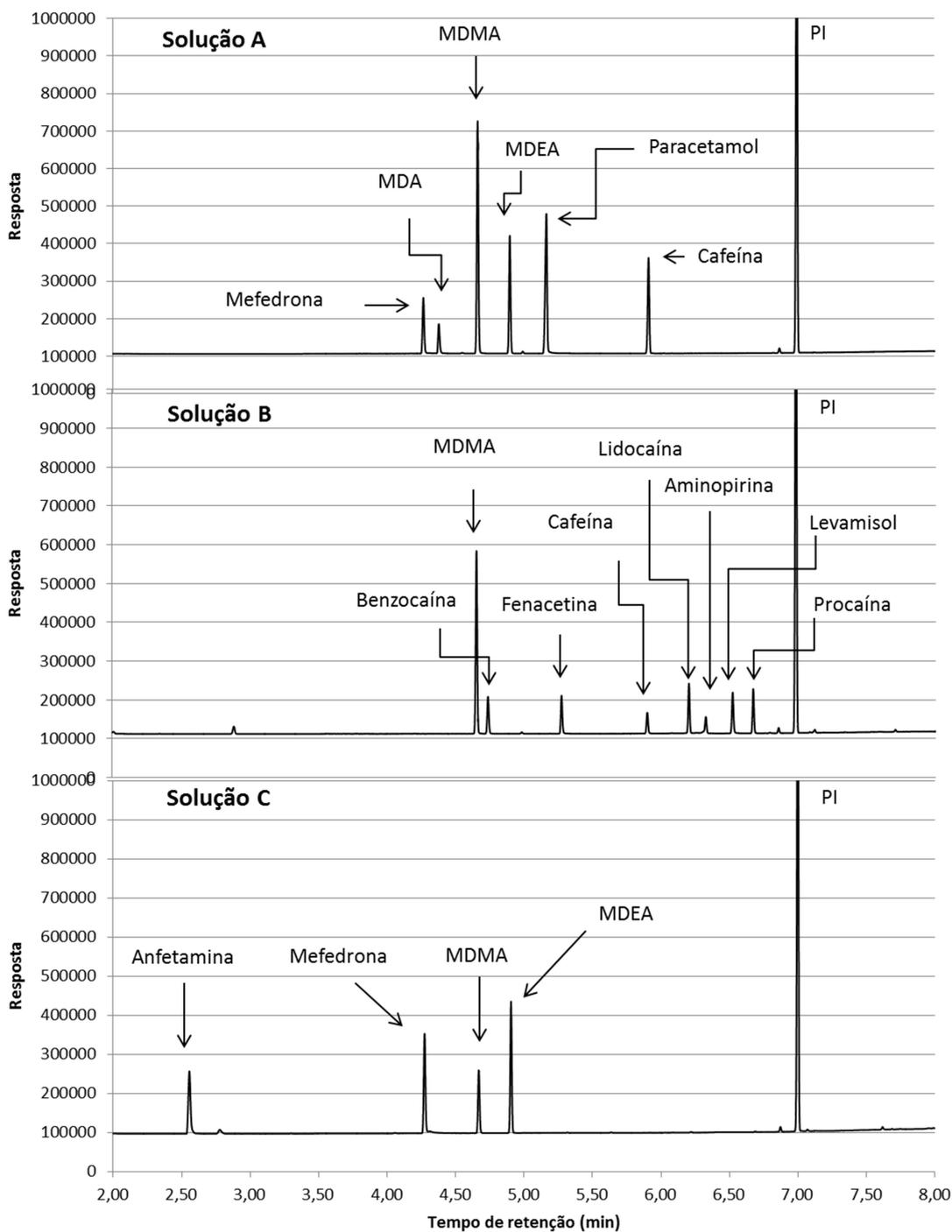


Figura 6 – Cromatogramas das soluções A, B e C da seletividade

Tabela 2 – Seletividade do método ao MDMA.HCl (CG-DIC)

Solução	Analito	R(s)
Solução A	MDMA - MDA	8,32
Solução A	MDMA - MDEA	7,70
Solução B	MDMA - Benzocaína	4,36
Solução C	MDMA - Mefedrona	15,23
Solução C	MDMA - MDEA	8,25

4.3.2.2 Precisão

Todas as análises de precisão foram feitas em três níveis de concentração, desta forma foi possível avaliar se os resultados foram satisfatórios ao longo da faixa de concentração estudada. O método apresentou valores de coeficiente de variação dentro dos limites definidos como critérios de aceitação e dessa forma, demonstrou ser um método preciso. A repetitividade do equipamento apresentou um CV menor que 0,2 % em todos os níveis de concentração (Tabela 3), enquanto que para a repetitividade do método (Tabela 4) e precisão intermediária (Tabela 5) esse valor foi menor que 3,0 %. Amostras reais foram utilizadas nos testes de repetitividade do método e precisão intermediária, por esse motivo, espera-se um desvio padrão, e conseqüentemente um CV, um pouco maior do que os valores obtidos nas outras figuras de mérito uma vez que essas amostras possuem vários componentes e baixa pureza, sendo difícil atingir um grau de homogeneidade comparável à de um padrão certificado. O teste de Grubbs identificou um *outlier* na precisão intermediária, no nível de concentração alto do ensaio C (Figura 30 - Apêndice B), e esse valor foi retirado dos cálculos.

Tabela 3 – Repetitividade do equipamento para MDMA.HCl (CG-DIC)

Nível de concentração	Pureza Média (%)	CV (%)
Baixo	14,4	0,18
Médio	33,3	0,12
Alto	60,8	0,05

Tabela 4 – Repetitividade do método (Intradia) para MDMA.HCl (CG-DIC)

Nível de concentração	Pureza Média (%)	CV (%)
Baixo	21,2	2,15
Médio	41,8	2,16
Alto	83,4	0,79

Tabela 5 – Precisão intermediária para MDMA.HCl (CG-DIC) – Ensaio **A** (mesmo analista, dias diferentes, mesmo equipamento); **B** (mesmo analista, mesmo dia, equipamentos diferentes) e **C** (analistas diferentes, mesmo dia, mesmo equipamento)

Nível de concentração (Pureza média - %)	Coeficiente de variação (%)		
	A	B	C
Baixo (21,3)	2,54	1,65	2,50
Médio (42,2)	2,22	1,81	2,90
Alto (83,7)	1,25	0,83	0,86

4.3.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi demonstrada através de um teste de recuperação, dessa maneira, avaliou-se a eficiência do método na extração e quantificação do analito na presença da matriz. Para isso uma mistura foi preparada com o objetivo de simular a composição típica

de um comprimido de *ecstasy*. Utilizou-se MDMA.HCl padrão e a celulose, que é um dos principais excipientes encontrados nas amostras reais. O método foi considerado exato, uma vez que os valores de erro relativo encontrados, considerando todas as replicatas e os três níveis de concentração, ficaram dentro da faixa de -3,10 % a 3,58 % (Figura 7), dentro do limite estabelecido de ± 10 %.

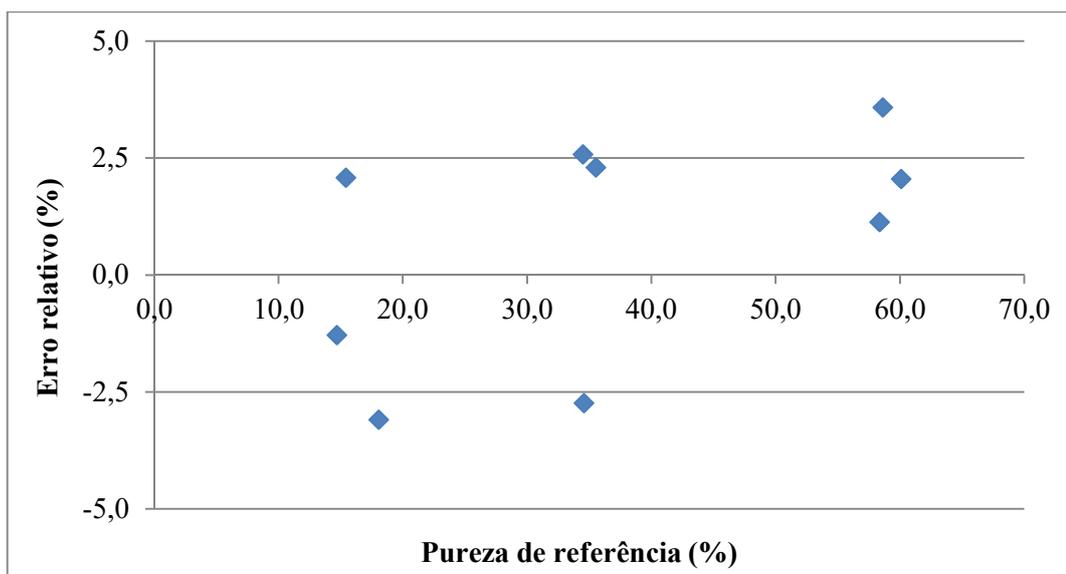


Figura 7 – Gráfico com os valores de erros relativos

4.3.2.4 Robustez

O método se mostrou robusto frente às variações realizadas no teste A (Tabela 1). Os coeficientes de variação foram menores que 0,5 % em todos os ensaios (Tabela 6), valor dentro dos 10 % estipulados como limite, o que demonstra uma boa repetitividade do teste e a baixa ocorrência de erros aleatórios. Após os cálculos, foi possível separar o resultado e avaliar cada variável, nas duas condições analisadas. O erro relativo da concentração média em relação ao método original não foi superior a 0,25 % em nenhuma das variáveis, valor também dentro do critério de aceitação definido em 10 %, e a resolução média do MDMA se manteve acima de 2,0, o que indica uma boa separação entre o pico de MDMA e os outros analitos (Tabela 7). Logo, pode-se dizer que nenhuma variação testada influencia significativamente na resposta analítica.

Tabela 6 – Coeficiente de variação da concentração média de MDMA.HCl para cada ensaio de robustez - Teste A (CG-DIC)

Teste A									
Ensaio	0	1	2	3	4	5	6	7	8
CV (%)	0,28	0,31	0,54	0,33	0,37	0,38	0,44	0,36	0,32

Tabela 7 – Resultado da robustez - Teste A (CG-DIC)

MDMA.HCl					
Parâmetro	Valores	Resolução Média	Concentração Média (mg/mL)	Referência	Erro relativo (%)
Fluxo (mL/min)	1,1	11,029	0,3279	0,3287	0,229
	0,9	9,026	0,3295	0,3287	-0,247
T _{injetor} (°C)	285	9,972	0,3287	0,3287	-0,017
	275	10,082	0,3287	0,3287	-0,001
T _{forno} (°C)	155	9,967	0,3286	0,3287	0,017
	145	10,087	0,3288	0,3287	-0,034
Razão Split	55	9,515	0,3285	0,3287	0,044
	45	10,539	0,3289	0,3287	-0,062
V _{injeção} (µL)	1,1	10,338	0,3290	0,3287	-0,092
	0,9	9,716	0,3284	0,3287	0,075

As análises quantitativas podem ser realizadas tanto com o balão volumétrico quanto com o dispensador, pois o teste B da robustez resultou em um erro relativo entre as purezas médias de apenas 1,2 % (Tabela 8). O coeficiente de variação foi menor que 2,0 % nas repetições feitas em cada experimento e na soma de todos os resultados, demonstrando, assim, que os erros aleatórios são baixos, dentro dos valores obtidos na repetitividade do método.

Como não há variação significativa entre os dois métodos, o balão volumétrico e o dispensador podem ser usados, de acordo com a disponibilidade e conveniência do laboratório.

Tabela 8 – Coeficiente de variação da robustez - Teste B para MDMA.HCl (CG-DIC)

Teste B	Balão Volumétrico	Dispensador	Média	Erro relativo (%)
Pureza média (%)	40,8	41,3	41,0	1,2
CV (%)	1,7	1,5	1,7	

4.3.2.5 Estabilidade

O tempo de estocagem no freezer, a -15°C , em que a estabilidade foi demonstrada foi de 2 meses. Para o armazenamento à temperatura ambiente, a estabilidade demonstrada foi de 13 dias. Os tempos de estocagem máximos podem ser maiores, porém outros testes deveriam ser realizados para comprovar. Os erros relativos das médias das soluções de MDMA.HCl encontrados foram menores que $\pm 5,0\%$ (Tabela 9) na estabilidade em temperatura ambiente e após armazenamento em freezer, valor do limite estabelecido. O clorofórmio é um solvente muito volátil, porém, como a quantificação é feita com o uso de um padrão interno, caso ocorra perda de solvente, a proporção relativa entre o MDMA.HCl e o dipentilftalato se mantém inalterada. Com isso, o valor de pureza calculado pelo método não muda significativamente caso haja alguma perda de solvente por evaporação.

Tabela 9 – Estabilidade das soluções de MDMA.HCl (CG-DIC)

Armazenamento	Erro Relativo (%)		
	Concentração Baixa	Concentração Média	Concentração Alta
13 dias (temp. ambiente)	1,19	-0,77	-0,57
60 dias (-15 °C)	-4,94	-2,48	-2,68

4.3.2.6 Limites de detecção e quantificação

Os experimentos de LD e LQ pela relação sinal/ruído foram realizados a partir dos cromatogramas das soluções diluídas (Tabela 10). Os pontos de diluição 2 e 3 correspondem ao LQ e LD, respectivamente. O CV para o LQ obtido experimentalmente, nível 2 (9,6 mg/L de MDMA.HCl), foi de 2,92 %, estando dentro do critério de aceitação. Já os valores de LD e LQ obtidos pela extrapolação da curva analítica apresentaram valores maiores (Tabela 11) para a concentração de MDMA.HCl referente ao LD e ao LQ (0,0034 mg/mL e 0,0112 mg/mL, respectivamente).

Tabela 10 – Relação sinal/ruído e cálculos para LD e LQ (CG-DIC)

Nível de diluição	Concentração de MDMA.HCl real (mg/mL)	Relação Sinal/Ruído	
		>3 (LD)	>10 (LQ)
1	0,0192	Sim	Sim
2	0,0096	Sim	Sim
3	0,0019	Sim	Não
4	0,0010	Não	Não
5	0,0002	Não	Não

Tabela 11 – Valores de LD e LQ calculados pela extrapolação da curva (CG-DIC)

	LD	LQ
Concentração relativa (mg/mL)	0,0068	0,0226
Concentração de MDMA (mg/mL)	0,0034	0,0112
Pureza - para 10,5g de amostra (%)	0,3	1,1

Os limites de detecção e quantificação obtidos pelas duas formas de cálculo foram concordantes e os valores utilizados como os resultados da validação foram os calculados a partir da curva analítica, por serem ligeiramente mais conservadores. Esses valores estão dentro do aceitável para a proposta do método uma vez que representam, em uma análise hipotética de uma amostra real, purezas de 0,3 % (LD) e 1,1 % (LQ), baseando os cálculos em uma pesagem de 10,5 mg de um comprimido para a análise. Esses valores de pureza já estão abaixo da faixa de concentração usualmente encontrada em comprimidos de *ecstasy*. Nas análises realizadas em amostras reais nesse estudo, por exemplo, a menor pureza encontrada foi de 10 %.

4.3.2.7 Estimativa da incerteza de medição

Os valores adimensionais das incertezas padrão de cada componente da incerteza (μ pad) estão apresentados na Tabela 12, assim como a contribuição de cada uma. O componente que contribui com mais de 95 % no resultado da incerteza padrão combinada foi a recuperação do método. Esta contribuição poderia ser reduzida se os experimentos de exatidão pudessem ser refeitos, com cuidados adicionais e por um analista treinado, ou através de uma eventual alteração do método de preparo de amostra. Porém, como não está disponível mais material de referência certificado para repetir o experimento e, além disso, o método mostrou precisão e exatidão adequadas aos parâmetros de aceitação normatizados, não foi considerado necessário realizar novos experimentos para alterar a metodologia e buscar uma incerteza menor para a recuperação.

Tabela 12 – Valores das incertezas de cada componente e suas contribuições (CG-DIC)

Componentes da incerteza	μ pad (valor adimensional)	$(\mu \text{ pad})^2$	Contribuição para incerteza (%)
μR_{area}	$2,00 \times 10^{-4}$	$4,01 \times 10^{-8}$	0,00
μ_{cc}	$3,14 \times 10^{-3}$	$9,83 \times 10^{-6}$	1,00
μM_{amostra}	$-1,00 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-12}$	0,00
μC_{PI}	$2,64 \times 10^{-13}$	$6,99 \times 10^{-26}$	0,00
μV_{PI}	$1,04 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^{-8}$	0,00
μP_{MDMA}	$4,51 \times 10^{-3}$	$2,04 \times 10^{-5}$	2,06
μRec	$3,09 \times 10^{-2}$	$9,57 \times 10^{-4}$	96,94
Soma dos quadrados		$9,87 \times 10^{-4}$	100,00
Incerteza padrão combinada (μ)		0,0314	

Para se obter a incerteza expandida do método (U_{amostra}), com 95 % de intervalo de confiança, multiplica-se a incerteza padrão combinada ($\mu = 0,0314$), pelo fator de abrangência de 95 % ($k_{95\%} = 2$) e pela pureza da amostra. Logo, deve-se multiplicar a pureza da amostra, em porcentagem por 6,28 %. Para exemplificar o valor da incerteza expandida de amostras, a Tabela 13 apresenta três valores hipotéticos de pureza, em 3 níveis de pureza de MDMA (baixo, médio e alto), dentro da curva analítica. O valor da incerteza expandida é considerado muito bom para o propósito do método de quantificar o MDMA.HCl em comprimidos de *ecstasy*.

Tabela 13 - Incerteza expandida (CG-DIC) de 3 amostras hipotéticas

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Pureza da amostra (P_{amostra}) (%)	5,0	40,0	80,0
Incerteza expandida (U_{amostra}) (%)	0,3	2,5	5,0

5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR RMN de ^1H

5.1 INTRODUÇÃO

Usualmente, a espectroscopia de RMN tem sido utilizada para a determinação de estruturas químicas, em particular de moléculas orgânicas. A técnica se baseia na aplicação de um campo magnético intenso na amostra que, devido às propriedades do spin nuclear, faz com que alguns núcleos precessem no seu próprio eixo de rotação com uma frequência angular definida (Frequência de Larmor). Se uma radiação nessa mesma frequência for fornecida ao núcleo em precessão, a energia é absorvida, causando mudança do estado energético do spin. O espectro é, então, obtido através da emissão da energia absorvida pelo núcleo. O número de sinais do espectro será corresponde ao número de núcleos em ambientes químicos distintos da molécula.^{22,24}

No caso de análises quantitativas, a espectroscopia de RMN de hidrogênio (RMN de ^1H) pode ser utilizada como uma importante ferramenta, uma vez que existe uma proporcionalidade direta entre a área de um sinal e o número de núcleos responsáveis por este sinal, desde que se respeitem certos parâmetros de aquisição e processamento dos espectros. Logo, se um sinal de ressonância do analito de interesse não se sobrepõe aos sinais de outros constituintes da amostra, este pode ser usado para determinar a concentração do respectivo analito, desde que o número de prótons correspondente àquele sinal seja conhecido. Essa é uma grande vantagem dessa técnica, pois não requer padrões do analito de interesse para a calibração e, além disso, permite a determinação quantitativa de mais de um composto simultaneamente.^{22,23,25,26,27}

A quantificação pode ser realizada a partir do uso de um padrão interno, que deve ser uma substância quimicamente estável, inerte, não higroscópica, não volátil e de concentração conhecida. O composto a ser utilizado como padrão interno deve ser solúvel no solvente da matriz e o deslocamento químico do sinal a ser utilizado na quantificação não deve se sobrepor aos sinais da amostra. Para calcular a pureza do analito leva-se em conta, além da

pureza do padrão interno, a área absoluta dos sinais, o número de prótons desses sinais, a massa molecular e a massa gravimétrica do padrão interno e da amostra.^{25,26,27,28}

Existem vários fatores importantes nas análises quantitativas por RMN, um deles é evitar efeitos diferenciais de saturação. É essencial que ocorra total relaxação dos spins entre os pulsos, o que demanda um tempo entre os transientes (*scans*) de pelo menos 5 vezes o T_1 (tempo de relaxação longitudinal) do núcleo mais lento, dentre os que serão quantificados. Se isso não for respeitado, pode ocorrer uma redução substancial da relação sinal/ruído e perda da proporcionalidade da área do sinal analítico com a concentração do analito de interesse. Além disso, a magnetização resultante pode, ao longo dos *scans*, no caso extremo, não ter tempo de se recuperar e ocorrer supressão do sinal, denominada de saturação. Outros exemplos de fatores que devem ser respeitados para que essa proporcionalidade seja garantida e para a aquisição de um espectro com uma adequada relação sinal/ruído são: aquisição de um sinal simétrico e com coerência de fase e evitar ganho de sinal pelo efeito Overhauser nuclear (NOE, do inglês *nuclear Overhauser effect*).²⁹

Na maior parte dos casos a quantificação por RMN envolve a utilização de espectros de RMN de ^1H . O uso do sinal de ^1H é mais apropriado, uma vez que o valor do T_1 desse núcleo é tipicamente menor do que os valores de outros núcleos utilizados nas análises por RMN. Além disso, um espectro com relação sinal/ruído adequada pode ser obtido em um tempo menor, devido à elevada abundância natural do hidrogênio (99,98%), ao alto valor da sua constante magnetogírica, entre outros fatores. Dessa forma, é possível garantir uma boa proporcionalidade entre área dos sinais e concentração do analito, com um tempo razoável de análise.^{24,29}

Um solvente deuterado é normalmente utilizado nas análises por RMN, uma vez que os espectrômetros de RMN modernos se amparam em canal exclusivo de deutério para garantir a estabilidade (*lock*) e homogeneidade (*shimming*) do campo magnético. É uma prática comum adicionar a soluções que serão analisadas no RMN um composto para ser a referência no espectro. Em solventes orgânicos a referência comumente utilizada é o tetrametilsilano (TMS) e o equivalente, solúvel em óxido de deutério (D_2O), é o 3-trimetilsilil-propionato- d_4 de sódio, ou sal do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-2,2,3,3- d_4 (TSP- d_4), ambos possuem um único sinal que é atribuído a 0.0 ppm.^{24,29}

A maioria dos métodos utilizados nas análises forenses de drogas de abuso, como o CG-DIC, necessita do padrão certificado do material para que se possa fazer a identificação e

quantificação da amostra. O acesso a padrões de drogas de abuso no Brasil é tradicionalmente muito restrito, pois são de difícil importação ou são muito caros. Nesse cenário, o desenvolvimento de um método de quantificação de drogas de abuso por ressonância magnética nuclear (RMN) é de grande aplicabilidade, uma vez que essa técnica oferece uma alternativa ao uso de um padrão certificado da amostra, que é dispensável tanto para a identificação, quanto para análise quantitativa.^{5,6,14}

Neste capítulo serão apresentados os métodos, resultados e discussões referentes à validação do método de quantificação por RMN de ^1H para aplicação em drogas sintéticas de modo geral, à aplicação do método em MDMA.HCl padrão e à comparação dos resultados com o método validado de quantificação de MDMA.HCl por CG-DIC.

5.2 MÉTODOS

A metodologia desenvolvida utilizou o método de padrão interno para se obter, após a integração dos espectros de RMN de ^1H , os valores de área referentes aos hidrogênios do analito e do padrão interno. Os parâmetros de aquisição e processamento utilizados como ponto de partida neste trabalho foram os descritos por Hays (2005).²⁵

Para a etapa de validação, a referência principal foi o artigo de Malz & Jancke (2005). O ácido maleico (AM) e a dimetilsulfona (DMS) são muito utilizados como padrão interno em análises quantitativas por RMN e padrões (MRC) destes dois reagentes foram usados para avaliar as figuras de mérito, no qual o AM foi definido como padrão interno e o DMS, como o analito a ser quantificado. Os analitos e padrões foram pesados em *eppendorffs*, solubilizados em 1,2 mL da solução de óxido de deutério (D_2O) e a solução analisada no RMN. Não foi necessário centrifugar e filtrar as soluções, pois os analitos utilizados são de alta pureza e boa solubilidade em D_2O . O valor da pureza do DMS descrita em seu certificado foi utilizado para comparação com os resultados obtidos.²⁷

Foram utilizados os mesmos parâmetros de aceitação do método CG-DIC, para as figuras de mérito na validação do método por RMN de ^1H . O teste estatístico de Grubbs foi aplicado, com o uso do *software* Minitab[®], em todos os conjuntos de análises para a identificação de *outliers*.

5.2.1 Condições de aquisição

Para a aquisição do espectro de RMN de ^1H , cerca de 0,6 mL da solução contendo AM e DMS foi transferida, com auxílio de uma pipeta, para um tubo de RMN que foi, então, encaixado no rotor e ajustado, para que a altura da solução ficasse correta para a aquisição do espectro. Após a inserção do tubo no equipamento, foram feitos, para cada amostra, o *lock* do campo e o ajuste da homogeneidade do campo (*shimming*) de forma automática. A sintonia da solução (*tunning* e o *matching*) foi feita manualmente. O P90 foi calibrado (comando *pulsecal*) e em seguida, os parâmetros de análise foram configurados de acordo com a Tabela 14 e a aquisição foi realizada com desacoplamento no ^{13}C (*zgig30*). Um experimento prévio de inversão-recuperação foi feito para o cálculo do T_1 dos analitos e determinação do valor do *delay* de relaxação (D1).

Tabela 14 - Parâmetros de aquisição de espectros de RMN de ^1H (Bruker)

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Potência do pulso a 90° (PLW1)	28 W	Número de <i>scans</i> (NS)	16
Largura do pulso a 90° (P1)	11.58 μs	Largura da janela (SW)	20 ppm
Giro da amostra	Desligado	Largura do filtro (FW)	625.000 Hz
Temperatura (Temp)	28 $^\circ\text{C}$	Filtro	Digital
Ângulo do pulso	30°	Número de pontos – FID (TD)	64k
<i>Delay</i> pré-aquisição (DE)	10 μs	<i>Dummy scans</i> (DS)	4
Tempo de aquisição (AQ)	2.7 s	FILCOR	1.5 μs
<i>Delay</i> de relaxação (D1)	25 s	Ganho do detector (RG)	32

5.2.2 Processamento

A transformada de Fourier foi aplicada ao FID (do inglês *free induction decay*), com 65.536 pontos (SI = 64 k), ou seja com preenchimento com zeros (*Zero filling*) e 0 hz de *line broadening* (lb = 0 Hz). A fase foi ajustada manualmente e a linha de base foi ajustada automaticamente com função polinomial de quinta ordem. Os espectros foram referenciados pelo sinal do TSP-d₄ (0 ppm) e as integrações foram feitas em sinais simpletos, de forma manual.

5.2.3 Cálculo da pureza

O cálculo da pureza da amostra foi feito levando em conta a área (integral) de um sinal referente a hidrogênios do analito e outro sinal referente a hidrogênios do PI, conforme a equação abaixo:

$$P_{amostra} = \frac{A_{ab\ analito}}{A_{ab\ PI}} \times \frac{nH_{PI}}{nH_{analito}} \times \frac{MM_{analito}}{MM_{PI}} \times \frac{m_{PI}}{m_{amostra}} \times P_{PI} \quad (10)$$

onde P é a pureza, A_{ab} é a área absoluta, nH é o número de hidrogênios do sinal que foi integrado, MM é a massa molecular, m é a massa gravimétrica referentes à amostra, ao padrão interno (PI) e ao analito de interesse.

A Tabela 15 apresenta a massa molecular (MM) dos analitos, o sinal selecionado para a integração, o número de hidrogênios referente a esse sinal e a pureza dos padrões utilizados na validação do método.

Tabela 15 - Padrões utilizados nas análises por RMN

Analito	MM (g/mol)	Sinal utilizado (ppm)	n° de H	Pureza do padrão (%)	T₁ – Pulso 30 ° (s)
AM	116,07	6,4	2	99,99	2,14
DMS	94,13	3,1	6	99,73	2,10
MDMA.HCl	229,7	5,9	2	99,6	0,76

5.2.4 Preparo da solução de D₂O

Pesou-se cerca de 50 mg de TSP-d₄ em balão volumétrico, adicionou-se cerca de 100 mL de óxido de deutério e homogeneizou-se manualmente. A solução foi então armazenada em 2 frascos de vidro âmbar, à temperatura ambiente. Após o uso de toda a solução, uma nova solução era sempre preparada.

5.2.5 Quantificação de Ácido Maleico de grau HPLC

Como uma alternativa mais barata ao AM certificado, foi feita a determinação da pureza do ácido maleico, de grau HPLC, utilizando-se do método desenvolvido. Para isso, foram analisadas 11 diferentes soluções, contendo cerca de 13,00 mg de DMS e 16,00 mg de AM, ou seja, uma relação molar de 50 %. O DMS foi utilizado como padrão interno para os cálculos de pureza do AM, de acordo com a equação 10. Esse material foi utilizado na avaliação da precisão e da linearidade do método geral, das figuras de mérito analisadas com o MDMA padrão e na quantificação das amostras reais.

5.2.6 Figuras de mérito

5.2.6.1 Linearidade

O teste de linearidade foi feito seguindo o modelo utilizado por Malz & Jancke (2005), no qual se comparou os resultados gravimétricos com os experimentais na determinação da relação molar de ácido maleico. Uma curva foi construída com os valores médios de relação molar experimental, obtidos a partir do espectro de RMN de ^1H , versus relação molar gravimétrica, calculados com as massas pesadas durante a preparação das soluções. Foram preparadas nove soluções, em triplicata, contendo AM e DMS, na faixa de 5 a 95 % na relação molar, que foi calculada segundo a equação a seguir:²⁷

$$\text{Relação molar} = \frac{\text{número de mols AM}}{\text{número de mols AM} + \text{número de mols DMS}} \times 100 \quad (11)$$

Os pós foram pesados em *ependorff*, de forma que a soma das massas de AM e DMS fosse de 56,00 a 73,00 mg. Adicionou-se 1,2 mL da solução de D_2O ao *ependorff* e homogeneizou-se a solução, utilizando-se o vórtex, por 1 minuto. Essa solução foi, então, analisada pela técnica de RMN.

Uma reta foi obtida após a aplicação da regressão linear pelo método dos quadrados mínimos no gráfico que continha o valor médio da relação molar das triplicatas. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação, que deve ser maior que 0,998, e pelo coeficiente de variação das replicatas de cada ponto, que deve ser igual ou inferior a 5%.

Um gráfico de resíduos foi construído para avaliação de erros aleatórios e possíveis *outliers*.

5.2.6.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada por três experimentos diferentes: repetitividade do equipamento, repetitividade do método e precisão intermediária.

Para avaliar a repetitividade do equipamento, uma mesma solução, com relação molar de 61 %, valor correspondente ao ponto médio da exatidão, foi analisada seis vezes pela técnica de RMN. Os valores dos coeficientes de variação da pureza do DMS foram avaliados, devendo ser igual ou inferior a 5 %.

A repetitividade do método foi avaliada pela análise de seis replicatas para cada nível de relação molar (baixo, médio, alto). As soluções foram preparadas, analisadas e processadas por um mesmo analista, em um mesmo dia, no mesmo equipamento e em um mesmo laboratório. O CV da pureza do DMS de cada nível de relação molar foi calculado e deve ser igual ou inferior a 10 %.

Dois ensaios independentes foram realizados para a avaliação da precisão intermediária: mesmo analista em dias diferentes e analistas diferentes em dias diferentes. No último caso, cada analista foi responsável por todo o processo de análise, desde a preparação das soluções até o processamento dos espectros de RMN. Em cada dia, foram preparadas seis replicatas das soluções contendo AM e DMS em três níveis de relação molar (baixo, médio, alto). A avaliação foi feita pelo coeficiente de variação, da pureza de DMS, calculado para cada um dos ensaios, que deve ser inferior a 10 % nos três níveis de relação molar.

5.2.6.3 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi feita através do cálculo do erro relativo. Foram preparadas seis soluções de AM e DMS para três diferentes níveis de relação molar (baixo, médio, alto). Os valores de pureza do DMS calculados a partir dos espectros de RMN ($P_{\text{experimental}}$) foram comparados com o valor de pureza dado pelo certificado do DMS ($P_{\text{certificado}}$). O erro relativo, expresso em porcentagem, foi calculado segundo a equação abaixo:

$$ER \% = \frac{P_{certificado} - P_{experimental}}{P_{certificado}} \times 100 \quad (12)$$

Para o método ser considerado exato em toda faixa linear, o erro relativo deve ser inferior a $\pm 10\%$ para cada solução.

5.2.6.4 Robustez

Foi realizado um planejamento fatorial saturado, com 7 fatores em 2 níveis, com base na literatura e na disponibilidade do laboratório, priorizando fatores que influenciam a relação sinal/ruído. Os fatores escolhidos foram tanto parâmetros de aquisição quanto de processamento dos espectros e estão descritos, assim como os dois níveis (-1 e 1) de cada um, na um, na Tabela 16.

Tabela 16 - Fatores a serem estudados na robustez e seus respectivos níveis (RMN)

Fatores	-1	1
Número de <i>scans</i> (NS)	8	16
Ganho do detector (RG)	16	32
Temperatura do sensor (Temp)	30	28
Qualidade dos tubos (Tb)	Economy	Selection
<i>Software</i> de processamento (S)	Topspin	ACD
Critério de integração (Int)	64xFWHH*	Manual
Função Line Broadening (lb)	0,3 Hz	0 Hz

*FWHH = largura à meia altura (do inglês *Frequency Width at Half Height*)

Foram preparadas soluções contendo cerca de 12,00 mg de DMS e 15,00 mg de AM, em 1,2 mL da solução de D₂O. As soluções foram transferidas para os tubos de RMN e os

espectros foram adquiridos e processados seguindo as especificações dos ensaios, conforme a Tabela 17. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 17 - Fatores e níveis utilizados em cada ensaio da robustez (RMN)

Ensaio	NS	RG	Temp	Tb	S	Int	lb
1	16	32	28	Selection	ACD	Manual	0,0
2	8	32	28	Economy	Topspin	Manual	0,3
3	16	16	28	Economy	ACD	64xFWHH	0,3
4	8	16	28	Selection	Topspin	64xFWHH	0,0
5	16	32	30	Selection	Topspin	64xFWHH	0,3
6	8	32	30	Economy	ACD	64xFWHH	0,0
7	16	16	30	Economy	Topspin	Manual	0
8	8	16	30	Selection	ACD	Manual	0,3

5.2.6.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados por extrapolação da curva analítica. Para os cálculos foram usados os valores de relação molar do DMS, que é usado como o analito a ser quantificado nessa validação. Assim, os limites inferiores indicam uma alta concentração de padrão interno e uma baixa concentração do analito. Os cálculos foram feitos conforme as equações a seguir:

$$LD = 3 \times \frac{S_b}{a} \quad (8)$$

$$LQ = 10 \times \frac{S_b}{a} \quad (9)$$

onde s_b é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e a é a inclinação da curva analítica.

5.2.6.6 Estabilidade

A estabilidade das soluções de AM e DMS em D_2O foi avaliada para o período de 20 dias, tempo considerado adequado para o método proposto. Analisaram-se três soluções para cada nível de relação molar (baixo, médio, alto) dentro da faixa linear do método. As soluções foram armazenadas em *ependorff*, mantidos dentro de um armário, à temperatura ambiente, e analisadas no dia da preparação e após 20 dias. O cálculo do ER foi feito (Equação 7) e a estabilidade é confirmada quando os erros relativos obtidos são menores que $\pm 5\%$, em todos os três níveis de relação molar avaliados.

5.2.6.7 Estimativa da incerteza de medição

A incerteza de medição do método de quantificação por RMN de 1H foi estimada pelo método *bottom-up*, utilizando como referência principal o artigo de Malz & Jancke (2005). Para os cálculos o ácido maleico foi considerado o padrão interno e o DMS a amostra. A descrição de todas as 4 etapas, em detalhes, encontra-se no Apêndice C.²⁷

5.2.7 Quantificação de MDMA.HCl padrão

Para demonstrar que o método geral validado pode ser aplicado na quantificação de MDMA.HCl, algumas figuras de mérito foram avaliadas com um padrão desse analito, uma vez que a validação realizada com o AM e o DMS não pode garantir a seletividade do método para outras moléculas, uma boa extração do analito no preparo da amostra e nem a estabilidade de outras soluções. Como havia pouco material disponível, as mesmas soluções foram utilizadas na avaliação da exatidão e da precisão.

5.2.7.1 Seletividade

Para demonstrar a seletividade do método, uma solução contendo cafeína, procaína, sacarose e MDMA.HCl padrão, além do AM, foi analisada de acordo com o método proposto. Os analitos selecionados foram encontrados em algumas amostras reais, identificados após análise por CG-DIC e FTIR/ATR. Uma solução contendo cada analito, separadamente, foi analisada para a identificação de possíveis interferências nos sinais do MDMA.HCl e do AM utilizados na quantificação. Além disso, uma solução contendo todos esses analitos, o MDMA e o AM foi analisada e quantificada, para avaliação do erro relativo do teor de MDMA nessa mistura.

5.2.7.2 Exatidão

A exatidão foi demonstrada pela preparação de 3 misturas contendo celulose e MDMA.HCl, para simular uma amostra real. Em um mesmo *ependorff* foram pesados a celulose e o MDMA.HCl padrão a 40 %, concentração média encontrada nas amostras reais quantificadas por CG-DIC, além de cerca de 10,00 mg de AM. As soluções foram centrifugadas e filtradas para retirar o material sólido.

O valor de pureza da amostra obtido a partir do espectro de RMN de ^1H ($P_{\text{experimental}}$) foi calculado considerando a massa total da mistura, MDMA.HCl e celulose. Os valores da $P_{\text{experimental}}$ foram comparados com o valor da pureza de referência ($P_{\text{referência}}$), calculada conforme a equação abaixo:

$$P_{\text{referência}} = \frac{M_{\text{padrão}} \times P_{\text{padrão}}}{\text{massa total}} \quad (13)$$

onde $M_{\text{padrão}}$ e $P_{\text{padrão}}$ são, respectivamente, a massa pesada e a pureza do certificado do padrão de MDMA.HCl.

O erro relativo (Equação 5) não pode ser superior a $\pm 10 \%$ para cada solução.

5.2.7.3 Precisão

Para a avaliação da precisão, os valores de pureza do MDMA.HCl nas mesmas amostras utilizadas na exatidão foram calculados a partir dos espectros de RMN de ^1H , considerando a massa de padrão pesada. O desvio padrão e o coeficiente de variação das 3 soluções foram calculados. Como parâmetro de aceitação, o CV deve ser menor que 10 %.

5.2.7.4 Estabilidade

A estabilidade das soluções contendo MDMA.HCl foi demonstrada após armazenamento em *ependorff*, a temperatura ambiente, por 3 dias. Analisaram-se três soluções com 40 % de MDMA.HCl em mistura com celulose. As médias dos valores de pureza da amostra calculados a partir do espectro de RMN de ^1H , $P_{\text{experimental}}$, obtidos no 1º e no 4º dia foram comparados e o erro relativo (Equação 7) não deve ser superior a $\pm 5\%$.

5.2.7.5 Estimativa da incerteza de medição para o MDMA.HCl

A incerteza de medição do método de quantificação de MDMA.HCl por RMN de ^1H foi estimada, também, pelo método *bottom-up*, conforme detalhado no Apêndice C. Para os cálculos foram usados os resultados obtidos para a exatidão, em que o ácido maleico é o padrão interno e o padrão de MDMA.HCl a amostra (Item 5.2.7.2).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seletividade deve ser, quando possível, demonstrada para cada novo analito que será quantificado pelo método. Uma alternativa, quando não há material disponível, por exemplo, é promover análises de RMN bidimensionais na amostra, como DOSY (do inglês *diffusion*

ordered spectroscopy) por exemplo, para avaliar se o sinal a ser utilizado na quantificação é de apenas um analito ou se há sobreposição de sinais. Essa figura de mérito não foi demonstrada para o DMS, pois esse não é um analito encontrado nas amostras reais de MDMA analisadas neste estudo. Deve-se avaliar se alterações no método ou novos experimentos de validação serão necessários no caso da aplicação do método em outros analitos, como drogas sintéticas, tais como estudos de recuperação, estabilidade e escolha adequada de solvente e padrão interno.

5.3.1 Quantificação de Ácido Maleico de grau HPLC

O AM de grau HPLC foi utilizado como uma alternativa à baixa disponibilidade do material certificado na avaliação da precisão, construção da curva analítica e quantificação das amostras reais. Após a análise e quantificação de todas as 11 soluções, a pureza média obtida foi de 99,76 %, com desvio padrão de 0,40 e um CV de 0,40 %. Nenhum *outlier* foi identificado. O valor encontrado está dentro do esperado, uma vez que deveria ser maior que 99 %, de acordo com o fabricante. Além disso, o resultado da quantificação apresentou pequeno desvio padrão, com valores inclusive abaixo da repetitividade do método e, por isso, o uso desse material como padrão interno não trouxe prejuízo para o desempenho do método.

5.3.2 Figuras de mérito

5.3.2.1 Linearidade

O método de quantificação por RMN de ^1H desenvolvido se baseia no cálculo da área relativa a um hidrogênio a partir de dados do padrão interno, sendo cada espectro suficiente na quantificação do analito na amostra. Dessa forma, não é necessário que se faça a construção de uma curva analítica para a quantificação do analito, como foi feito na validação do CG-DIC (item 4.2.4). Por isso a avaliação da linearidade foi feita de forma diferente, conforme preconizado por Malz & Jancke (2005), variando-se as massas do analito de

interesse e do padrão interno de forma que as proporções cobrissem a faixa linear a ser estudada. A curva obtida (Figura 8) e o valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 1,00000$) demonstraram uma boa relação linear entre os valores esperados (gravimétricos) e os valores obtidos (experimentais) da relação molar, em toda a faixa analisada, demonstrando que o método é linear. Os resíduos (Figura 9) encontrados foram pequenos, menores que 0,3 %, e homocedásticos, com boa distribuição ao longo da curva, o que confirma a linearidade do método.

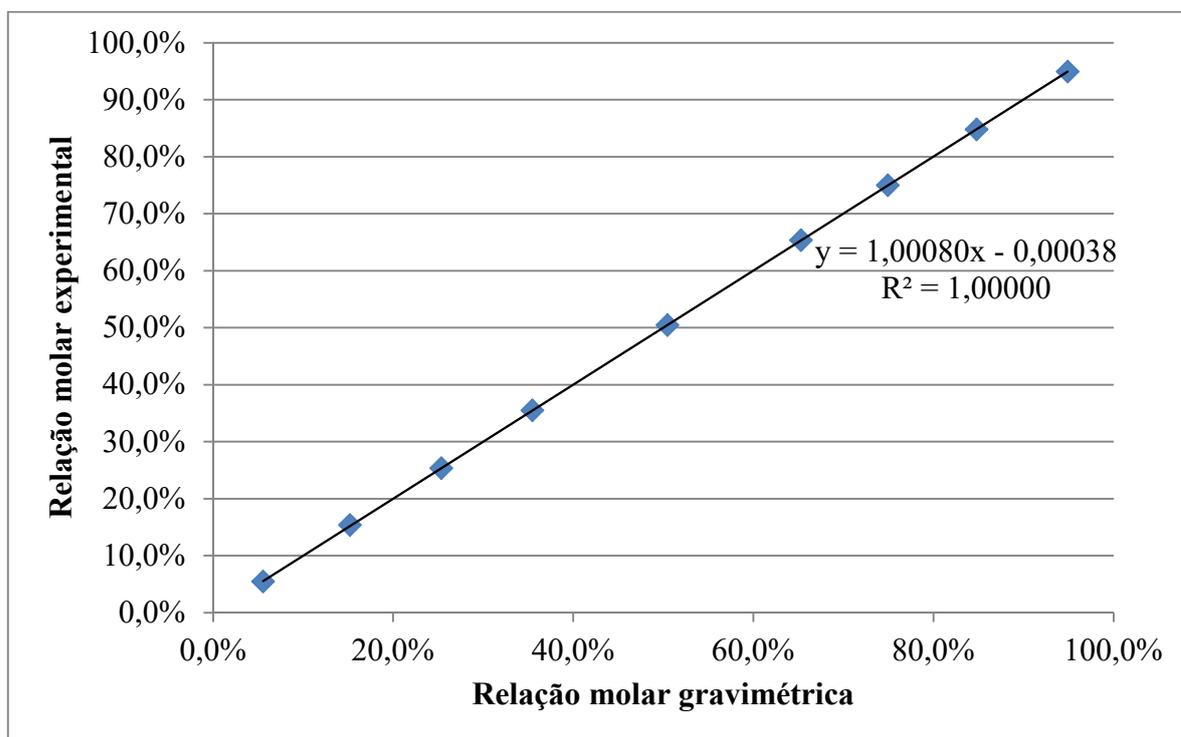


Figura 8 - Teste de linearidade (RMN)

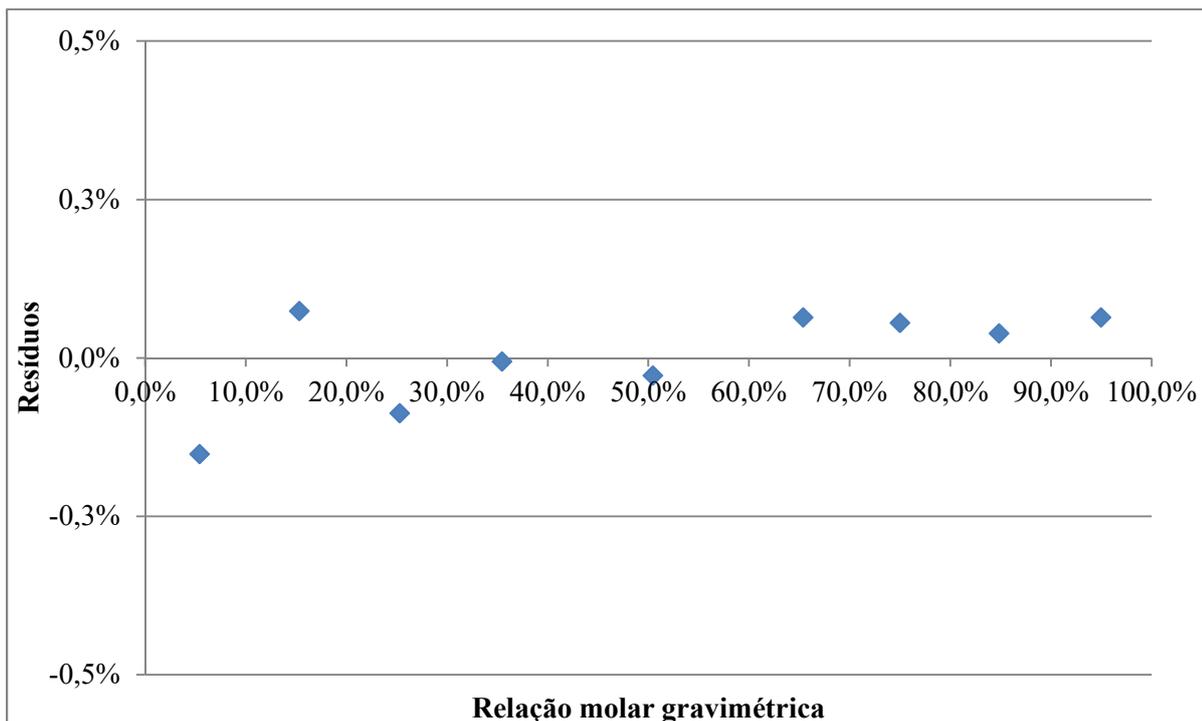


Figura 9 – Gráfico de resíduos da curva obtida para a linearidade do método (RMN)

5.3.2.2 Precisão

O método foi considerado preciso, pois apresentou bons resultados nos três testes realizados e em todos os níveis de relação molar. Os coeficientes de variação em todos os testes ficaram dentro dos limites estabelecidos de 10 %, indicando baixos valores de erros aleatórios. A repetitividade do equipamento apresentou um CV de 0,08 %, enquanto o maior valor obtido na repetitividade do método foi de 1,85 % (Tabela 18). A precisão intermediária obteve CV abaixo de 3,0 % (Tabela 19). O teste de Grubbs identificou um *outlier* na repetitividade do método (Figura 31 – Apêndice B) e outro na precisão intermediária no ensaio com analistas diferentes (Figura 32 – Apêndice B), ambos observados no nível baixo de relação molar. Dessa forma, os cálculos desses ensaios foram feitos com 5 resultados.

Tabela 18 – Repetitividade do método (RMN)

Nível	Relação molar média (%)	CV (%)
Baixo	9,9	0,86
Médio	60,6	0,61
Alto	80,3	1,85

Tabela 19 – Precisão intermediária (RMN)

Nível (relação molar média)	Coeficiente de variação (%)	
	Ensaio	
	dias diferentes	analistas diferentes
Baixo (15%)	0,37	0,52
Médio (50%)	0,40	0,43
Alto (80%)	1,52	1,72

5.3.2.3 Exatidão

Os valores de erro relativo obtidos, nos três níveis de relação molar, estão dentro da faixa de $\pm 4\%$ (Figura 10) e, assim, dentro do limite de aceitação de $\pm 10\%$. O teste de Grubbs identificou um *outlier* nos resultados das amostras com relação molar próxima a 10% (nível baixo) (Figura 31 - Apêndice B), logo para este ponto foram utilizados 5 resultados. Tanto este *outlier* quanto aquele encontrado no ponto baixo da repetitividade do método são referentes a uma mesma solução, usada em ambos os testes. Dessa forma, pode-se considerar que o método é exato, pois apresenta valores aceitáveis de erros sistemáticos.

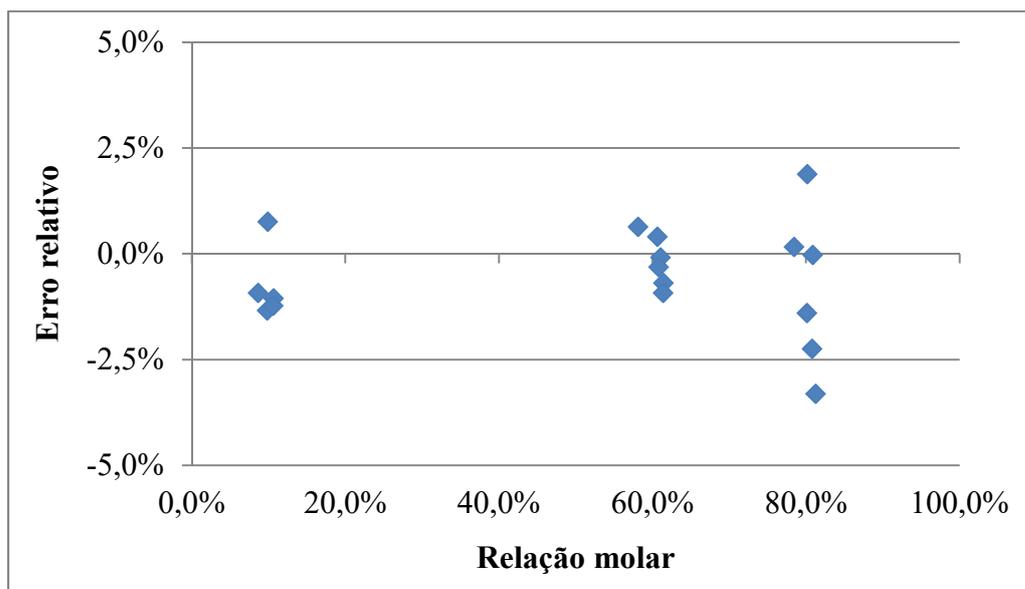


Figura 10 – Erros relativos encontrados para a exatidão do método (RMN)

A validação realizada, porém, não garante a recuperação de soluções de diferentes analitos ou solventes. Uma boa recuperação depende do método de extração, sendo crítico principalmente em amostras pouco puras e, por isso, deve ser planejado para cada tipo de amostra.

5.3.2.4 Robustez

Os fatores selecionados para o teste de robustez foram aqueles que influenciam na relação sinal/ruído do espectro, uma vez que esse é um dos pontos críticos para a quantificação por RMN. O planejamento fracionário saturado permite avaliar, com um número razoável de experimentos, uma grande quantidade de fatores, sendo um recurso adequado para se avaliar a robustez. Os resultados das soluções analisadas em cada ensaio, assim como a média, o desvio-padrão (s) e a variância (s^2), se encontram na Tabela 20.

Tabela 20 - Resultado da quantificação do DMS em cada ensaio da robustez (RMN)

Ensaio	Solução 1	Solução 2	Média	s	s ²
1	100,15	99,72	99,93	0,30	0,09
2	100,20	99,79	99,99	0,29	0,08
3	100,18	99,69	99,94	0,35	0,12
4	100,15	99,41	99,78	0,53	0,28
5	100,14	99,60	99,87	0,38	0,15
6	100,08	100,27	100,17	0,14	0,02
7	100,11	99,67	99,89	0,31	0,10
8	100,18	99,75	99,97	0,30	0,09

O efeito de cada fator foi calculado através da construção de uma matriz de planejamento (y) contendo a média das respostas de cada ensaio. Essa matriz foi multiplicada pela sua transposta (Xt). Os resultados foram então divididos por divisores apropriados (Tabela 21). Para avaliar se os efeitos são estatisticamente significativos, um intervalo de confiança (IC) foi calculado e um gráfico com o resultado dos fatores e o IC foi construído (Figura 11). Todos os fatores apresentaram valores de efeitos dentro do intervalo de confiança e, portanto, não influenciam, de maneira significativa, a quantificação. Logo, o método é robusto para as variações de aquisição e processamento avaliadas. Além disso, conclui-se, também, que é possível reduzir o tempo de análise, pela aquisição dos espectros com apenas 8 *scans*, e que a utilização de tubos de alta qualidade (Selection), que são mais caros, não é necessária para a quantificação.

Tabela 21 – Cálculo dos efeitos dos fatores avaliados na robustez (RMN)

	Fatores	Xt*y	Divisor	Efeitos
M	Média	799,549	8	99,94
1	Número de <i>scans</i> (NS)	-0,28	4	-0,07
2	Ganho do detector (RG)	0,39	4	0,10
3	Temperatura do sensor (Temp)	-0,26	4	-0,06
4	Qualidade dos tubos (Tb)	-0,45	4	-0,11
5	<i>Software</i> de processamento (S)	0,47	4	0,12
6	Critério de integração (Int)	0,02	4	0,005
7	Função <i>Line Broadening</i> (lb)	0,02	4	0,004

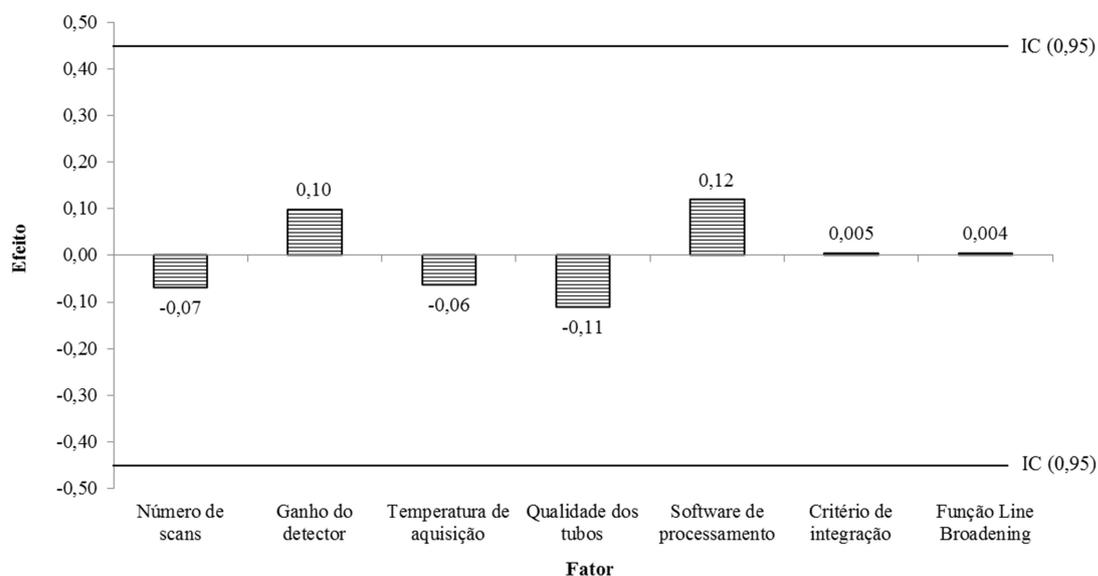


Figura 11 – Gráfico com fator versus valores de efeito calculados pela robustez (RMN)

5.3.2.5 Limites de detecção e quantificação

Os valores dos limites de detecção e quantificação calculados pela extrapolação da curva, considerando a relação molar do DMS (amostra), foram respectivamente 0,12 % e 0,41

%. Ou seja, 99,88 % e 99,59 % considerando a relação molar do ácido maleico (PI). Como ilustração, esse valor de LQ representa como quantidade mínima da amostra a ser detectada e quantificada pelo método, para a pesagem de 10,00 mg de AM, 0,03 mg de DMS na solução.

5.3.2.6 Estabilidade

As soluções contendo AM e DMS foram estáveis para o período de 20 dias, a temperatura ambiente, uma vez que apresentaram erro relativo para as purezas médias dentro da faixa de $\pm 1\%$ (Tabela 22) e dentro do limite de aceitação de $\pm 5\%$.

Tabela 22 – Erros relativos calculados para a estabilidade das soluções de AM e DMS (RMN)

Relação molar média (%)	Pureza média Dia 1 (%)	Pureza média Dia 21 (%)	Erro relativo (%)
10,1	96,5	96,2	0,32
59,9	99,4	99,6	-0,19
80,2	101,5	101,7	-0,18

Deve-se destacar, entretanto, que esse resultado não garante a estabilidade de soluções de diferentes analitos ou solventes. Essa figura de mérito deve ser avaliada para cada solução específica, por isso os resultados obtidos não podem ser extrapolados e utilizados para diferentes amostras e matrizes.

5.3.2.7 Estimativa da incerteza de medição

A Tabela 23 apresenta as componentes da incerteza, com os respectivos valores de incerteza padrão. A contribuição de cada componente (Tabela 24), calculada considerando o quadrado dos valores adimensionais das incertezas padrão e a soma dos quadrados, demonstra que a recuperação é o fator principal (85,66 %), como era de se esperar, pois essa incerteza

representa um somatório de várias incertezas, como, por exemplo, as do preparo de amostra e das purezas do padrão interno e do analito.

Tabela 23 - Componentes da incerteza e respectivos valores de incerteza padrão (RMN)

Componentes da incerteza	Valor (x)	Unidade	U(x)	Divisor (k)	Incerteza padrão (μ pad)
Massa de PI	0,03	g	0,00002	2,00	$1,00 \times 10^{-3}$
Massa da amostra	0,01	g	0,00002	2,00	$1,00 \times 10^{-5}$
Massa molecular do PI	116,07	g/mol	0,00500	1,73	$2,89 \times 10^{-3}$
Massa molecular do analito	94,13	g/mol	0,00800	1,73	$4,62 \times 10^{-3}$
Pureza do PI	0,9999	-	0,00090	2,00	$4,50 \times 10^{-4}$
Razão das áreas	1,90	-	0,00149	2,45	$6,07 \times 10^{-4}$
Recuperação	1,00	-	0,00610	2,45	$2,48 \times 10^{-3}$

Tabela 24 – Valores das incertezas de cada componente e suas contribuições (RMN)

Componentes da incerteza	μ pad (valor adimensional)	$(\mu \text{ pad})^2$	Contribuição para incerteza (%)
Massa de PI	$3,89 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-7}$	1,83
Massa da amostra	$7,68 \times 10^{-4}$	$5,90 \times 10^{-7}$	8,22
Massa molecular do PI	$2,49 \times 10^{-5}$	$6,19 \times 10^{-10}$	0,01
Massa molecular do analito	$4,91 \times 10^{-5}$	$2,41 \times 10^{-9}$	0,03
Pureza do PI	$4,50 \times 10^{-4}$	$2,03 \times 10^{-7}$	2,82
Razão das áreas	$3,19 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-7}$	1,42
Recuperação	$2,48 \times 10^{-3}$	$6,14 \times 10^{-6}$	85,66
Soma dos quadrados		$7,17 \times 10^{-6}$	100,00
Incerteza padrão combinada		0,0027	

A incerteza combinada foi então multiplicada por 2, valor do fator de abrangência de 95 % de confiança. A incerteza expandida (U) é relativa e por isso a pureza de cada amostra, em porcentagem, deve ser multiplicada por 0,54 % para se obter a sua incerteza expandida. No caso dessa validação, o DMS foi utilizado como amostra e a sua pureza e incerteza expandida são respectivamente 99,90 % \pm 0,54 %. A estimativa da incerteza do método de RMN de ^1H apresentou baixo valor, demonstrando a capacidade dessa técnica quando associada a um bom preparo de amostra.

5.3.3 Quantificação de MDMA.HCl padrão

Como havia uma quantidade limitada de MDMA.HCl padrão disponível, somente 4 soluções foram preparadas. As poucas análises realizadas com o padrão não interferiram significativamente na conclusão de que o método poderia ser efetivamente usado para quantificação desse analito, pois a precisão e exatidão também puderam ser avaliadas através de resultados da quantificação das amostras reais e na comparação desses resultados com os obtidos por CG-DIC. De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2005, é suficiente, para a validação de um método, comparar seus resultados com aqueles obtidos por um método já validado ou, alternativamente, pela determinação da incerteza do método, que também foi estimada nesse trabalho. Por isso é possível afirmar que o método de quantificação de MDMA por RMN de ^1H está validado.

Para a identificação dos hidrogênios da molécula de MDMA no espectro de RMN de ^1H avaliou-se o deslocamento químico, a multiplicidade, o valor da integral e as constantes de acoplamento (J) de cada sinal (Apêndice D). Na Figura 12 observa-se um duplete (1,27 ppm, 3 ^1H , J = 6,60 Hz) referente à metila A e um simpleto (2,70 ppm, 3 ^1H) referente à metila B. Os dois duplo dupletos (2,83 ppm, 1 ^1H , J₁ = 7,89 Hz, J₂ = 14,09 Hz; 2,97 ppm, 1 ^1H , J₁ = 6,60 Hz, J₂ = 14,09 Hz) são dos dois hidrogênios C, que estão acoplando entre si e com o hidrogênio D, que parece ser um sexteto (3,48 ppm, 1 ^1H). O simpleto (5,97 ppm, 2 ^1H) é do metileno E e os três hidrogênios do anel aromático, F, G e H, acoplam entre si e são, respectivamente: um duplo duplete (6,78 ppm, 1 ^1H , J₁ = 1,83 Hz, J₂ = 7,89 Hz), um duplete (6,84 ppm, 1 ^1H , J = 1,83 Hz) e um duplete (6,88 ppm, 1 ^1H , J = 7,89 Hz).

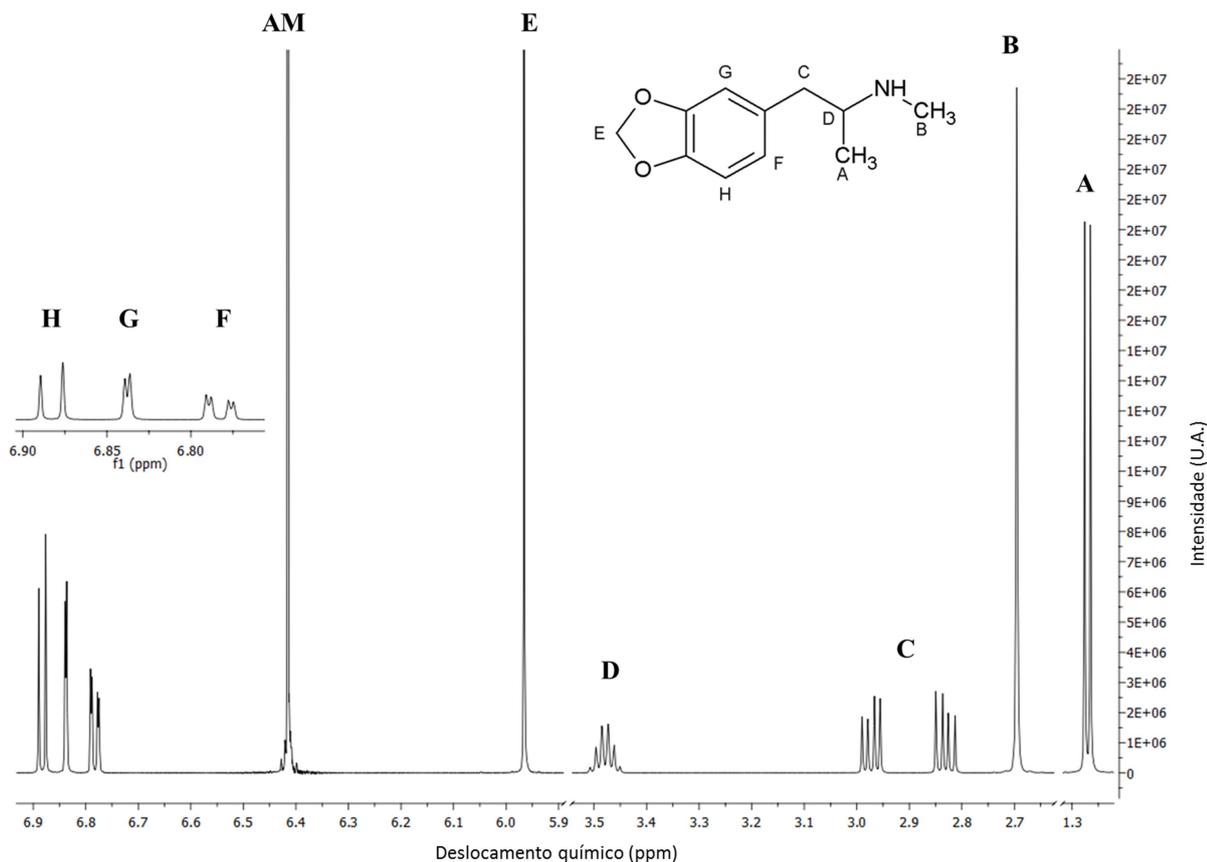


Figura 12 - Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H do MDMA.HCl padrão, com identificação dos hidrogênios da molécula, em D_2O , contendo ácido maleico (6,4 ppm)

Os dois hidrogênios identificados pela letra C obtiveram deslocamentos químicos e constantes de acoplamento com o hidrogênio D diferentes. Isso ocorreu porque os hidrogênios C são diastereotópicos, uma vez que o carbono ligado ao hidrogênio D é um estereocentro. Além disso, esses hidrogênios sofrem efeito do anel aromático, denominado anisotropia magnética. Logo, esses dois hidrogênios acoplam entre si, formando um duplete com um J grande ($J_2 = 14,09$ Hz), e com o hidrogênio D, formando um duplete com um J menor ($J_1 = 6,60/7,89$ Hz). Por isso o espectro apresenta dois duplo dupletos, de integral 1 cada e com valores de constante de acoplamento ligeiramente diferentes, e não um único duplete de integral 2. O hidrogênio D se assemelha a um sexteto, pois acopla com constantes de acoplamento muito próximas, porém diferentes, com os três hidrogênios A ($J = 6,60$ Hz) e com os dois hidrogênios C ($J = 6,60/7,89$ Hz). O hidrogênio ligado ao nitrogênio não está identificado no espectro devido à troca do hidrogênio com o deutério do solvente, que faz o sinal desaparecer.

O sinal utilizado na quantificação do MDMA foi o referente ao metileno dioxi, hidrogênios E (5,97 ppm , 2 ^1H), pois, além de ser um simpleto, ocupando menor espaço no espectro, o que reduz a possibilidade de interferência, é um sinal mais específico, que diferencia o espectro do MDMA com das moléculas similares, como metanfetamina e anfetamina.

5.3.3.1 Seletividade

A seletividade do método de quantificação por RMN de ^1H para o MDMA foi demonstrada pela não sobreposição dos sinais dos adulterantes nos sinais utilizados na quantificação. Os analitos selecionados foram aqueles encontrados como adulterantes nas amostras reais (anfetamina, aminopirina, cafeína e procaína) pela análise por CG-DIC e a sacarose, excipiente identificado em algumas amostras reais, que é solúvel em D_2O . Os espectros dos adulterantes e da sacarose (Figura 13) mostram que não há sinais nas regiões do ácido maleico (6,4 ppm) e nem do MDMA.HCl (5,9 ppm) utilizados na quantificação das amostras (Apêndice E).

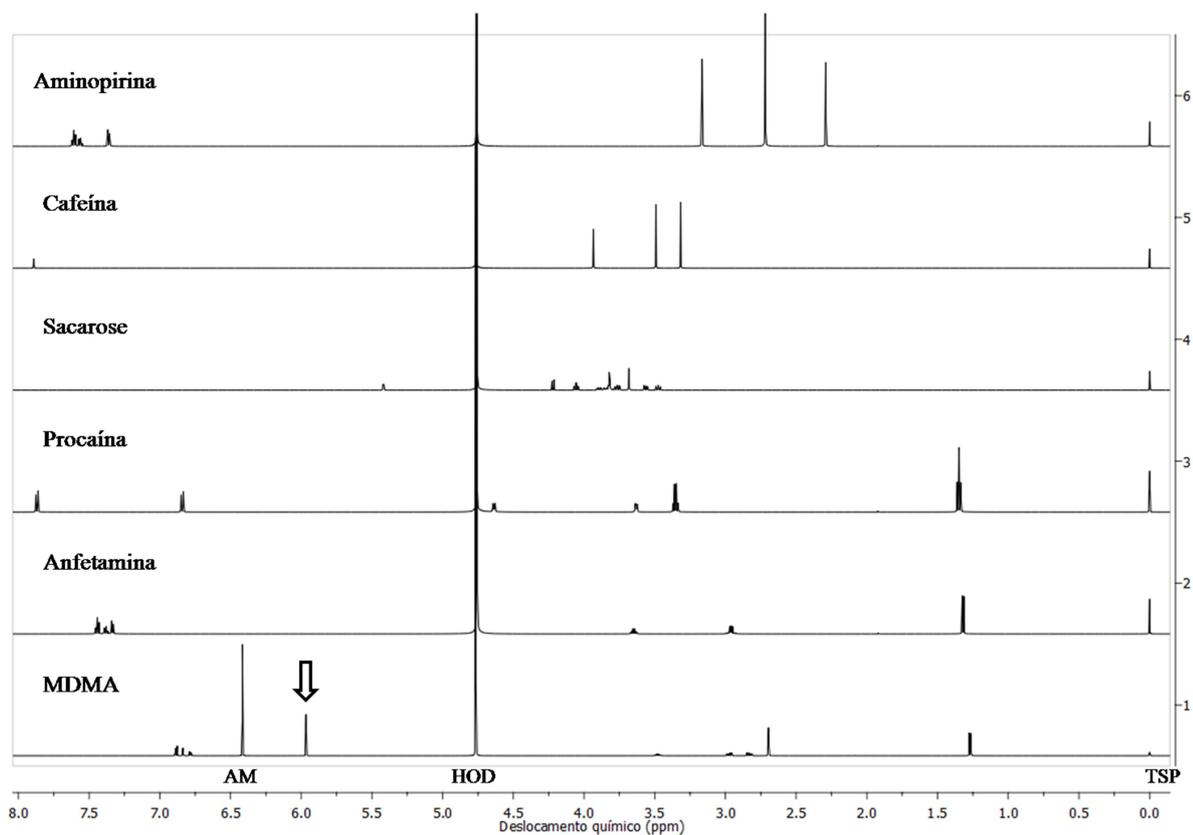


Figura 13 – Espectros de RMN de ^1H dos possíveis adulterantes e da solução de seletividade

A quantificação do MDMA.HCl realizada no espectro da solução contendo a aminopirina, a anfetamina, a cafeína, a procaína e a sacarose apresentou pureza de 103,5 % e erro relativo igual a 3,92 %, valor dentro dos limites estabelecidos para a exatidão. Ficou demonstrado, mais uma vez, que o método é seletivo para esse analito.

5.3.3.2 Precisão

O CV obtido com MDMA.HCl (1,82 %) está próximo aos CV calculados com o DMS para a precisão do método de quantificação por RMN de ^1H (Item 5.3.2.2) e, portanto, dentro do limite de ± 10 %.

5.3.3.3 Exatidão

Os valores de erro relativo obtidos para a exatidão (Tabela 25) estão abaixo de $\pm 5,0\%$ e, portanto, dentro do limite de aceitação estabelecido de $\pm 10\%$. Dessa forma, o método é exato para o MDMA.HCl. Os valores de erro relativo obtidos para a exatidão são um pouco maiores do que os obtidos no teste de exatidão do método de RMN de ^1H validado com o DMS (Item 5.3.2.3). O maior desvio obtido pelo MDMA.HCl pode ser devido ao maior erro de balança, uma vez que se pesou o padrão e a celulose no mesmo *ependorff*, e a possíveis perdas no processo de filtração.

Tabela 25 – Exatidão do padrão de MDMA.HCl (RMN)

Replicata	MDMA.HCl		Erro relativo (%)
	Pureza obtida (%)	Pureza de referência (%)	
1	41,9	42,3	0,9
2	41,1	42,9	4,2
3	43,3	43,9	1,4

5.3.3.4 Estabilidade

A estabilidade das soluções de MDMA.HCl e ácido maleico em óxido de deutério, à temperatura ambiente, foi demonstrada para 3 dias, com erros relativos menores que $0,2\%$ nas três soluções analisadas. O erro relativo encontrado para a média das soluções foi de $0,1\%$, dentro do limite de aceitação de 5% .

5.3.3.5 Estimativa da incerteza de medição para o MDMA.HCl

Aproveitando os dados obtidos com o padrão de MDMA.HCl e para que o resultado pudesse ser comparado, de forma mais fiel, com o valor de estimativa de incerteza obtido para

o método de quantificação de MDMA.HCl por CG-DIC, a estimativa da incerteza do método de quantificação por RMN de ^1H também foi calculado considerando o MDMA.HCl como amostra.

Os componentes da incerteza, com os respectivos valores de incerteza padrão estão na Tabela 26.

Tabela 26 - Componentes da incerteza e respectivos valores de incerteza padrão (RMN/MDMA)

Componentes da incerteza	Valor (x)	Unidade	U(x)	Divisor (k)	Incerteza padrão (μ pad)
Massa de PI	0,01	g	0,00002	2,00	$1,00 \times 10^{-5}$
Massa da amostra	0,01	g	0,00002	2,00	$1,00 \times 10^{-5}$
Massa molecular do PI	116,07	g/mol	0,00500	1,73	$2,89 \times 10^{-3}$
Massa molecular do analito	229,70	g/mol	0,02000	1,73	$1,15 \times 10^{-2}$
Pureza do PI	0,9999	-	0,00090	2,00	$4,50 \times 10^{-4}$
Razão das áreas	1,90	-	0,00149	2,45	$6,07 \times 10^{-4}$
Recuperação	0,9822	-	0,01788	1,73	$1,03 \times 10^{-2}$

As contribuições de cada componente (Tabela 27), calculadas considerando o quadrado das incertezas padrões, mostra que a recuperação é o fator principal (98,53 %), como esperado.

Tabela 27 – Valores das incertezas de cada componente e suas contribuições (RMN/MDMA)

Componentes da incerteza	μ pad (valor adimensional)	$(\mu \text{ pad})^2$	Contribuição para incerteza (%)
Massa de PI	$9,09 \times 10^{-4}$	$8,26 \times 10^{-7}$	0,74
Massa da amostra	$7,14 \times 10^{-4}$	$5,10 \times 10^{-7}$	0,46
Massa molecular do PI	$2,49 \times 10^{-5}$	$6,19 \times 10^{-10}$	0,00
Massa molecular do analito	$5,03 \times 10^{-5}$	$2,53 \times 10^{-9}$	0,00
Pureza do PI	$4,50 \times 10^{-4}$	$2,03 \times 10^{-7}$	0,18
Razão das áreas	$3,19 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-7}$	0,09
Recuperação	$1,05 \times 10^{-2}$	$1,10 \times 10^{-4}$	98,53
Soma dos quadrados		$1,12 \times 10^{-4}$	100,00
Incerteza padrão combinada		0,0106	

A incerteza expandida (U) é obtida pelo valor da pureza, em porcentagem, de cada amostra multiplicada por 2,12 %, valor da incerteza padrão combinada multiplicada pelo fator de abrangência de 95 % de confiança ($k = 2$). Para exemplificar, a Tabela 28 apresenta três valores hipotéticos de pureza e os respectivos valores de incerteza expandida.

Tabela 28 - Incerteza expandida para 95 % de IC (RMN/MDMA) de 3 amostras hipotéticas

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Pureza da amostra (P_{amostra}) (%)	5,00	40,00	80,00
Incerteza expandida (U_{amostra}) (%)	0,11	0,85	1,69

Ao se comparar os valores de incerteza que devem ser multiplicados pela pureza da amostra, a incerteza do RMN de ^1H para o MDMA (2,12 %) é menor do que a obtida para o

método de quantificação por CG-DIC (6,28 %). A recuperação foi o componente principal na estimativa das duas incertezas.

6 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MDMA EM COMPRIMIDOS DE *ECSTASY*

6.1 INTRODUÇÃO

A UNODC, através da Avaliação Global sobre Drogas Sintéticas de 2014, relata que a cocaína e a maconha ainda dominam o mercado das drogas na América do Sul, América Central e Caribe, porém, as apreensões de *ecstasy* nessas regiões têm aumentado significativamente e mais do que triplicou entre 2008 e 2012. A maioria das apreensões de *ecstasy* ocorreu no Brasil, representando 47 % de todo os anfetamínicos apreendidos nessas regiões no referido período (Figura 14). Em 2012, o *ecstasy* representou mais de 95 % das apreensões de anfetamínicos no Brasil.³⁰

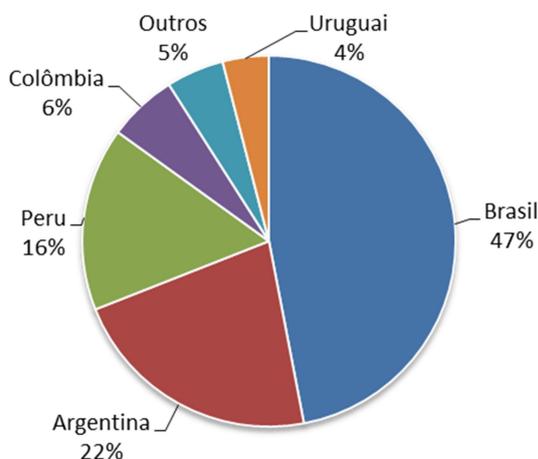


Figura 14 - Apreensões de *ecstasy* na América do Sul, América Central e Caribe, por país, 2008-2012

De acordo com dados internos da Polícia Federal, em 2014 foram apreendidos 99,44 kg de comprimidos contendo MDMA. Essa massa corresponde a cerca de 400 mil comprimidos, considerando 250 mg como massa média de um comprimido. Os principais estados, responsáveis por 88,9 kg, quase 90 % dos comprimidos apreendidos no país em um ano, foram São Paulo e Rio de Janeiro e a maior parte das apreensões ocorreu nos aeroportos

internacionais localizados nestes estados. A Figura 15 apresenta a contribuição da massa de comprimidos apreendidos em 2014 dos estados que representaram mais de 0,1 % do total.

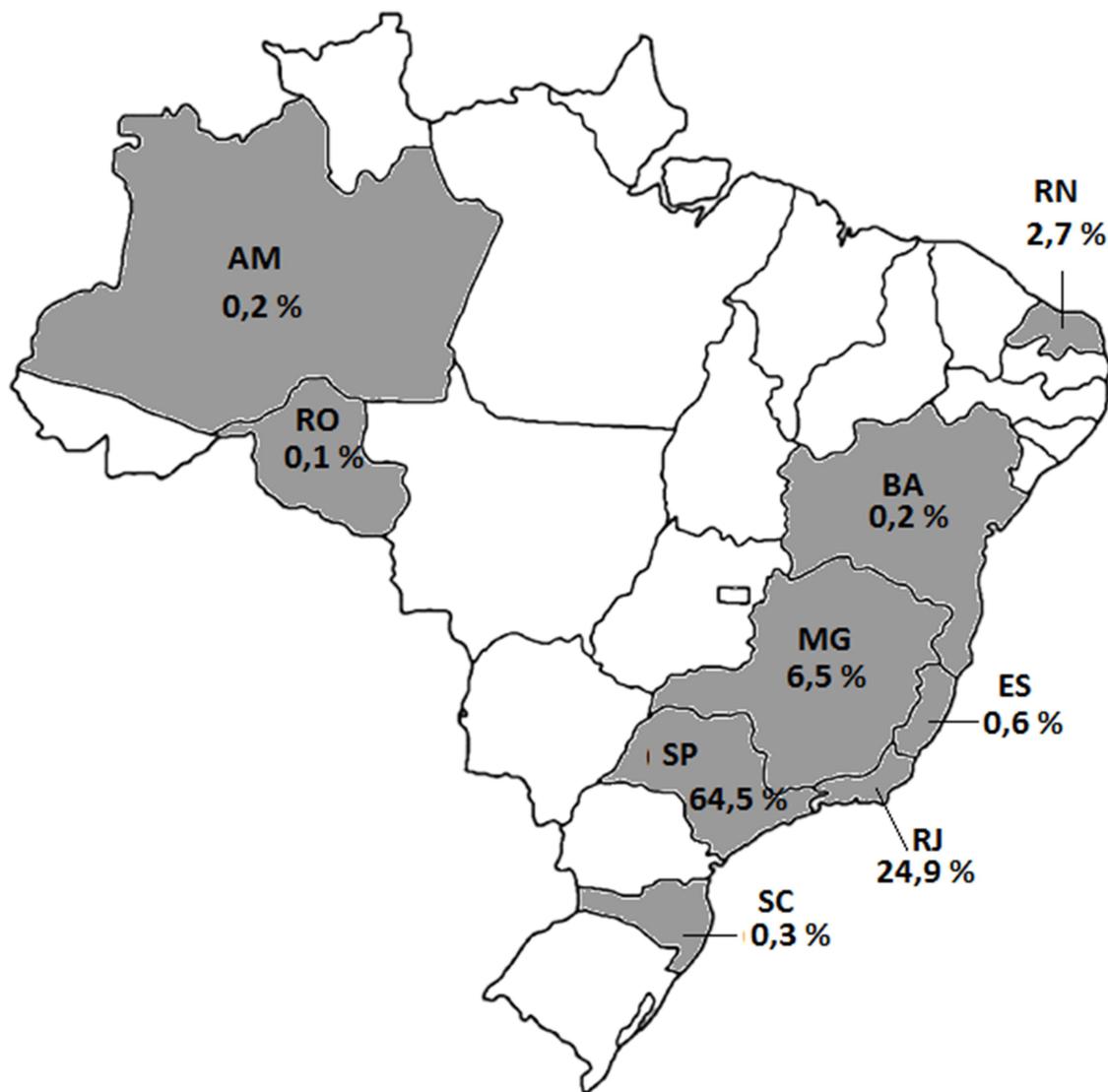


Figura 15 - Mapa das principais apreensões de MDMA por estado do Brasil, realizadas pela Polícia Federal, em 2014

Nesse capítulo serão apresentados os métodos, resultados e discussões referentes às análises realizadas nas amostras reais de comprimidos de *ecstasy*.

6.2 MÉTODOS

As amostras reais de comprimidos de *ecstasy* foram disponibilizadas pela Polícia Federal e analisadas no INC. Os comprimidos utilizados foram os encaminhados ao INC, para análise do projeto PeQui, por laboratórios forenses da Polícia Federal localizados em diversos estados brasileiros.

Os 682 comprimidos de *ecstasy* disponíveis foram inicialmente separados em 39 lotes que levaram em consideração o número de registro na perícia da PF, o estado da apreensão da droga e características físicas (massa, cor e logotipo impresso durante a fabricação). Um comprimido de cada lote foi triturado, com auxílio de almofariz e pistilo de vidro, até a obtenção de um pó fino. Esse pó foi utilizado em todas as análises químicas, de caracterização e quantificação, feitas nesse projeto.

6.2.1 Caracterização dos comprimidos

Imagens dos comprimidos foram registradas em arquivo digital, através do digitalizador VSC 50, que permite incidir iluminação lateral para destacar logotipos.

A massa média foi calculada após a pesagem em balança analítica de 10 comprimidos de cada lote, selecionados aleatoriamente. Quando o número de comprimidos de um lote foi igual ou menor que 10, a média foi calculada com a massa de todos os comprimidos disponíveis.

A identificação do excipiente principal de cada lote dos comprimidos foi feita por espectroscopia no infravermelho médio (FTIR-ATR). Cerca de 10 mg do pó de um comprimido de cada lote foi solubilizado em 10 mL de metanol, submetido à agitação por vórtex e, em seguida, ao ultrassom por 5 minutos. Após centrifugação da solução resultante, a 1100 rpm por 5 minutos, o sobrenadante (fase metanólica, contendo o MDMA), foi descartado e o precipitado analisado no infravermelho e confrontado com as bibliotecas de FTIR disponíveis na estação de trabalho. Nos casos em que praticamente toda amostra se

solubilizou no metanol, a análise por infravermelho foi feita com o pó do comprimido e, quando necessário, o espectro do MDMA foi subtraído do espectro resultante.

O teste de cloreto foi realizado para a identificação de íons cloreto no comprimido, o que indica o uso de MDMA na forma de sal cloridrato. Em um tubo de ensaio foi adicionado aproximadamente 10 mg do comprimido pulverizado, cerca de 1 mL de água e 2 gotas de uma solução de ácido nítrico 5 mol/L. Ao sobrenadante adicionou-se 2 gotas de uma solução de nitrato de prata 1 % e o resultado foi observado e registrado. Um branco e um controle positivo foram feitos para comparação. Para um resultado positivo, um precipitado branco deve se formar.

6.2.2 Análise das amostras reais por CG-DIC

Entre 10,00 mg e 11,00 mg do pó de um comprimido foram pesados em balança analítica dentro de *erlenmeyers* de 25 mL. Adicionou-se, com dispensador, 10 mL da solução de padrão interno e agitou-se manualmente a solução resultante, fazendo-se movimentos de agitação circulares com o *erlenmeyer* por cerca de 10 segundos, para extração e dissolução do MDMA.HCl. Cerca de 1,5 mL dessa solução foi transferida para um *vial*, que foi lacrado e submetido à centrifugação (3.000 rpm por 5 minutos) e levado para análise no CG-DIC. Os tempos de retenção dos analitos utilizados durante a seletividade do método foram utilizados na identificação de adulterantes presentes nas amostras.

6.2.3 Análise das amostras reais por RMN de ¹H

Pesou-se, em triplicata, de 25,00 a 30,00 mg do pó obtido a partir de um comprimido e de 10,00 a 12,00 mg de AM em um mesmo *ependorff*. Acrescentou-se, a este *ependorff*, 1,2 mL da solução de D₂O. O *ependorff* foi levado ao vórtex por 1 minuto e em seguida à centrifuga, a 2.000 rpm por 5 minutos. Cerca de 1,0 mL do sobrenadante foi, então, transferido a um segundo *ependorff*, com auxílio de uma pipeta automática. Nos casos em que a solução apresentou material em suspensão mesmo após centrifugação, um algodão foi

colocado na ponteira para filtração dos sólidos durante a transferência. As soluções foram armazenadas à temperatura ambiente e analisadas no RMN após um período máximo de 3 dias.

Uma solução controle foi sempre preparada nos dias de pesagem das amostras. Para isso, pesou-se de 10 a 13 mg de AM e de DMS em um mesmo *ependorff*, no qual se acrescentou 1,2 mL da solução de D₂O. O *ependorff* foi, então, levado ao vórtex por 1 minuto. A solução foi armazenada à temperatura ambiente até um período máximo de 20 dias. Para avaliar se o equipamento estava funcionando adequadamente, soluções controle foram analisadas e quantificadas, seguindo o método utilizado na validação por RMN de ¹H, no início, no meio e no fim de uma sequência de análises de amostras. Como parâmetro de aceitação, desvios de até ± 5,0 % do valor da pureza do certificado do DMS foram aceitos.

6.2.4 Comparação dos métodos

Para a comparação dos métodos, os valores das purezas médias obtidas para as replicatas de cada amostra em cada um dos métodos foram comparados pela construção de um gráfico, plotando-se o resultado obtido por CG-DIC no eixo x e o resultado do RMN de ¹H no eixo y. A regressão linear pelo método dos quadrados mínimos foi aplicada para a obtenção de uma reta e para avaliar o quão próximos estariam os resultados obtidos pelos dois métodos. Os resíduos, ou seja, a diferença do valor médio de pureza obtido pela análise por RMN de ¹H e aquela determinada pela reta, foram calculados. Para avaliar a presença de *outliers* nos resultados de pureza dos comprimidos de *ecstasy*, foram analisados o conjunto dos 6 resultados, sendo 3 da quantificação por CG-DIC e 3 da por RMN de ¹H. Para uma comparação estatística dos métodos, o teste T pareado foi aplicado, com o uso do *software* Minitab, para o conjunto das purezas médias das amostras obtidas pelos dois métodos.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1 Caracterização dos comprimidos

A caracterização dos comprimidos de *ecstasy* apreendidos pela PF foi feita com o objetivo de uma possível correlação entre drogas apreendidas em estados e/ou épocas diferentes, no contexto do Projeto PeQui do *ecstasy*, que pode resultar na indicação de rotas de tráfico e até mesmo de laboratórios de síntese dessas drogas.

Os comprimidos foram separados em 39 lotes, que apresentaram variadas cores e 17 logotipos diferentes, sendo apenas um, o logotipo denominado diamante, em alto relevo. Alguns dos logotipos podem ser vistos nas fotos apresentadas na Figura 16.

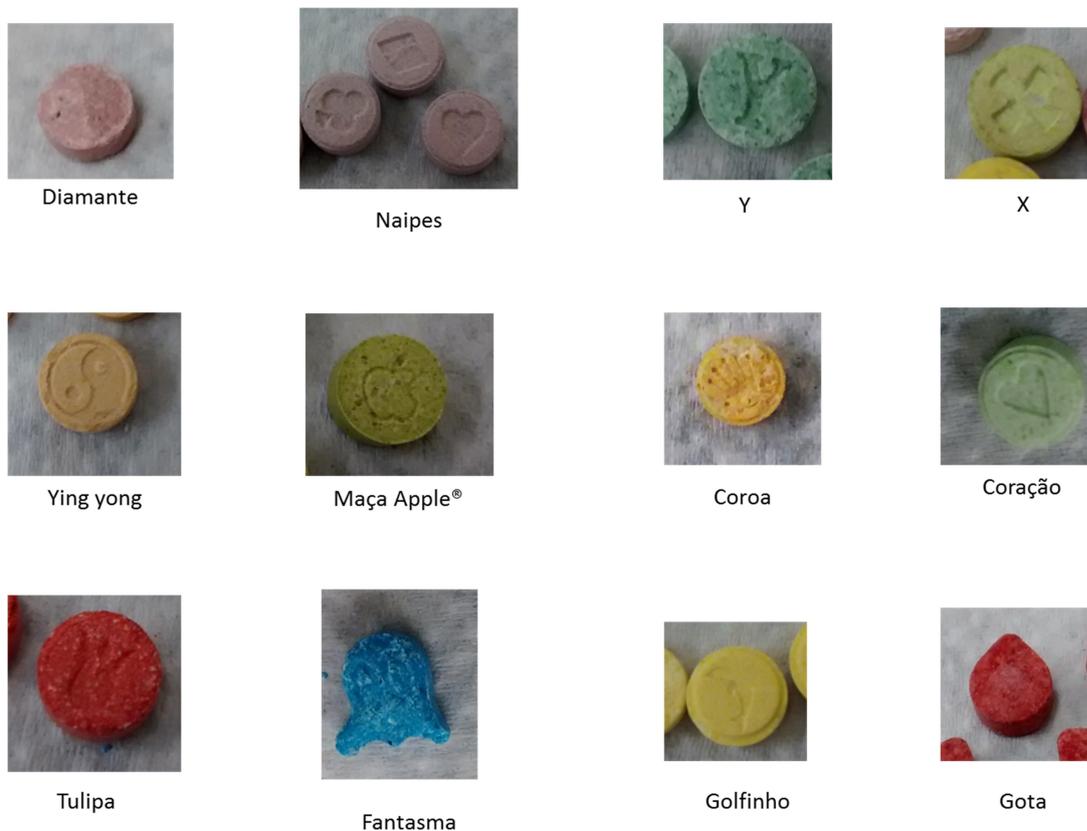


Figura 16 – Logotipos das amostras de comprimidos de *ecstasy*

As amostras analisadas decorrem de 25 apreensões em 6 estados brasileiros: Alagoas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná e São Paulo, conforme apresentado na Tabela 29. O Pará foi o estado que obteve a maior média de comprimidos por apreensão, com 19.956 comprimidos em uma única apreensão, enquanto a média geral foi de 5.931 comprimidos por apreensão. São Paulo apresentou o maior número de comprimidos apreendidos, representando 63 % do total, conforme demonstrado na Figura 17.

Tabela 29 – Comprimidos apreendidos em cada estado

Estado	Nº de apreensões	Nº total de comprimidos apreendidos	Média de comprimidos por apreensão
AL	1	197	197
MS	1	215	215
MT	5	2.754	551
PA	1	19.956	19.956
PR	12	32.211	2.684
SP	5	92.935	18.587
TOTAL	25	148.268	5.931

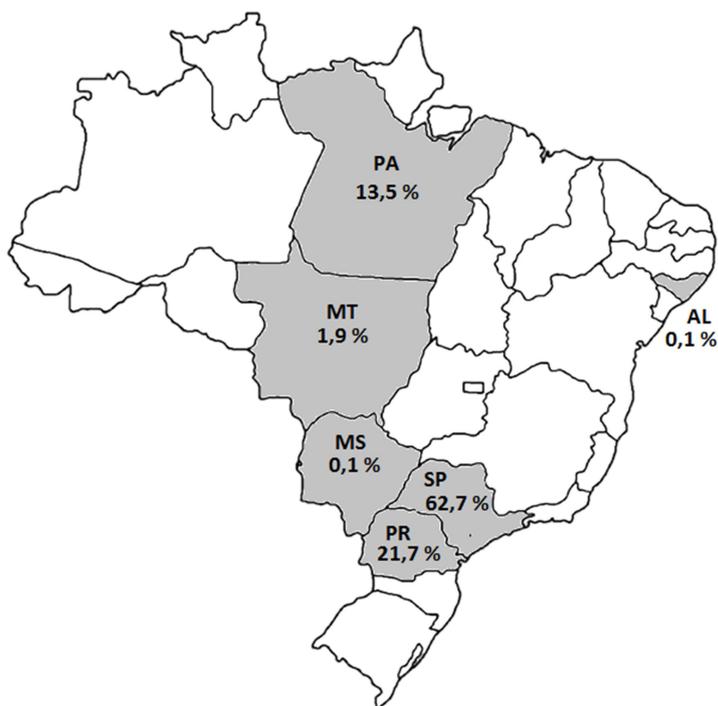


Figura 17 – Mapa com a porcentagem do número de comprimidos apreendidos por estado

A massa média de 10 comprimidos de cada lote variou de 158,42 a 429,19 mg (média de 252,23 mg). A Figura 18 mostra a distribuição da massa média dos comprimidos nos lotes apreendidos.

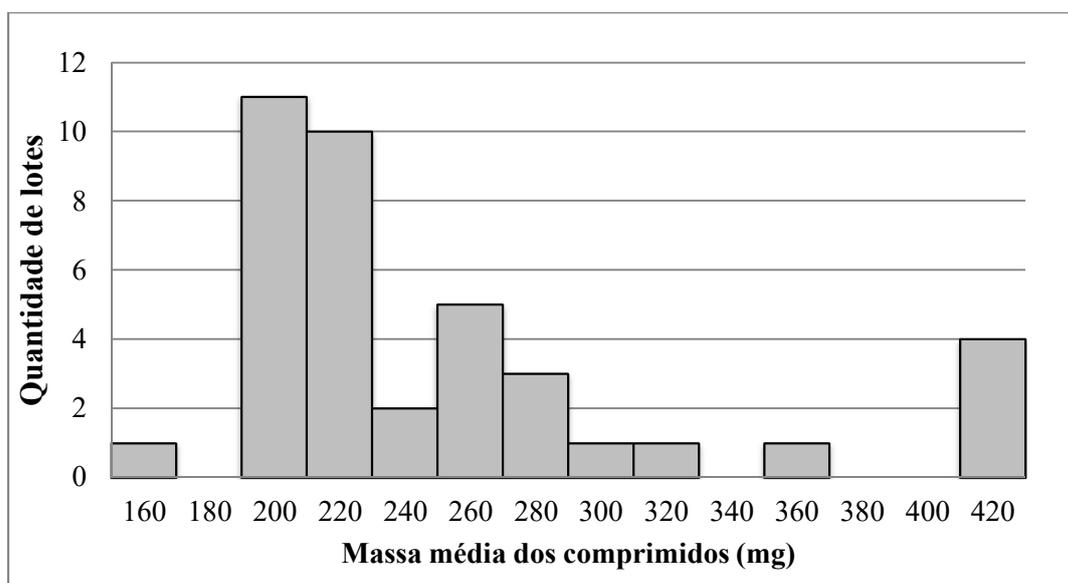


Figura 18 - Gráfico da quantidade de lotes em uma mesma faixa de massa média dos comprimidos

O excipiente identificado em mais de 60 % dos lotes foi a celulose. Na Figura 19 encontra-se o espectro de FTIR/ATR da celulose utilizado para a sua identificação. Outros excipientes encontrados foram sacarose, amido, talco e ésteres graxos de cadeia longa.

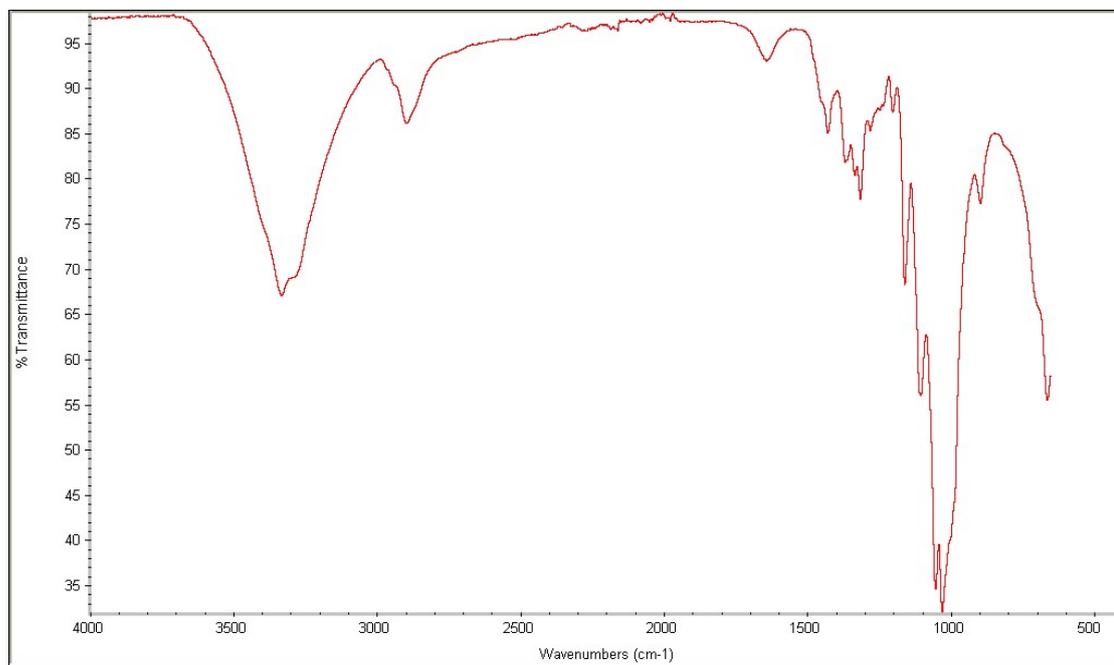


Figura 19 – Espectro de FTIR/ATR de amostra padrão de celulose

Os resultados da caracterização dos comprimidos estão compilados na Tabela 30, com os lotes agrupados por logotipo.

Tabela 30 – Caracterização físico-química dos comprimidos de *ecstasy*

Registro	Massa média (mg)	Comprimidos		Estado - Mês/Ano da apreensão	Excipiente (FTIR/ATR)
		Cor	Logotipo		
1309/11	217,79	Rosa	Diamante	PA - 06/2011	Celulose
363/12	227,09	Rosa	Diamante	MS - 02/2012	Celulose
187/12	229,4	Rosa	Diamante	MT - 02/2012	Celulose
1839/12 C	227,27*	Rosa	Diamante	PR - 07/2012	Celulose
4332/12 A	260,14	Verde	Maça - 'Mac'	SP - 08/2012	Celulose
5212/12	295,73	Verde	Maça - 'Mac'	SP - 10/2012	Celulose
4332/12 B	268,36	Azul escuro	Maça - 'Mac'	SP - 08/2012	Celulose
3780/11 A	429,19	Amarelo	Maça - 'Mac'	PR - 11/2011	Sacarose
3781/11 A	426,21	Amarelo	Maça - 'Mac'	PR - 11/2011	Sacarose
3780/11 B	414,41	Roxo	Maça - 'Mac'	PR - 11/2011	Talco
3781/11 B	413,61	Roxo	Maça - 'Mac'	PR - 11/2011	Amido
4332/12 C	198,16	Amarelo	Coroa - 'Rolex'	SP - 08/2012	Talco
4332/12 E	196,36	Azul claro	Coroa - 'Rolex'	SP - 08/2012	Celulose
2626/12	220,02	Rosa	Coroa - 'Rolex'	SP - 06/2012	Celulose
1839/12 E	216,48*	Rosa	Coroa - 'Rolex'	PR - 07/2012	Celulose
1959/12	201,5	Verde	Y	MT - 12/2012	Ésteres graxos de cadeia longa
1465/12	195,76	Verde	Y	MT - 09/2012	Ésteres graxos de cadeia longa
1839/12 D	205,81*	Verde escuro	Y	PR - 07/2012	Ésteres graxos de cadeia longa
2949/12	197,13	Verde	Y	PR - 12/2012	Ésteres graxos de cadeia longa

Continua

Registro	Massa média (mg)	Comprimidos		Estado - Mês/Ano da apreensão	Conclusão
		Cor	Logotipo		Excipiente (FTIR/ATR)
958/12	196,93*	Vermelho	Y	PR - 05/2012	Ésteres graxos de cadeia longa
5870/12	204,97	Azul	Y	SP - 11/2011	Ésteres graxos de cadeia longa
543/13	158,42	Rosa	Y	PR - 02/2013	Celulose
1837/12	231,59*	Amarelo	Golfinho	PR - 07/2012	Celulose
1839/12 A	207,19*	Amarelo	Golfinho	PR - 07/2012	Celulose
798/13	261,4	Vermelho	Formato de gota	PR - 03/2013	Sacarose
835/13	271,99	Vermelho	Formato de gota	PR - 03/2013	Sacarose
843/13	263,93	Verde	Formato de gota	PR - 03/2013	Sacarose
672/13	202,39	Verde	Coração	PR - 03/2013	Celulose
768/13	195,32	Verde	Coração	PR - 03/2013	Celulose
652/12	210,65*	Azul	C	AL - 06/2012	Celulose
122/13	226,03	Branco	0 0 7	MT - 02/2013	Celulose
913/13	275,26	Vermelho	Tulipa	MT - 10/2013	Celulose
4460/12 A	276,47	Rosa claro	Naipes	SP - 09/2012	Celulose
4460/12 B	258,15	Rosa escuro	Flor	SP - 09/2012	Celulose
4332/12 D	354,32	Laranja	Ying Yang	SP - 08/2012	Celulose
1746/12	247,47*	Azul	Fantasma	PR - 07/2012	Celulose
1839/12 F	228,36*	Roxo	Flor	PR - 07/2012	Celulose
3267/13	214,98	Verde	Símbolo da paz	PR - 11/2013	Celulose
1839/12 B	310,65*	Verde claro	X	PR - 07/2012	Celulose

*Média calculada com n < 10.

Os testes de precipitação para cloreto resultaram positivo para todos os lotes, indicando o uso geral do MDMA na forma de sal cloridrato. No decorrer dos testes, as soluções apresentaram formação de turvação intensa, confirmando a formação de um precipitado branco, conforme ilustrado na Figura 20.

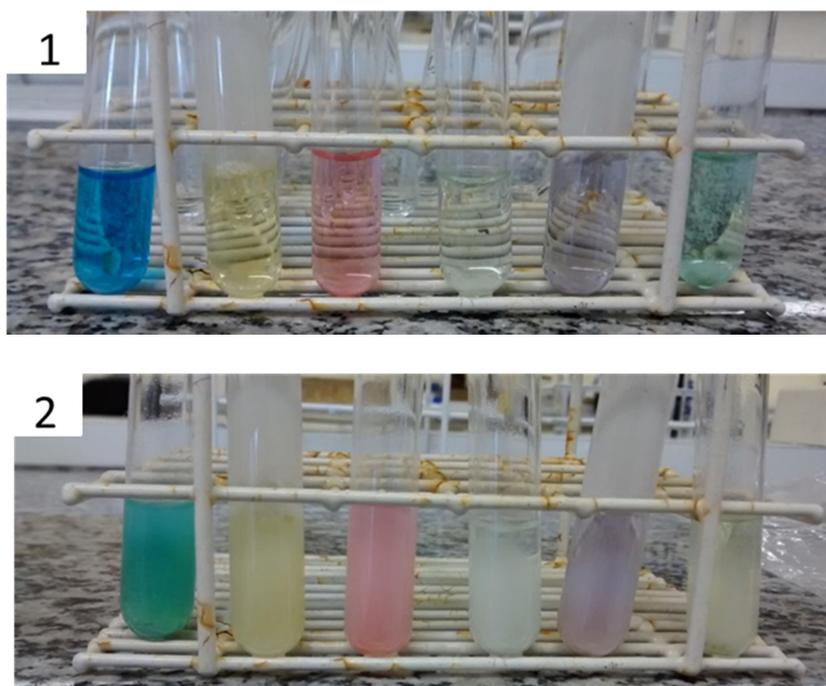


Figura 20 – Teste de Cloreto: 1. Amostras solubilizadas em água. 2. Amostras ao final do teste

6.3.2 Análise das amostras reais por CG-DIC

A pureza de um comprimido de cada lote encontrada após análise pelo CG-DIC (Tabela 31) variou de $10,5 \pm 0,7$ % a $77,0 \pm 4,8$ %, com média de $41,9 \pm 2,6$ %. O maior coeficiente de variação das triplicatas de cada lote encontrado foi de 4,4 %, e a média dos CV foi de 1,9 % (Apêndice F). Ao usar a massa média dos comprimidos de cada lote e a pureza, foi possível estimar a quantidade de MDMA.HCl em um comprimido de cada lote e esse valor variou de 39,4 a 151,8 mg, sendo a média dos 39 lotes igual a 96,4 mg por comprimido. Dessa forma, a maioria das amostras reais apresentou concentração dentro da faixa descrita na literatura, de 50 a 150 mg de MDMA, sendo apenas 5 lotes com quantidades estimadas fora dessa faixa (3 lotes com valores abaixo de 50 mg e 2 lotes com valores acima de 150 mg). A

Figura 21 mostra a distribuição da massa de MDMA.HCl, por comprimido, por número de lotes apreendidos.

Tabela 31 – Pureza das amostras determinada por CG-DIC

Amostra	Pureza (%)	Massa MDMA.HCl (mg)	Amostra	Pureza (%)	Massa MDMA.HCl (mg)
3780/11 A	10,5	44,9	768/13	43,9	85,8
3780/11 B	12,7	52,6	2626/12	44,4	97,7
3781/11 A	12,8	54,7	4332/12 E	45,8	90,0
3781/11 B	13,2	54,5	1309/11	48,0	104,4
835/13	14,8	40,2	4332/12 C	48,3	95,6
798/13	15,1	39,4	1839/12 C	48,5	110,2
843/13	19,6	51,7	652/12	52,4	110,4
913/13	21,4	59,0	363/12	52,9	120,1
1839/12 F	29,9	68,2	187/12	53,0	121,5
5212/12	31,4	92,9	1837/12	53,5	124,0
1839/12 B	31,9	99,1	1746/12	54,0	133,5
122/13	32,0	72,3	1839/12 A	55,6	115,3
4460/12 A	33,3	91,9	543/13	56,6	89,7
4332/12 D	33,3	118,0	1465/12	60,9	119,3
4460/12 B	36,0	92,9	5870/12	61,9	126,8
4332/12 B	41,8	112,1	1839/12 D	66,1	136,0
1839/12 E	41,9	90,7	1959/12	74,9	151,0
4332/12 A	42,9	111,7	958/12	75,7	149,1
3267/13	42,9	92,3	2949/12	77,0	151,8
672/13	43,6	88,3			

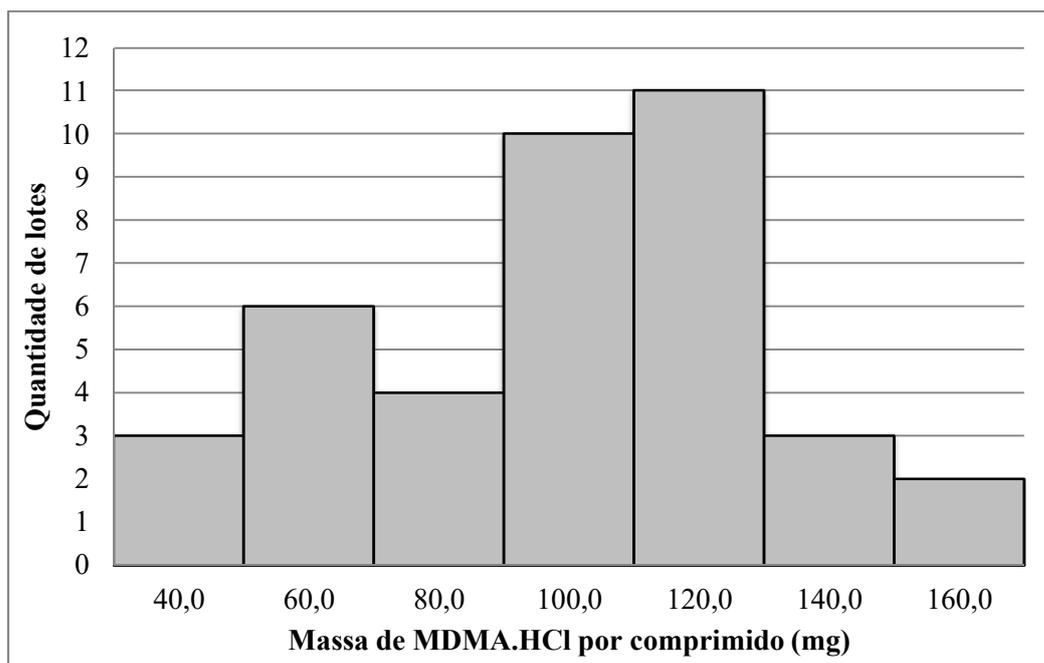


Figura 21 – Quantidade de lotes em uma mesma faixa de massa de MDMA.HCl por comprimido

Para a identificação de adulterantes nas amostras, foram utilizados os tempos de retenção dos analitos presentes nas soluções analisadas no teste de seletividade do método de CG-DIC, logo é possível que outros analitos, além desses, estejam presentes nas amostras. Foi identificado pelo menos um adulterante em 15 % das amostras analisadas. A partir dos cromatogramas foi possível identificar a presença de aminopirina em 3 amostras, 3781/11 B, 2949/12 e 1959/12 (Figura 22). A cafeína e a procaína foram encontradas em duas amostras, 798/13 e 835/13, e a anfetamina, em apenas uma amostra, 843/13 (Figura 23). A presença destes adulterantes foi confirmada por análises de CG-EM.

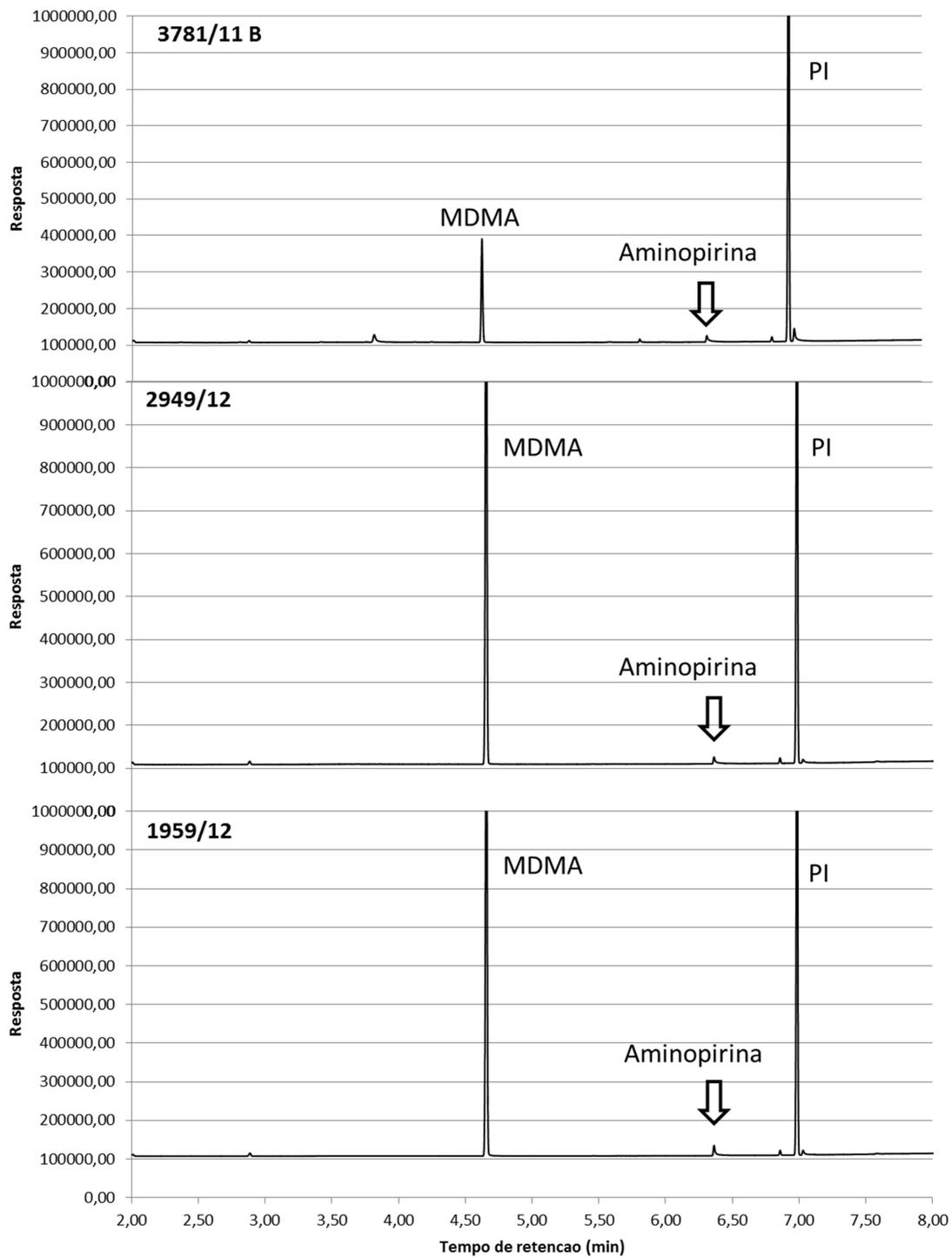


Figura 22 – Cromatogramas das amostras 3781/11 B, 2949/12 e 1959/12

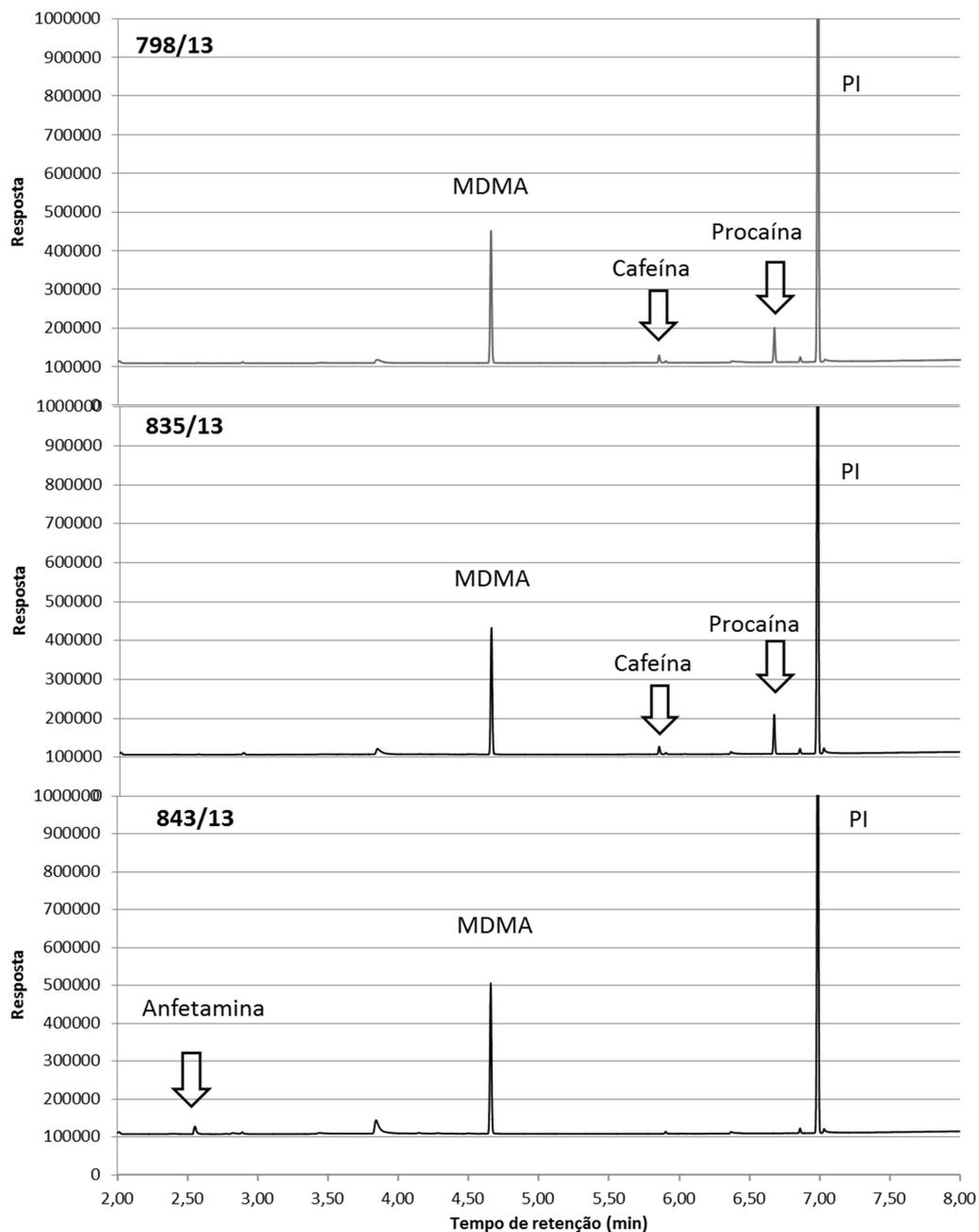


Figura 23 – Cromatogramas das amostras 798/13, 835/13 e 843/13

6.3.3 Agrupamento de amostras

Agrupou-se os lotes com o mesmo logotipo, excipiente e adjuvante e foi possível propor 9 conjuntos, dos quais 6 apresentavam CV intragrupo para pureza do MDMA menor que 10 % (Tabela 32), valor de aceitação usado no teste de repetitividade do método.

Tabela 32 – Agrupamento de lotes de comprimidos similares

Comprimidos		Número de lotes	Estados das apreensões	Pureza média de MDMA.HCl (%)	CV (%)
Logotipo	Excipiente/Adulterante				
Coração	Celulose	2	PR	43,8	0,5
Formato de gota	Sacarose/ Cafeína e Procaína	2	PR	14,9	1,4
Golfinho	Celulose	2	PR	54,6	2,7
Coroa - 'Rolex'	Celulose	3	PR, SP	44,1	4,5
Diamante	Celulose	4	MS, MT, PA, PR	50,6	4,7
Y	Ésteres graxos de cadeia longa/ Aminopirina	2	MT, PR	76,0	8,9
Y	Ésteres graxos de cadeia longa	4	MT, PR, SP	66,2	10,2
'Maça - 'Mac'	Sacarose	2	PR	11,6	14,4
'Maça - 'Mac'	Celulose	3	SP	38,7	16,4

A partir desses dados, uma análise mais aprofundada sobre os comprimidos destes lotes e uma pesquisa das suas respectivas apreensões pode ser feita, possibilitando uma correlação mais confiável. Por exemplo, no caso dos comprimidos com logotipo de diamante, as 4 apreensões foram feitas em 4 estados diferentes (Pará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná) entre junho de 2011 e julho de 2012 (Tabela 30), indicando que houve uma ampla distribuição dos mesmos pelo Brasil.

6.3.4 Análise das amostras reais por RMN de ¹H

Das amostras quantificadas por CG-DIC, 38 também foram quantificadas por RMN de ¹H, a maioria em triplicata. Como não havia material suficiente de algumas amostras, em alguns casos um número menor de replicatas foi feito. O coeficiente de variação das amostras

(Apêndice F), obtido para as análises por RMN, apresentou média igual a 2,82 %. Uma amostra apresentou valor acima do limite usado para a repetitividade do método de 10 % (15,82 %), porém o teste de Grubbs não identificou nenhuma replicata dessa amostra como *outlier*.

O método de RMN de ^1H não foi utilizado neste trabalho com o propósito de auxiliar na identificação de adulterantes, pois para avaliar misturas, como as esperadas em comprimidos de *ecstasy* adulterados, costuma ser necessário separar os sinais de cada analito para identificar cada conjunto de sinais, e análises por outras técnicas de RMN, como as bidimensionais, não fazem parte do escopo desse trabalho.

6.3.5 Comparação dos métodos

O teste de Grubbs foi feito avaliando-se os resultados de quantificação dos dois métodos para cada amostra e dois *outliers* foram identificados, um da amostra 1839/12 A (Figura 33 – Apêndice B) e outro da amostra 2626/12 (Figura 34 – Apêndice B), ambos obtidos na quantificação por RMN de ^1H . Esses valores foram excluídos dos resultados.

Os coeficientes de variação das triplicatas dos 39 lotes quantificados por CG-DIC foram menores que 5,0 %, sendo a média igual a 1,9 % (Apêndice F). Já na quantificação por RMN de ^1H , os resultados apresentaram CV um pouco maiores (média 2,82 %), sendo que uma das amostras apresentou CV acima 10 % e, portanto, fora do limite de aceitação da precisão para a validação dos métodos. O valor maior de CV médio obtido no RMN pode estar relacionado ao diferente preparo de amostra, ao longo período de armazenamento das amostras e ao menor número de triplicatas. Os comprimidos utilizados nas duas quantificações foram triturados e armazenados em *eppendorff* por aproximadamente 1 ano até a efetiva análise quantitativa por RMN. Esse longo período, utilizado para desenvolvimento da metodologia, pode ter ocasionado uma segregação do pó, diminuindo a homogeneidade da amostra. Das 38 amostras analisadas por RMN, apenas 30 puderam ser analisadas em triplicata e, das amostras restantes, 6 foram analisadas em duplicata. Os valores dos CV das amostras reais foram maiores do que os determinados durante a validação dos dois métodos, o que pode ser reflexo da esperada menor homogeneidade das amostras reais.

Na construção do gráfico para comparação dos resultados dos dois métodos validados, o resultado obtido por CG-DIC foi colocado no eixo x, sendo esse método escolhido como referência, por apresentar um CV menor na quantificação das amostras. A reta obtida apresenta bons resultados, equação da reta com inclinação de 0,936, intercessão no eixo y em 0,02 e valor de R^2 de 0,9909 (Figura 24).

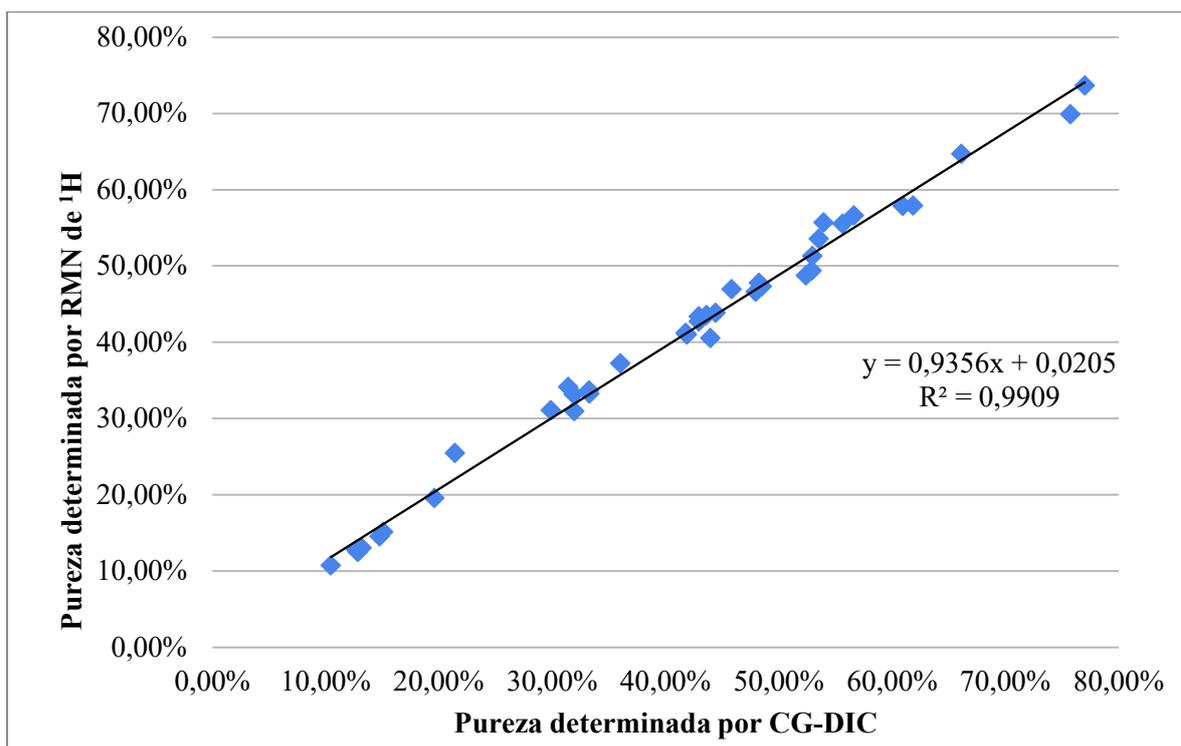


Figura 24 – Gráfico da comparação dos métodos pela pureza das amostras

Os resíduos calculados para os valores obtidos por RMN de ^1H e aqueles previstos pela reta (Figura 25) ficaram abaixo de 5 % para todas as 38 amostras, que foram numeradas pela ordem crescente do valor de pureza, mostrando, novamente, uma boa correlação dos resultados dos 2 métodos. O gráfico de resíduos construído é homocedástico, com distribuição aleatória, sem tendências ou curvaturas, como desejado.

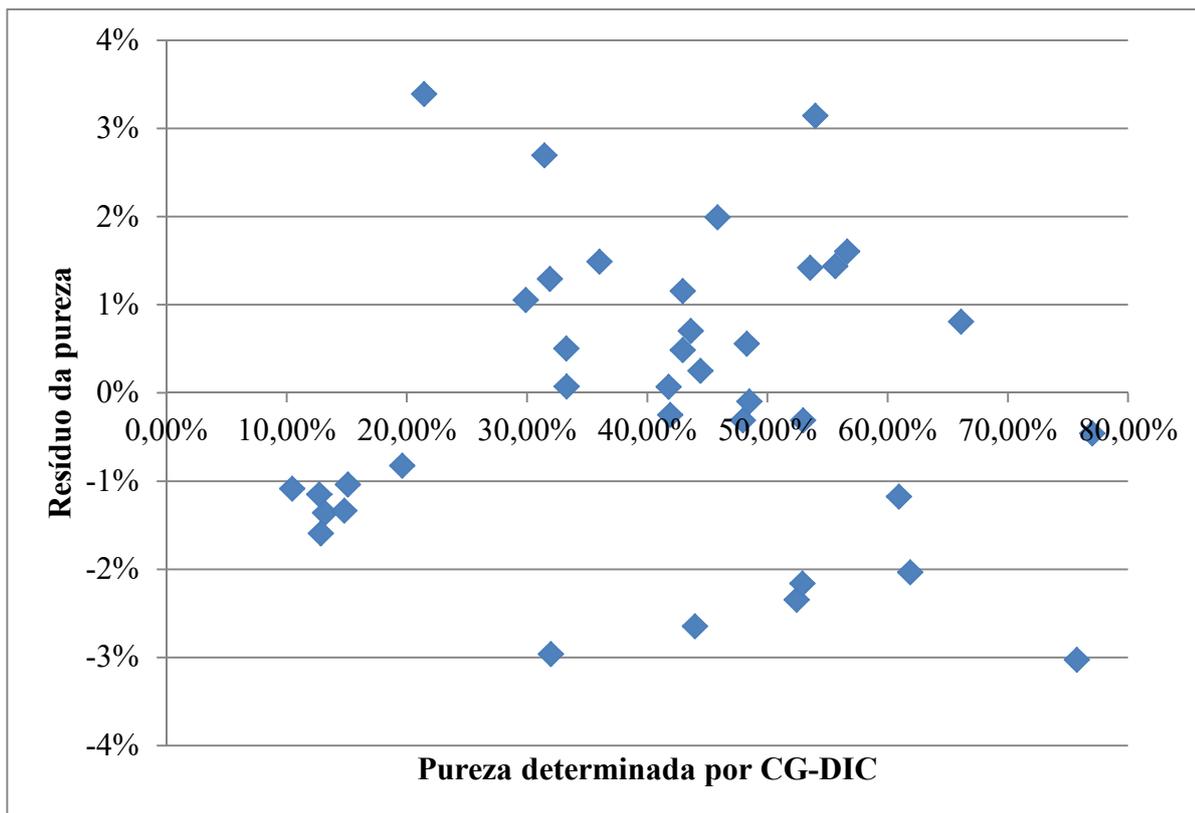


Figura 25 – Resíduos do gráfico de comparação entre CG-DIC e RMN de ^1H

Os resultados das quantificações das amostras pelos dois métodos foram plotados em um gráfico, no qual é possível ver as duas faixas, com os valores de purezas médias e as respectivas incertezas, dos dois métodos (Figura 26).

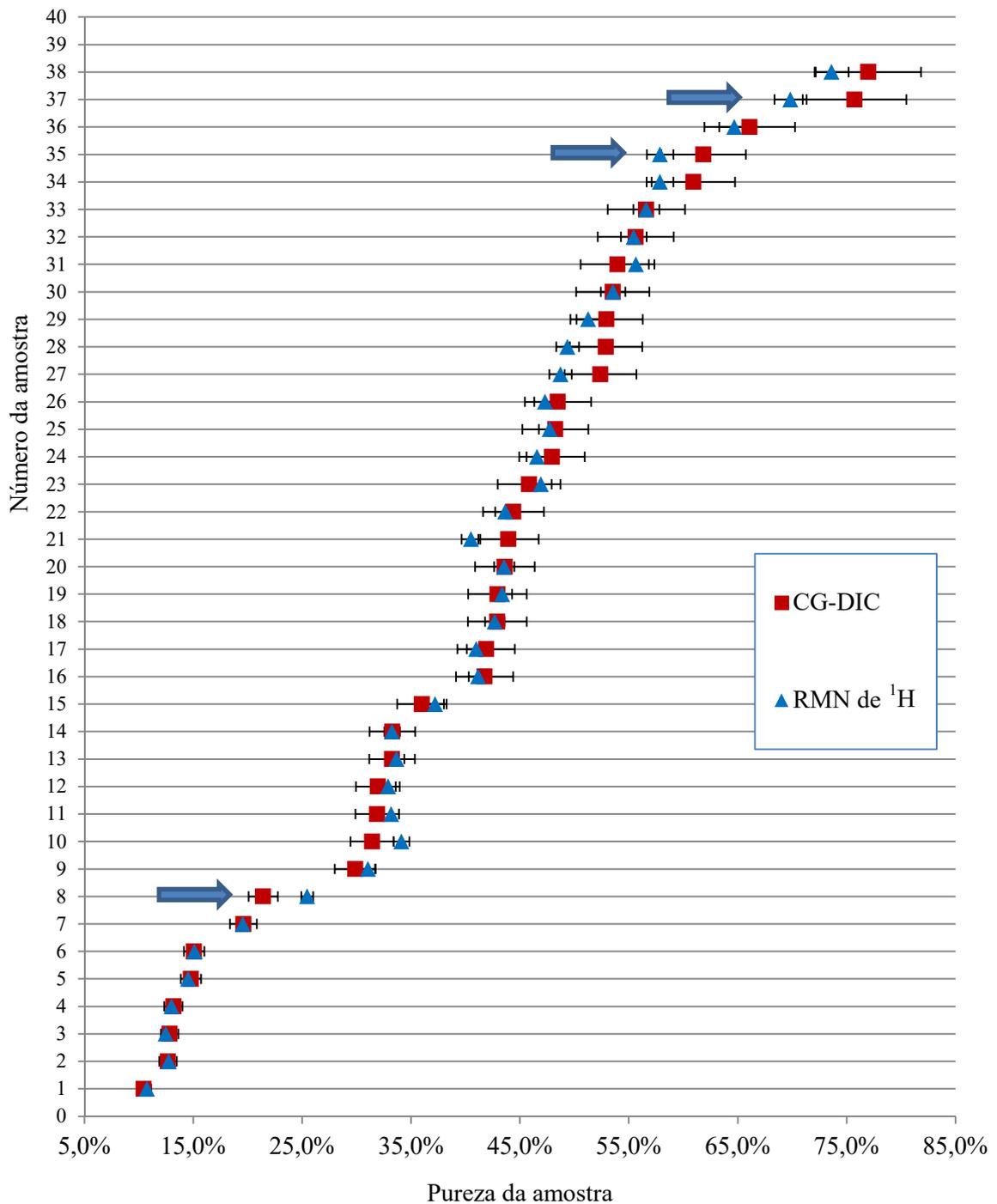


Figura 26 – Pureza média das amostras e incerteza do respectivo método. Amostras discrepantes (8, 35 e 37) destacadas.

Ao se comparar os resultados obtidos pelos dois métodos, foram identificadas 3 amostras discrepantes (8 = 913/13, 35 = 5870/12, 37 = 958/12), em que a diferença entre os resultados dos dois métodos foi maior que a observada nas outras amostras. Nessas três

amostras nenhuma das médias se encontram dentro da faixa de incerteza do outro método (Tabela 33). Somente a amostra 8 (913/13) apresentou faixas de pureza e incerteza não coincidente entre os dois métodos em nenhum momento.

Tabela 33 – Amostras com resultados distantes na quantificação pelos dois métodos

Número da amostra	Amostra	CG-DIC		RMN de ¹ H	
		Pureza média (%)	Incerteza (%)	Pureza média (%)	Incerteza (%)
8	913/13	21,4	1,3	25,5	0,5
35	5870/12	61,9	3,9	57,9	1,2
37	958/12	75,7	4,8	69,9	1,5

Ao se aplicar o teste T pareado, em que a hipótese nula representa a igualdade no resultado dos dois métodos ($H_0: \mu = 0$), concluiu-se que os resultados do CG-DIC e do RMN de ¹H não são significativamente diferentes (Tabela 34). O valor de t observado ($t_{obs} = 1,93$) está incluído na região crítica, definida por valores tabelados ($-2,026 < t_{obs} < 2,026$) e o valor de P é maior que 0,05 ($P = 0,061$), logo se aceita a H_0 ao nível de 5 % de significância. Além disso, o valor de μ para H_0 ($H_0: \mu = 0$) está dentro dos limites obtidos para o intervalo de 95 % de confiança ($-0,0003 < 0,00000 < 0,01243$). Portanto, os resultados obtidos pelos dois métodos na quantificação das amostras são estatisticamente iguais.

Tabela 34 – Resultado do teste T pareado

Informação	Valor
t_{obs}	1,93
Graus de liberdade	37
P	0,061
Média das diferenças	0,00607
Desvio padrão das diferenças	0,01936
Hipótese alternativa	$\neq 0$
Intervalo de confiança	95%
Limite inferior	-0,0003
Limite superior	0,01243

Cabe ressaltar que a análise por RMN de uma das amostras identificou um problema no método de CG-DIC. A análise por RMN de ^1H da amostra 2696/12, inicialmente identificada como contendo MDMA pelo método de CG-DIC desenvolvido, mostrou que, na realidade, a amostra não continha esse analito. A ausência dos sinais específicos de MDMA no espectro de RMN de ^1H (Figura 27) e a análise da amostra por CG-EM, feita pela comparação com um banco de dados, mostraram que a amostra continha a 1-m-(trifluorometilfenil) piperazina (TFMPP), substância também comercializada na forma de comprimidos e que apresenta tempo de retenção muito próximo ao MDMA no CG-DIC.

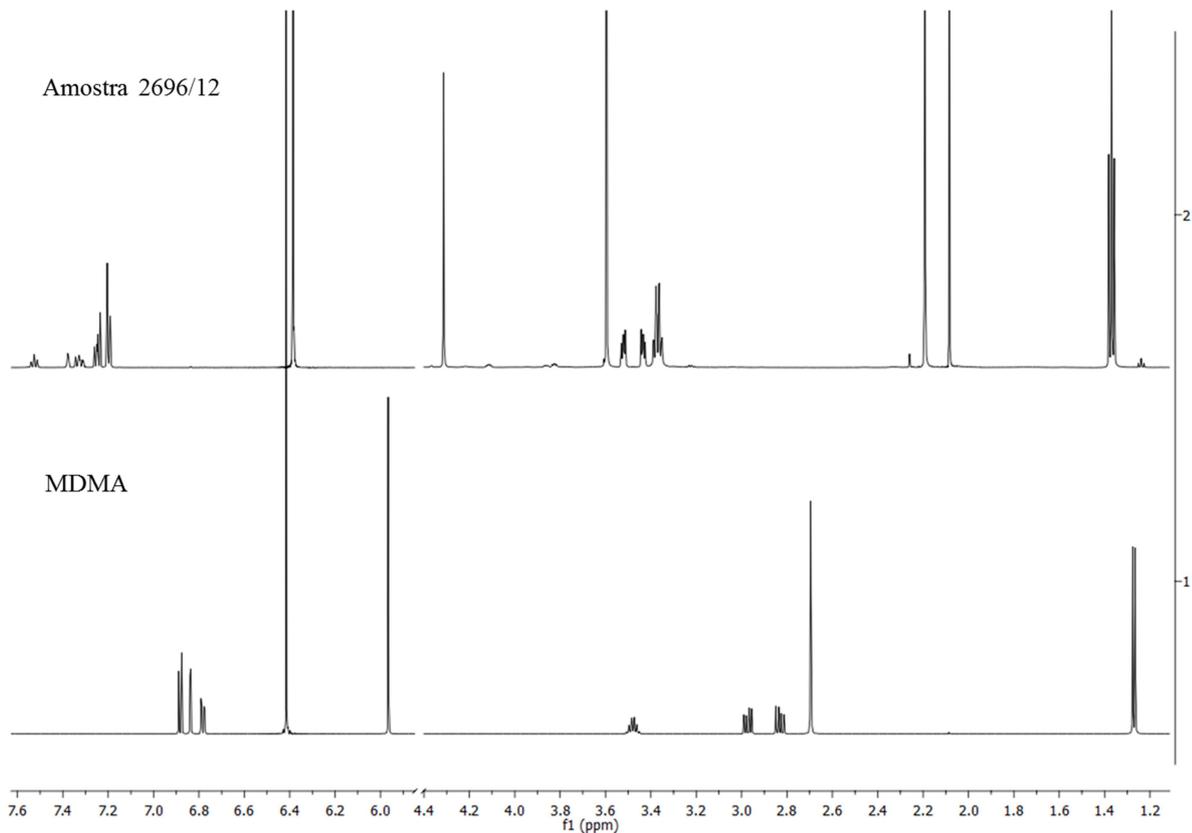


Figura 27 – Espectros de RMN de ^1H do padrão de MDMA.HCl e da amostra 2696/12

O RMN, como possibilita a caracterização da amostra pela identificação dos hidrogênios, é menos passível de um resultado falso positivo, pois uma análise de todos os sinais dos diferentes hidrogênios da molécula pode ser feita, enquanto o cromatograma utiliza apenas o tempo de retenção do analito. Dessa forma, é uma ótima ferramenta para análise de amostras desconhecidas, como é o caso de novas drogas sintéticas.

A injeção no CG-DIC de solução contendo material de referência de TFMPP mostrou que, na realidade, os tempos de retenção do TFMPP e MDMA não são totalmente coincidentes (4,61 min e 4,67 min, respectivamente) e a resolução obtida foi maior que 1,5 (2,21), demonstrando que não há sobreposição dos dois picos (Figura 28). Este caso de “falso positivo” poderia ter sido evitado se a faixa de tempo de retenção usada para identificação de MDMA no CG-DIC estivesse mais estreita. Esse parâmetro foi corrigido no método e não são esperados mais problemas de identificação entre estes dois analitos no CG-DIC.

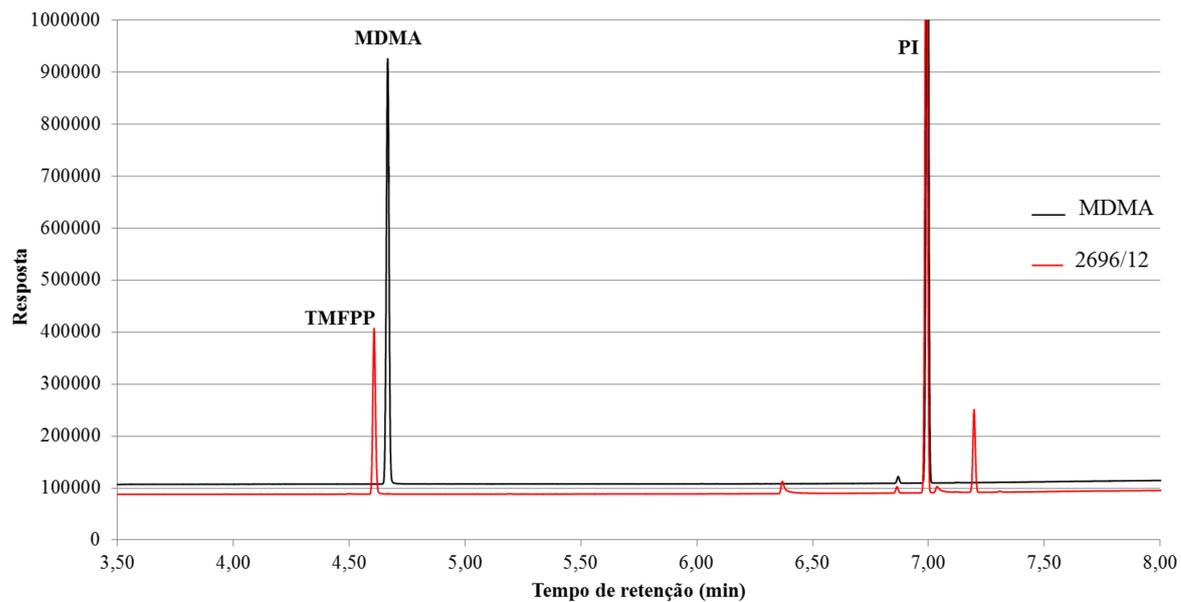


Figura 28 – Cromatogramas do padrão de MDMA e da amostra 2696/12

7 CONCLUSÃO

O método de quantificação de MDMA em comprimidos de *ecstasy* por CG-DIC desenvolvido nesse trabalho foi validado através das figuras de mérito: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação, estabilidade e estimativa de incerteza. Os resultados obtidos para as figuras de mérito podem ser considerados adequados ao propósito de utilização na área forense. A faixa de trabalho estudada é grande, cobrindo as concentrações de MDMA usualmente encontradas nos comprimidos e expressando os resultados com uma estimativa de incerteza adequada para os objetivos da análise forense. A precisão e a exatidão foram demonstradas nos extremos e no centro da curva analítica, garantindo um resultado confiável ao longo de toda essa faixa. O método se mostrou robusto e estável, sendo resistente a pequenas variações nos parâmetros do CG-DIC e ao tempo entre o preparo e a análise. O preparo de amostra ficou simples, rápido e, por ser similar a outros métodos já em uso no laboratório do INC, se mostrou, também, conveniente.

A validação do método geral de quantificação por RMN de ^1H foi demonstrada pela avaliação das figuras de mérito linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação, estabilidade e estimativa de incerteza. Todas as figuras de mérito apresentaram resultados muito bons para os objetivos da análise forense, mostrando-se como uma alternativa viável para quantificação de drogas de abuso. O método apresentou uma ótima linearidade ao longo da faixa de relação molar do padrão interno, podendo ser aplicado em amostras de diferentes concentrações e expressando os resultados com uma estimativa de incerteza adequada para os objetivos da análise forense. A precisão e a exatidão apresentaram bons resultados ao longo de toda a faixa de relação molar. O método se mostrou robusto frente às alterações realizadas tanto nos fatores de aquisição quanto de processamento do espectro de RMN de ^1H . As soluções utilizadas para a validação do método se mostraram estáveis para o período avaliado.

O método de identificação e quantificação por RMN de ^1H validado pode ser utilizado nas análises de drogas reais apreendidas pela Polícia Federal. O método validado garante a quantificação de hidrogênios, em diferentes ambientes químicos, presentes na solução. Por isso, esse método pode, em teoria, ser aplicado para qualquer molécula orgânica desde que figuras de mérito como recuperação e seletividade sejam verificadas, sendo, portanto, uma

ótima alternativa para amostras desconhecidas. Além disso, a técnica de RMN pode ser utilizada na construção de padrões de trabalho de novas drogas sintéticas, ao fazer uma fiel identificação do analito e a determinação da pureza da amostra. Assim, o padrão de trabalho pode ser utilizado como referência nas análises desse material por outras técnicas, evitando a compra de padrão certificado, o que gera economia e agilidade para as análises forenses.

A aplicação do método de quantificação por RMN de ^1H no MDMA.HCl padrão avaliou as figuras de mérito seletividade, exatidão, precisão e estabilidade. Os resultados confirmaram a ótima aplicabilidade do método nesse analito. A seletividade ao MDMA.HCl ficou evidenciada para todos os adulterantes analisados. Bons resultados também foram obtidos para a precisão e a exatidão. As soluções se apresentaram estáveis para os tempos e condições avaliados.

Foram analisadas 39 amostras de comprimidos contendo MDMA.HCl apreendidos em procedimentos da Polícia Federal e os parâmetros quantitativos obtidos fizeram parte da análise de possíveis correlações entre as diferentes apreensões. Além da pureza, o excipiente majoritário da amostra, identificado por análise de infravermelho, a presença de adulterantes, identificados por CG-DIC, e o logotipo também foram usados para agrupar as amostras. A partir de dados como estes a Polícia Federal poderá aprofundar sua compreensão a respeito da composição do *ecstasy* e avaliar se novas análises serão necessárias, como a identificação de componentes minoritários derivados da síntese do MDMA.

Os resultados obtidos na quantificação das amostras reais por CG-DIC e RMN mostraram a grande proximidade no desempenho dos métodos para quantificação de MDMA em comprimidos de *ecstasy* das duas técnicas. O CG-DIC é uma técnica relativamente barata e amplamente aplicada na quantificação de drogas em análises forenses. Porém, o RMN de ^1H gerou resultados quantitativos com menor incerteza de medição de forma eficiente e versátil. A desvantagem do RMN é o alto custo do equipamento, entretanto isso não se aplica quando colaborações entre instituições de ensino e laboratórios forenses são firmadas. A possibilidade do RMN de identificar o princípio ativo de uma droga e o quantificar sem uso de um material de referência em uma mesma análise, demandando menos trabalho e tempo (não é necessário construir uma curva analítica), é a maior vantagem dessa técnica frente aos métodos cromatográficos normalmente utilizados, tornando-o uma valiosa ferramenta no apoio à obtenção de dados quantitativos no ambiente forense, que sempre lida com urgência na emissão de resultados e imprevisibilidade de composição das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 www.unodc.org/wdr2014, acesso em Julho de 2014.
- 2 Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuto, J.A.O.; Fundamentos de toxicologia, 3^a ed.; Atheneu: São Paulo, Brasil, 2008.
- 3 Lapachinske, S. F. Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico em fase gasosa para análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina (*ecstasy*) e outros derivados anfetamínicos em comprimidos. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.
- 4 Lapachinske, S. F.; Yonamine, M.; Moreau, R. L. M. Validação de método para determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de *ecstasy* por cromatografia em fase gasosa. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **2004**, 40, 75.
- 5 Lasmar, M. C.; Leite, E. M. A.; Desenvolvimento e validação de um método cromatográfico em fase gasosa para análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina (*ecstasy*) e outros derivados anfetamínicos em comprimidos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **2007**, 43, 223.
- 6 Passagli, M.; *Toxicologia Forense: teoria e prática*, 2^a ed.; Millennium: Campinas, Brasil, 2009.
- 7 Baer, I. *The analysis of excipients in ecstasy tablets and their contribution in a drug profiling context*. *Tese de Doutorado*, Université de Lausanne, Suíça, 2007.
- 8 Amara-Chem; *Drug Identification Bible*, Amara-Chem: Colorado, EUA, 2006.
- 9 Costa, J. L.; Pintão, E. R.; Corrighiano; C. M. C.; Negrini; O. N. Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de *ecstasy* por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF). *Química nova*, **2009**, 32, 965.
- 10 Ribeiro, F. A. L.; Ferreira, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, **2008**, 31, 164.
- 11 www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf, acesso em Julho 2014.
- 12 ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2005.
- 13 www.chem.mtu.edu/~fmorriso/cm3215/UncertaintySlopeInterceptOfLeastSquaresFit.pdf, acesso em Julho 2014.

14 Bieniek, D. D.; Bessegato, T. C.; Sansone, P. E. S.; Costa, T. D.; Guterres, S. S.; Conrado, D. J.; Haas, S. E. Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento de clozapina em nanopartículas poliméricas. *Erechim*, **2011**, 35, 17.

15 Botelho, E. D. Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, Brasil, 2011.

16 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*, **2004**, 27, 771.

17 Gehring, P. A. F.; Santos, O. M. M.; Pereira, G. R.; Araújo, M. B. Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de cinarizina empregando planejamento fatorial. *Química Nova*, **2011**, 34, 455.

18 Rodrigues, J. M.; Cruz, M. H. C.; Couto, P. R. G.; Cunha, V. S. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. *Química Nova*, **2010**, 33, 1578.

19 Bruni, A. T.; Velho, J. A.; Oliveira, M. F., *Fundamentos de Química Forense*, 1ª ed.; Millennium: Campinas, Brasil, 2012.

20 www.swgdrug.org, acesso em Maio de 2015.

21 Moreau, R. L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; *Toxicologia Analítica*, 1ª ed.; Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

22 Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Princípios de Análise Instrumental*, 6ª ed.; Bookman: Porto Alegre, Brasil, 2009.

23 Harris, D. C. *Análise Química Quantitativa*, 8ª ed.; LTC: Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

24 Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R.; *Introdução à espectroscopia*, 4ª ed.; Cengage Learning: São Paulo, Brasil, 2010.

25 Hays, P. A. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods for determining the purity of reference drug standards and illicit forensic drug seizures. *Journal of forensic science*, **2005**, 50, 1342.

26 Hays, P. A.; Thompson R. A. A processing method enabling the use of peak height for accurate and precise proton NMR quantitation. *Magnetic resonance in chemistry*, **2009**, 47, 819.

27 Malz, F.; Jancke, H. Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, 38, 813.

28 Bharti, S. K.; Roy, R. *Quantitative ¹H NMR spectroscopy. Trends in Analytical Chemistry*, **2012**, 35, 5.

29 Claridge, T. D. W.; *High-resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2^a ed.; Elsevier: Oxford, Inglaterra, 2009.

30

www.unodc.org/documents/scientific/2014_Global_Synthetic_Drugs_Assessment_web.pdf,
acesso em Julho de 2014.

APÊNDICE A

INCERTEZA DA MEDIÇÃO (CG-DIC)

Etapa 1 - Especificação do mensurando

O mensurando desse método é a pureza da amostra e a equação que calcula seu valor, obtida a partir da equação da curva analítica, é a equação abaixo:

$$P_{amostra} = \left(\frac{A_{MDMA}}{A_{PI}} - b \right) \times \frac{C_{PI} \times V_{PI} \times P_{MDMA}}{a \times M_{amostra}} \quad (14)$$

A descrição, o valor e a unidade de cada componente da equação acima estão na Tabela 35.

Tabela 35 - Legenda e valores dos componentes da Equação 14

Sigla	Descrição	Unidade	Valor
$P_{amostra}$	Pureza da amostra	-	-
$\frac{A_{MDMA}}{A_{PI}}$	Razão média da área relativa ($R_{area} = \text{Área do MDMA} / \text{Área do Padrão Interno}$)	-	0,47268
$M_{amostra}$	Massa da amostra (massa média pesada no ponto médio da repetitividade do equipamento)	mg	10,17
P_{MDMA}	Pureza do MDMA padrão (usado na repetitividade do equipamento)	-	0,996
a	Coefficiente de inclinação da curva analítica	-	0,68435
b	Valor da interseção com o eixo y – curva analítica	-	0,00561
C_{PI}	Concentração da solução de Padrão Interno	mg/mL	0,496902
V_{PI}	Volume da solução de Padrão Interno dispensada	mL	10,0

Etapa 2 - Identificação das fontes de incerteza

As fontes de incerteza do método são evidenciadas no diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa), Figura 29. Nesse diagrama estão listadas todas as grandezas presentes na fórmula anterior e as provenientes de fontes externas.

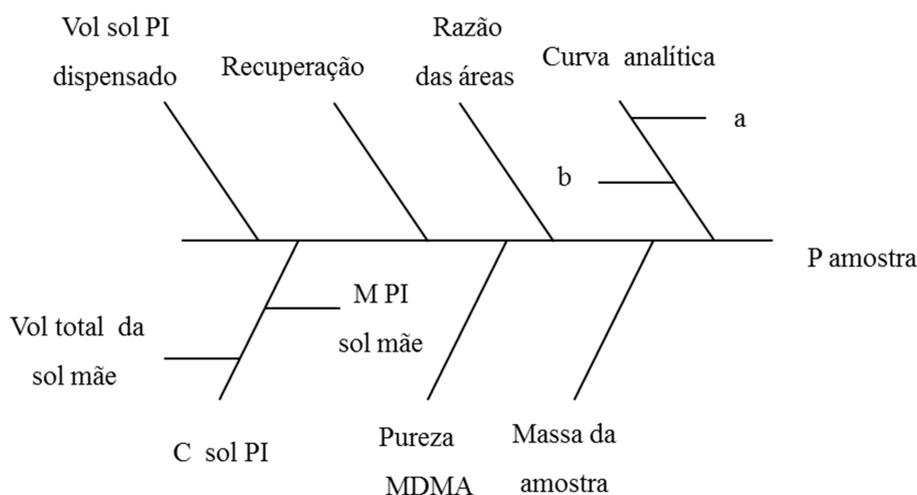


Figura 29 - Diagrama de Ishikawa: contribuições na incerteza na determinação da pureza de uma amostra contendo MDMA

Etapa 3 - Quantificação dos componentes de incerteza

A derivada (coeficiente de sensibilidade) foi utilizada para uniformizar as unidades das grandezas de entrada em relação à pureza da amostra, unidade do mensurando.

Para o cálculo das incertezas associadas no método clássico, deriva-se o componente de incerteza, Tabela 36, em função da pureza da amostra, a partir da equação 14, e multiplica-se pela incerteza desta fonte.

Tabela 36 – Componentes de incerteza do CG-DIC

Incerteza associada	Sigla	Cálculo	Incerteza da fonte
Razão média da área relativa (Área relativa = A_{MDMA}/A_{PI})	μR_{area}	Met. Clássico	Desvio padrão
Curva analítica (a + b)	μcc	Met. Clássico	Desvio padrão
Massa da amostra	$\mu M_{amostra}$	Met. Clássico	Certificado da Balança
Concentração Padrão interno (massa PI + volume total da sol. mãe + pureza do PI)	μC_{PI}	Met. Clássico	Certificado da Balança e Calibração do Balão de 2L
Volume dispensado da solução de padrão interno	μV_{PI}	Met. Clássico	Certificado do Dispensador
Pureza do padrão de MDMA.HCl	μP_{MDMA}	Met. Clássico	Certificado NMI
Recuperação	μRec	Tipo A	Desvio padrão

As equações que definem cada uma das incertezas associadas são apresentadas a seguir:

- μR_{area}

$$\mu R_{area} = \frac{C_{PI} \times V_{PI} \times P_{MDMA}}{a \times M_{amostra}} \times \frac{s_{area}}{\sqrt{n_1}} \quad (15)$$

Em que s_{area} é o desvio padrão das áreas relativas (razões de área) e n_1 é o número de injeções da amostra na repetitividade do equipamento. Substituindo os valores de cada componente tem-se:

$$\mu R_{area} = \frac{0,496902 \times 10 \times 0,996}{0,68435 \times 10,17} \times \frac{0,00056}{\sqrt{6}} = 0,000162640$$

- μ_{cc}

$$\mu_{cc} = \mu'_{cc} \times \frac{C_{PI.cc}}{C_{MDMA.cc}} \quad (16)$$

$$\begin{aligned} \mu'_{cc^2} = & \left(\left(\frac{-1}{a} \right)^2 \times \mu b^2 \right) + \left(- \left(\frac{R_{area} - b}{a^2} \right) \right)^2 \times \mu a^2 + 2 \times \left(- \frac{1}{a} \right) \\ & \times - \left(\frac{R_{area} - b}{a^2} \right) \times \mu a \times \mu b \times r_{ab} \end{aligned} \quad (17)$$

$$\mu a = \sqrt{\frac{((\sum \text{residuo}^2 / (n_2 - 2)) \times \sum x^2)}{(n_2 \times \sum x^2) - (\sum x)^2}} \quad (18)$$

$$\mu b = \sqrt{\frac{n_2 \times (\sum \text{residuo}^2) / (n_2 - 2)}{(n_2 \times \sum x^2) - (\sum x)^2}} \quad (19)$$

$$r_{ab} = - \frac{\sum x}{\sqrt{n \times \sum x^2}} \quad (20)$$

$$x = \frac{C_{MDMA.cc}}{C_{PI.cc}} \quad (21)$$

No qual μ'_{cc} é a incerteza combinada da curva de calibração não relativa; $C_{PI.cc}$ e $C_{MDMA.cc}$ são as concentrações médias da curva analítica de padrão interno e de MDMA.HCl respectivamente; x é a concentração relativa; r_{ab} é o coeficiente de correlação entre a e b ; μ_a e μ_b são as incertezas dos coeficientes angular e linear, nessa ordem; resíduo é a diferença das concentrações relativas gravimétrica e calculada a partir da curva analítica e n_2 é o número de pontos da curva multiplicado pelas replicatas. Substituindo os valores de cada componente das equações 16 e 17 tem-se:

$$\mu_{cc} = 0,00227712 \times \frac{0,49696}{0,360957} = 0,00313515$$

$$\mu'_{cc} =$$

$$\sqrt{\left(\left(\frac{-1}{0,68435}\right)^2 \times 0,00242288^2\right) + \left(-\left(\frac{0,472676 - 0,00561}{0,68435^2}\right)\right)^2 \times 0,00225951^2 + 2 \times \left(-\frac{1}{0,68435}\right) \times -\left(\frac{0,472676 - 0,00561}{0,68435^2}\right) \times 0,00225951 \times 0,00242288 \times -0,778835}$$

$$= 0,00227712$$

- $\mu M_{amostra}$

$$\mu M_{amostra} = -\left(\frac{A_{MDMA}}{A_{PI}} - b\right) \times \frac{C_{PI} \times V_{PI} \times P_{MDMA}}{a \times (M_{amostra})^2} \times \frac{U_{balança}}{k_1} \quad (22)$$

Sendo $U_{balança}$ a incerteza expandida e k_1 o fator de abrangência do certificado de calibração da balança. Substituindo os valores de cada componente tem-se:

$$\begin{aligned}\mu M_{amostra} &= -(0,472676 - 0,00561) \times \frac{0,496902 \times 10 \times 0,996}{0,68435 \times (10,17)^2} \times \frac{0,00005}{2} \\ &= 8,16447 \times 10^{-7}\end{aligned}$$

• μC_{PI}

$$\mu C_{PI} = \left(\frac{A_{MDMA}}{A_{PI}} - b \right) \times \frac{V_{PI} \times P_{MDMA}}{a \times M_{amostra}} \times \mu' C_{PI} \quad (23)$$

$$(\mu' C_{PI})^2 = (\mu M_{PI \text{ sol mãe}})^2 \times (\mu V_{sol \text{ mãe}})^2 \quad (24)$$

$$\mu M_{PI \text{ sol mãe}} = \frac{P_{PI}}{V_{sol \text{ mãe}}} \times \frac{U_{balança}}{k_1} \quad (25)$$

$$\mu V_{sol \text{ mãe}} = - \frac{M_{PI} \times P_{PI}}{(V_{sol \text{ mãe}})^2} \times \frac{U_{balão}}{k_2} \quad (26)$$

Sendo $\mu' C_{PI}$ a incerteza da concentração da solução de padrão interno; $M_{PI \text{ sol mãe}}$ e $\mu M_{PI \text{ sol mãe}}$ a massa de padrão interno pesada para fazer a solução mãe de PI e sua incerteza combinada; $V_{sol \text{ mãe}}$ e $\mu V_{sol \text{ mãe}}$ o volume total da solução mãe de PI e sua incerteza combinada; P_{PI} o valor da pureza do padrão interno e $U_{balão}$ e k_2 , respectivamente, a incerteza expandida e o fator de abrangência do certificado de calibração do balão volumétrico de 2 L. Unindo as equações 23 a 26 e substituindo os valores de cada componente das equações tem-se:

$$\mu C_{PI} = (0,472676 - 0,00561) \times \frac{10 \times 0,996}{0,68435 \times 10,17} \times$$

$$\sqrt{\left(\frac{0,97}{2000} \times \frac{0,00005}{2}\right)^2 \times \left(\frac{-993,80 \times 0,97}{(2000)^2} \times \frac{0,22}{2}\right)^2} = 2,14845 \times 10^{-13}$$

- μV_{PI}

$$\mu V_{PI} = \left(\frac{A_{MDMA}}{A_{PI}} - b\right) \times \frac{C_{PI} \times P_{MDMA}}{a \times M_{amostra}} \times \frac{U_{disp}}{k_3} \quad (27)$$

Em que U_{disp} é a incerteza expandida e k_3 é o fator de abrangência do certificado de calibração do dispensador. Substituindo os valores de cada componente tem-se:

$$\mu V_{PI} = (0,472676 - 0,00561) \times \frac{0,496902 \times 0,996}{0,68435 \times 10,17} \times \frac{0,0062}{2,43} = 8,47411 \times 10^{-5}$$

- μP_{MDMA}

$$\mu P_{MDMA} = \left(\frac{A_{MDMA}}{A_{PI}} - b\right) \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{a \times M_{amostra}} \times \frac{U_{MDMA}}{k_4} \quad (28)$$

Em que U_{MDMA} é a incerteza expandida e k_4 é o fator de abrangência, da pureza, obtidos do certificado de calibração do padrão de MDMA. Substituindo os valores de cada componente tem-se:

$$\mu P_{MDMA} = (0,472676 - 0,00561) \times \frac{0,496902 \times 10}{0,68435 \times 10,17} \times \frac{0,022}{2} = 0,00366811$$

- μ_{Rec}

A recuperação não faz parte do cálculo da pureza da amostra e por isso não pode ser calculada diretamente através da derivada da equação 18. Esta incerteza é obtida por um experimento prévio, sendo combinada como uma incerteza do tipo A (usualmente baseada em um conjunto de informações comparativamente confiáveis). Para o cálculo da incerteza da recuperação foram utilizadas as equações abaixo:

$$\mu_{Rec} = \frac{\mu'_{Rec}}{Rec_{media}} \quad (29)$$

$$\mu'_{Rec} = \sqrt{\left(\frac{1}{C_{grav}} \times \frac{s_{rec}}{\sqrt{n_3}}\right)^2 + \left(\frac{C_{curva}}{(C_{grav})^2} \times \frac{U_{MDM}}{k_4}\right)^2} \quad (30)$$

$$Rec_{media} = \frac{C_{curva}}{C_{grav}} \quad (31)$$

Sendo Rec_{media} a recuperação média do MDMA.HCl do ponto médio da exatidão; μ'_{Rec} a incerteza da recuperação (não relativa ao valor recuperado); C_{curva} o valor médio da concentração de MDMA.HCl, obtido a partir dos valores de área dos cromatogramas do ponto médio da exatidão e da equação da curva analítica; C_{grav} valor médio da concentração gravimétrica de MDMA, calculado a partir da massa pesada na preparação das soluções do ponto médio da exatidão; s_{rec} é o desvio padrão da recuperação e n_3 é o número de replicatas utilizadas. Unindo as equações 29 a 31 e substituindo os valores de cada componente das equações tem-se:

$$\mu_{Rec} = \frac{\sqrt{\left(\frac{1}{0,358594} \times \frac{0,000888643}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,361253}{(0,358594)^2} \times \frac{0,022}{2}\right)^2}}{\frac{0,361253}{0,358594}} = 0,0309329$$

Etapa 4 - Cálculo da incerteza padrão combinada

Para que as incertezas possam ser somadas, as incertezas associadas advindas da equação da curva analítica (incerteza da área relativa, da massa da amostra, da concentração do PI, do volume da solução de PI e da Pureza do MDMA) devem ter seus resultados divididos pela concentração relativa do ponto médio da curva analítica (0,81250), para que se tornem valores adimensionais, assim como a incerteza da curva analítica e da recuperação.

Todas as incertezas foram somadas, seguindo a equação abaixo:

$$\mu = \sqrt{(\mu R_{area})^2 + (\mu Cc)^2 + (\mu M_{amostra})^2 + (\mu C_{PI})^2 + (\mu V_{PI})^2 + (\mu P_{MDMA})^2 + (\mu Rec)^2} \quad (32)$$

Ao inserir os valores adimensionais de cada incerteza (Tabela 12) na Equação 32, obtém-se a incerteza padrão combinada:

$$\begin{aligned} \mu &= \sqrt{(0,000200148)^2 + (0,003135146)^2 + (-1,00474 \times 10^{-6})^2 + (2,64393 \times 10^{-1})^2} \\ &\quad + (0,000104284)^2 + (0,00451406)^2 + (0,0309329)^2 \\ &= 0,0314182 \end{aligned}$$

Para se obter a incerteza na unidade da pureza, deve-se multiplicar a incerteza padrão combinada calculada pela pureza da amostra, uma vez que a incerteza padrão combinada,

equação 32, é relativa. A incerteza expandida da amostra ($U_{amostra}$) é a obtida pela multiplicação desse valor pelo fator de abrangência, conforme a equação a seguir:

$$\begin{aligned}U_{amostra} &= \mu \times k_{95\%} \times P_{amostra} & (33) \\ &= 0,0314182 \times 2 \times P_{amostra}\end{aligned}$$

em que $U_{amostra}$ é a incerteza expandida da pureza da amostra e $k_{95\%}$ é o fator de abrangência (95 %) da incerteza expandida.

Os cálculos foram feitos utilizando-se tabelas e fórmulas no Excel[®], logo não foram feitos arredondamentos durante as contas, por isso os valores finais das fórmulas apresentadas acima podem não ser iguais ao valor obtido caso as fórmulas descritas sejam calculadas como expostas.

APÊNDICE B

TESTE DE GRUBBS - *OUTLIERS*

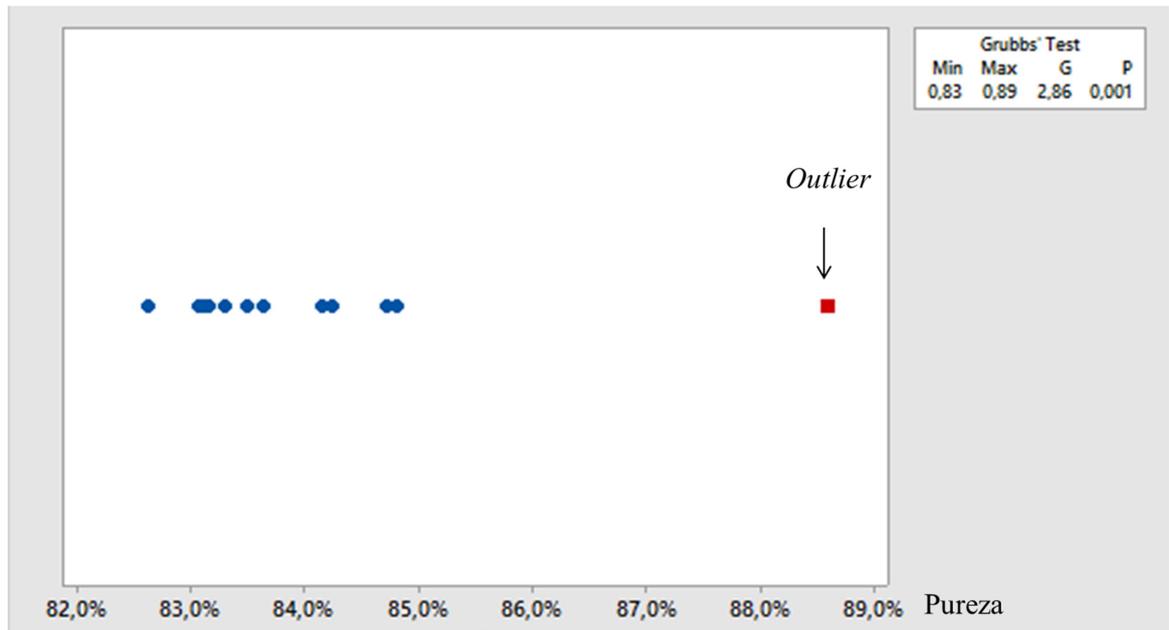


Figura 30 – *Outlier* precisão intermediária (ensaio C), nível alto – CG-DIC

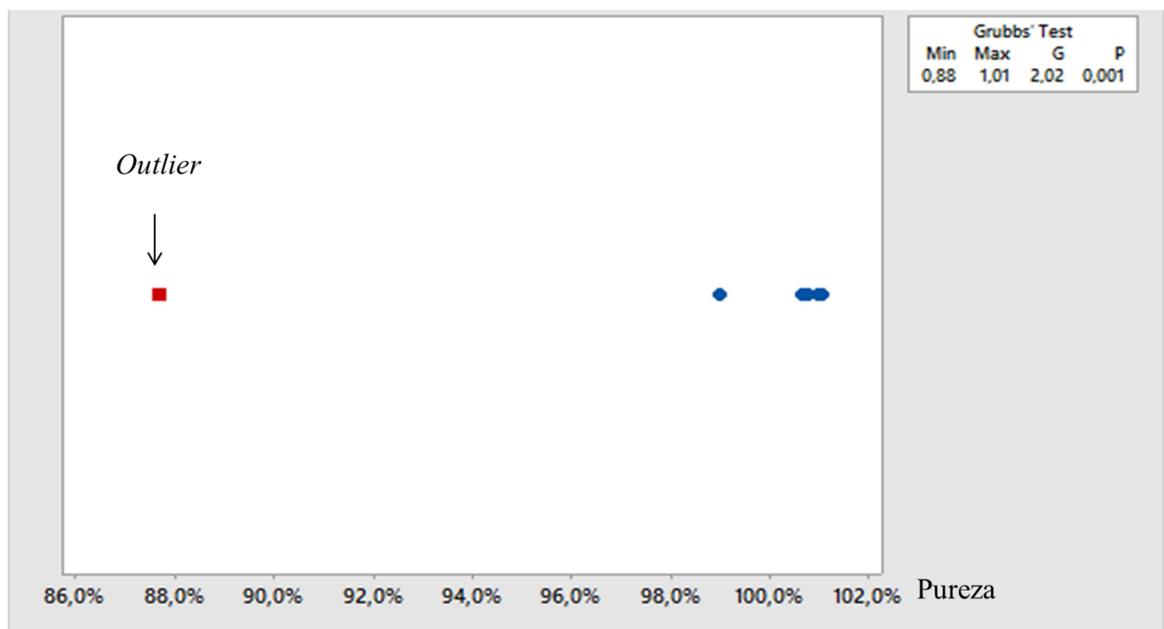


Figura 31 – *Outlier* repetitividade do método e exatidão, nível baixo – RMN de ^1H

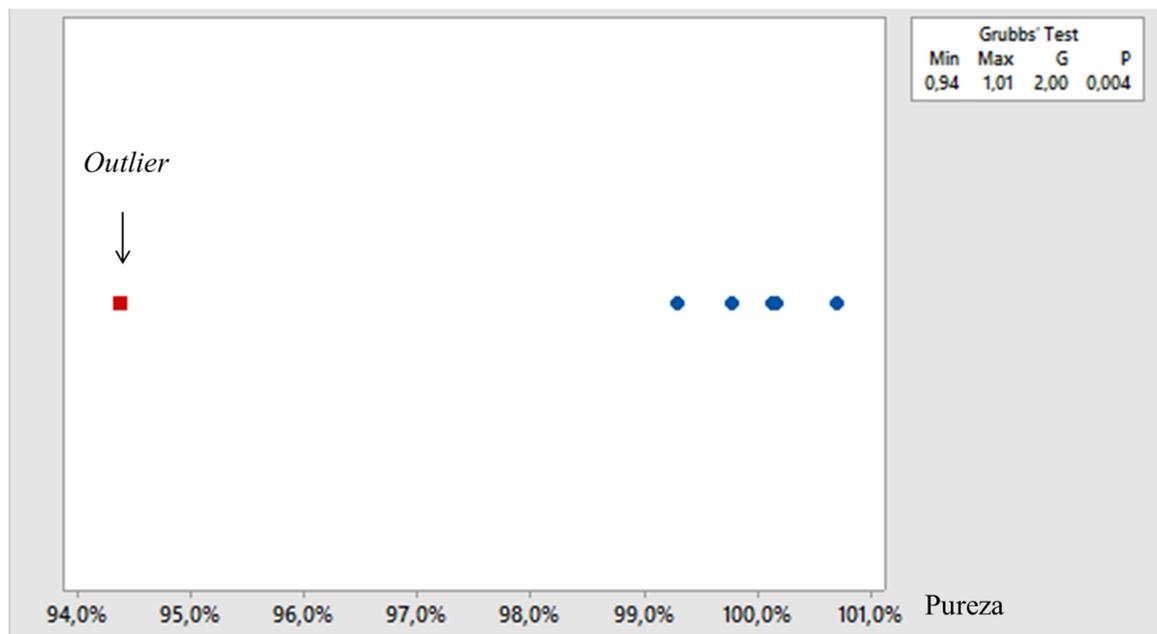


Figura 32 – *Outlier* precisão intermediária (analistas diferentes), nível baixo – RMN de ^1H

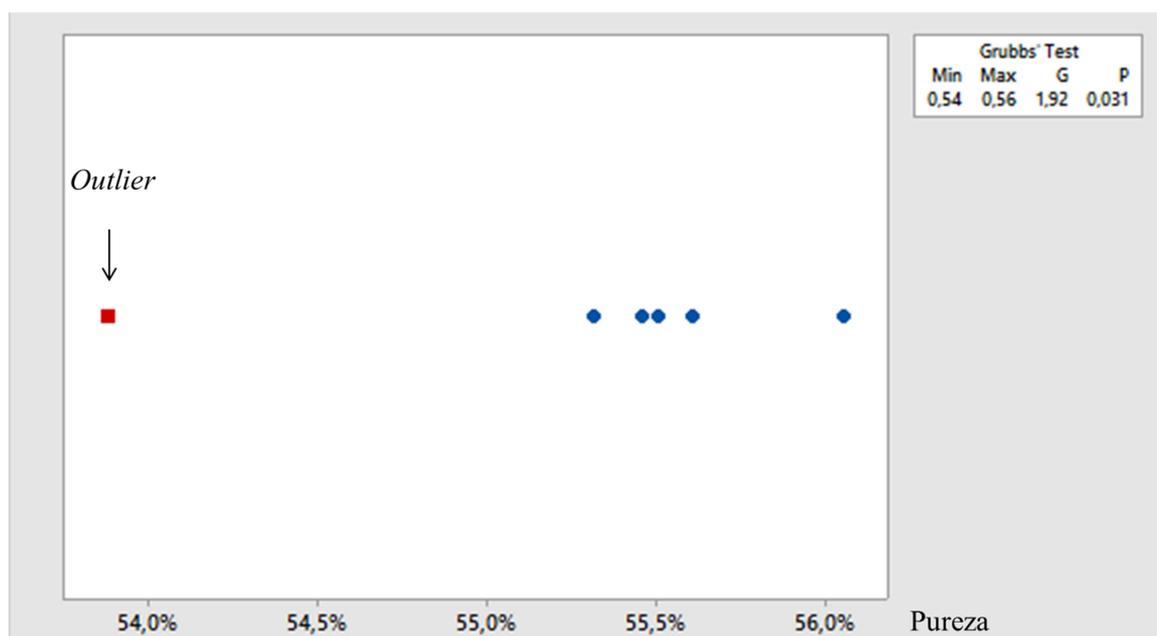


Figura 33 – *Outlier* quantificação de MDMA, amostra 1839/12 A

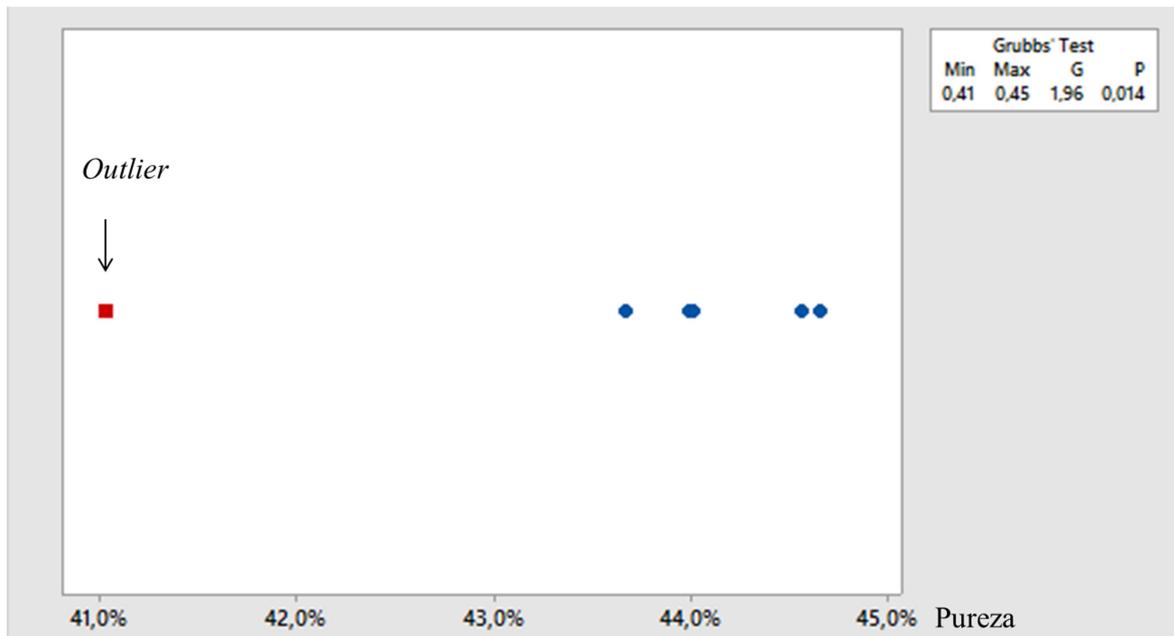


Figura 34 – *Outlier* quantificação de MDMA, amostra 2626/12

APÊNDICE C

INCERTEZA DA MEDIÇÃO (RMN de ^1H)

Etapa 1 - Especificação do mensurando

O mensurando desse método é a pureza da amostra e a equação que calcula seu valor, é a equação abaixo:

$$P_{amostra} = \frac{A_{ab\ analito}}{A_{ab\ PI}} \times \frac{nH_{PI}}{nH_{analito}} \times \frac{MM_{analito}}{MM_{PI}} \times \frac{m_{PI}}{m_{amostra}} \times P_{PI} \quad (34)$$

A descrição, o valor e a unidade de cada componente da equação acima estão na tabela abaixo:

Tabela 37 - Legenda e valores dos componentes da Equação 34

Sigla	Descrição
$P_{amostra}$	Pureza da amostra
$A_{ab\ analito} / A_{ab\ PI}$	Razão média da área absoluta relativa (R_{area} – no ponto médio da repetitividade do equipamento)
$nH_{PI} / nH_{analito}$	Razão do número de prótons dos sinais selecionados para quantificação
$MM_{analito}$	Massa molecular do analito
MM_{PI}	Massa molecular do padrão interno
m_{PI}	Massa pesada de PI (no ponto médio da repetitividade do equipamento)
$m_{amostra}$	Massa pesada da amostra (no ponto médio da repetitividade do equipamento)
P_{PI}	Pureza do padrão interno

Etapa 2 - Identificação das fontes de incerteza

As fontes de incerteza do método são evidenciadas no diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa), Figura 35. Nesse diagrama estão listadas todas as grandezas presentes na equação 34 e as provenientes de fontes externas.

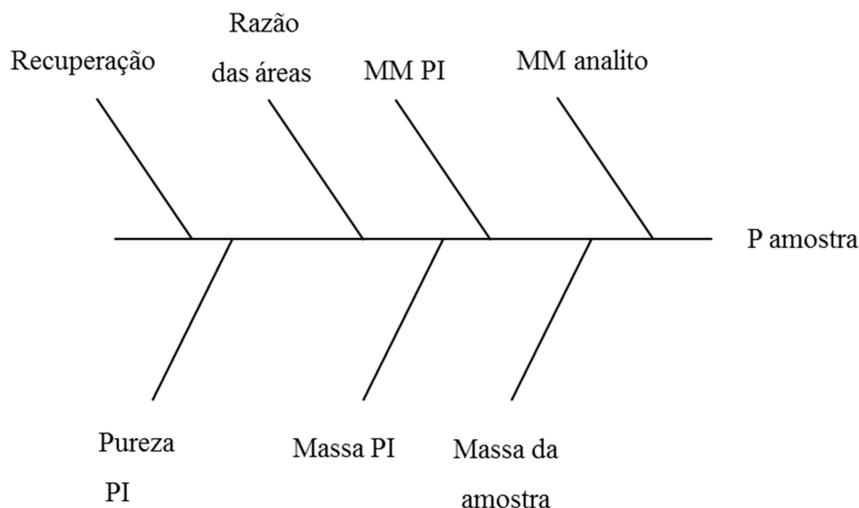


Figura 35 - Diagrama de Ishikawa: contribuições na incerteza do RMN

Etapa 3 - Quantificação dos componentes de incerteza

Para a obtenção da incerteza padrão das fontes de incerteza do tipo B, utilizou-se a incerteza fornecida no certificado do padrão interno e no de calibração da balança analítica. O programa Mass calculator[®] foi utilizado para calcular a massa molecular e a incerteza associada a esse valor. Os valores de incerteza fornecidos foram divididos por um divisor adequado (k), para a obtenção da incerteza padrão de cada componente.

A incerteza padrão da razão da área e da repetitividade foram calculadas como fontes do tipo A, que são aquelas em que as informações das incertezas são baseadas em análises estatísticas de medições feitas durante a validação. Para a razão das áreas utilizou-se a média e o desvio das análises do ponto médio da repetitividade do equipamento. Como incerteza externa foi calculada a incerteza da recuperação (Rec) e utilizou-se o valor de pureza obtido para o DMS, e o respectivo desvio, das análises feitas no teste de repetitividade do método, no ponto médio. Todas as incertezas padrão foram, então, divididas pelo valor (x) da componente respectiva, para que os resultados sejam adimensionais e possam ser somados.

Etapa 4 - Cálculo da incerteza padrão combinada

Para a obtenção da incerteza padrão combinada as incertezas (valores adimensionais) foram somadas, seguindo a equação abaixo:

$$\mu = \sqrt{(\mu m_{PI})^2 + (\mu m_{analito})^2 + (\mu MM_{PI})^2 + (\mu MM_{amostra})^2 + (\mu P_{PI})^2 + (\mu R_{area})^2 + (\mu Rec)^2} \quad (34)$$

A incerteza padrão combinada é relativa e por isso seu valor deve ser multiplicado pela pureza da amostra. A incerteza expandida da amostra ($U_{amostra}$) é a obtida pela multiplicação desse valor pelo fator de abrangência ($k_{95\%}$) para 95 % de confiança, conforme a equação a seguir:

$$U_{amostra} = \mu \times k_{95\%} \times P_{amostra} \quad (35)$$

APÊNDICE D

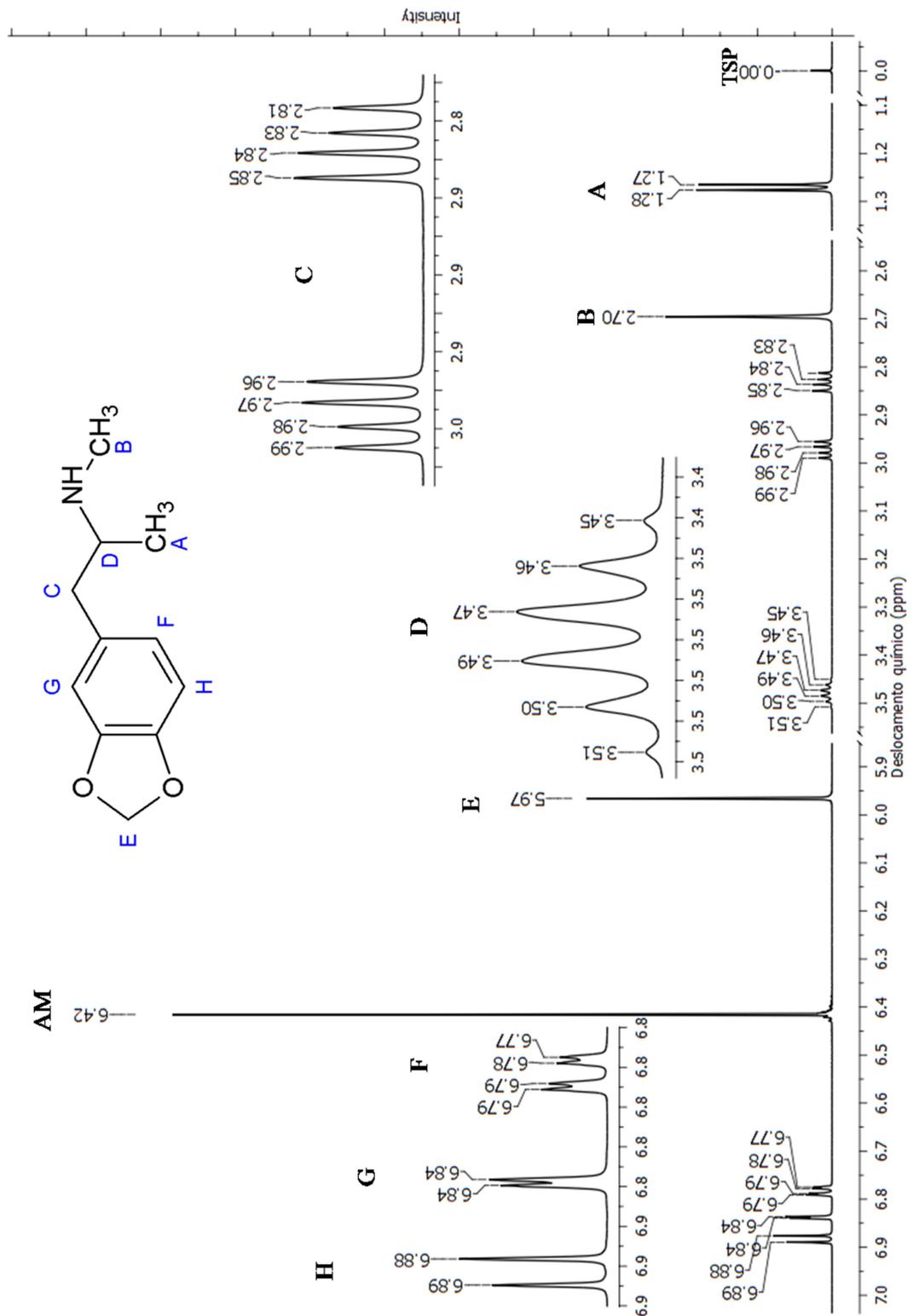


Figura 36 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ¹H do MDMA.HCl padrão, com identificação dos hidrogênios da molécula, em D₂O, contendo ácido maleico (AM) e TSP (0,0 ppm)

APÊNDICE E

SELETIVIDADE (RMN DE ^1H)

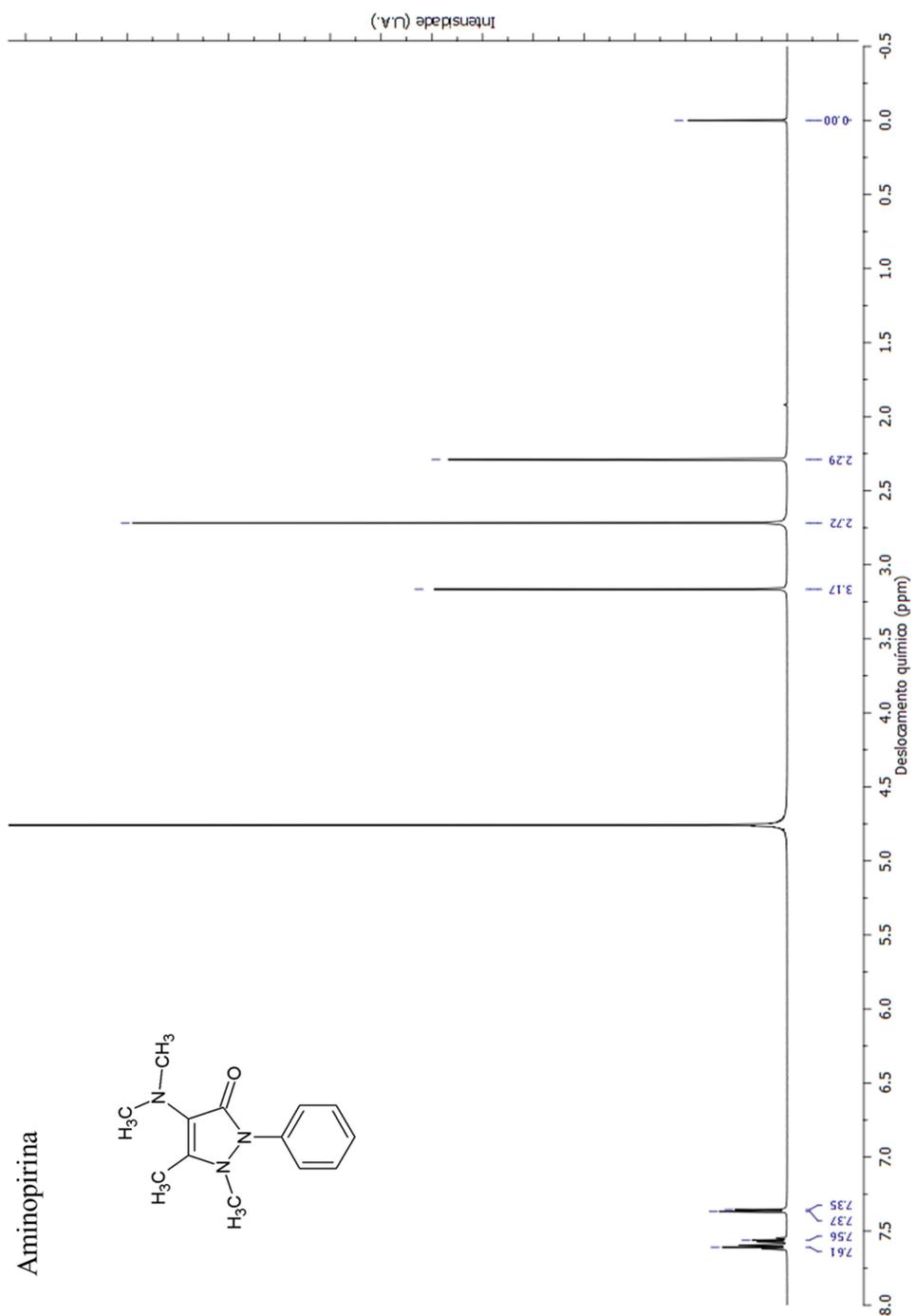


Figura 37 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da aminopirina em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm)

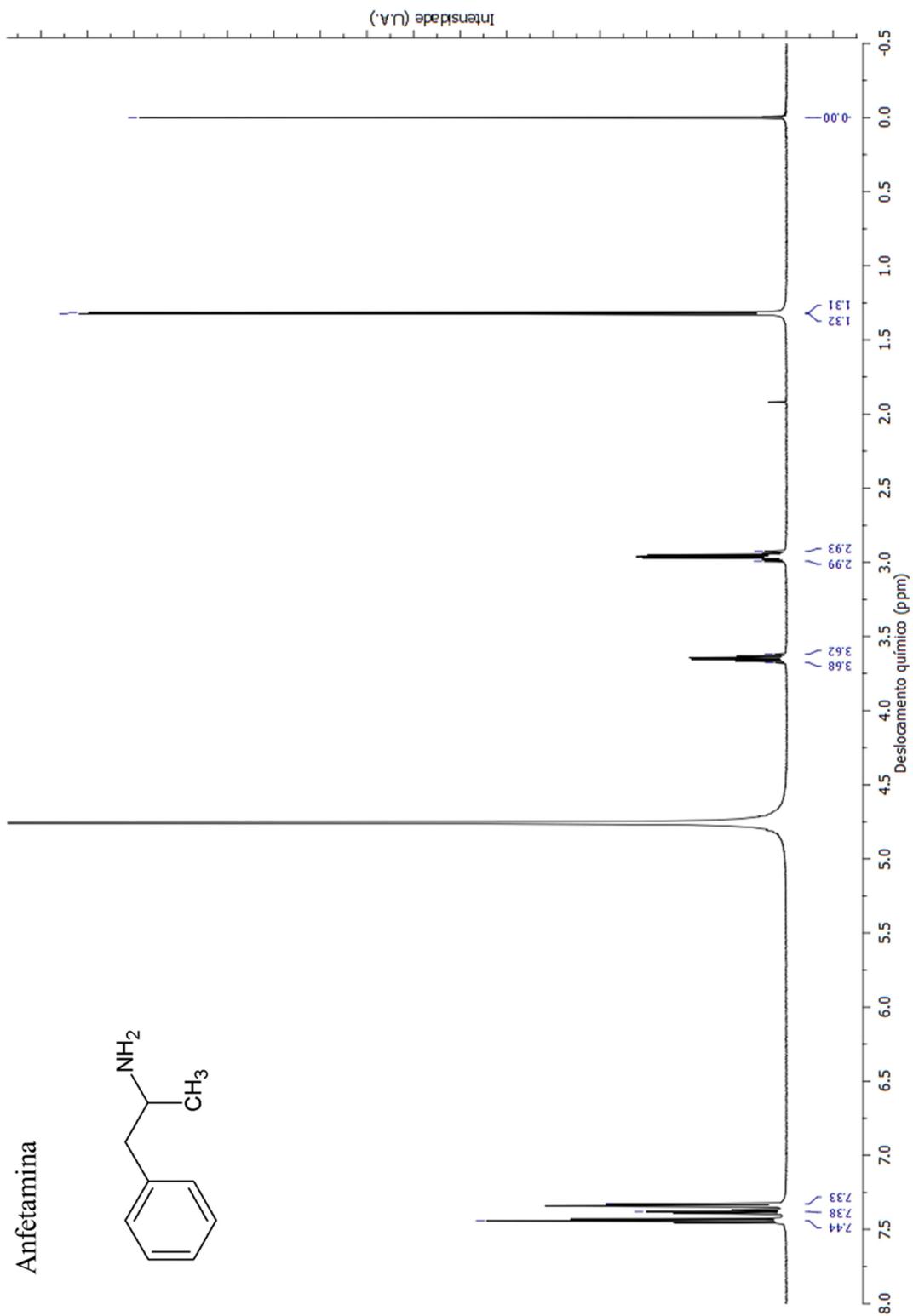


Figura 38 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da anfetamina em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm)

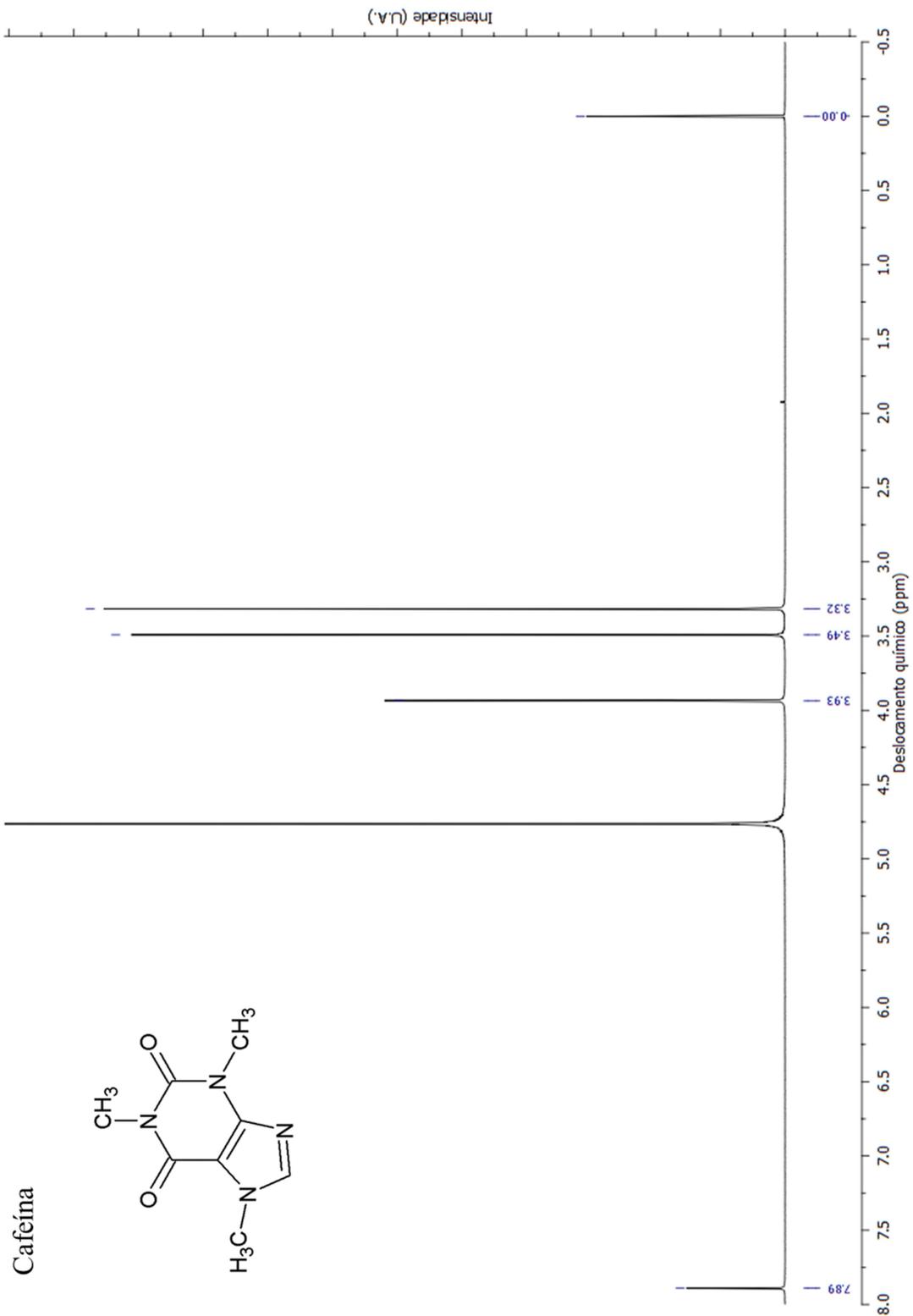


Figura 39 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da cafeína em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm)

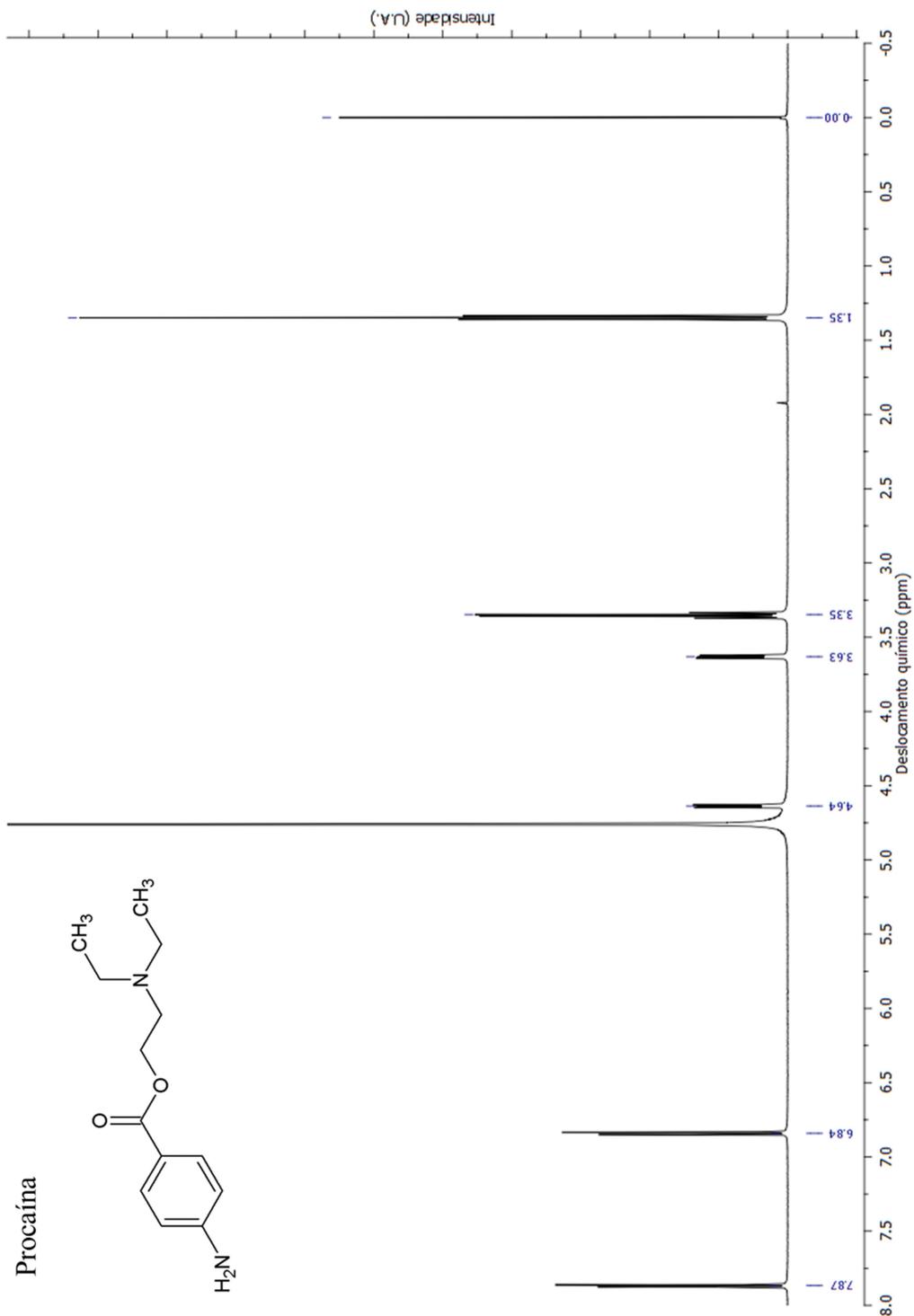


Figura 40 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ^1H da procaína em D_2O , contendo TSP (0,0 ppm)

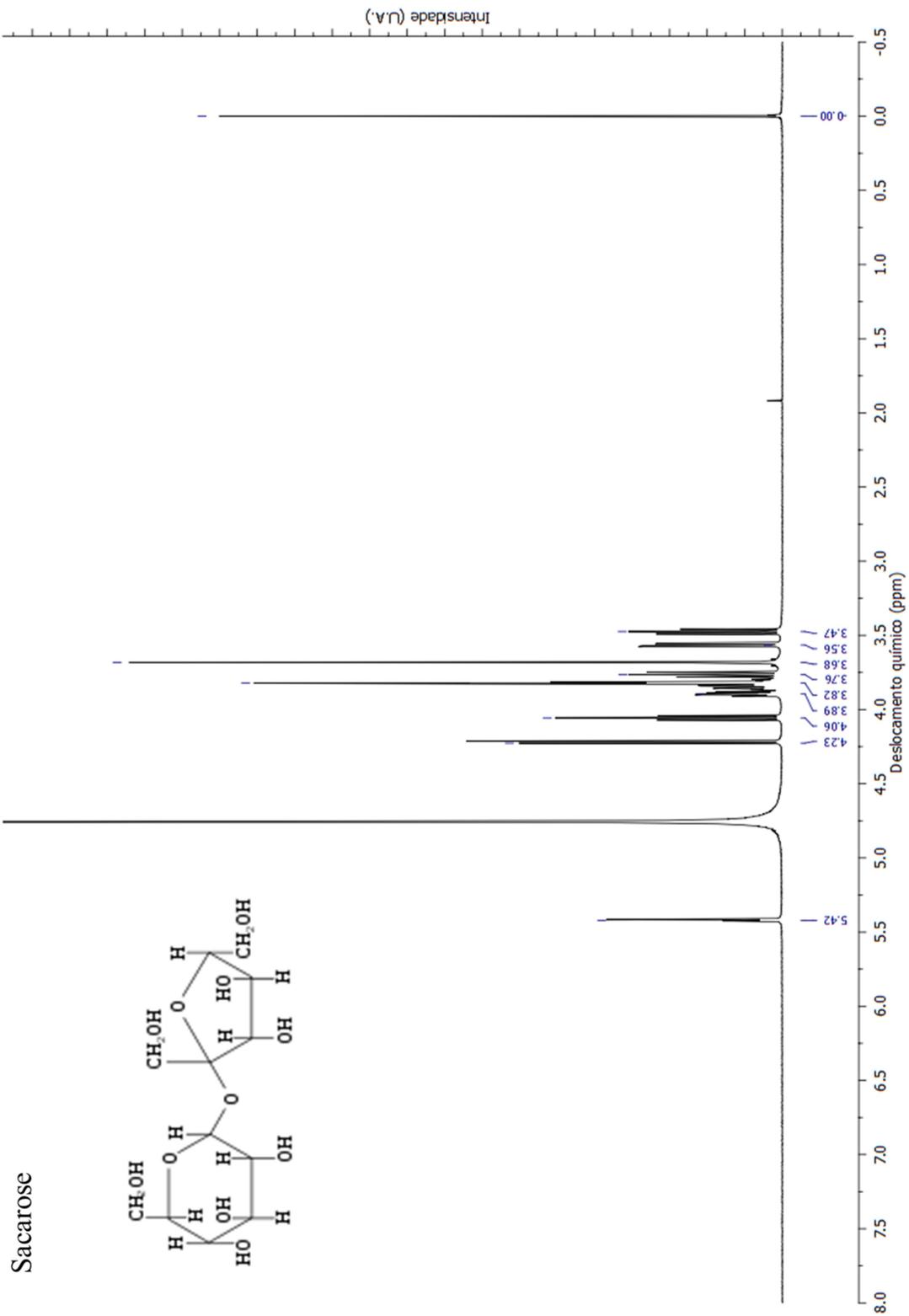


Figura 41 – Estrutura molecular e espectro de RMN de ¹H da sacarose em D₂O, contendo TSP (0,0 ppm)

APÊNDICE F

Tabela 38 – Valores de pureza média e CV das replicatas das amostras

Amostra	CG-DIC		RMN de ¹ H	
	Pureza Média (%)	CV (%)	Pureza Média (%)	CV (%)
3780/11 A	10,5	2,3	10,8	4,5
3780/11 B	12,7	1,3	12,8	0,9
3781/11 A	12,8	1,2	12,5	2,7
3781/11 B	13,2	2,5	13,0	6,2
835/13	14,8	0,5	14,5	1,0
798/13	15,1	4,4	15,1	2,4
843/13	19,6	3,9	19,6	2,2
913/13	21,4	3,0	25,5	1,4
1839/12 F	29,9	3,0	31,1	5,2
5212/12	31,4	0,9	34,1	2,9
1839/12 B	31,9	2,3	33,2	0,6
122/13	32,0	1,5	30,9	15,9
4460/12 A	33,3	2,9	33,7	0,9
4332/12 D	33,3	1,8	33,3	0,8
4460/12 B	36,0	0,8	37,2	5,5
4332/12 B	41,8	1,8	41,2	2,2
1839/12 E	41,9	0,5	41,0	1,0
4332/12 A	42,9	4,1	42,7	3,0
3267/13	42,9	3,3	43,4	0,8
672/13	43,6	2,6	43,6	6,7
768/13	43,9	1,8	40,5	*
2626/12	44,4	0,8	43,7	3,8

Continua

Conclusão

Amostra	CG-DIC		RMN de ¹ H	
	Pureza Média (%)	CV (%)	Pureza Média (%)	CV (%)
4332/12 E	45,8	2,3	46,9	3,1
1309/11	48,0	0,7	46,6	0,9
4332/12 C	48,3	2,0	47,8	2,1
1839/12 C	48,5	1,9	47,3	1,6
652/12	52,4	3,8	48,7	2,8
363/12	52,9	1,5	49,4	2,4
187/12	53,0	0,7	51,3	3,4
1837/12	53,5	1,0	53,6	1,0
1746/12	54,0	1,3	55,7	8,5
1839/12 A	55,6	0,7	55,5	1,7
543/13	56,6	4,4	56,6	*
1465/12	60,9	2,1	57,9	2,4
5870/12	61,9	1,4	57,9	1,0
1839/12 D	66,1	0,4	64,7	0,2
1959/12	74,9	1,9	*	*
958/12	75,7	1,7	69,9	0,7
2949/12	77,0	0,4	73,6	4,1
Média	41,9	1,9	40,4	2,9

*valor não calculado.