

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Identificação e Quantificação de Novas Substâncias Psicoativas em Material Apreendido em Portugal

Margarida Maria Maniés Sequeira

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar
Maria João Nunes Vilela Caldeira

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à minha família. Aos meus pais, por fazerem com que este Mestrado fosse possível, mantendo a confiança em mim, mesmo que isso implicasse a saída do mercado de trabalho para voltar à vida de estudante. E claro, à minha irmã, por sermos tão diferentes e ao mesmo tempo tão iguais...sempre lá para o que der e vier.

Depois, como não podia deixar de ser, ao meu namorado, Luís. Aquele que mais presente esteve, nos bons e nos maus momentos, nunca deixando que desistisse e fazendo com que encontrasse sempre uma luz que me ajudava a continuar. Acredita, será para a vida toda.

Um ENORME agradecimento às minhas orientadoras!

À Professora Doutora Helena Gaspar, por todo o apoio e disponibilidade demonstrados, desde o dia em que surgiu a hipótese de desenvolvermos um tema de dissertação em conjunto, ao dia em que entrego este que já é um dos meus maiores feitos, até então. Por todos os pormenores e conselhos, pela paciência para os melhores e piores dias, e acima de tudo pela confiança e amizade demonstradas. Senti-me apoiada, e isso foi meio caminho andado para a conclusão deste trabalho!

À Doutora Maria João Caldeira, Chefe do Setor de Drogas e Toxicologia do Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária. Foi sem dúvida um prazer e uma honra trabalhar nesta equipa, aprendi muito e espero também ter dado a aprender. Por toda a disponibilidade e amizade demonstrados. Muito muito obrigada!

Ao anterior Diretor do LPC-PJ, Doutor Carlos Farinha, atualmente Diretor Nacional Adjunto da PJ, pela hospitalidade manifestada e por ter permitido este estágio no âmbito do Protocolo com a FCUL, sem hesitação ou receio. Como disse, foi uma honra poder trabalhar nesta Instituição Nacional, e ao lado de toda a equipa dela integrante.

À atual Diretora do LPC-PJ, Doutora Alexandra André, pela excelente receção e hospitalidade evidenciadas, mesmo sem me conhecer.

À Professora Doutora Susana Santos e ao Professor Doutor Ricardo Silva, por todo o apoio nas respetivas áreas de ensino. Sem dúvida que aprendi imenso sobre síntese orgânica e validação de metodologias analíticas, num tão curto intervalo de tempo, graças aos seus conhecimentos, estratégias de ensino e, acredito, amizade demonstrada. Muito muito obrigada. Não teria conseguido sem este grande apoio.

Por último, a todos os meus amigos e colegas, pelo apoio e amizade!

A todos, MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito da colaboração entre a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ), com vista ao estudo das novas substâncias psicoativas (NSP).

As NSP são substâncias não abrangidas pelas Convenções das Nações Unidas sobre os Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas, mas que podem colocar riscos sociais ou para a saúde. O aparecimento destas substâncias levou à formação de um fenómeno que se vem difundindo a uma taxa sem precedentes, representando um desafio em constante evolução que acarreta graves riscos para a saúde em geral. As catinonas sintéticas são o segundo maior grupo de NSP monitorizadas pelo Observatório Europeu de Droga e da Toxicodependência (EMCDDA), estando quimicamente relacionadas com a catinona, um estimulante psicoativo que ocorre na planta Khat (*Catha edulis*).

Contrariamente ao que acontece para as drogas clássicas, são escassos os estudos sobre a identificação e quantificação de catinonas sintéticas, sendo que o rápido surgimento de novas moléculas, bem como a sua propagação no mercado ilícito, dificulta o trabalho dos analistas, não existindo por vezes técnicas que permitam uma resposta tão rápida quanto desejável. Nesse sentido, no âmbito de uma ação pró-ativa, surgiu a importância da validação de um método de quantificação de catinonas sintéticas, que não são consideradas “de consumo mais frequente” ao abrigo da Portaria n.º 94/96, de 26 de Março, pelo que atualmente não são quantificadas. No entanto, tendo em conta a sua crescente difusão passarão, muito provavelmente, no futuro, a ser consideradas “de consumo mais frequente” e, conseqüentemente, terão que ser quantificadas.

O método desenvolvido teve como base o procedimento de rotina do LPC-PJ aplicado para quantificação das substâncias ilícitas descritas na referida Portaria. Deste modo, foi desenvolvida uma metodologia de GC-FID para aplicação na quantificação das 3 catinonas sintéticas: mefedrona, metilona e MDPV (3,4-metilenodioxipirovalerona). A seleção foi feita em virtude de estas 3 substâncias terem sido recentemente consideradas drogas ilícitas e introduzidas na legislação portuguesa sobre drogas (Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro). A validação englobou duas fases de extrema importância: a calibração do método e a estimativa da incerteza associada ao resultado. Para tal, foi necessário sintetizar a metilona, e caracterizar as 3 substâncias em estudo com recurso a diversas técnicas analíticas (GC-MS, GC-FID, RMN), assim como 21 outros padrões de catinonas sintéticas, e 5 outras substâncias, que poderiam funcionar como possíveis interferentes da metodologia em desenvolvimento, resultando num total de 450 análises. De modo a facilitar a aplicação da abordagem utilizada para estimar a incerteza global associada ao resultado, foram implementadas 3 folhas de cálculo, uma para cada catinona em estudo, tendo por base o método numérico de Kragten. Por último foi verificada a compatibilidade metrológica da metodologia em desenvolvimento e a sua aplicação a 4 amostras reais de material proveniente de uma “*SmartShop*”. Os resultados mostraram que o método é simples, rápido, eficaz e de custos reduzidos, originando resultados com um grau de incerteza baixo, permitindo a quantificação das catinonas sintéticas selecionadas em amostras de material apreendido em Portugal, quando não existem interferentes, estando a metodologia pronta a ser aplicada nos trabalhos de rotina do LPC-PJ.

De salientar que neste trabalho foram ainda identificadas substâncias de abuso em material apreendido em Portugal para a resolução de casos judiciais. Neste âmbito, foram analisadas 57 amostras de diversas matrizes (pós, matrizes herbais, comprimidos, soluções líquidas, microselos e autocolantes, resíduos de comida, animais, vinho e torrões de açúcar), através de diversas metodologias analíticas (testes colorimétricos, TLC, CC, GC-MS, GC-FID, RMN, MS e FTIR), que permitiram a identificação de 26 substâncias psicoativas, evidenciando a complementaridade das várias técnicas, com vista à identificação inequívoca e a uma correta monitorização das substâncias.

Palavras-Chave: NSP; Catinonas sintéticas; Quantificação; GC-FID; Validação

ABSTRACT

The present work was developed in the framework of the collaboration between the Faculty of Sciences of the University of Lisbon (FCUL) and the Laboratory of the Scientific Police of the Judiciary Police (LPC-PJ) to study the new psychoactive substances (NSP).

NSP are compounds that are not covered by the United Nations Conventions on Narcotic Drugs and Psychoactive Substances, but may pose health or social risk. The emergence of these substances around the world, that start in the beginning of the last decade, has led to a unprecedented rate phenomena, constantly growing and evolving, representing a challenge that poses serious risks to public health. Synthetic cathinones are the second largest family of NSP monitored by European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), and are chemically related to cathinone, which is a stimulant found in the Khat plant (*Catha edulis*).

Unlike common drugs, few studies are available on the identification and quantification of synthetic cathinones. In fact, the rapid diffusion of new molecules, as well as their propagation in the illicit market, hinders the analyst work, not allowing a response as fast as desirable. Therefore, in an proactive action, the validation of a method of quantification of synthetic cathinones emerge as an very important matters, although these should not be quantified under the portuguese legislation (Portaria n.º 94/96, de 26 de Março) because they are not considered “of more frequent consumption”. However, most likely and in the future, they will also became so considered, due to their increasing diffusion.

The developed method was based on the routine of Scientific Police Lab (LPC-PJ) procedure used to quantify the illicit substances described in the cited legislation. Therefore, a GC-FID methodology war developed in order to quantify 3 synthetic cathinones: mephedrone, methylone and MDPV (3,4-methylenedioxypropylone). The selection was made because this 3 substances were recently considered illicit drugs, and added to the portuguese legislation on drugs (Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro). The validation procedure englobed two extremely important phases: the calibration of the method and the global result uncertainty evaluation. Therefore it was necessary synthetize methylone, and characterize the 3 substances in the study by using different analytical techniques (GC-MS, GC-FID, RMN), and 27 other patterns of synthetic cathinones, and 6 other substances, that could be possible interferers of this procedure, resulting in a total of 450 analysis. In order to facilitate the approach used to estimate the global result uncertainty, three spreadsheets based on the Kragten method where implemented. Lastly, the metrological compatibility was verified and the methodology was applied to 4 real samples seized from a SmartShop. The results showed that the procedure is very simple to apply, fast, effective and low cost, producing results with a low degree of uncertainty, allowing the quantification of this 3 synthetic cathinones in seized material, when it doesn't exist interferers, showing that the methodology is ready for application in routine LPC-PJ work.

It should also be noted that in this work it were identified abuse substances in seized material in Portugal to solve judiciary cases. Thus, 57 samples were analysed in different matrices (powders, herbal matrices, tablets, liquid solutions, microselos and stickers, food residues, animals, wine, sugar clumps) by using different analytical methods (colorimetric tests, TLC, CC, GC-MS, GC-FID, NMR, MS and FTIR), that allowed the identification of 26 psychoactive substances, showing that the complementarity of many techniques is crucial for an unambiguous identification and correct substances monitoring.

Keywords: NSP; Synthetic Cathinones; Quantification; GC-FID; Validation

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE GERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 AS NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS	2
1.1.1 ENQUADRAMENTO LEGAL	4
1.1.2 MECANISMO DE AÇÃO E DANOS CAUSADOS.....	5
1.2 CATINONAS SINTÉTICAS	7
1.2.1 ASPETOS TOXICOLÓGICOS	9
1.3 A ERA DOS PRÉ-PRÉ-PERCUSORES	10
1.4 ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE ABUSO.....	11
1.4.1 QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS POR GC-FID.....	13
1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	15
1.6 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO.....	17
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	19
2.1 EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	19
2.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	20
2.3 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS POR GC-FID.....	20
2.3.1 OBTENÇÃO DE PADRÕES	21
2.3.1.1 SÍNTESE DE METILONA.....	22
2.3.1.2 GRAU DE PUREZA E ESTABILIDADE.....	24
2.3.2 SELETIVIDADE	24
2.3.3 CALIBRAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO	26
2.3.3.1 GAMA DE TRABALHO E HOMOSCEDASTICIDADE	26
2.3.3.2 LINEARIDADE	27
2.3.4 ESTIMATIVA DA INCERTEZA	28
2.3.4.1 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DE INCERTEZA	28
2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS EM AMOSTRAS REAIS	30
2.4 ANÁLISE DE MATERIAL APREENDIDO	31
3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	35

3.1	VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS POR GC-FID	35
3.1.1	OBTENÇÃO DE PADRÕES	36
3.1.1.1	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS EM ESTUDO	36
3.1.1.2	GRAU DE PUREZA E ESTABILIDADE	40
3.1.2	SELETIVIDADE	41
3.1.3	CALIBRAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO	45
3.1.3.1	GAMA DE TRABALHO E HOMOSCEDASTICIDADE	45
3.1.3.2	LINEARIDADE	47
3.1.4	ESTIMATIVA DA INCERTEZA	48
3.1.4.1	ESPECIFICAÇÃO DA MENSURANDA	49
3.1.4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA	53
3.1.4.3	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DE INCERTEZA	54
3.1.4.4	COMBINAÇÃO DOS COMPONENTES DE INCERTEZA	60
3.1.4.5	CÁLCULO DA INCERTEZA EXPANDIDA	61
3.1.4.6	REPORTAR A INCERTEZA	62
3.1.4.7	OUTROS ELEMENTOS IMPLEMENTADOS NA FOLHA DE CÁLCULO.....	62
3.1.4.8	COMPATIBILIDADE DA METODOLOGIA.....	63
3.1.5	QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS EM AMOSTRAS REAIS	64
3.2	IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ABUSO.....	67
3.2.1	CANABINÓIDES SINTÉTICOS – MATRIZES HERBAIS	68
3.2.2	LSD – O COMPOSTO OPIÓIDE MAIS COMUM	71
3.2.3	CATINONAS SINTÉTICAS – A IMPORTÂNCIA DAS TÉCNICAS DE CONFIRMAÇÃO	74
3.2.4	PRECURSORES – UM PROBLEMA EM ASCENSÃO	76
3.2.5	OUTROS TÓXICOS – EXAMES MENOS COMUNS NA CASUÍSTA DO LPC/PJ.....	77
4	CONCLUSÃO.....	79
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
6	ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Número e principais categorias de NSP notificadas pela primeira ao EWS da União Europeia, no período entre 2005 e 2017 - adaptado de [12].....	3
Figura 1.2 - Estrutura da anfetamina, catinona, efedrina e catina, verificando-se as similaridades a nível estrutural.....	7
Figura 1.3 - Estrutura da metilona, mefedrona e MDPV, assim como dos respetivos análogos MDMA, metcatinona e pirovalerona.	8
Figura 1.4 - (Pré)-(Pré)-Precusores que permitem a síntese das anfetaminas e metanfetaminas.....	11
Figura 1.5 - Estrutura das três catinonas sintéticas estudadas, no âmbito da validação de um método de quantificação.	17
Figura 2.1 - Esquema reacional da síntese da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2).	22
Figura 3.1 – Representação esquemática da degradação oxidativa do MDPV, que resulta na formação do produto de degradação 2,3-enamina, pela perda de dois átomos de hidrogénio.	37
Figura 3.2 - Identificação das principais fragmentações das três catinonas sintéticas em estudo.....	38
Figura 3.3 - Estrutura das três catinonas em estudo, na forma de sal de hidrocloreto.	38
Figura 3.4 - Compilação esquemática dos tempos de retenção (minutos) das 24 catinonas sintéticas analisadas para a primeira fase do estudo da seletividade do método em validação.....	42
Figura 3.5 - Discriminação dos tempos de retenção (minutos) das 6 catinonas sintéticas selecionadas como possíveis interferentes para as substâncias em estudo, após análise por GC-FID.....	42
Figura 3.6 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, 5 possíveis interferentes e 3 catinonas sintéticas em estudo, para validação do método de quantificação.....	43
Figura 3.7 - Esquema do procedimento analítico em desenvolvimento, que consiste na análise de duas soluções em simultâneo por GC-FID, uma para a catinona sintética que se pretende quantificar e uma para o padrão que lhe é correspondente, com vista à obtenção dos sinais de resposta que permitam a determinação da concentração da catinona sintética alvo por extrapolação. Em que $V_{solvPad}$ e $V_{solvCat}$ representam o volume de solvente adicionado ao padrão e catinona alvo, respetivamente, V_{PIPad} e V_{PICat} representam o volume de PI adicionado ao padrão e catinona alvo, respetivamente, $APad$, $ACat$ e API as áreas de sinais de resposta do padrão, catinona alvo e PI, respetivamente, e $RAPad/PI$ e $RACat/PI$ as respetivas razões.	50
Figura 3.8 - Esquema da proporção existente entre a razão entre a área do sinal de resposta do padrão de calibração e a área do sinal de resposta do PI e a concentração de padrão, assim como entre a razão entre área do sinal de resposta da catinona sintética alvo e a área do sinal de resposta do PI e a concentração de catinona sintética. Em que $CCat$ e $CPad$ representam a concentração de catinona sintética alvo e de padrão, respetivamente, e $RAPad/PI$ e $RACat/PI$ representam a razão das áreas entre o sinal de resposta do padrão e catinona sintética, respetivamente, e o sinal de resposta do PI. .	51
Figura 3.9 - Representação esquemática da reta ótima (mais confiável) de calibração da resposta instrumental “real” – tracejado, e da reta que mimetiza a resposta instrumental mais divergente esperada, pela aplicação de uma calibração do tipo monoponto – linha contínua.	52
Figura 3.10 - Diagrama de causa/efeito para a metodologia de quantificação de catinonas sintéticas em estudo, sendo possível constatar a grandeza correspondente à mensuranda, $wCat$, bem como todos os parâmetros de incerteza dos quais depende (ver seção 3.1.1.1).	53
Figura 3.11 - Representação esquemática de $u(amax)$, correspondente ao desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração a partir de apenas um ponto (monoponto) em relação à origem, no eixo das ordenadas.....	57

Figura 3.12 - Resultados obtidos a partir da aplicação dos testes colorimétricos de Marquis e Scott, às quatro amostras apreendidas numa "SmartShop", suspeitas de conterem NSP. O retângulo preto identifica a linha da placa onde apenas foi colocado o reagente, o retângulo a vermelho identifica a zona da placa onde efetivamente o teste foi aplicado às quatro amostras, e o retângulo verde identifica a zona onde o teste foi aplicado a um padrão de anfetamina e cocaína, para o teste de Marquis e Scott, respetivamente, pelo que com resultado positivo, facilitando a comparação com os restantes resultados.	65
Figura 3.13 - Estruturas dos canabinóides sintéticos 5F-PB22 (A) e 5F-AKB48 (B), identificados em material apreendido em Portugal.....	69
Figura 3.14 - Estrutura do composto LSD, identificado em soluções etanólicas de material apreendido em Portugal.	71
Figura 3.15 - Análise RMN ¹ H em DMSO-d ₆ das 4 soluções etanólicas, verificando-se os sinais compatíveis com a presença maioritária de etanol, e comprovando-se a similaridade das soluções. ...	72
Figura 3.16 - Estrutura do composto 25I-NBOH, identificado a partir em microselos, material apreendido em Portugal.....	73
Figura 3.17 - Estrutura de três compostos da classe das fenetilaminas substituídas no anel aromático por dois grupos metoxilo, e uma substituição na posição 4 por um átomo de I, integrantes de diferentes séries.	74
Figura 3.18 - Estrutura da catinona α -PHP, identificado num invólucro de "Bloom", material apreendido em Portugal.	75
Figura 3.19 - Estrutura do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado a partir da análise de material apreendido em Portugal.....	76
Figura 3.20 - Estrutura molecular do composto lorazepam, uma benzodiazepina identificada a partir da análise de material apreendido em Portugal.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Compilação do mecanismo de ação e sintomas mais frequentes das principais classes de NSP - adaptado de [11], [13], [14], [40], [41].	6
Tabela 1.2 – Compilação do mecanismo de ação e sintomas mais frequentes das três catinonas em estudo - adaptado de [9], [10], [13], [49], [57], [58].	10
Tabela 2.1 - Dados relativos à preparação das soluções para estudo de interferentes, no que respeita à análise de uma mistura de oito catinonas sintéticas.	25
Tabela 2.2 - Dados relativos à preparação das soluções para a seleção da gama de trabalho e identificação dos limites analíticos, assim como do estudo da linearidade e repetibilidade do método.	27
Tabela 2.3 - Dados relativos à preparação das soluções resultantes de material apreendido de um “SmartShop”, utilizadas para testar o método de validação.	30
Tabela 2.4 - Testes colorimétricos aplicados a amostras na forma de pó, matriz herbal, produto vegetal prensado ou comprimidos, para uma análise preliminar.	31
Tabela 3.1 - Caracterização por GC-MS, das três catinonas em estudo na forma de sal hidroclorado, identificando-se o tempo de retenção (R_t , minutos), e o valor de m/z dos picos base e dos principais fragmentos formados.	37
Tabela 3.2 - Caracterização por RMN das três catinonas em estudo, na forma de sal de hidrocloreto, em DMSO- d_6 .	39
Tabela 3.3 - Grau de pureza, das 3 catinonas em análise para a validação do método de quantificação.	40
Tabela 3.4 - Compilação dos resultados obtidos para a avaliação da estabilidade dos três compostos em estudo em diferentes condições de armazenamento (dentro e fora do frigorífico).	41
Tabela 3.5 - Compilação das concentrações correspondentes aos extremos mínimos da gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo, assim como do LD estimado, comprovando-se a sua adequação.	46
Tabela 3.6 - Compilação da razão entre as variâncias no extremo mínimo e máximo, para cada catinona em estudo, e dos valores de $F_{crítico}$, valor tabelado para $n-1$ graus de liberdade.	47
Tabela 3.7 - Valores de desvio padrão agrupado calculado a partir dos resultados de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração na gama de trabalho, analisadas ao longo de 10 dias (ver seção 2.3.4.1).	55
Tabela 3.8 - Valores de incerteza associados à razão da área do sinal do Padrão de Calibração e a área do sinal do PI adicionado à solução.	55
Tabela 3.9 – Sumário das condições que permitem apurar aos valores de incerteza associados à razão da área do sinal do analito (catinona sintética alvo) e a área do sinal do PI adicionado à solução. Em que $APad/PI$ (diária) representa a média diária das áreas dos sinais obtidos correspondentes aos padrões de referência ($Pad1 - 5$).	56
Tabela 3.10 - Valores $u(amax)$ que representam a incerteza associada ao desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração, para cada uma das três catinonas em estudo.	57
Tabela 3.11 – Valores umA e $umPad$ que representam as incertezas associadas às massas pesadas de amostra e padrão de calibração medidas numa balança analítica, bem como os valores de incerteza individuais determinados, utilizados para a calcular.	58
Tabela 3.12 - Valores $u(VASolv) = u(VPadSolv)$ e $u(VAPI) = u(VPadPI)$ que representam a incerteza associada aos volumes de solução e PI, respetivamente, medidos em dispensadores de 2 e 5 mL, bem como valores de CV (%) e Exatidão (%) fornecidos pelo fabricante, e utilizados para este cálculo.	60

Tabela 3.13 - Valores u_{Pur} para cada padrão de referência, que representam a incerteza associada ao respetivo grau de pureza, bem como valores de $Sr_{Pur}(\%)$, que representa o desvio padrão associado à percentagem de área dos sinais obtidos no âmbito da análise do grau de pureza, e conversão em Sr_{Pur} , utilizado para o cálculo da incerteza referida.	60
Tabela 3.14 - Implementação esquemática do método de Kragten numa folha de cálculo, com um exemplo de 5 fontes de incerteza, para calcular a incerteza combinada associada a uma grandeza que depende dessas fontes.....	61
Tabela 3.15 - Compilação dos resultados finais obtidos a partir da análise da solução de Padrão 3, com vista a quantificação de mefedrona, metilona e MDPV pela aplicação da metodologia desenvolvida. 63	63
Tabela 3.16 - Compilação dos resultados finais, em percentagem (%), obtidos a partir da análise da solução de Padrão 3, com vista a quantificação de mefedrona, metilona e MDPV pela aplicação da metodologia desenvolvida.	63
Tabela 3.17 - Compilação dos resultados finais dos cálculos para obtenção dos valores da fração mássica de cada catinona sintética em estudo, na solução de Padrão de Calibração 3, utilizada como amostra problema, para verificar a compatibilidade metrológica.	64
Tabela 3.18 - Lista de material apreendido de uma "SmartShop", vendido sob a forma de Blow e Bliss com diferentes cores de invólucro, respetiva designação ao longo deste trabalho e substância suspeita de se apresentar na sua constituição.	65
Tabela 3.19 - Lista de material apreendido de uma "SmartShop", com identificação da substância suspeita de se apresentar na sua constituição e resultados de GC-MS que permitiram apurar a sua efetiva composição.....	66
Tabela 3.20 - Compilação dos resultados finais obtidos a partir da análise de uma amostra de material apreendido (<i>Blow Rosa 3</i>), com vista a quantificação de MDPV, pela aplicação da metodologia desenvolvida.....	66
Tabela 3.21 - Caracterização por RMN 1H e ^{13}C em $CDCl_3$ e MeOD dos canabinóides sintéticos 5F-PB22 e 5F-AKB48, identificado a partir da análise de material apreendido em Portugal.	70
Tabela 3.22 - Caracterização por RMN 1H e ^{13}C em dois solventes diferentes, do composto 25I-NBOH identificado a partir em microselos, material apreendido em Portugal.	73
Tabela 3.23 - Caracterização por RMN 1H e ^{13}C em $DMSO-d_6$, do composto butirato de metil-3-oxo-fenilo.....	76

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 6.1 - Lista de solventes adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.....	87
Anexo 6.2 - Lista de reagentes, adquiridos comercialmente e preparados previamente, utilizados sem purificação prévia.....	87
Anexo 6.3 - Catinonas sintéticas utilizadas para o estudo de interferentes do método. Estas encontram-se na forma de hidróclorato, apesar de as estruturas se encontrarem na forma de base livre.....	88
Anexo 6.4 - Espetro de RMN ^1H do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl_3	90
Anexo 6.5 - Espetro de RMN ^{13}C do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl_3	90
Anexo 6.6 - Espetro de COSY do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl_3	91
Anexo 6.7 - Espetro de HSQC do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl_3	91
Anexo 6.8 - Espetro de HMBC do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl_3	92
Anexo 6.9 - Espetro de RMN ^1H do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3	92
Anexo 6.10 - Espetro de RMN ^{13}C do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3	93
Anexo 6.11 - Espetro de COSY do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3	93
Anexo 6.12 - Espetro de HSQC do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3	94
Anexo 6.13 - Espetro de HMBC do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3	94
Anexo 6.14 - Espetro de RMN ^1H do composto intermediário da síntese da metilona, a metilona na forma de base livre (6), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3	95
Anexo 6.15 - Espetro de RMN ^1H da metilona na forma de sal de hidróclorato (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em $\text{DMSO}-d_6$	95
Anexo 6.16 - Espetro de RMN ^{13}C da metilona na forma de sal de hidróclorato (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em $\text{DMSO}-d_6$	95
Anexo 6.17 - Espetro de COSY da metilona na forma de sal de hidróclorato (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em $\text{DMSO}-d_6$	96
Anexo 6.18 - Espetro de HSQC da metilona na forma de sal de hidróclorato (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em $\text{DMSO}-d_6$	96

Anexo 6.19 - Espectro de HMBC da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em DMSO- <i>d</i> ₆	97
Anexo 6.20 - Espectro de RMN ¹ H da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	97
Anexo 6.21 - Espectro de RMN ¹³ C da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	98
Anexo 6.22 - Espectro de COSY da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	98
Anexo 6.23 - Espectro de HMQC, equivalente a HSQC, da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	99
Anexo 6.24 - Espectro de HMBC da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	99
Anexo 6.25 - Espectro de RMN ¹ H do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	100
Anexo 6.26 - Espectro de RMN ¹³ C do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	100
Anexo 6.27 - Espectro de COSY do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	101
Anexo 6.28 - Espectro de HSQC do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	101
Anexo 6.29 - Espectro de HMBC do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	102
Anexo 6.30 - Cromatograma resultante da análise da mefedrona por GC-MS, revelando um pico maioritário com R _t 8.26 minutos.....	102
Anexo 6.31 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.26 minutos, resultante da análise do padrão de mefedrona por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com este composto.	103
Anexo 6.32 - Cromatograma resultante da análise da metilona por GC-MS, revelando um pico maioritário com R _t 10.88 minutos.....	103
Anexo 6.33 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 10.88 minutos, resultante da análise do padrão de metilona por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com este composto. ...	103
Anexo 6.34 - Cromatograma resultante da análise da MDPV por GC-MS, revelando um pico maioritário com R _t 14.88 minutos.....	104
Anexo 6.35 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.88 minutos, resultante da análise do padrão de MDPV por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com este composto.....	104
Anexo 6.36 - Resultados obtidos a partir das 30 análises por GC-FID realizadas para estudo do grau de pureza das três catinonas sintéticas selecionadas.....	105
Anexo 6.37 - Compilação dos cromatogramas obtidos por GC-FID, a partir da análise das soluções utilizadas para apurar o grau de pureza, bem como verificação da estabilidade dos três compostos em estudo quando em solução, armazenadas fora do frigorífico (temperatura ambiente). Verifica-se um decréscimo no grau de pureza, decorrente do aparecimento de impurezas resultantes da degradação dos compostos quando em solução fora do frigorífico, após 8 e 14 dias da sua preparação.....	106
Anexo 6.38 - Compilação dos cromatogramas obtidos por GC-FID a partir da análise das soluções utilizadas para apurar o grau de pureza, bem como verificação da estabilidade dos três compostos em estudo quando em solução, armazenadas no interior do frigorífico. Verifica-se a manutenção aproximada do grau de pureza, após 17 dias da sua preparação, não se observando-se alterações significativas nos cromatogramas dos três compostos.....	107

Anexo 6.39 - Porções do cromatograma resultante da análise por GC-FID de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo, nas zonas entre os 7-10, 10-12 e 14-18 minutos.....	108
Anexo 6.40 - Cromatogramas correspondentes à análise individual por GC-FID, das catinonas sintéticas DMB, mefedrona e NEB.....	109
Anexo 6.41 - Cromatogramas correspondentes à análise individual por GC-FID, das catinonas sintéticas metilona, α -PBP, MPPP e α -PVP.....	110
Anexo 6.42 - Cromatograma correspondentes à análise individual por GC-FID da solução contendo as catinonas sintéticas MDPBP e MDPV.....	111
Anexo 6.43 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo, com pormenor das zonas maior abundância de picos (perto de 8, 11 e 15 minutos), devidamente identificadas.	111
Anexo 6.44 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.10 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto DMB.	112
Anexo 6.45 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.25 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto mefedrona.....	113
Anexo 6.46 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.30 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto NEB.	113
Anexo 6.47 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 10.76 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto α -PBP.	114
Anexo 6.48 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 10.94 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto metilona.	114
Anexo 6.49 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.32 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto MPPP.	115
Anexo 6.50 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.51 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto α -PVP.	115
Anexo 6.51 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.85 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto MDPV.	116
Anexo 6.52 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 16.52 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o PI adicionado à solução – Tetracosano.	116

Anexo 6.53 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo anfetamina, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 4.40 minutos, não interferindo com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	117
Anexo 6.54 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 4.40 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo anfetamina. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.	117
Anexo 6.55 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo metanfetamina, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 5.03 minutos, não interferindo com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	117
Anexo 6.56 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 5.03 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo metanfetamina. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.	118
Anexo 6.57 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo MDMA, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 9.05 minutos. Após análise por GC-FID confirmou-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	118
Anexo 6.58 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 9.05 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo MDMA. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.	118
Anexo 6.59 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de uma amostra contendo MDMA, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 9.26 minutos, confirmando-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	119
Anexo 6.60 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de um padrão de cafeína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.18 minutos. Após análise por GC-FID confirmou-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	119
Anexo 6.61 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 12.18 minutos, resultante da análise por GC-MS de um padrão de cafeína. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.	119
Anexo 6.62 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de padrão de cafeína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.12 minutos, confirmando-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	120
Anexo 6.63 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de um padrão de lidocaína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.64 minutos. Após análise por GC-FID confirmou-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	120
Anexo 6.64 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 12.64 minutos, resultante da análise por GC-MS de um padrão de lidocaína. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.	120
Anexo 6.65 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de padrão de lidocaína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.60 minutos, confirmando-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.	121
Anexo 6.66 - Resultados obtidos a partir das análises por GC-FID realizadas para verificação da adequação do extremo mínimo da gama de trabalho, assim como para o estudo da homoscedasticidade do sinal instrumental na gama de trabalho selecionada. O único <i>outlier</i> identificado encontra-se realçado, sendo correspondente à 19ª repetição para a mefedrona (1), tendo sido desprezado.	121
Anexo 6.67 - Resultados obtidos a partir das análises por GC-FID do extremo máximo da gama de trabalho, realizadas para o estudo da homoscedasticidade do sinal instrumental na gama de trabalho selecionada. Os <i>outliers</i> identificados encontram-se realçados, sendo correspondentes à 3ª, 7ª e 12ª repetições para a mefedrona (1), tendo sido desprezados.	122
Anexo 6.68 - Resultados obtidos a partir da análise por GC-FID de 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, ao longo de 10 dias não consecutivos, para posterior construção das curvas de calibração	

diárias. Os resultados, para a mefedrona (1), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).	123
Anexo 6.69 - Resultados obtidos a partir da análise por GC-FID de 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, ao longo de 10 dias não consecutivos, para posterior construção das curvas de calibração diárias. Os resultados, para a metilona (2), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).	124
Anexo 6.70 - Resultados obtidos a partir da análise por GC-FID de 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, ao longo de 10 dias não consecutivos, para posterior construção das curvas de calibração diárias. Os resultados, para o MDPV (3), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).	125
Anexo 6.71 - Valores médios das 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, para construção das curvas de calibração diárias utilizadas e verificação de linearidade. Os resultados, para a mefedrona (1), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).	126
Anexo 6.72 - Valores médios das 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, para construção das curvas de calibração diárias utilizadas e verificação de linearidade. Os resultados, para a metilona (2), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).	126
Anexo 6.73 - Valores médios das 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, para construção das curvas de calibração diárias utilizadas e verificação de linearidade. Os resultados, para o MDPV (3), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).	126
Anexo 6.74 - Equações das retas que dão origem às das curvas de calibração diárias para cada catinona, decorrente da análise por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, de 5 soluções de Padrões de calibrações, com duas injeções diárias, intercaladas de brancos.	127
Anexo 6.75 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de simplificar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo da folha de cálculo implementada para a catinona sintética mefedrona.	128
Anexo 6.76 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de simplificar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo da folha de cálculo implementada para a catinona sintética metilona.	129
Anexo 6.77 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de simplificar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo da folha de cálculo implementada para a catinona sintética MDPV.	130
Anexo 6.78 - Valores de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas ao longo de 10 dias não consecutivos, que permitem determinar a componente de incerteza associada ao sinal instrumental para o composto mefedrona (1).	131
Anexo 6.79 - Valores de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas ao longo de 10 dias não consecutivos, que permitem determinar a componente de incerteza associada ao sinal instrumental para o composto metilona (2).	131
Anexo 6.80 - Valores de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas ao longo de 10 dias não consecutivos, que permitem determinar a componente de incerteza associada ao sinal instrumental para o composto MDPV (3).	131
Anexo 6.81 – Compilação dos valores obtidos com vista ao estudo da repetibilidade da balança analítica instalada no LPC-PJ, para posterior determinação da incerteza associada às massas pesadas.	132

Anexo 6.82 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Azul 1</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartShop</i> ”, verificando-se um pico maioritário com tr de 8.9 minutos, e ainda o pico do PI de tr 16.5 minutos.....	132
Anexo 6.83 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.9 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Azul 1</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da catinona sintética 4-MEC.	132
Anexo 6.84 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Azul 1B</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartShop</i> ”, verificando-se um pico maioritário com tr de 8.3 minutos, e ainda o pico do PI de tr 16.5 minutos.....	133
Anexo 6.85 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.3 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Azul 1B</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença de mefedrona.	133
Anexo 6.86 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Bliss Rosa 2</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartShop</i> ”, verificando-se a existência de um pequeno pico de tr 8.9 minutos, um pico maioritário com tr de 11.0 minutos, e ainda o pico do PI de tr 16.5 minutos.....	134
Anexo 6.87 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.9 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Bliss Rosa 2</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da catinona sintética 4-MEC.	134
Anexo 6.88 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.0 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Bliss Rosa 2</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da metilona.	134
Anexo 6.89 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Rosa 3</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartShop</i> ”, verificando-se a presença de 3 picos significativos, com tr de 7.5, 8.6 e 8.9 minutos. Verifica-se ainda uma zona com um pico muito alargado e reduzida abundância, na zona de tr 15.4 minutos, e por fim o pico do PI de tr 16.5 minutos.....	135
Anexo 6.90 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 7.5 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Rosa 3</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da Etcatinona.	135
Anexo 6.91 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.6 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Rosa 3</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da Pentedrona.	136
Anexo 6.92 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.9 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Rosa 3</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da catinona sintética 4-MEC.	136
Anexo 6.93 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 15.4 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra <i>Blow Rosa 3</i> , sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença de MDPV.....	136
Anexo 6.94 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID da amostra <i>Blow Azul 1B</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartShop</i> ”, verificando-se que na zona do tr da mefedrona – na ordem dos 8 minutos (catinona sintética que se pretendia quantificar), existe um pico muito alargado, não sendo possível afirmar com certeza de que será apenas correspondente a esta catinona. Deste modo, a mefedrona não deve ser quantificada pela aplicação da metodologia desenvolvida.....	137
Anexo 6.95 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID da amostra <i>Bliss Rosa 2</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartShop</i> ”, verificando-se que na zona do R _t da metilona – na ordem dos 11 minutos (catinona sintética que se pretendia quantificar), existe um pico muito alargado, não sendo possível afirmar com certeza de que será apenas correspondente a esta catinona. Deste modo, a metilona não deve ser quantificada pela aplicação da metodologia desenvolvida.....	137

Anexo 6.96 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID da amostra <i>Blow Rosa 3</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartShop</i> ”, verificando-se que na zona do tr do MDPV – na ordem dos 14 minutos (catinona sintética que se pretendia quantificar), existe um pico estreito e bem definido, pelo que é possível quantificar o MDPV nesta amostra, pela aplicação da metodologia desenvolvida.	137
Anexo 6.97 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de facilitar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo de aplicação para determinação da fração de mefedrona na solução de Padrão 3, que neste caso funcionou como amostra problema, para testar a aplicação desta metodologia.	138
Anexo 6.98 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de facilitar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo de aplicação para determinação da fração de metilona na solução de Padrão 3, que neste caso funcionou como amostra problema, para testar a aplicação desta metodologia.	139
Anexo 6.99 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de facilitar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo de aplicação para determinação da fração de MDPV na solução de Padrão 3, que neste caso funcionou como amostra problema, para testar a aplicação desta metodologia.	140
Anexo 6.100 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de facilitar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo de aplicação para determinação da fração mássica de MDPV na amostra <i>Blow Rosa 3</i> , resultante de material apreendido numa “ <i>SmartsShop</i> ”.....	141
Anexo 6.101 – Cálculos para obtenção dos valores da fração mássica de cada catinona sintética em estudo, na solução de Padrão de Calibração 3, utilizada como amostra problema, para verificar a compatibilidade metrológica.	142
Anexo 6.102 - Invólucro dos quatro produtos resultantes de material apreendido de uma "SmartShop", com suspeita de conterem pelo menos uma das catinonas sintéticas em estudo.	142
Anexo 6.103 - Compilação das 57 amostras analisadas no âmbito deste trabalho e análises efetuadas com vista à identificação das substâncias psicoativas eventualmente presentes.	143
Anexo 6.104 - Cromatograma do exame correspondente à amostra que revelou conter dois canabinóides sintéticos, 5F-PB22 e 5F-AKB48, com tempos de retenção de 6.5 e 29.8 minutos, respetivamente, por GC-MS.	145
Anexo 6.105 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 6.5 minutos, resultante da análise por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 5F-PB22.....	145
Anexo 6.106 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 29.8 minutos, resultante da análise por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 5F-AKB48.	145
Anexo 6.107 - Espetro de RMN ¹ H do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	146
Anexo 6.108 - Espetro de RMN ¹³ C do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	146
Anexo 6.109 - Espetro de COSY do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	147
Anexo 6.110 - Espetro de HSQC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	147
Anexo 6.111 - Espetro de HMBC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	148

Anexo 6.112 - Espectro de RMN ¹ H do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	148
Anexo 6.113 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	149
Anexo 6.114 - Espectro de COSY do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.	149
Anexo 6.115 - Espectro de HSQC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.	150
Anexo 6.116 - Espectro de HMBC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.	150
Anexo 6.117 - Espectro de RMN ¹ H do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	151
Anexo 6.118 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	151
Anexo 6.119 - Espectro de COSY do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	152
Anexo 6.120 - Espectro de HSQC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	152
Anexo 6.121 - Espectro de HMBC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl ₃	153
Anexo 6.122 - Espectro de RMN ¹ H do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	153
Anexo 6.123 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	154
Anexo 6.124 - Espectro de COSY do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	154
Anexo 6.125 - Espectro de HSQC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	155
Anexo 6.126 - Espectro de HMBC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	155
Anexo 6.127 - Espectro de RMN ¹ H da amostra resultante de material apreendido em Portugal contendo LSD em mistura com outras substâncias não identificadas, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆ . Encontram-se identificados os sinais que permitiram chegar à conclusão da presença de LSD.....	156
Anexo 6.128 - Espectro de COSY da amostra resultante de material apreendido em Portugal contendo LSD em mistura com outras substâncias não identificadas, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆ . Encontra-se identificada a correlação de sinais que permitiu chegar à conclusão da presença de LSD, e não de um derivado na amina referida.	156
Anexo 6.129 - Espectro de HSQC da amostra resultante de material apreendido em Portugal contendo LSD em mistura com outras substâncias não identificadas, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆ . Encontram-se identificados os sinais que permitiram chegar à conclusão da presença de LSD.....	157
Anexo 6.130 - Cromatograma do exame de microselos, correspondente à amostra que revelou conter um composto maioritário, 25I-NBOH, por GC-MS.....	157
Anexo 6.131 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.0 minutos, resultante da análise à extração de microselos por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2C-H.	158
Anexo 6.132 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 12.9 minutos, resultante da análise à extração de microselos por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2C-C.	158

Anexo 6.133 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.8 minutos, resultante da análise à extração de microselos por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2C-I.	158
Anexo 6.134 - Espectro de RMN ¹ H do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	159
Anexo 6.135 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	159
Anexo 6.136 - Espectro de COSY do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	160
Anexo 6.137 - Espectro de HSQC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	160
Anexo 6.138 - Espectro de HMBC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.....	161
Anexo 6.139 - Espectro de RMN ¹ H do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆	161
Anexo 6.140 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆	162
Anexo 6.141 - Espectro de COSY do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆	162
Anexo 6.142 - Espectro de HSQC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆	163
Anexo 6.143 - Espectro de HMBC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆	163
Anexo 6.144 - Cromatograma do exame com suspeita de <i>Bloom</i> , correspondente à amostra que revelou conter um composto maioritário, α-PHP, por GC-MS.	164
Anexo 6.145 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.23 minutos, resultante da análise à amostra suspeita de <i>Bloom</i> , por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto α-PHP.....	164
Anexo 6.146 - Cromatograma do exame que dizia conter “Sulfato de Bário”, e que após análise por GC-MS, revelou conter um composto minoritário (R _t 5.9 minutos) cujo padrão de fragmentação seria semelhante ao precursor BMK, e um composto maioritário (R _t 9.5 minutos), cujo padrão de fragmentação seria semelhante ao composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo (biblioteca de espectros <i>Wiley</i> - 56%)......	164
Anexo 6.147 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 5.9 minutos, resultante da análise à amostra suspeita que dizia conter “Sulfato de Bário”, por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o precursor BMK.	165
Anexo 6.148 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 9.5 minutos, resultante da análise à amostra suspeita que dizia conter “Sulfato de Bário”, por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo com um grau de certeza de apenas 56% (biblioteca de espectros <i>Wiley</i>)......	165
Anexo 6.149 - Espectro de RMN ¹ H do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆	166
Anexo 6.150 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆	166
Anexo 6.151 - Espectro de COSY do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d ₆ . ..	167

Anexo 6.152 - Espectro de HSQC do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆ . .	167
Anexo 6.153 - Espectro de HMBC do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- <i>d</i> ₆	168
Anexo 6.154 - Resultados da análise de FTIR da amostra 53 (tabela 2.8), em pastilha de KBr.....	168
Anexo 6.155 - Resultados da análise MS (ESI+) realizada à amostra 53 (tabela 2.8).	169
Anexo 6.156 - Cromatograma do exame com suspeita de conter uma substância depressora, que revelou conter um composto maioritário, Lorazepam, por GC-MS.....	170
Anexo 6.157 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 13.91 minutos, resultante da análise à amostra suspeita de conter uma substância depressora, por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto Lorazepam.	170
Anexo 6.158 - Compilação das amostras analisadas ao longo do trabalho desenvolvido, com identificação da suspeita e do resultado efetivamente obtido no decorrer das análises.	171

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

- 3,4-DMMC** – 3,4-dimetilmetcatinona
3-FPM – 3-fluorofenmetrazina
3-MEC – 3-metilectatinona
4-Acetoxi-DMT – *O*-acetilpsilocina
4-CMC – 4-clorometcatinona (ou clefedrona)
4Cl-PVP – 4-cloro- α -pirrolidinovalerofenona
4Me-Amfepramona – 4-metil-*N,N*-dietilpropiona
4-MBC – Bazedrona (4-metilbenzilcatinona)
4-MEC – 4-metilectatinona
4-MMC – Mefedrona (4-metilmetcatinona)
5-HT – Serotonina
5-MeO-MiPT – 5-metoxi-*N*-metil-*N*-isopropil-triptamina
5F-ADB – 5F-MDMB-PINACA {2-[1-(5-fluoropentil)-1*H*-indazole-3-carbonil]amino}-3,3-dimetilbutanoato)
5F-AKB48 – 5F-APINACA (*N*-(adamantan-1-il)-1-(5-fluoropentil)-1*H*-indazole-3-carboxamida)
5F-PB22 – 1-(5-fluoropentil)-1*H*-indole-3-carboxilato de quinolin-8-ilo
APAA – Alfa-fenilacetoacetamida (do inglês *Alpha-PhenylAcetoAcetamide*)
APAAN – Alfa-fenilacetoacetoneitrilo (do inglês *Alpha-PhenylAcetoAcetoNitrile*)
APT ¹³C – Experiência de RMN ¹³C (do inglês *Attached Proton Test*)
BMK – Fenilacetona (do inglês *Benzyl Methyl Ketone*)
brs – Singuleto alargado (do inglês *Broad Singlet*)
CAS – do inglês *Chemical Abstracts Service*
CB1/CB2 – Recetores canabinóides do tipo ½
CC – Coluna Cromatográfica
CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado
COSY – Espectroscopia de Correlação Homonuclear (do inglês *Homonuclear Correlation Spectroscopy*)
C_q – Carbono Quaternário
d – Duplete
DAT – Transportador Ativo de Dopamina (do inglês *Dopamine Active Transporter*)
dd – Duplo Duplete
DEB – *N,N*-dietilbufedrona
DEP – *N,N*-dietilpropiofenona
DMC – *N,N*-dimetilcatinona
DMB – *N,N*-dimetilbufedrona
DMP – *N,N*-dimetilpentedrona
DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido Deuterado
DOC – 2,5-dimetoxi-4-cloroanfetamina
DOP – Recetor Opióide *Delta* (δ) (do inglês *Delta Opioid Receptor*)
EI – Ionização por Impacto Eletrónico (do inglês *Electron Ionization*)
EMCDDA – Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, OEDT (do inglês *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*)
Ectatinona – *N*-etilcatinona
EU – União Europeia (do inglês *European Union*)
FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometer*)

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (do inglês *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*)

HILIC – Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (do inglês *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

HMBC – Espectroscopia de Correlação Heteronuclear (do inglês *Heteronuclear Multi-Bond Correlation Spectroscopy*)

HMQC – do inglês *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation Spectroscopy*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor de Foto-Díodos (do inglês *High-Performance Liquid Chromatography-Diode-Array Detection*)

HSQC – Espectroscopia de Correlação Heteronuclear a uma ligação (do inglês *Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy*)

Hz – Hertz

INML-CF – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

IST – Instituto Superior Técnico

J – Constante de Acoplamento

KOP – Recetor Opióide *Káppa* (*k*) (do inglês *Kappa Opioid Receptor*)

LC – Cromatografia Líquida (do inglês *Liquid Chromatography*)

LC-CLND – Cromatografia Líquida com Detecção de Nitrogénio por Quimiluminescência (do inglês *Liquid Chromatography-Chemiluminescence Nitrogen Detection*)

LD – Limite de Detecção

LLE – Extração Líquido-Líquido (do inglês *Liquid-Liquid Extraction*)

LPC-PJ – Laboratório da Polícia Científica da Polícia Judiciária

m – Multiplete

m/z – Razão massa/carga

MDMA – 3,4-metilenodioximetanfetamina (ecstasy)

MDPV – 3,4-metilenodioxipirovalerona

MDPBP – 3,4-metilenodioxi- α -pirrolidinobutirofenona

MeOD – Metanol- d_4

MHz – Mega Hertz

MM – Massa Molar

MPPP – 4-Metil- α -pirrolidinopropiofenona

MOP – Recetor Opióide *Mu* (μ) (do inglês *Mu Opioid Receptor*)

MS – Espectrometria de Massa (do inglês *Mass Spectrometry*)

MSD – Detetor Seletivo de Massas (do inglês *Mass Selective Detector*)

NEB – *N*-etilbufedrona

NEP – *N*-etilpentedrona

NET – Transportador de Norepinefrina (do inglês *Norepinephrine Transporter*)

nm – Nanómetros

NSP – Novas Substâncias Psicoativas

NT – Neurotransmissores

ONU – Organização das Nações Unidas

OPC – Órgão(s) de Polícia Criminal

PI – Padrão Interno

PJ – Polícia Judiciária

ppm – Partes por Milhão
q – Quarteto
R_f – Fator de Retenção (do inglês *Retention Factor*)
R_t – Tempo de Retenção (do inglês *Retention Time*)
RMN – Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H – Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão
RMN ¹³C – Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
s – Singuleto
SERT – Transportador de Serotonina (do inglês *Serotonin Transporter*)
SICAD – Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid-Phase Extraction*)
t – Triplete
THF – Tetrahidrofurano
TLC – Cromatografia de Camada Fina (do inglês *Thin-layer Chromatography*)
UNODC – Gabinete das Nações Unidas contra a Droga e o Crime (do inglês *United Nations Office on Drugs and Crime*)
UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*)
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana
VHC – Vírus da Hepatite C
VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia
α-PBP – α-pirrolidinobutiofenona
α-PHP – α-pirrolidinohexiofenona
α-PPP – α-pirrolidinopropiofenona
α-PVP – α-pirrolidinovalerofenona
δ – Desvio Químico

1 INTRODUÇÃO

A toxicologia é uma das mais antigas ciências ao serviço da humanidade, podendo ser definida como o estudo da interação entre os xenobióticos - *compostos estranhos ao organismo* - e os endobióticos - *compostos não estranhos ao organismo*, e os sistemas biológicos, com o objetivo de determinar qualitativa e quantitativamente o seu potencial de indução de efeitos nesses sistemas [1]. Assim, para além da identificação das substâncias em análise, é também um objetivo desta disciplina perceber o modo como as mesmas interagem com os sistemas biológicos, a fim de prevenir, diagnosticar e tratar os seus efeitos nocivos [2], [3].

Devido à sua grande abrangência e objetivos, a toxicologia engloba várias subdisciplinas, como é o caso da toxicologia analítica, da toxicologia clínica ou da toxicologia forense. A toxicologia forense é uma área da ciência dedicada à aplicação de métodos e práticas científicas para análise de substâncias, drogas e venenos, onde os resultados possam ser aplicados no auxílio da justiça, nomeadamente no esclarecimento de questões judiciais e judiciais, desempenhando um papel crucial na investigação criminal [1]–[3].

Em Portugal, as duas instituições públicas que detêm na sua orgânica setores de toxicologia com vista à aplicação à alçada forense, são o Laboratório da Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ) e o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INML-CF). Enquanto este último tem como principal objetivo a análise de substâncias como drogas de abuso, medicamentos ou pesticidas em diferentes matrizes, principalmente biológicas, o LPC-PJ analisa, principalmente, material apreendido [4], [5].

As drogas de abuso têm estado desde sempre presentes na história da humanidade. Estas podem ser usadas no âmbito terapêutico, para tratar sintomas como a dor ou tosse, ou para efeitos recreacionais enquanto substâncias de abuso, induzindo a sensação de bem-estar e reduzindo a tensão ou a ansiedade. O uso destas substâncias inclui um elevado risco de infeção, doença, e *overdose*, na medida em que, os compostos farmacêuticos são produzidos em ambientes controlados, estando a sua concentração e grau de pureza bem documentados, enquanto as substâncias de abuso que circulam no mercado ilícito/recreativo, são provenientes de laboratórios clandestinos e de composição desconhecida [2].

De acordo com a Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho [6], que altera a Decisão-Quadro 2004/757/JAI [7], que estabelece uma abordagem comum de resposta ao tráfico ilícito de droga, droga é qualquer substância abrangida pela Convenção Única das Nações Unidas sobre os Estupefacientes, de 1961, alterada pelo Protocolo de 1972, ou pela Convenção das Nações Unidas sobre as Substâncias Psicotrópicas, de 1971, bem como qualquer das substâncias enumeradas no anexo a esta diretiva, onde foram incluídas algumas das novas substâncias psicoativas que mais riscos sociais e para a saúde pública colocam, como é o caso das catinonas - mefedrona e MDPV. Sempre que, no âmbito de uma avaliação de riscos nos termos do Regulamento (CE) n.º 1920/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho [8], uma NSP revelar graves riscos sociais e para a saúde pública, representando uma ameaça para a vida, a Comissão pode adotar um ato delegado a fim de alterar o anexo à diretiva citada, aditando essa NSP e incluindo-a na definição de droga.

O uso e o tráfico ilícito de drogas são fenómenos de contexto mundial crescentes e dinâmicos, que ameaçam a saúde e a estabilidade social. De facto, os dados existentes sugerem que a disponibilidade das drogas é elevada e que em algumas regiões está mesmo a aumentar. A Europa funciona como um importante mercado neste setor, não só a nível de produção interna, mas também no que respeita ao tráfico de substâncias provenientes de todas as regiões do mundo. A América do Sul, a Ásia Ocidental e o norte de África são as regiões mais importantes de produção de drogas ilícitas, entrando facilmente na Europa, muitas das vezes pelo lado de Portugal.

1.1 AS NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS

Novas Substâncias Psicoativas (NSP) são, na sua maioria, compostos projetados para mimetizar os efeitos das drogas ilícitas tradicionais e recreativas existentes, com efeitos psicoativos intensos. De uma forma geral, estes compostos são produzidos com o intuito de contornar as restrições legais existentes no que respeita a drogas de abuso, nomeadamente pela alteração da sua estrutura química [2], [9]. De acordo com a Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho [6], que altera a Decisão-Quadro 2004/757/JAI [7], que estabelece uma abordagem comum de resposta ao tráfico ilícito de droga, uma NSP é “uma substância na forma pura ou numa preparação que não está abrangida pela Convenção Única das Nações Unidas sobre o Estupefacientes, de 1961, alterada pelo Protocolo de 1972, nem pela Convenção das Nações Unidas sobre as Substâncias Psicotrópicas, de 1971, mas que pode colocar riscos sociais ou para a saúde, semelhantes aos colocados pelas substâncias abrangidas pelas referidas convenções”.

O fenómeno das NSP tem-se difundido a uma taxa sem precedentes desde o início da década passada por todo o mundo, principalmente em resultado da sua ‘legalidade’ e ampla disponibilidade, fazendo com que sejam conhecidas vulgarmente como ‘*legal highs*’ [9], [10]. O reconhecimento destas substâncias como ‘legais’, associado aos preços reduzidos e ao facto de serem difíceis de detetar nas análises de rotina dos laboratórios de toxicologia, aumenta o grau de risco, levando a uma falsa sensação de segurança [11]. As NSP representam assim um desafio em constante evolução no que respeita às políticas em matéria de drogas de abuso [12]. Novas substâncias significam novos riscos toxicológicos e novos desafios analíticos para a sua identificação, pelo que é cada vez mais necessário um esforço multidisciplinar para perceber os seus efeitos, crónicos ou agudos, e os riscos que lhes estão associados [10], [13]. Atualmente, estas substâncias são vendidas principalmente na internet, habitualmente em embalagens rotuladas como “não para consumo humano”, cujo conteúdo pode ser de uma ou mais substâncias, que poderão incluir NSP ou adulterantes como é o caso da cafeína. No entanto, nem sempre o rótulo corresponde de facto ao conteúdo [10]. A maioria das NSP são produzidas em empresas químicas e farmacêuticas da China, e posteriormente remetidas para a Europa, onde são transformadas em produtos prontos a entrar no mercado de venda e consumo. Por outro lado, algumas destas substâncias podem ainda ser produzidas em laboratórios clandestinos ou desviadas da cadeia legítima de abastecimento, nomeadamente com origem em medicamentos [12]. Nos últimos anos tem ocorrido um aumento significativo de informações sobre este tipo de substâncias, sugerindo a propagação do seu consumo, no entanto, este aumento pode ser em parte devido à existência de novos instrumentos de pesquisa e análise. Na verdade, a pesquisa sobre estes compostos é muitas vezes dificultada pela existência de diferentes nomes relacionados com as mesmas substâncias, ou até por determinado composto ser conhecido por diferentes designações [14]. É de salientar que o termo ‘novas’ não significa necessariamente que se refiram a novas moléculas, mas sim a substâncias recentemente disponibilizadas nos mercados de substâncias recreativas. Na realidade, muitas destas substâncias foram sintetizadas há muitos anos, com o objetivo de desenvolver medicamentos, como é o caso da mefedrona sintetizada em 1929, ou da metilona, patenteada em 1996 como agente anti Parkinson [14]–[17].

A nível europeu, quem monitoriza a problemática das drogas, onde são incluídas as NSP, é o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, usualmente designado como EMCDDA. Este fornece à União Europeia e respetivos Estados-Membros uma visão geral do panorama existente, com o intuito de ajudar na elaboração de leis e estratégias para o combate aos fenómenos associados ao consumo e tráfico de substâncias recreativas [18]. Até ao final de 2017, globalmente, o sistema monitorizou mais de 670 novas substâncias psicoativas, e embora o número de novas substâncias que aparecem no mercado tenha diminuído em relação ao pico observado em 2015, o problema associado ao seu consumo e as suas consequências ao nível de saúde pública permanecem elevados. Nos últimos cinco anos, foram detetadas quase 70% das novas substâncias identificadas através do mecanismo de

alerta rápido na União Europeia (EWS), o primeiro dos três níveis de controlo implementados aquando da criação do EMCDDA, sendo que em 2017 foram detetadas pela primeira vez 51 novas substâncias na Europa. Assim, verificou-se um declínio em relação ao valor máximo de 100 novas identificações, alcançado por ano em 2014 e 2015 (**Figura 1.1**). As causas desta redução não são claras, mas podem dever-se às medidas adotadas pelos governos nacionais europeus para proibir estas substâncias, em especial a sua venda livre [12].

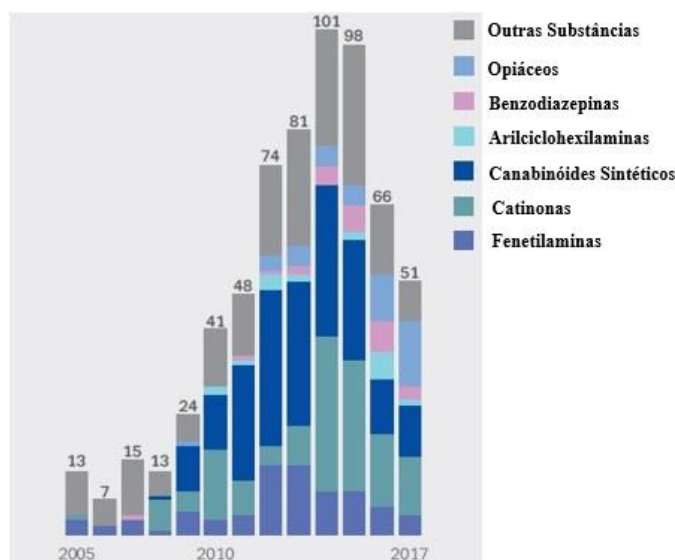


Figura 1.1 - Número e principais categorias de NSP notificadas pela primeira ao EWS da União Europeia, no período entre 2005 e 2017 - adaptado de [12].

Com base nos seus mecanismos farmacológicos, propriedades psicoativas ou estrutura, as NSP podem ser agrupadas em diferentes categorias. De acordo com a sua estrutura química, podem ser diferenciadas nas seguintes classes: fenetilaminas, catinonas sintéticas, canabinóides sintéticos, arilciclohexilaminas, benzodiazepinas, opiáceos e outras substâncias. Só no ano passado surgiram diversos casos de intoxicação aguda e morte relacionados com o consumo de opiáceos e canabinóides sintéticos. Foram ainda investigados cinco derivados do fentanilo, que se encontravam disponíveis numa série de novas formas, incluindo pulverizadores nasais, ou misturadas com outras drogas como a heroína ou cocaína. A emergência destas drogas potencialmente fatais coloca desafios significativos tanto para os serviços de saúde como para os serviços de aplicação da lei. No entanto, as catinonas e os canabinóides sintéticos continuam a ser as classes predominantes das NSP, representando quase 80 % de um universo de 71 000 apreensões só no ano de 2016 [12].

Em Portugal, o fenómeno das *'legal highs'* teve a sua explosão em 2007, com a abertura da primeira loja dedicada ao comércio destas substâncias, lojas já então designadas de *"SmartShops"*. Nos anos seguintes e até 2013 o número de lojas com o mesmo fim comercial aumentou exponencialmente no país, sendo que no início desse último ano já existiam mais de 63 lojas abertas [19]. O primeiro grande episódio de intoxicação decorrente deste tipo de substâncias ocorreu na ilha da Madeira em 2011, com vários casos de jovens hospitalizados, evidenciando o problema de considerável risco para a saúde pública. No início do ano seguinte, a mefedrona (catinona sintética) e o tapentadol (opióide sintético) foram inseridos na legislação aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas (Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro [20]). Em 2013, foi criada uma legislação própria para as NSP, porquanto a rápida proliferação do problema das *"SmartShops"* e na medida em que, apesar de ameaçarem gravemente a saúde pública, não se encontravam previstas na legislação penal. Desde aí, novas substâncias vêm surgindo, sendo gradualmente colocados ao abrigo do regime jurídico nacional (conforme seção 1.1.1).

É no entanto de salientar que a canábis continua a ser a substância ilícita mais consumida em Portugal, seguida pela cocaína e MDMA, com uso das NSP muito abaixo da média europeia. Ainda assim, o território nacional funciona como um país de trânsito para quantidades significativas de diferentes substâncias ilícitas, destinadas a outros países europeus, decorrente da sua localização geográfica [21]. A China é o principal país produtor de NSP, sendo este um mercado em constante evolução e com grande emergência e variedade na última década [12].

1.1.1 ENQUADRAMENTO LEGAL

Para impedir a oferta de drogas no âmbito global, existem três Convenções das Nações Unidas que estabelecem um quadro internacional para o controlo da produção, tráfico e posse de mais de 240 substâncias psicoativas. De facto, duas delas encontram-se mencionadas na definição de NSP, como referido, sendo elas a Convenção Única das Nações Unidas sobre o Estupefacientes, de 1961, alterada pelo Protocolo de 1972 [22], e a Convenção das Nações Unidas sobre as Substâncias Psicotrópicas, de 1971 [23]. A terceira diz respeito ao tráfico destas substâncias, a Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas de 1988 [24]. O rápido surgimento de NSP e a diversidade dos produtos disponíveis constituem também um desafio para a atualização destas Convenções, bem como para os legisladores de cada país [12]. No entanto, é de ressaltar que as tabelas anexas a estas Convenções têm vindo a sofrer atualizações, aumentando assim o número de substâncias a controlar. A última atualização ocorreu em 2017, tendo sido acrescentadas novas substâncias que, deste modo, passam a fazer parte da definição de droga, ao abrigo da Decisão-Quadro 2004/757/JAI [7] (alterada pela Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho [6]).

A nível da União Europeia (UE), o quadro jurídico implementado para dar resposta às ameaças a nível social e para a saúde pública mantém desde 1997 uma abordagem baseada em três fases de resposta: 1. Intercâmbio de informações; 2. Avaliação de Risco; 3. Controlo de novas drogas sintéticas (97/396/JAI). Em 2005 este diploma foi revogado, com o surgimento da Decisão 2005/387/JAI do Conselho [25], implementando-se o conceito de NSP, em substituição do termo “drogas sintéticas”. O objetivo era o de aprimorar a abordagem de três fases de resposta citada, tornando-se: 1. Mecanismo de alerta rápido (EWS); 2. Avaliação de riscos; 3. Medidas de controlo, e reforçar simultaneamente os processos existentes, simplificando e acelerando a recolha de dados e os procedimentos de avaliação, bem como pela aplicação de prazos mais curtos [12], [26]. Neste âmbito, surgiu no final do ano precedente nova legislação publicada com o intuito de acelerar a resposta ao fenómeno das NSP, nomeadamente pelo reforço do EWS. Esta legislação inclui o Regulamento (EU) 2017/2101 do Parlamento Europeu e do Conselho [27], que vem alterar o Regulamento (CE) n.º 1920/2006 [8], e a Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho [6], que pretende alterar a Decisão-Quadro 2004/757/JAI [7] e revogar a Decisão 2005/387/JAI [25], ambos de 15 de Novembro de 2017. Neste sentido, quando uma NSP é detetada no cenário europeu das drogas, os Estados-Membro asseguram que a informação sobre o fabrico, tráfico e uso, é transmitida ao EMCDDA e Europol, através dos pontos focais nacionais da Reitox – Rede Europeia de Informação sobre a Droga e a Toxicod dependência. Se estas entidades considerarem que a informação recolhida sobre uma NSP merece acompanhamento ativo, é apresentado um relatório inicial sobre a possibilidade de iniciar ou não um procedimento de avaliação de riscos. O passo seguinte é então essa avaliação de risco, por parte do Comité Científico do EMCDDA e peritos adicionais da Europol e Comissão Europeia. Estes avaliam os possíveis riscos sociais e para a saúde da substância recentemente identificada, e as implicações da sua colocação sob controlo, sendo apresentado um relatório de avaliação de riscos à Comissão e ao Conselho, para consideração. Por último é tomada a decisão, por iniciativa da Comissão Europeia ou do Estado-Membro, e com base no relatório de avaliação de riscos. O Conselho pode decidir adotar uma decisão que defina se a substância deve ser sujeita a medidas de controlo, que são decididas em

conformidade com as legislações nacionais, que por sua vez cumprem as convenções da ONU [26]. De salientar que, em Portugal, o Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) é o ponto focal nacional do EMCDDA, prestando apoio técnico e administrativo, e apoiando a implementação da estratégia nacional, através do planeamento e avaliação de intervenções de redução do fenómeno das drogas, com o auxílio do LPC-PJ [21].

No nosso país, a política de drogas tem por base três documentos estratégicos, a Estratégia Nacional para o Combate às Drogas de 1999 [28], o Plano Nacional de Redução de Comportamentos Aditivos e das Dependências 2013-2020 [29], e o respetivo Plano de Ação 2013-2016 [30], mas que permanece em vigor até à finalização do Plano de Ação 2017-2020. A principal lei relativa às drogas é o Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de Janeiro [20], que define o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicoativas. A Lei n.º 30/2000, de 29 de Novembro – mas em vigor desde Julho de 2001 [31], uma das alterações publicadas a este Decreto-Lei, veio descriminalizar o consumo, a aquisição e a posse para consumo de drogas, de acordo com “a quantidade necessária para o consumo médio individual durante o período de 10 dias”. Os limites quantitativos máximos para cada dose média individual diária, apenas estão descritos para as “plantas, substâncias ou preparações constantes das tabelas I a IV anexas ao Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro, de consumo mais frequente”, ao abrigo da Portaria n.º 94/96 de 26 de Março [32]. Nestas não se encontram as NSP, que detêm uma legislação separada emitida pelo Ministério da Saúde, nomeadamente pelo Decreto-Lei n.º 54/2013 [33], com vista à proibição da produção, exportação, propaganda, distribuição, venda ou dispensação das NSP indicadas na lista publicada no âmbito da Portaria n.º 154/2013 [34], ambos de 17 de Abril [21]. Neste sentido, consideram-se NSP “as substâncias não especificamente enquadradas e controladas ao abrigo de legislação própria que, em estado puro ou numa preparação, podem constituir uma ameaça para a saúde pública comparável à das substâncias previstas naquela legislação, com perigo para a vida ou para a saúde e integridade física, devido aos efeitos no sistema nervoso central, podendo induzir alterações significativas a nível da função motora, bem como das funções mentais, designadamente do raciocínio, juízo crítico e comportamento, muitas vezes com estados de delírio, alucinações ou extrema euforia, podendo causar dependência e, em certos casos, produzir danos duradouros ou mesmo permanentes sobre a saúde dos consumidores”. De acordo com o artigo 3.º do Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de Abril [33], são ainda considerados todos “os derivados, os isómeros e os sais” das substâncias constantes da lista aprovada pela Portaria n.º 154/2013 já citada.

É ainda de salientar que, ainda antes de ser publicada esta legislação “específica”, e porquanto o grande episódio de intoxicação que ocorreu na ilha da Madeira em 2011, com vários casos de jovens hospitalizados, foi publicado o Decreto Legislativo Regional n.º 28/2012/M, de 25 de Outubro [35], com vista à implementação de “um regime contraordenacional de proibição das novas drogas, sem prejuízo do quadro penal adequando que venha a ser aprovado na Assembleia da República”. Este acontecimento evidenciou o problema de considerável risco para a saúde pública destas novas substâncias, tendo esta legislação saído já depois da primeira alteração ao Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de Janeiro que pretendia acrescentar NSP às tabelas que lhes são anexas, pela Lei n.º 13/2012, de 26 de Março [36], que não se afigurou eficiente neste aspeto.

1.1.2 MECANISMO DE AÇÃO E DANOS CAUSADOS

De uma maneira geral, sabemos que o consumo de drogas ilícitas contribui para o peso global dos problemas de saúde agudos e crónicos, agravados por diferentes fatores como as propriedades da substância em causa, a via de administração, a vulnerabilidade individual ou o contexto social do consumo. Para além do risco individual associado a estas substâncias, também a saúde pública é colocada em risco, nomeadamente porquanto os comportamentos de risco relacionados com a transmissão de vírus como o VIH ou o VHC, maioritariamente associados ao consumo de drogas

injetáveis. Apesar de os eventos relacionados com emergências hospitalares resultantes do consumo de algumas das substâncias ilícitas mais recorrentes, como o caso da heroína e da cocaína, continuarem a predominar, são os riscos associados às NSP que cada vez mais constituem um desafio às políticas em matéria de droga [12]. O facto de ser complicado estabelecer uma relação entre a NSP consumida e o efeito causado no respetivo consumidor, dificulta a avaliação do risco que lhe está associado. Na verdade, muitas das substâncias disponíveis no mercado das NSP, contêm na sua composição moléculas que, apesar de identificadas ou reconhecidas como tal, podem não partilhar efeitos e perfis de risco semelhantes às substâncias ilícitas para as quais foram projetadas mimetizar. Na maioria das vezes, o próprio consumidor não tem conhecimento sobre a substância que consumiu, porque não sabe ou porque foi mal informado [37], [38]. Durante anos a falta de conhecimento sobre as substâncias, os seus efeitos específicos nos consumidores, e o acesso limitado a dados analíticos válidos, tornou a perceção da farmacocinética e farmacodinâmica destes compostos, complexa [13]. Atualmente, os efeitos de algumas NSP no corpo humano ainda não são totalmente compreendidos na medida em que os dados de segurança relativos à sua toxicidade muitas vezes não estão disponíveis e os seus efeitos colaterais a longo prazo não são conhecidos [39].

Apesar de não existirem estudos toxicológicos para a maioria das NSP, sabe-se que um considerável número destas substâncias pode potencialmente provocar intoxicações agudas, originando sérias consequências. Farmacologicamente, elas interagem com vários alvos de neurotransmissores, afetando tanto o sistema nervoso central como o periférico [11], [37]. Os opiáceos e os canabinóides sintéticos são dois grupos de NSP particularmente preocupantes, sendo que, no primeiro, são os derivados do fentanilo que evidenciam mais problemas, na medida em que são especialmente potentes conseguindo provocar intoxicações fatais com quantidades mínimas [12]. De facto, estas substâncias são por vezes vendidas como heroína ou até medicamentos falsificados, pelo que o risco de envenenamento grave e fatal está eminente [38]. No que respeita às substâncias pertencentes à classe dos canabinóides sintéticos, a sua maioria foi inicialmente projetada para pesquisa farmacológica, no entanto, nenhuma é atualmente permitida para uso médico [14].

De uma forma geral incluem-se nos problemas crónicos a dependência e as doenças infecciosas relacionadas com as drogas, enquanto as *overdoses* correspondem ao problema mais visível dos casos agudos [12]. Na **Tabela 1.1** encontram-se compilados os mecanismos de ação associados às mais comuns classes de NSP, bem como os sintomas mais frequentes resultantes do seu consumo.

Tabela 1.1 - Compilação do mecanismo de ação e sintomas mais frequentes das principais classes de NSP - adaptado de [11], [13], [14], [40], [41].

	<i>Fenetilaminas</i>	<i>Catinonas Sintéticas</i>	<i>Canabinóides Sintéticos</i>	<i>Opiáceos</i>
<i>Mecanismo de Ação</i>	São inibidores da recaptção de NT monoamínicos e promovem a libertação de 5-HT no SERT	Promovem a libertação de NT monoamínicos, e inibem a sua reabsorção	Agonistas sintéticos dos recetores de canabinóides (CB1 ou CB2)	Agonistas, antagonistas ou agonistas parciais dos recetores opióides (DOP, KOP e MOP)
<i>Sintomas mais frequentes</i>	Psicose Alucinações Náuseas Tonturas Dores de cabeça/corpo Depressão Confusão Hipertermia Taquicardia	Agitação Euforia Paranoia Alucinações Psicoses Mioclonia Dores de cabeça/peito Hipertermia Taquicardia	Agitação Psicose Mioclonia Convulsões Tonturas Taquicardia Hiperatividade Danos no fígado Tendências suicidas	↓ Respiratória ↓ Consciência Sedação Coma Miose Náuseas Tonturas

^a Denotar que: **NT** – Neurotransmissor; **5-HT** – Serotonina ; **SERT** - Transportador de Serotonina; **SNC** – Sistema Nervoso Central; **CB1** e **CB2** – Recetores Canabinóides do tipo ½; **DOP, KOP** e **MOP** – Recetores Opióides Delta, Káppa e Mu.

1.2 CATINONAS SINTÉTICAS

As catinonas sintéticas são uma das mais comuns classes de NSP estando quimicamente relacionadas com a (*S*)-catinona (**Figura 1.2**), um estimulante psicoativo natural que ocorre na planta Khat (*Catha edulis*), identificado pela primeira vez em 1975 [12]. A planta Khat é um arbusto nativo da África Ocidental e do sul da Península Arábica, sendo que é nas folhas que se encontram as substâncias psicoativas que produzem efeitos estimulantes, populares entre os povos dessas regiões desde há longos anos [39], [42]. Habitualmente conhecidas no mercado ilícito como “*bath salts*”, as catinonas sintéticas têm, de uma forma geral, efeitos semelhantes a drogas ilícitas comuns como a anfetamina, cocaína ou o MDMA. De facto, elas apresentam similaridades a nível estrutural e farmacológico com as anfetaminas, sendo que a única diferença é a presença de um grupo cetona no carbono α da cadeia lateral da catinona (**Figura 1.2**) [12], [43], [44]. Para além da catinona, estão ainda presentes na planta Khat a efedrina e a catina (**Figura 1.2**), no entanto, é a primeira que lhe confere, quase exclusivamente, as capacidades psicoestimulantes [45].

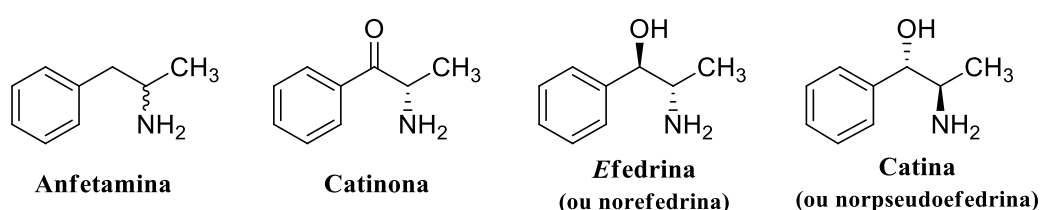


Figura 1.2 - Estrutura da anfetamina, catinona, efedrina e catina, verificando-se as similaridades a nível estrutural.

Apesar de a planta Khat ser conhecida desde finais do século XVIII e de o primeiro princípio ativo, a catina, ter sido identificado e isolado em 1930, os estudos para compreensão dos efeitos psicoestimulantes da Khat culminaram apenas em 1975, com o isolamento e a identificação da catinona nas folhas frescas da planta. Nesta altura, apurou-se então que a catinona apresentava propriedades estimulantes muito superiores às da catina, no entanto, degradava-se rapidamente, razão pela qual não teria sido previamente identificada. Em anos anteriores foram reportados trabalhos de síntese de dois compostos relacionados com a catinona, a metcatinona (ou efedrona) em 1928, comercializada como antidepressivo na década 1930-1940, e a mefedrona em 1929 (**Figura 1.3**) [16], [17], [46]. As primeiras preocupações com a potencial utilização dos derivados da catinona como substâncias de abuso surgiram na década de 1970 na União Soviética e em 1999 nos EUA, pelo uso generalizado da metcatinona, levando à adição desta substância ao Anexo I das Convenções das Nações Unidas sobre as Substâncias Psicotrópicas, de 1971 [23]. Mas foi apenas em meados dos anos 2000 que começaram a surgir vários derivados da catinona no mercado de substâncias de abuso [16].

Uma das primeiras catinonas sintéticas reportadas ao EMCDDA foi a metilona, identificada no final de 2004 na Holanda, sob o nome comercial de “*Explosion*”. No entanto, esta substância foi sintetizada por Alexander Shulgin em 1996, tendo sido patenteada como antidepressivo e anti Parkinson [16], [47]–[49]. A metilona é um β -ceto análogo do MDMA (“*ecstasy*”), (**Figura 1.3**), sendo que estudos afirmam que esta catinona é três vezes menos potente que o MDMA na inibição dos transportadores de serotonina (SERT) e tão potente como o MDMA nos seus efeitos inibidores dos transportadores de dopamina (DAT) e norepinefrina (NET), no entanto, estas substâncias não produzem os mesmos efeitos [47]. A catinona sintética mais popular entre os consumidores é a mefedrona, conhecida comercialmente como “*Meow Meow*” ou “*Miaow*”, apresentando uma estrutura similar à metcatinona, a primeira catinona sintética não utilizada para fins terapêuticos adicionada à legislação aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas (Tabela II-A do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro [20]) (**Figura 1.3**), ao abrigo da 7ª versão deste diploma, publicada a 24 de Fevereiro de 2001 (Decreto-Lei n.º 69/2001 [50]). É uma das mais reportadas ao EMCDDA desde o início do surgimento das NSP, tendo

sido a primeira catinona sintética a deter um relatório para avaliação de risco, e tendo vindo a demonstrar prevalência no mercado mundial, porquanto ser reportada ano após ano entre 2009 e 2015. De salientar que prevalência não significa necessariamente a continuação de uso pelos consumidores, no entanto, este termo sugere que algumas NSP têm uma ‘vida-útil’ maior que outras [14], [15], [49], [51]. Para além da mefedrona, também o MDPV é uma das substâncias mais difundidas a nível mundial, tendo sido identificado pela primeira vez na Alemanha em 2007, em material apreendido proveniente de uma remessa de correspondência com origem na China [37], [49], [52]. Esta substância é um análogo da pirovalerona, a primeira catinona sintética adicionada à legislação aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, utilizada para fins terapêuticos (Tabela IV do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro [20]), em que o anel aromático apresenta uma substituição por um grupo 3,4-metilenodioxilo (**Figura 1.3**), e foi sintetizada pela primeira vez em 1969, fazendo na altura parte da classe de estimulantes [53].

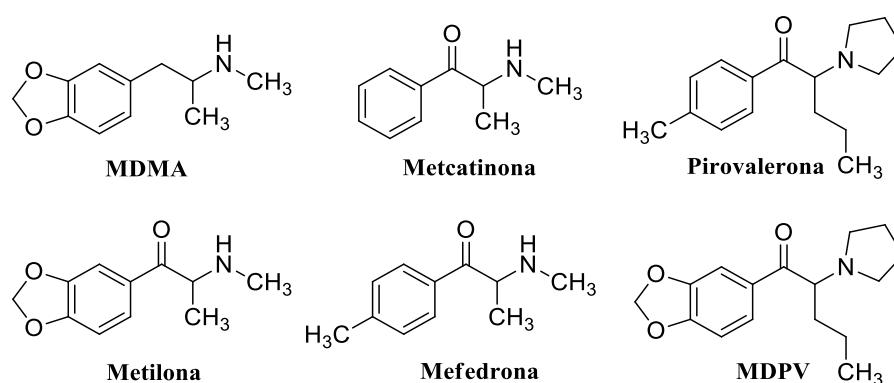


Figura 1.3 - Estrutura da metilona, mefedrona e MDPV, assim como dos respetivos análogos MDMA, metcatinona e pirovalerona.

As catinonas sintéticas são o segundo maior grupo de NSP monitorizadas pelo EMCDDA, com 130 reportadas no total até ao final de 2017, incluindo 12 que foram detetadas pela primeira vez neste ano. Em 2016, as cinco catinonas mais apreendidas na Europa foram a α -PVP, a 3-CMC, a 4-CMC, a *N,N*-4-metildimetcatinona e a 3-MMC. As apreensões destas substâncias representaram um total de quase 1,9 toneladas em 2016, tornando as catinonas sintéticas também o grupo de NSP mais apreendido em termos de quantidade nesse ano [12]. A prevalência deste tipo de drogas de abuso, as catinonas sintéticas, deu origem a desafios legais mas também analíticos, com vista à sua identificação, sendo necessário o desenvolvimento de métodos robustos validados [51].

Em Portugal, os primeiros casos de alarme público relacionados com NSP surgiram com a abertura das primeiras “*Smartshops*” em 2007, no entanto, pouco se sabia, não estando a maioria dos casos relacionados com uma substância em específico. Só no final de 2011, com o primeiro grande episódio de intoxicação decorrente deste tipo de substâncias na ilha da Madeira, e com os primeiros casos de urgência relacionados com o uso deste tipo de produtos no final de 2012 no distrito de Lisboa, o problema gerou maior preocupação social [19], [54]. No início de 2012, foi inserida na legislação portuguesa a primeira catinona sintética que era uma NSP, na legislação aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro [20]), a mefedrona. Só no ano seguinte saiu o Decreto-Lei n.º 54/2013, com vista à proibição da produção, exportação, propaganda, distribuição, venda ou dispensação das NSP indicadas na lista publicada no âmbito da Portaria n.º 154/2013, ambos de 17 de Abril, da qual faziam parte 33 catinonas sintéticas [33], [34], [55]. A última alteração ao Decreto-Lei n.º 15/93 veio inserir, além de outras substâncias, o MDPV e a metilona, deixando na prática, e à semelhança da mefedrona, de ser consideradas NSP [20].

1.2.1 ASPETOS TOXICOLÓGICOS

As catinonas sintéticas representam uma classe de compostos farmacologicamente ativos, quimicamente relacionados com a catinona, que induzem inúmeros efeitos, decorrentes de diferentes mecanismos de ação [10]. Tal como outros psicoestimulantes, as catinonas sintéticas exercem a sua atividade ao nível dos transportadores de monoamina - proteínas de membrana - presentes na membrana plasmática, que controlam a concentração dos neurotransmissores (NT) monoamínicos, a dopamina (DAT), norepinefrina (NET) e serotonina (SERT), na fenda sináptica. No entanto, os mecanismos de ação nesta classe de substâncias não são homogêneos, podendo variar consoante a composição e estrutura química do composto, e dependendo da sua função (libertação ou inibição de absorção) e seletividade para determinado tipo de transportador (DAT, NET ou SERT). Os agentes de libertação aumentam a concentração de NT na fenda sináptica, enquanto os inibidores de absorção impedem a sua recaptção nos neurónios pré-sinápticos, aumentando igualmente a sua concentração na fenda. Como tal, cada caso de intoxicação decorrente de uma catinona sintética, deve ser avaliado separadamente [9]–[11], [56].

Sabe-se que a alteração na estrutura molecular das catinonas sintéticas origina diferentes mecanismos de ação, nomeadamente pela alteração da afinidade para os diferentes transportadores monoamínicos. Enquanto a mefedrona, que pertence à classe das catinonas β -cetoanfetaminas metiladas na posição 4, atua nos transportadores DAT e SERT, o MDPV é altamente seletivo para os transportadores DAT (impedindo a recaptção de dopamina) e NET, devido ao anel pirrolidina, que faz esta catinona sintética pertencer à classe dos derivados α -pirrolidínicos. A metilona faz parte da classe dos β -ceto análogos das metilendioxianfetaminas e, tal como a mefedrona, atua maioritariamente pela libertação de NT atuando nos transportadores DAT e SERT maioritariamente. O facto de as catinonas sintéticas possuírem um grupo cetona no carbono α da cadeia lateral faz aumentar a sua polaridade quando comparadas com as anfetaminas [9], [13], [16], [57].

De uma maneira geral, as catinonas sintéticas são rapidamente absorvidas quando ingeridas oralmente, sendo que algumas das manifestações físicas que lhes estão associadas incluem a taquicardia, convulsões e agitação. As manifestações psicológicas estão relacionadas com a ansiedade, agitação e paranoia (conforme seção 1.1.2) [13]. O efeito das catinonas sintéticas no incremento da transmissão de dopamina origina um elevado potencial de dependência o que, por sua vez, poderá resultar em efeitos adversos graves [10]. Na **Tabela 1.2** encontram-se compilados os mecanismos de ação associados às três das catinonas sintéticas mais recentemente adicionadas à legislação portuguesa de combate à droga, bem como os sintomas mais frequentes resultantes do seu consumo.

Tabela 1.2 – Compilação do mecanismo de ação e sintomas mais frequentes das três catinonas em estudo - adaptado de [9], [10], [13], [49], [57], [58].

	<i>Mefedrona</i>	<i>Metilona</i>	<i>MDPV</i>
<i>Mecanismo de Ação</i>	Atua nos transportadores DAT, NET e SERT, induzindo a libertação (maioritariamente) e impedindo a recaptação de NT	Atua nos transportadores DAT, NET e SERT, induzindo a libertação (maioritariamente) e impedindo a recaptação de NT	Atua maioritariamente nos transportadores DAT e NET, impedindo a recaptação de NT
<i>Sintomas mais frequentes</i>	Euforia Sensação de bem-estar Estado de alerta ↑ Autoestima ↓ Sensação de cansaço ↑ Concentração Empatia Desinibição e estimulação sexual ↓ Apetite Taquicardia e Suores Dores de cabeça Náuseas Alucinações e Paranoia	Euforia Sensação de bem-estar Estado de alerta Empatia Medo reduzido Taquicardia e Suores Náuseas Anorexia Confusão Tremores involuntários Ansiedade Alucinações Ideais suicidas	Euforia Estimulação sensorial e física Estado de alerta Agitação Hipertermia Taquicardia Paranoia Delírio Ataques de pânico Alucinações Rabdomiólise Dores de ossos ↓ Apetite

^a Denotar que: DAT, NET e SERT – Transportadores de Dopamina, Norepinefrina e Serotonina; NT – Neurotransmissor.

1.3 A ERA DOS PRÉ-PRÉ-PRECURSORES

De acordo com a Decisão-Quadro 2004/757/JAI [7], que estabelece uma abordagem comum de resposta ao tráfico ilícito de droga, um precursor é qualquer substância, inventariada na legislação comunitária, que dê origem às obrigações decorrentes do artigo 12.º da Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas, de 1988 [24]. Neste artigo, estão referidas as substâncias frequentemente utilizadas no fabrico ilícito de substâncias narcóticas ou psicotrópicas. Estas mesmas substâncias foram, desde logo, em Portugal, aditadas às tabelas existentes no Decreto-Lei n.º 15-93, de 22 de Janeiro, nos termos desta Convenção de 1988, dando origem às Tabelas V e VI desse diploma [20].

Os precursores são substâncias químicas essenciais à produção, legítima ou ilegítima, de produtos como medicamentos, perfumes ou cosméticos, ou de drogas como anfetaminas, heroína ou cocaína, respetivamente [59]. Neste sentido, a monitorização é feita através de regulamentos que incidem sobre a inventariação de algumas destas substâncias, nomeadamente pela adição às listas de substâncias controladas. A sua disponibilidade tem um grande impacto no mercado de drogas sintéticas e nos métodos de produção utilizados nos laboratórios ilícitos. De facto, os produtores de substâncias de abuso continuam a tentar contornar os mecanismos de controlo nomeadamente mantendo a constante evolução das técnicas de produção, o que inclui a introdução de novos químicos não inventariados. Este desenvolvimento ilustra a natureza das redes modernas de produção de droga, bem como a necessidade de legislar as respostas de controlo destas substâncias numa perspetiva global [12]. A utilização de novos precursores na síntese de substâncias de abuso pode inclusivamente levar à formação, acidental ou não, de NSP [60].

Na UE, a interceção de substâncias controladas e não controladas como precursores para a produção de drogas ilícitas está especialmente relacionada com o fabrico de anfetaminas e metanfetaminas. O principal precursor das anfetaminas é o BMK, que por sua vez tem vários precursores como o APAAN, APAA ou o butirato de metil-3-oxo-2-fenilo (**Figura 1.4**), então designados de pré-pré-precursor das anfetaminas. As metanfetaminas podem igualmente ser produzidas a partir das substâncias enumeradas, no entanto, é a efedrina e pseudoefedrina que mais são utilizadas como seus precursores [60]–[63].

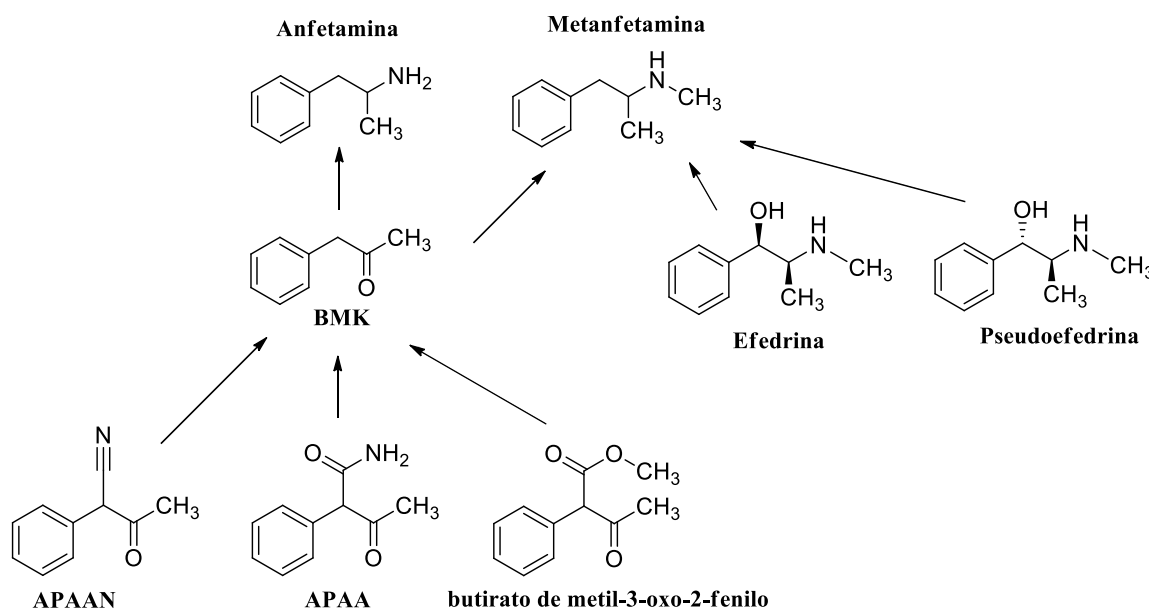


Figura 1.4 - (Pré)-(Pré)-Precusores que permitem a síntese das anfetaminas e metanfetaminas.

No entanto, também o caso da heroína, o maior opióide vendido no mercado ilícito das drogas na Europa, está em evolução, nomeadamente pelo desmantelamento de laboratórios que transformam esta substância a partir da morfina, pela utilização de anidrido acético, um precursor essencial à produção de heroína. As estratégias atuais passam pela realização das últimas fases da produção de heroína na Europa, onde precursores como o anidrido acético são mais baratos, quando comparados com os preços nos países produtores do ópio, como o caso do Afeganistão [12], [60].

Tal como na problemática das NSP, o mercado dos precursores tem vindo a desenvolver-se, surgindo novas moléculas com o intuito de contornar a legislação existente. A produção de novas substâncias está a tornar-se cada vez mais sofisticada e diversificada, nomeadamente pela utilização de novos precursores, pré-precusores e até pré-pré-precusores, o que de facto tende a aumentar significativamente os riscos para a saúde. A estratégia é a utilização de pré-precusores não controlados, em detrimento dos precursores que já são controlados. Esta situação é semelhante ao jogo do “gato e rato” que vem sendo observada no campo das NSP [60].

1.4 ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS DE ABUSO

O processo de identificação de substâncias de abuso em amostras apreendidas segue, geralmente, uma sequência de técnicas projetadas para a obtenção de resultados fidedignos, de uma forma eficaz e, se possível, reduzindo ao máximo os custos e tempo que lhes são inerentes [3], [64].

A análise inicia-se pela aplicação de testes de *screening* (presuntivos), que têm como objetivo fornecer dados preliminares sobre a presença ou ausência de uma determinada classe de compostos. Os testes colorimétricos são testes de *screening* utilizados em amostras sob a forma de pó, comprimidos ou matrizes herbais (prensadas ou não), e de uma forma geral são feitos pela adição de uma ou duas gotas de reagente, o que irá produzir uma cor diferente consoante o grupo funcional presente na amostra. Apesar de não serem testes específicos, na medida em que variam facilmente com a concentração da amostra, presença de diluentes e/ou adulterantes, ou até consoante o analista, a sua aplicação é fundamental e determinante na seleção dos métodos subsequentes que melhor se adequam à identificação do composto desconhecido [2], [64]. Quando se tratam de amostras biológicas, como é o caso da urina, são habitualmente feitos imunoensaios, que são utilizados habitualmente para triagem com o objetivo de diferenciar amostras negativas de amostras presumivelmente positivas [65].

Estes testes simples são então seguidos de uma análise instrumental confirmatória, que requer a aplicação de técnicas de elevado poder discriminatório, com vista à identificação, numa primeira fase, e em seguida, se necessário, com vista à quantificação de determinado analito numa amostra [64]. As técnicas cromatográficas, nomeadamente a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) para análises qualitativas e a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) para análises quantitativas, são dotadas de elevada sensibilidade, sendo que a técnica de GC-MS apresenta elevada especificidade e é utilizada para caracterização de substâncias de abuso [66].

Uma vez que a maioria das amostras que chegam aos laboratórios de análise de substâncias de abuso se encontram na forma de misturas complexas, é necessário, numa primeira fase, separá-la em componentes individuais, para melhor identificar o composto maioritário. Nesse sentido, a aplicação de uma cromatografia torna-se ideal, sendo este um método físico de separação. A mais simples técnica deste tipo é a cromatografia de camada fina (TLC), que é uma técnica analítica sensível, rápida, de baixo custo e muito simples, mas que apenas é identificativa por comparação com o resultado de um padrão aplicado. Ainda assim, não é conclusiva, sendo necessária a aplicação de uma técnica analítica instrumental, com superior sensibilidade e resolução [2], [3].

A cromatografia gasosa (GC) é a técnica mais popular para a análise de misturas de compostos voláteis, sendo inquestionavelmente a técnica de eleição tanto para análises preliminares como para análises de confirmação. Esta tem por base a separação de uma mistura líquida ionizável em componentes individuais, ao passar um fluxo de gás inerte (fase móvel) ao longo de uma coluna de separação, e de acordo com a afinidade para a fase estacionária, originando tempos de retenção (R_t) diferentes [2], [3]. As grandes vantagens da GC são elevada sensibilidade e especificidade, bem como a robustez. No entanto, está limitada a substâncias voláteis e termicamente estáveis, e é muitas vezes necessária uma preparação da amostra específica, tal como a derivatização, de acordo com a matriz em análise [3], [65].

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica que permite a separação de uma mistura líquida em componentes individuais, à sua passagem através de uma coluna de aço com diferentes camadas de partículas sólidas (fase estacionária) [2]. Esta técnica é ideal para análise de substâncias de considerável tamanho e de menor volatilidade, sendo rápida e não requerendo técnicas de preparação trabalhosas, no entanto, é preciso ter em atenção os efeitos da matriz, que poderão influenciar os resultados. Os métodos de LC (HPLC e UPLC) são muito mais versáteis que os de GC, sendo cada vez mais utilizados, na medida em que fornecem mais parâmetros para otimização [3], [67]. Uma recente inovação é a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC), que se baseia na partição de um soluto entre a fase móvel e uma camada de água na superfície de uma fase estacionária polar, e que é atualmente considerada uma alternativa à LC de fase reversa para análise de substâncias polares e/ou ionizadas [3].

No entanto, as técnicas cromatográficas por si só não representam técnicas muito específicas, na medida em que não fornecem necessariamente uma prova definitiva quanto à identificação de determinado analito. O R_t pode ser utilizado para identificação de substâncias mas, ainda assim, é necessária a existência de uma análise de referência que permita a comparação e, deste modo, a identificação da substância em análise. É nesse sentido que é necessário o acoplamento a uma técnica mais descritiva, como é o caso da espetrometria de massa (MS) para confirmação da identificação. Esta técnica permite a medição quantitativa da abundância relativa de fragmentos iónicos positivos, criados a partir da destruição da amostra, sendo os dados registados num detetor sob a forma de espectro (gráfico da razão m/z em função da abundância). É criado um padrão único de fragmentação para cada molécula, que pode ser usado para a sua identificação. A tecnologia padrão para análise de substâncias de abuso é a MS por impacto eletrónico (EI-MS). Assim, a técnica de GC-EI/MS é a mais utilizada no âmbito de análises forenses com vista à identificação de substâncias de abuso, sendo bastante sensível a uma ampla gama de compostos e fornecendo resultados consistentes e definitivos. De facto, esta combinação é vantajosa para ambas as técnicas, uma vez que a MS requer componentes puros. No entanto, é de

salientar que a técnica de GC-MS não permite a distinção entre a maioria dos isómeros, a não ser que se encontrem disponíveis os padrões de referência que podem ser utilizados nos casos em que é possível a separação cromatográfica [2], [3], [44], [67].

Neste sentido, o grande desafio analítico na aplicação deste tipo de técnicas é na análise de NSP, uma vez que a maioria dos padrões de referência não estão disponíveis. A grande alternativa é assim a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), que dá origem a espectros muito distintos inclusivamente quando se tratam de isómeros, permitindo determinar a estrutura química de determinada molécula [67], [68]. Também a espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) constitui um método alternativo à técnica de GC-MS, fornecendo mais informação sobre a estrutura molecular, facilitando a identificação e permitindo, por vezes, a distinção de certos regioisómeros [44].

De facto, é recomendada a utilização de diferentes técnicas analíticas complementares, com vista à confirmação real da identidade de determinada substância [68].

Outra das técnicas que pode ser acoplada à GC, podendo ser aplicada como técnica complementar secundária com vista à identificação de substâncias de abuso, é a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) [68]. A espectroscopia de IR depende da capacidade que cada composto tem em absorver radiação infravermelha, sendo característica e podendo ser utilizada para identificação [2]. Um estudo atual demonstrou que a técnica de GC-MS e GC-FTIR funcionam bem quando aplicadas de forma complementar, sendo que os resultados demonstraram que a identificação delas decorrentes apresentava um elevado grau de confiança [68].

No que respeita a análises quantitativas, a maioria dos laboratórios que rotineiramente analisam substâncias de abuso utilizam procedimentos analíticos também baseados na cromatografia [66]. Neste tipo de análises, cromatográficas, um dos detetores mais usados é o detetor de ionização de chama (FID), sendo um detetor não seletivo em que os iões induzem uma corrente elétrica que é medida e registada sob a forma de pico num cromatograma. No entanto, esta é uma técnica destrutiva, tal como a GC-MS, pelo que mais uma vez é uma desvantagem nomeadamente em comparação com a técnica de RMN [2], [69].

A técnica de LC pode igualmente ser aplicada quando o intuito é a quantificação destas substâncias. A LC com deteção de nitrogénio por quimiluminescência (LC-CLND) vem emergindo, na medida em que mais de 90% das substâncias de abuso contêm na sua composição o átomo de nitrogénio. Esta é uma técnica para quantificação rápida e simples, nomeadamente para aplicação às NSP [70].

Deste modo, importa referir que, apesar de o uso de técnicas hifenadas para análise de substâncias de abuso permitir a identificação de uma larga gama de compostos, o aparecimento de NSP poderá ser uma ameaça à sua utilização de forma singular. A garantia de critérios que permitem a identificação indubitável das substâncias de abuso é cada vez mais importante, nomeadamente quando o tema em apreço é a toxicologia forense [68].

1.4.1 QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS POR GC-FID

Conforme referido, as técnicas habitualmente utilizadas para quantificação de substâncias de abuso no geral, são as técnicas de separação cromatográficas [66]. Neste sentido, vários métodos vêm sendo relatados com o objetivo de detetar e quantificar catinonas, na sua maioria quando presentes em matrizes biológicas [71].

Vários métodos foram descritos na literatura com vista à quantificação de catinonas sintéticas em matrizes biológicas, como é o caso da urina, sangue, fluidos orais ou cabelo. Em 1992, pouco tempo depois da entrada da catinona para as tabelas de controlo internacional, um estudo desenvolvido por Mathys *et al.* permitiu a validação de um método de quantificação de catinonas detetadas em amostras de urina, pela utilização da técnica de HPLC com detetor UV de matriz de díodo (DAD) [72]. Desde aí, diferentes métodos foram igualmente validados, pela utilização de HPLC-MS/MS em amostras de

sangue [73] e plasma [74], revelando métodos seletivos e precisos para diferentes catinonas. A mesma técnica foi aplicada em amostras de cabelo, nomeadamente para a quantificação das catinonas sintéticas mefedrona [75], 4-MEC e MDPVP [76]. Dois recentes estudos permitiram a validação de métodos de quantificação de catinonas em sangue [77] e urina [78], pela aplicação da técnica de UPLC-MS/MS. De facto, o método de quantificação descrito por Wiergowski *et al.* é um dos primeiros métodos validados para a quantificação da catinona sintética 4-CMC em amostras de sangue [77]. Os fluidos orais são outro tipo de matriz biológica na qual é possível identificar e quantificar substâncias de abuso, sendo cada vez mais popular principalmente pelo facto de a recolha ser fácil e não-invasiva, e por ser uma matriz muito difícil de adulterar, sendo que a concentração das substâncias ali detetadas pode ser correlacionada com a concentração no sangue [71], [79]. Diferentes metodologias foram utilizadas para a quantificação de catinonas sintéticas neste tipo de matriz, nomeadamente pela aplicação da técnica de UPLC-MS/MS [79] e de GC-MS [71]. De facto, no que respeita à técnica de GC-MS, sabe-se que é considerada a mais utilizada pelos laboratórios forenses para análise qualitativa de NSP, principalmente devido às suas características de elevada seletividade e sensibilidade [67], [68]. No entanto, por vezes, esta técnica é igualmente utilizada para análises quantitativas [67]. Para além de Mohamed *et al.* que desenvolveu um estudo com vista à validação de um método de quantificação de diferentes catinonas em amostras de fluidos orais [71], como referido, três outros métodos de quantificação das catinonas sintéticas α -PBP [80], MDPV [81], pentilona e mefedrona [82], em amostras de urina, foram validados pela aplicação da mesma técnica analítica.

Neste tipo de amostras, métodos de purificação são necessários antes da aplicação das técnicas de separação. De facto, a seleção dos métodos de preparação a aplicar depende da matriz biológica em análise, das propriedades do analito e dos eventuais problemas analíticos que poderão ser colocados no decorrer da análise [77]. Do ponto de vista analítico, uma preparação adequada da amostra para posterior análise instrumental, é crucial e decisiva [44]. Os métodos mais frequentemente utilizados para a preparação deste tipo de substâncias dos metabolitos e impurezas habitualmente presentes nas matrizes biológicas, são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) [44]. Quando a matriz é cabelo humano, existem ainda outras metodologias de preparação que devem ser tidas em conta previamente, como a descontaminação e digestão da amostra, aplicadas antes da extração [75], [76].

No entanto, sabe-se que a maioria das catinonas sintéticas são vendidas na forma de pó, pelo que, quando a análise diz respeito ao material apreendido diretamente e antes do consumo, a fase de preparação da amostra não é, na maioria das vezes, problemática para a análise cromatográfica [67]. De facto, a maioria das substâncias presentes nas amostras contendo catinonas sintéticas são solúveis nos solventes orgânicos mais comuns, como é o caso do clorofórmio, metanol ou *n*-hexano [67].

Existem descritos na literatura estudos com vista à quantificação de catinonas sintéticas pela utilização da técnica analítica de LC, os estudos desenvolvidos por Santali *et al.* [51] e Khreit *et al.* [83], que pretendiam quantificar a mefedrona, e a 4-MEC, e 4-MBC, respetivamente, pelo método de HPLC/UV, e por Rasanen *et al.* [70], que pretendia quantificar diferentes catinonas sintéticas, tais como α -PVP, 3,4-DMMC, MDPV, metilona e mefedrona, pela aplicação da técnica de LC com deteção de nitrogénio por quimiluminescência (LC-CLND).

Leffler *et al.* descreveu e validou um método de quantificação de catinonas sintéticas em material apreendido, pela aplicação da técnica de GC-FID, após identificação por GC-MS e HPLC-MS/MS. O objetivo inicial deste estudo era a quantificação pela utilização da técnica de GC-MS, no entanto, não se verificou a linearidade dos resultados, muito provavelmente porquanto a degradação dos compostos na fonte de iões utilizada [69]. De facto, o GC-FID é a metodologia utilizada pelo LPC-PJ, pelo que foi a selecionada para aplicação neste trabalho de validação de uma metodologia para quantificação de três catinonas sintéticas.

No LPC-PJ, a metodologia utilizada para quantificação de substâncias com estrutura molecular semelhante à das catinonas sintéticas, anfetaminas e metanfetaminas, passa pela aplicação de testes

colorimétricos, posterior identificação por GC-MS e, por fim, quantificação pela aplicação da técnica de GC-FID. De facto, e conforme descrito, a análise qualitativa apenas pela utilização da técnica de GC-FID não deve ser praticada, existindo grandes limitações à identificação de substâncias apenas tendo por base o respetivo R_t , nomeadamente porquanto a ocorrência de co-eluições [68]. Apesar de a técnica de GC-MS também poder, eventualmente, ser utilizada para quantificação deste tipo de substâncias, conforme descrito na literatura, no LPC-PJ isso não seria o ideal, na medida em que os equipamentos de GC-MS são utilizados para a identificação de todo o tipo de substâncias que chega ao laboratório para análise. Se também a quantificação de todas as substâncias fosse feita pela aplicação desta técnica, a resposta não sairia no tempo útil desejável.

Assim, sendo a técnica de GC-FID atualmente aplicada para quantificação de substâncias, faz sentido a manutenção desta técnica aquando da implementação da quantificação de catinonas sintéticas, não alterando a rotina do laboratório, trazendo mais-valias e devendo ser igualmente eficaz. A quantificação por GC-FID passa então pela elaboração de curvas de calibração para cada composto a quantificar, permitindo estimar a concentração de analito numa determinada amostra.

1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Milhões de testes, análises e exames são feitos todos os dias em milhares de laboratórios espalhados pelo mundo. De facto, praticamente todos os aspetos da sociedade são suportados, de determinada maneira, por trabalhos analíticos. Neste sentido, é nítido que a correta realização destas análises é extremamente importante, assim como a capacidade das mesmas para demonstrar a veracidade dos resultados delas consequentes. Se o trabalho de um analista não for confiável, ele terá pouco valor e os resultados da análise por si realizada poderão não ser utilizados [84]. No âmbito da temática da toxicologia forense, falsos resultados analíticos podem levar à condenação de um inocente ou à libertação de um culpado. Assim, de modo a assegurar que todos os resultados analíticos dão origem a conclusões credíveis, bem como perceber se os métodos analíticos aplicados são os mais adequados, todos os procedimentos realizados num laboratório devem ser continuamente monitorizados e previamente validados [3], [84].

São muitas as definições existentes para o termo validação, no entanto, é possível afirmar que, de uma forma geral, a validação de um método é o processo de definição de um procedimento analítico, e demonstração de que o mesmo possui recursos consistentes e adequados para atingir os objetivos pretendidos. A validação faz uso de um conjunto de testes que avaliam as suposições nas quais o método analítico é baseado para documentar as características de desempenho do mesmo [84]–[86].

Os requisitos mínimos para o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica variam consoante o tipo de método, assim como consoante o objetivo de aplicação do mesmo [87], [88]. Apesar de não existir um consenso sobre o modo como um processo de validação deve ser conduzido, e quais os parâmetros que devem ser integrados nesse processo, de uma maneira geral, pelo menos os seguintes parâmetros devem ser estudados: seletividade, gama de trabalho e limites analíticos, modelo de calibração (que inclui a verificação da linearidade), exatidão, precisão, estimativa de incerteza e robustez [84], [89]. No entanto, há que ter em conta que requisitos que são importantes numa análise quantitativa podem não ser relevantes para aplicação a análise qualitativas, não fazendo por exemplo sentido uma avaliação da linearidade neste último tipo de análises. Da mesma forma que se um método for para aplicação à rotina de um laboratório específico, não fará sentido uma avaliação da reprodutibilidade do método pela alteração dos equipamentos de análise, por exemplo [87], [88].

As características quantitativas de interesse para avaliação do desempenho de um método referem-se à previsão do resultado provável a ser obtido. Assim, o desempenho do método deve ser validado, o que inclui a seleção de um modelo de calibração que descreva uma resposta instrumental adequada à

quantificação de um analito, e a incerteza, quanto ao resultado, estimada, num determinado nível de confiança [84], [90], [91].

Em geral a palavra incerteza está associada ao conceito de dúvida, no entanto, esta é uma premissa que deve ser esclarecida. O termo incerteza (de medição) é definido como um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam razoavelmente ser atribuídos à mensuranda – grandeza que se pretende medir. Deste modo, não implica dúvida sobre a validade de uma medição mas, pelo contrário, implica uma maior confiança na validade de um resultado de medição [86], [92]. É ainda importante esclarecer a diferença entre o conceito de erro e de incerteza. O erro pode ser definido como a diferença entre um resultado individual e o valor real da mensuranda (valor de referência), enquanto, como já referido, a incerteza toma a forma de um intervalo de valores [84], [86]. Os erros podem ser aleatórios, que resultam tipicamente de variações imprevisíveis de quantidades que influenciam os resultados, ou sistemáticos, que são definidos como componentes do erro que, no decurso de um número de análises do mesmo mensurando, permanece constante ou varia de uma forma previsível. O resultado de uma medição deveria ser corrigido para todos os seus erros sistemáticos significativos [92].

Para estimar a incerteza global associada a um método analítico, pode ser necessário tomar cada fonte de incerteza como uma componente individual, nomeadamente pela definição de valores alvo das características de desempenho da medição, como o caso dos limites analíticos, a precisão ou a recuperação. Estes valores podem ser convertidos numa “incerteza alvo”, caso essas características reflitam os efeitos aleatórios e sistemáticos mais relevantes que afetam as medições. Essa “incerteza alvo” tem assim a vantagem de resumir todas as fontes de incerteza, incluindo algumas que muitas vezes não são identificadas nas características de desempenho convencionais [93]. De acordo com a última edição do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), o termo “incerteza alvo” pode definir-se como uma incerteza de medição, especificada como um limite superior, e decidida com base na utilização prevista dos resultados da medição [86]. Uma incerteza de medição é adequada para o uso pretendido se for comprovada como não sendo maior que o valor alvo definido [86], [92].

Uma das estratégias que podem ser utilizadas para avaliar a incerteza de medição, e que diferencia todos os procedimentos de medição envolvidos na metodologia em componentes individuais de incerteza, conforme referido, é a abordagem sub-analítica, também conhecida como abordagem “*bottom-up*”. Neste tipo de estratégia, cada procedimento é responsável por efeitos aleatórios ou sistemáticos, sendo posteriormente quantificados com o objetivo final de determinar o efeito combinado dos vários componentes, numa aplicação da lei da propagação da incerteza [92], [94], [95]. Ainda que esta abordagem seja facilmente compreensível, a sua aplicação não é simples para medições complexas, pelo que existem alternativas, como é o caso da abordagem supra-analítica, também conhecida como abordagem “*top-down*” (ou interlaboratorial), mas que está mais direcionada para estimativa dos diferentes componentes de incerteza de vários laboratórios [94], [95]. No caso da incerteza de medição ser superior à “incerteza alvo”, é necessária uma otimização no sentido de reduzir a incerteza de medição, tornando-a adequada para o uso pretendido. A abordagem “*bottom-up*” produz modelos mais adequados para esta otimização, podendo ser estabelecida uma ligação direta com os efeitos analíticos que poderão reduzir a incerteza global do método [93].

Para facilitar a aplicação deste tipo de abordagem, J. Kragten desenvolveu, em 1994, um método simples e rápido para auxiliar os analistas, nomeadamente pela implementação de uma folha de cálculo que auxilia na elaboração de todos os cálculos necessários à estimativa da incerteza global de uma metodologia em desenvolvimento [96].

Para que a abordagem “*bottom-up*” possa ser utilizada para avaliação da incerteza de um método, é necessário que, numa primeira fase, seja feita a validação do procedimento de calibração instrumental. Neste sentido, é necessário que seja verificada a linearidade dos resultados, assim como uma avaliação da homogeneidade de variâncias da resposta instrumental – homoscedasticidade, o que vai condicionar

a seleção do modelo de regressão. Por sua vez o modelo de regressão deve ser avaliado quanto à qualidade do seu ajuste aos dados experimentais [87], [90], [91].

Finalmente, depois de desenvolvida a metodologia em validação, ela deve ser testada em amostras problema, verificando o desempenho do método e a respetiva compatibilidade metrológica. De acordo com os resultados obtidos, trabalhos de otimização devem ser desenvolvidos, nomeadamente pela redução da incerteza de medição associada aos componentes que revelaram afetar de forma mais vincada a metodologia [92], [97].

1.6 ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

Este trabalho, realizado no âmbito do Protocolo existente entre a FCUL e o LPC-PJ para o estudo de NSP, tem como principal objetivo a validação de um método de quantificação de três catinonas sintéticas por GC-FID. Parte do trabalho pretende ainda auxiliar o LPC-PJ na identificação de substâncias presentes em material apreendido em Portugal e na obtenção de padrões (por síntese ou através da purificação de produtos resultantes de apreensões nacionais), com vista à sua inserção na biblioteca de espetros, facilitando as análises de rotina desse laboratório.

Contrariamente ao que acontece para as drogas clássicas, são escassos os estudos sobre a identificação e quantificação de NSP, em diferentes matrizes. O rápido surgimento de novas substâncias, bem como a sua propagação no mercado ilícito, dificulta o trabalho das entidades competentes, não permitindo, muitas vezes, uma resposta tão rápida quanto desejável. Assim, no âmbito de uma ação pró-ativa, surge a importância da validação de um método de quantificação para substâncias psicoativas, que não são atualmente consideradas como “de consumo mais frequente” em Portugal, mas, tendo em conta a sua crescente difusão, não só a nível europeu mas também mundial, passarão, muito provavelmente, no futuro, também a ser consideradas “de consumo mais frequente”.

Para validação de um método de quantificação foram selecionadas três catinonas sintéticas, pertencentes a três classes distintas de derivados: mefedrona (**1**), da classe das β -cetoanfetaminas metiladas na posição 4, metilona (**2**), β -ceto análogos das metilenodioxianfetaminas, e MDPV (**3**), derivados α -pirrolidínicos. A seleção foi feita com base nas suas características estruturais e químicas, bem como no histórico que lhes é inerente.

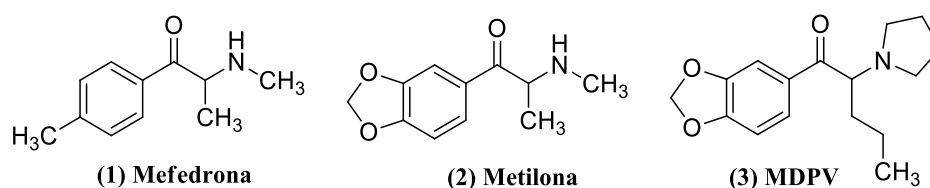


Figura 1.5 - Estrutura das três catinonas sintéticas estudadas, no âmbito da validação de um método de quantificação.

A mefedrona é a catinona sintética mais popular entre os consumidores, sendo uma das mais reportadas ao EMCDDA desde o início da emergência das NSP no mercado das drogas ilícitas. Foi detetada pela primeira vez no final de 2007, e acabou por ser a primeira da classe das catinonas sintéticas a deter um relatório de risco. Já a metilona terá sido uma das primeiras catinonas sintéticas reportadas ao EMCDDA, após inicial identificação em 2004 na Holanda, apesar de ter sido sintetizada em 1996 com vista ao tratamento de depressão e doenças como o Parkinson. Por último, o MDPV é também uma das substâncias mais difundidas a nível mundial, tendo sido identificado pela primeira vez na Alemanha em 2007. Tal como a metilona, esta catinona sintética foi sintetizada pela primeira vez em 1969, muito antes do início da sua utilização como substância de abuso, fazendo na altura parte da classe dos estimulantes. Acresce que, estas três catinonas sintéticas foram das mais recentes NSP adicionadas à legislação portuguesa de combate à droga, deixando, na prática, de ser consideradas NSP.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES ANALÍTICAS

Análises de GC-MS realizadas no LPC-PJ – A maioria das análises foram realizadas num cromatógrafo gasoso (Agilent® GC System 7890B), acoplado a um espectrómetro de massa (Agilent® MSD 5977B), coluna HP-5MS modelo 19091S-433 (30 m x 250 µm x 0,25 µm) e injetor automático (Agilent® Autosampler 7693). Outras das análises por GC-MS foram realizadas pela utilização de um cromatógrafo gasoso (Agilent® GC System 6890), acoplado a um espectrómetro de massa (Agilent® MSD 5973 Network), coluna HP-5 [5% Phenyl Methyl Siloxane] modelo 19091J-433 (30 m x 250 µm x 0,25 µm) e injetor automático (Agilent® Autosampler 7683). O *software* de processamento e tratamento de dados foi o *ChemStation*. O modo de ionização utilizado foi o de ionização por impacto eletrónico (EI), sendo que a energia fixada foi de 70 eV. A gama de *scan* utilizada foi de 50 a 550 m/z.

Programas de análise:

‘**anfet**’ - Inicia-se com uma temperatura de 80 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, numa taxa de 12 °C/min, finalizando com 23,833 minutos a 270 °C. Amostras injetadas no modo *split* a uma taxa de 100:1, sendo que o volume de injeção foi de 1 µL.

‘**anfet_L**’ - Inicia-se com uma temperatura de 80 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, numa taxa de 12 °C/min, e de seguida até aos 300 °C, numa taxa de 20 °C/min, finalizando com 43,33 minutos a 325 °C. Amostras injetadas no modo *split* a uma taxa de 50:1, sendo que o volume de injeção foi de 1 µL.

‘**bup**’ - Inicia-se com uma temperatura de 150 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, numa taxa de 20 °C/min, finalizando com 47 minutos a 270 °C. Amostras injetadas no modo *split* a uma taxa de 17.1:1, sendo que o volume de injeção foi de 1 µL.

‘**MS_M**’ - Inicia-se com uma temperatura de 150 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, numa taxa de 12 °C/min, finalizando com 19 minutos a 270 °C. Amostras injetadas no modo *split* a uma taxa de 40:1, sendo que o volume de injeção foi de 1 µL.

‘**MS_L**’ - Inicia-se com uma temperatura de 150 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, numa taxa de 12 °C/min, finalizando com 30 minutos a 325 °C. Amostras injetadas no modo *split* a uma taxa de 32.7:1, sendo que o volume de injeção foi de 1 µL.

‘**MS_25min**’ - Inicia-se com uma temperatura de 150 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, numa taxa de 12 °C/min, finalizando com 25 minutos a 325 °C. Amostras injetadas no modo *split* a uma taxa de 32.7:1, sendo que o volume de injeção foi de 1 µL.

Análises de GC-FID realizadas no LPC-PJ – As análises por GC-FID foram feitas pela utilização de um cromatógrafo gasoso (Agilent® GC System 7890B), com detetor por ionização de chama, coluna Agilent 19091J-413 HP-5 (30 m x 320 µm x 0,25 µm) e injetor automático (Agilent® Autosampler 7693). O *software* de processamento e tratamento de dados foi o *Open LAB CDS ChemStation*.

Programas de análise:

‘**ANFET1**’ - Inicia-se com uma temperatura de 80 °C (1 min), subindo gradualmente até aos 270 °C, numa taxa de 12 °C/min, finalizando com 23,833 minutos a 270 °C. Amostras injetadas no modo *split* a uma taxa de 40:1, sendo que o volume de injeção foi de 1 µL.

Análises de RMN realizadas na FCUL – As análises de RMN foram obtidas no espectrofotómetro Bruker Avance 400. Os espetros foram obtidos a uma frequência de 400,13 MHz (¹H RMN) e 100,61

MHz (^{13}C RMN), e foi utilizado o *software* Topspin (versão 3.5) para processamento de dados. Os desvios químicos (δ) foram expressos em ppm, sendo utilizados como referência os valores dos sinais dos solventes (DMSO- d_6 – $\delta\text{H}=2,50/\delta\text{C}=39,50$; CDCl_3 – $\delta\text{H}=7,26/\delta\text{C}=77,00$; MeOD – $\delta\text{H}=3,31/\delta\text{C}=49$), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. A identificação e caracterização dos compostos nas diferentes matrizes e dos compostos sintéticos foi feita através da análise dos espectros de RMN 1D (^1H e ^{13}C APT) e 2D (COSY, HSQC, HMBC e HSQC-TOCSY).

Análises de MS realizadas no IST – Análises por MS efetuadas pela utilização de um HPLC (Dionex Ultimate 3000), com bomba binária HPG3200, injetor automático (Autosampler WPS300) e forno de coluna TCC3000, acoplado a um espectrómetro de massa *ion trap* (LCQ Fleet) equipado com uma fonte de ionização ESI (*Thermo Scientific TM*). Amostra introduzida por FIA (*Flow Injection Analysis*), num método isocrático [50% água (0,1% ácido fórmico)/50% acetone], durante 10 minutos, a uma taxa de 10 arb e 275 °C (*spray voltage*: 4.50 kV e *capillary voltage*: 42 V).

Pesagens – A pesagem dos compostos para análise no LPC-PJ foi feita numa balança METTLER AE 100 (max 109 mg, $d=0,1\text{mg}$), e na FCUL numa METTLER TOLEDO XS205 Dual Range (max 81g/220g, $d=0,01\text{mg}/0,1\text{mg}$) ou numa OHAUS® PIONEER™ Modelo PA224 (max 220g, $d=0,1\text{mg}$).

Volumes – As medições de volume foram feitas com recurso a dois dispensadores do LPC-PJ, um Dispensette® [Número-Série: 11S 08208] marca BRAND de 2 mL (Exatidão 0,01%, CV 0,05%) e um Dispensette® S Organic [Número-Série: 16D 70349] marca BRAND de 5 mL (Exatidão 0,02%, CV 0,06%).

Análises de TLC – As TLC foram efetuadas com placas de sílica gel (60 F₂₅₄) em alumínio (Merck 05554), e visualizadas com recurso a luz ultravioleta de 254 nm. Algumas das placas foram posteriormente pulverizadas com a solução de Ehrlich previamente preparada.

2.2 SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes foram adquiridos comercialmente, tendo sido utilizados sem purificação prévia. As listas destes solventes e reagentes encontram-se em anexo (**Anexo 6.1** e **Anexo 6.2**).

Soluções preparadas previamente:

Reagente de Marquis – Foi preparado pela adição de 10 mL de formaldeído a 100 mL de H_2SO_4 concentrado.

Reagente de Scott – Foi preparado pela dissolução de 2 g de tiocianato de cobalto, em 100 mL de ácido acético glacial a 10%, com posterior adição de 100 mL de glicerina.

Reagente de Duquenois-Levine – Foi preparado pela dissolução de 20 g de vanilina, em 1000 mL de etanol, com posterior adição de 8 mL de acetaldeído.

Solução Reveladora de Reagente de Ehrlich (TLC) – Foi preparada pela dissolução de 500 mg de 4-(dimetilamino)benzaldeído, em 500 mL de etanol, com posterior adição de 5 mL de HCl concentrado.

2.3 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS POR GC-FID

Tal como referido anteriormente, é essencial que as metodologias analíticas aplicadas à área forense sejam de elevada qualidade e permitam a obtenção de conclusões credíveis e confiáveis. Neste sentido, todos os métodos devem ser validados e constantemente monitorizados [3].

A primeira etapa no âmbito do desenvolvimento de uma metodologia analítica consiste, evidentemente, na definição dos objetivos da sua aplicação. Uma vez identificados os principais objetivos, deve ser feita uma pesquisa bibliográfica de modo a identificar a eventual publicação de outros métodos para os mesmos fins ou semelhantes [3]. No entanto, é de salientar que, para o trabalho em apreço, deve igualmente ser tido em conta que o método em validação é para aplicação num laboratório de rotina, com metodologias de análise implementadas, pelo que apenas as alterações ao quotidiano do laboratório necessárias devem ser feitas.

Para a realização deste estudo e validação de um método de quantificação para utilização futura no LPC-PJ foram selecionadas três catinonas sintéticas, pertencentes a três classes distintas de derivados: a mefedrona (**1**), da classe das β -cetoanfetaminas metiladas na posição 4, a metilona (**2**), β -ceto análogo das metilenodioxianfetaminas, e MDPV (**3**), dos derivados α -pirrolidínicos (**Figura 1.5**). Conforme referido, estas três catinonas foram das mais recentes NSP adicionadas à legislação portuguesa de combate à droga, deixando, na prática, de ser consideradas NSP [20], e conseqüentemente é expeável que futuramente sejam consideradas “de consumo mais frequente”, passando a integrar a tabela do mapa anexo à Portaria n.º 94/96, de 26 de Março [32], pelo que tenham que ser quantificadas, de modo a apurar se o montante de material apreendido é inferior ao limite quantitativo para cada dose média individual diária.

Neste sentido, o método desenvolvido teve como base o procedimento para quantificação de anfetaminas e metanfetaminas já existente no LPC-PJ (ao abrigo da Portaria n.º 94/96, de 26 de Março [32]), uma vez que apresentam similaridades a nível estrutural com as catinonas sintéticas, sendo a única diferença a presença de um grupo cetona no carbono β (da cadeia lateral da amina), desta última classe de substâncias.

Assim, a metodologia desenvolvida consistiu na pesagem de aproximadamente 10 mg de amostra de material apreendido para um balão de precipitação de 5 mL, com recurso a uma balança analítica. A esse balão foram adicionados 4 mL de solvente (solução 1:1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) e 1 mL de PI (tetracosano em solução com CHCl_3 – 0,5 mg/mL), com recurso a dispensadores volumétricos. Em seguida, uma porção da solução foi injetada no equipamento de GC-FID, pela utilização do programa ‘ANFET1’. A partir desta análise obtiveram-se os valores de R_i dos diferentes analitos presentes na amostra, assim como a correspondente percentagem (%) de área do sinal de resposta, obtida pelo *software* de tratamento de dados do equipamento.

A validação de um método é o processo de demonstração da capacidade do mesmo para produzir resultados confiáveis e, depois de definidos os objetivos da sua aplicação, existem duas fases de extrema importância: a calibração do método e a estimativa da incerteza. Nesse sentido, esta seção foi dividida de acordo com estas etapas, sendo previamente necessária a obtenção de padrões, necessários à realização das fases seguintes, assim como a realização de um estudo da seletividade do método em desenvolvimento. Por último foi ainda verificada a compatibilidade metrológica e descrita a aplicação da metodologia, de modo a testá-la, nomeadamente pela sua aplicação a amostras reais.

De salientar que, para simplificar o futuro trabalho dos analistas do LPC-PJ, foram também desenvolvidas três folhas de cálculo (**Anexo 6.75**, **Anexo 6.76** e **Anexo 6.77**), uma para cada catinona sintética em estudo, onde serão preenchidos os resultados das análises realizadas com vista à sua quantificação em amostras de material apreendido, sendo fornecido o resultado final com a incerteza expandida que lhe está associada.

2.3.1 OBTENÇÃO DE PADRÕES

As catinonas mefedrona (**1**), metilona (**2**) e MDPV (**3**) (**Figura 1.5**), foram selecionadas para este trabalho. Por serem substâncias psicoativas controladas, a sua aquisição comercial encontra-se limitada, pelo que a síntese foi a solução mais vantajosa encontrada, principalmente por razões temporais.

Destes três compostos, a mefedrona (**1**) e o MDPV (**3**) foram anteriormente sintetizados na FCUL, e a metilona (**2**) foi sintetizada no âmbito deste trabalho, conforme descrito em 2.3.1.1. O grau de pureza das 3 catinonas foi avaliado de acordo com o procedimento descrito em 2.3.1.2.

Para o estudo de eventuais interferentes do método a desenvolver foram utilizados 21 padrões de catinonas sintéticas (metcatinona, bufedrona, pentedrona, metedrona, 3,4-DMMC, DMC, DMB, DMP, etcatinona, NEB, NEP, 4-MEC, amfepramona, DEB, DEP, 4Me-amfepramona, α -PPP, α -PBP, α -PVP, MPPP, MDPBP) obtidas no âmbito de trabalhos anteriormente realizados na FCUL e que fazem parte da biblioteca de padrões do LPC-PJ. A listagem das 24 catinonas sintéticas, que inclui as três catinonas em estudo, encontra-se no **Anexo 6.3**.

Foram ainda utilizados padrões de anfetamina, metanfetamina, MDMA, cafeína e lidocaína, para o estudo de interferentes, fornecidos pelo LPC-PJ, por serem as substâncias maioritariamente encontradas em mistura com catinonas sintéticas, e os adulterantes mais comuns encontrados nestes produtos.

2.3.1.1 SÍNTESE DE METILONA

A síntese da metilona (**2**) foi efetuada, na FCUL, a partir do composto 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona, adquirido comercialmente, tendo por base o trabalho de *McDermont et al.* [98], e envolveu três etapas distintas, conforme apresentado na **Figura 2.1**.

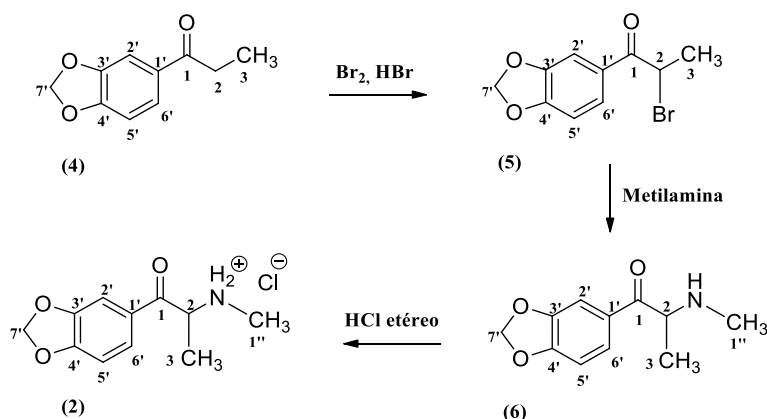


Figura 2.1 - Esquema reacional da síntese da metilona na forma de sal de hidrocloreto (**2**).

Síntese da bromocetona 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (**5**):

A primeira etapa consistiu na formação da bromocetona a partir da respetiva cetona, pela bromação da posição α da cetona de partida, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (**4**), com catálise ácida, formando-se a 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (**5**).

A cetona de partida (2,0 g), 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (**4**), foi dissolvida em CH_2Cl_2 seco (6 mL). De seguida, adicionou-se uma gota de HBr , assim como 0,57 mL de Br_2 , gota-a-gota com recurso a uma ampola de carga, sob agitação. A reação foi controlada durante cerca de duas horas, com recurso a TLC (eluente: éter de petróleo/éter etílico 9:1), verificando-se que após este período de tempo, ainda existia composto de partida em solução. Apenas no dia seguinte a reação se deu como terminada, verificando-se por TLC (eluente: benzeno) a ausência de composto de partida ($R_f \approx 2,7$ cm) e a existência de dois compostos ($R_f \approx 1,4$ cm e $R_f \approx 1,2$ cm, respetivamente), correspondentes à cetona bromada e dibromada. O produto resultante foi evaporado à secura sob corrente de ar, ficando com uma coloração castanho-escuro-roxeado e textura pastosa (3,430 g). Este produto é uma mistura racémica da bromocetona porque em meio ácido (neste caso HBr), ocorre a formação lenta de um enol, que é seguida de reação rápida com o bromo molecular, uma vez que o ataque nucleofílico pode ocorrer de duas formas distintas.

A cetona de partida (**4**) e o produto resultante contendo maioritariamente a bromocetona (**5**), foram dissolvidos em CDCl₃, e analisados por RMN. Os espetros 1D (RMN ¹H e ¹³C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) obtidos encontram-se em anexo (**Anexo 6.4** a **Anexo 6.13**).

1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.56 (1H, *dd*, *J*=8.1, 1.5 Hz, H-6'), 7.44 (1H, *d*, *J*=1.4 Hz, H-2'), 6.84 (1H, *d*, *J*=8.2 Hz, H-5'), 6.03 (2H, *s*, H-7'), 2.92 (2H, *q*, *J*=7.3 Hz, H-2), 1.20 (3H, *t*, *J*=7.3 Hz, H-3). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 198.98 (C=O, C-1), 151.51 (C_q, C-4'), 148.08 (CH, C-3'), 131.74 (C_q, C-1'), 124.07 (CH, C-6'), 107.83 (CH, C-5'), 107.81 (CH, C-2'), 101.74 (CH₂, C-7'), 31.51 (CH, C-2), 8.44 (CH₃, C-3).

2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.64 (1H, *dd*, *J*=8.2, 1.5 Hz, H-6'), 7.49 (1H, *d*, *J*=1.5 Hz, H-2'), 6.87 (1H, *d*, *J*=8.2 Hz, H-5'), 6.06 (2H, *s*, H-7'), 5.21 (1H, *q*, *J*=6.6 Hz, H-2), 1.88 (3H, *d*, *J*=6.6 Hz, H-3). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 191.59 (C=O, C-1), 152.27 (C_q, C-4'), 148.30 (C_q, C-3'), 128.54 (C_q, C-1'), 125.28 (CH, C-6'), 108.70 (CH, C-2'), 108.01 (CH, C-5'), 102.01 (CH₂, C-7'), 41.29 (CH, C-2), 20.27 (CH₃, C-3).

Síntese da metilona na forma de base livre (6):

A etapa seguinte consistiu na adição gota-a-gota, com recurso a uma seringa, de 25 mL (54,93 mmol) de uma solução de metilamina em THF (2M), a uma solução do produto resultante da reação anterior (3,430 g contendo a bromocetona (**5**)) dissolvida em THF seco, sob agitação magnética. De realçar que, de acordo com o trabalho citado, foi tida em conta uma proporção de 3,4 mmol de bromocetona para 14,0 mmol de amina, apurando-se que seria necessário um volume total de 27,46 mL de metilamina. Neste passo sintético ocorre uma reação de substituição nucleofílica do tipo S_N2, havendo um ataque por parte do nucleófilo (átomo de azoto da metilamina) ao carbono α da bromocetona. À medida que a reação progride, a ligação carbono-amina é fortalecida, enquanto a ligação carbono-bromo enfraquece, formando-se um ião brometo. A reação foi controlada com recurso a TLC (eluente: éter de petróleo/éter etílico 8:2), dando-se por completa a reação após cerca de 4 a 5 horas, verificando-se a ausência da bromocetona (**5**) (R_f ≈ 3,2 cm) e a existência de um novo composto (R_f ≈ 1,8 cm). O produto obtido foi evaporado à secura sob corrente de ar.

De seguida foi realizado o *work-up* ácido por extração contínua, sendo que para tal, numa primeira fase, dissolveu-se o produto obtido em CH₂Cl₂, e de seguida adicionou-se HCl 6M até a solução atingir o pH de 1, extraindo-se a fase orgânica (FO1) após adição de 25 mL de CH₂Cl₂. À fase aquosa adicionou-se novamente 25 mL de CH₂Cl₂, e extraiu-se uma nova fase orgânica (FO2). Em seguida, adicionou-se NaOH 5M à fase aquosa na ampola de decantação, até a solução atingir o pH de 10, após nova adição de 25 mL CH₂Cl₂, para recolha da terceira fase orgânica (FO3). As três fases orgânicas foram secas com MgSO₄ e concentradas sob vácuo, sendo que na FO3 verificou-se a presença de um óleo amarelo-alaranjado (1,254 g) que, conforme verificado por RMN ¹H, correspondia à metilona na forma de base livre (**6**). O rendimento obtido para esta etapa foi de aproximadamente 46 %, e a análise por RMN ¹H do produto final foi feita pela dissolução de uma alíquota em CDCl₃. A caracterização baseou-se na interpretação do espetro 1D (RMN ¹H) que se encontra no **Anexo 6.14**.

Metilona (na forma de base livre) (6): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.57 (1H, *d*, *J*= 8.1 Hz, H-5'), 7.44 (1H, *s*, H-2'), 6.87 (1H, *dd*, *J*=8.2, 0.8 Hz, H-6'), 6.05 (2H, *s*, H-7'), 4.21 (1H, *m*, H-2), 2.39 (3H, *s*, H-3), 1.33 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, H-1').

Síntese da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2):

A terceira e última etapa consistiu na precipitação do produto final na forma de hidrocloreto, numa reação ácido-base entre a metilona na forma de base livre (**6**) e uma solução de ácido clorídrico etéreo (3M). Esta solução foi obtida pela reação entre 43,83 g de NaCl (750 mmol, MM=58,44 g/mol), previamente seco na estufa (250°C), e de 19,20 mL de H₂SO₄ (96%, 375 mmol, MM=98,018 g/mol, densidade: 1,840 g/mL), borbulhando em 250 mL de éter etílico (750 mmol), em banho de gelo. O

precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado repetidamente com éter etílico numa primeira fase, depois acetona, e mais tarde uma solução 1:1 éter etílico/acetona, formando-se um pó bege que foi evaporado a vácuo. O produto obtido foi analisado por RMN ¹H, pela dissolução de uma pequena porção em DMSO-*d*₆, comprovando tratar-se da metilona na forma de hidrocloreto (**6**) (1,082 g). O rendimento obtido para esta etapa foi de aproximadamente 86 %, e a caracterização do produto final foi feita por RMN, em DMSO-*d*₆, sendo que a caracterização se baseou na interpretação dos espectros 1D (RMN ¹H e ¹³C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC). Os espectros se encontram em anexo (**Anexo 6.15** a **Anexo 6.19**).

Metilona (na forma de sal de hidrocloreto) (2): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 9.69 (1H, *brs*, NH), 9.17 (1H, *brs*, NH), 7.69 (1H, *dd*, *J*=8.2, 1.6 Hz, H-6'), 7.53 (1H, *d*, *J*=1.5 Hz, H-2'), 7.13 (1H, *d*, *J*=8.2 Hz, H-5'), 6.19 (2H, *s*, H-7'), 5.06 (1H, *m*, H-2), 2.54 (3H, *s*, H-1''), 1.42 (3H, *d*, *J*=7.1 Hz, H-3). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 194.38 (C=O, C-1), 152.77 (C_q, C-4'), 148.26 (C_q, C-3'), 127.41 (C_q, C-1'), 125.88 (CH, C-6'), 108.60 (CH, C-5'), 107.94 (CH, C-2'), 102.53 (CH₂, C-7'), 57.98 (CH, C-2), 30.67 (CH₃, C-1''), 15.79 (CH₃, C-3).

Assim, a partir de 2 g de cetona de partida (**4**), foi possível sintetizar 1,082 g de metilona na forma de hidrocloreto (**2**), sendo o rendimento global da reação de aproximadamente 46 %.

2.3.1.2 GRAU DE PUREZA E ESTABILIDADE

O grau de pureza dos três compostos em análise para validação do método de quantificação de cationas sintéticas foi estimado por GC-FID. As soluções foram preparadas pela dissolução de cerca de 5 mg de cada substância em 1 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH), tendo-se obtido 3 soluções: mefedrona (**1**) (5,2 mg/mL), metilona (**2**) (5,3 mg/mL) e MDPV (**3**) (5,1 mg/mL). Os brancos utilizados ao longo do trabalho foram preparados da mesma forma que as soluções em análise, mas isentas de analito. Estas soluções foram previamente analisadas por GC-MS, no programa 'anfet', de modo a confirmar a correta identificação dos compostos.

A determinação do grau de pureza dos compostos foi efetuada pela análise de 10 repetições de cada solução, intercaladas de brancos, com o programa 'ANFET1' no GC-FID, calculando-se a média da percentagem (%) das áreas dos sinais obtidos nas 10 injeções.

A estabilidade das três cationas sintéticas em solução foi avaliada pela análise de soluções armazenadas dentro (temperatura do frigorífico, 10 °C) e fora do frigorífico (temperatura ambiente do laboratório, 21 °C). Uma porção de cada uma das 3 soluções utilizadas para avaliação do grau de pureza (uma para cada cationa sintética) foi deixada fora do frigorífico e analisada 8 e 14 dias depois, nas mesmas condições analíticas. Uma outra porção de cada solução foi armazenada no interior do frigorífico, e analisada 17 dias depois, nas mesmas condições analíticas.

2.3.2 SELETIVIDADE

De uma forma geral a seletividade de um método pode ser descrita como a capacidade do mesmo para discriminar o analito em estudo, em relação aos restantes componentes presentes numa mistura ou matriz complexa, por forma a garantir que o sinal de resposta é exclusivamente do composto de interesse [88].

Neste trabalho, o estudo da seletividade do método foi feito por duas fases, sendo que numa primeira fase foi realizada uma análise de 24 padrões de cationas sintéticas disponíveis, por GC-MS e GC-FID, de modo a apurar quais seriam possivelmente interferentes com as três cationas em estudo, tendo em conta o tempo de retenção. Em anexo encontram-se sumariadas as estruturas químicas dos 24 padrões, bem como os R_t obtidos a partir da respetiva análise por GC-MS e GC-FID, e ainda os principais fragmentos resultantes da análise por GC-MS (**Anexo 6.3**).

As soluções foram preparadas pela dissolução de cerca de 5 mg de cada substância (com exceção do MDPBP por existir pouca quantidade de padrão disponível - apenas 3 mg) em 5 mL de solvente (solução

1:1 CHCl₃/MeOH), tendo-se obtido 24 soluções: metcatinona (1,0 mg/mL), bufedrona (1,1 mg/mL), pentedrona (1,0 mg/mL), mefedrona (**1**) (1,0 mg/mL), metedrona (1,0 mg/mL), 3,4-DMMC (1,0 mg/mL), metilona (**2**) (1,0 mg/mL), DMC (1,0 mg/mL), DMB (1,1 mg/mL), DMP (1,0 mg/mL), etcatinona (1,1 mg/mL), NEB (1,0 mg/mL), NEP (1,0 mg/mL), 4-MEC (1,0 mg/mL), amfepramona (1,0 mg/mL), DEB (1,0 mg/mL), DEP (1,0 mg/mL), 4Me-amfepramona (1,0 mg/mL), α -PPP (1,1 mg/mL), α -PBP (1,1 mg/mL), α -PVP (1,0 mg/mL), MPPP (1,0 mg/mL), MDPBP (0,6 mg/mL) e MDPV (**3**) (1,0 mg/mL).

Desta análise, foram selecionadas como potenciais interferentes as catinonas sintéticas com R_t por GC-FID mais próximos das substâncias em estudo para validação do método de quantificação, nomeadamente DMB e NEB para a mefedrona, α -PBP, MPPP e α -PVP para a metilona, e MDPBP para o MDPV.

Antes de serem quantificadas, todas as substâncias desconhecidas têm de ser primeiramente identificadas pelo que, no LPC-PJ, são analisadas por GC-MS. Assim, numa primeira fase foi necessário perceber se a metodologia utilizada para identificação de catinonas sintéticas, permite a distinção entre estas substâncias quando misturadas em solução.

Uma das catinonas potencialmente interferentes, o MDPBP, não se encontrava disponível nesta fase de análise, pelo que foi preparada uma solução com as restantes 8 catinonas alvo (5 possíveis interferentes + 3 catinonas em estudo), pela dissolução de cerca de 5 mg de cada em 4 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e com adição de 1 mL de PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL), conforme **Tabela 2.1**. Esta solução foi analisada por GC-MS utilizando o programa ‘anfet’ para verificar se seria possível a identificação das substâncias na mistura. A mesma solução foi também analisada por GC-FID com o programa ‘ANFET1’, de modo a perceber se a metodologia em validação para quantificação de catinonas sintéticas permite a distinção das substâncias com R_t próximo quando misturadas em solução e, deste modo, a sua quantificação.

Tabela 2.1 - Dados relativos à preparação das soluções para estudo de interferentes, no que respeita à análise de uma mistura de oito catinonas sintéticas.

Composto	Massa (mg)	Volume (mL)		Concentração final solução (mg/mL)
		Solvente	PI	
<i>DMB</i>	5,26	4	1	1,05
<i>Mefedrona (1)</i>	5,24			1,05
<i>NEB</i>	5,20			1,04
<i>α-PBP</i>	5,34			1,07
<i>Metilona (2)</i>	5,38			1,08
<i>MPPP</i>	5,45			1,09
<i>α-PVP</i>	5,17			1,03
<i>MDPV (3)</i>	5,31			1,06

A análise do MDPBP como potencial interferente do MDPV (**3**) foi feita posteriormente, e uma vez que existia pouca quantidade deste padrão, foi preparada uma solução contendo apenas estas duas substâncias, pela dissolução de 1,2 mg de MDPBP (quantidade disponível), e 1,8 mg de MDPV, em 4 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e com adição de 1 mL de PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL). A solução, contendo MDPBP (0,24 mg/mL) e MDPV (0,36 mg/mL), foi analisada no programa ‘anfet’ no GC-MS e no programa ‘ANFET1’ no GC-FID.

Numa segunda fase do estudo da seletividade, foi avaliada a eventual interferência de algumas das substâncias maioritariamente encontradas em mistura com catinonas sintéticas, e os adulterantes mais comuns adicionados a produtos de mercado que contêm catinonas sintéticas: anfetamina, metanfetamina, MDMA, cafeína e lidocaína.

As soluções de anfetamina e metanfetamina foram preparadas pela dissolução de cerca de 5 mg em 1 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH), tendo-se obtido 3 soluções de concentração aproximada de 5,0 mg/mL. Estas foram analisadas por GC-MS no programa ‘anfet’.

As soluções de MDMA, cafeína e lidocaína foram preparadas pela dissolução de cerca de 10 mg em 4 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e com adição de 1 mL de PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL). As três soluções obtidas, MDMA (1,7 mg/mL), cafeína (2,3 mg/mL) e lidocaína (2,6 mg/mL), foram analisadas por GC-MS e GC-FID, no programa ‘anfet’ e ‘ANFET1’ respectivamente.

2.3.3 CALIBRAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

O processo de validação de um método inicia-se geralmente pela legitimação do procedimento de calibração aplicado. É assim necessário que o modelo de calibração aplicado descreva uma resposta instrumental adequada à quantificação de um analito [91], [99]. A validação do modelo de calibração, de uma maneira genérica, é feita pela avaliação da relação entre a concentração do analito na amostra e a resposta analítica correspondente. Para tal, é necessário que, tendo por base um modelo de regressão matemático, seja avaliada a tendência média do sinal instrumental em função do teor de analito, isto é, a linearidade da curva de calibração, bem como o comportamento da dispersão da resposta instrumental, na gama de trabalho, descrito como o estudo da homoscedasticidade [87], [90], [91].

Assim, numa primeira fase foi selecionada a gama de trabalho para aplicação do método de quantificação, bem como os limites analíticos aplicáveis ao mesmo. Os resultados obtidos nesta gama de trabalho foram analisados quanto à homoscedasticidade, para posterior seleção do modelo de regressão a aplicar e verificação da linearidade da resposta instrumental.

2.3.3.1 GAMA DE TRABALHO E HOMOSCEDASTICIDADE

A gama de trabalho pode ser definida como o intervalo entre as concentrações mínima e máxima esperadas para o analito, durante o qual o método fornece resultados com uma incerteza aceitável.

Uma vez que este trabalho é para validação de um método de rotina do LPC-PJ e que o desenvolvimento da componente experimental teve por base o procedimento já existente para quantificação de anfetaminas e metanfetaminas (conforme descrito em 2.3), verificou-se que nesta metodologia a massa máxima pesada é de 25 mg e a mínima de 10 mg. Assim, foi selecionada a concentração de 0,5 mg/mL para o extremo superior da gama de trabalho (assumindo que num caso extremo teríamos uma amostra de 25 mg com um grau de pureza de 100%) e para o extremo mínimo, foi selecionada a concentração de 0,02 mg/mL (assumindo que num caso extremo teríamos uma amostra de 10 mg em que o analito apresenta um grau de pureza de 1%). Estas duas concentrações foram assim selecionadas como representativas dos extremos, mínimo e máximo. Deste modo, foram preparadas duas soluções para cada uma das três catinonas sintéticas em análise para a validação do método, designadas de “Concentração Baixa” e “Concentração Alta” que, se verificadas como adequadas, iriam corresponder aos extremos da gama de trabalho. Cada solução foi preparada pela dissolução de cerca de 0,10 mg e 25 mg de cada composto, respetivamente para a designada “Concentração Baixa” e “Concentração Alta”, em 4 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e com adição de 1 mL de PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL), conforme **Tabela 2.2**.

Uma vez que o extremo mínimo deve ser igual ou superior ao limite de deteção (LD), foi necessário verificar para cada catinona se a “Concentração Baixa” estava ou não acima desse valor. Assim, as três soluções de “Concentração Baixa” para cada catinona sintética em estudo foram assim analisadas por GC-FID (conforme descrito em 2.3), de forma a estimar o sinal correspondente ao extremo mínimo da gama de trabalho, a partir de 20 repetições realizadas sob condições de repetibilidade (mesmo laboratório, durante um curto período, com o mesmo operador e equipamento). A adequação do extremo mínimo para a gama de trabalho em estudo foi avaliada com recurso à folha de *Excel* disponibilizada por Bettencourt *et al.* [94], que sugere que o sinal de um calibrador correspondente ao extremo mínimo da gama de trabalho deve ser estimado a partir de pelo menos 10 repetições realizadas sob condições de repetibilidade.

Para cada catinona, a solução de “Concentração Baixa”, foi ainda utilizada para o estudo da homoscedasticidade dos resultados, em conjunto com a solução de “Concentração Alta”. Ambas as soluções foram analisadas por GC-FID (conforme descrito em 2.3), sob as mesmas condições de repetibilidade, para os três compostos em estudo. A homoscedasticidade dos resultados foi também avaliada pela utilização da folha de *Excel* citada, disponibilizada por Bettencourt *et al.* [94], cujos cálculos se baseiam na aplicação do Teste F, que testa a dispersão dos resultados a partir de sinais replicados de calibradores com a menor e maior quantidade da gama de trabalho.

2.3.3.2 LINEARIDADE

De uma forma sucinta, linearidade pode ser definida como a capacidade de um método para fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais ao teor de analito numa determinada gama de trabalho. A linearidade da resposta instrumental deve ser avaliada com recurso a um modelo de regressão matemático, e permite descrever a curva de calibração associada aos dados experimentais obtidos por determinado método [91].

A linearidade da resposta do método de quantificação por GC-FID foi verificada testando a adequação do modelo de regressão linear ponderado, através de um Teste χ^2 (Chi-Quadrado). Assim, foram construídas curvas diárias para utilização durante 10 dias, para cada uma das três catinonas sintéticas em estudo, com 5 padrões de calibração cada uma. As soluções de padrões de calibração correspondentes aos extremos mínimo (“Concentração Baixa”) e máximo (“Concentração Alta”) já se encontravam preparadas (conforme seção 2.3.3.1), designando-se neste sentido de Padrão de Calibração 1 e 5, respetivamente. As restantes três soluções correspondentes aos Padrões de Calibração 2, 3 e 4, cujas concentrações seriam de cerca de 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL e 3,75 mg/mL, respetivamente, foram preparadas pela dissolução de cerca de 6,25 mg, 12,5 mg e 18,75 mg, respetivamente e de cada composto, em 4 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e com adição de 1 mL de PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL), conforme Tabela 2.2.

Para avaliação da linearidade da resposta do método de quantificação, foram obtidas, para cada catinona em estudo, curvas de calibração em duplicado por dia, em 10 dias não consecutivos. Em cada dia, as 5 soluções padrão de cada composto, foram analisadas por GC-FID (conforme descrito em 2.3), em sequências iniciadas por brancos, seguidas dos padrões por ordem decrescente de concentração (Padrão 5 → Padrão 1), sendo cada sequência injetada duas vezes e intercaladas por brancos.

Tabela 2.2 - Dados relativos à preparação das soluções para a seleção da gama de trabalho e identificação dos limites analíticos, assim como do estudo da linearidade e repetibilidade do método.

	Composto	Massa (mg)	Volume (mL)		Concentração (mg/mL)
			Solvente	PI	
“Concentração Baixa” Padrão 1	Mefedrona (1)	0,16	4	1	0,032
	Metilona (2)	0,12			0,024
	MDPV (3)	0,16			0,032
Padrão 2	Mefedrona (1)	6,35	4	1	1,270
	Metilona (2)	6,37			1,274
	MDPV (3)	6,22			1,244
Padrão 3	Mefedrona (1)	12,93	4	1	2,586
	Metilona (2)	12,92			2,584
	MDPV (3)	12,68			2,536
Padrão 4	Mefedrona (1)	19,00	4	1	3,800
	Metilona (2)	18,79			3,758
	MDPV (3)	18,72			3,744
“Concentração Alta” Padrão 5	Mefedrona (1)	25,40	4	1	5,080
	Metilona (2)	25,32			5,064
	MDPV (3)	25,18			5,036

A adequação do modelo de regressão linear ponderado, foi feita através de um Teste χ^2 , previamente implementado numa folha de *Excel*, no âmbito de um trabalho previamente publicado [100].

2.3.4 ESTIMATIVA DA INCERTEZA

Depois de realizada a calibração do método de quantificação em desenvolvimento, deve ser estimada a incerteza que lhe está associada, para que a dispersão dos valores que podem razoavelmente ser atribuídos à mensuranda em estudo seja caracterizada.

A primeira etapa que permite a estimativa da incerteza é a definição da mensuranda, isto é, da grandeza que se pretende medir no âmbito da metodologia em desenvolvimento. Para tal, é necessário definir uma expressão algébrica quantitativa que relaciona o seu valor com os parâmetros das quais depende. Essa é uma determinação não experimental pelo que não foi descrita nesta seção (ver seção 3.1.4.1).

Em seguida procede-se à determinação, quantificação e combinação das fontes de incerteza. Depois de expressa a relação algébrica entre a mensuranda e os parâmetros dos quais depende, é feita a quantificação da incerteza associada a todos esses parâmetros, sob a forma de componentes individuais, cujos efeitos são combinados num só valor de incerteza – incerteza combinada. Apenas a quantificação da incerteza associada a estas componentes individuais tem uma componente experimental, pelo que apenas essa fase é descrita nesta seção.

Depois de determinado o valor associado à incerteza combinada da metodologia em desenvolvimento, é calculada a incerteza expandida que permite associar um nível de confiança elevado ao resultado final, sendo por último reportado o resultado final.

2.3.4.1 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DE INCERTEZA

Como referido, após identificação da mensuranda e determinação das fontes de incerteza das quais tal grandeza é dependente, estas foram quantificadas.

A - Sinal Instrumental

A componente de incerteza associada ao sinal instrumental está relacionada com a incerteza relacionada com a razão entre as áreas dos sinais obtidos instrumentalmente, de analito (catinona sintética) e de padrão (referência), com o PI adicionado à solução analisada. Esta componente foi estimada através do cálculo do desvio padrão (S_r) associado à repetibilidade da resposta instrumental, que foi avaliada através da análise dos cinco padrões de calibração selecionados, em duplicado, ao longo de 10 dias não seguidos, para cada uma das três catinonas sintéticas em estudo.

Não foram preparadas soluções para esta análise, uma vez que foram utilizados os resultados obtidos a partir da análise das soluções preparadas para a avaliação da linearidade do método (ver seção 2.3.3.2).

Numa primeira fase foi calculado o desvio padrão associado às duas repetições diárias (S_r), por cada padrão de calibração, e nos 10 dias não seguidos ((Equação 2.1). A partir destes valores foi calculado o desvio padrão agrupado ($S_{r_{agrupado}}$), associado às 10 repetições por cada padrão de calibração, nas condições de repetibilidade ((Equação 2.2).

(Equação 2.1)

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Em que x_i representa o valor correspondente ao sinal de resposta obtido para cada análise, havendo neste caso um x_1 e um x_2 , para cada catinona sintética e cada padrão, decorrentes das duas repetições

por dia, e n é igual a 2 (repetições). O \bar{x} representa a média aritmética dos dois sinais diários (x_1 e x_2), para cada catinona e cada padrão.

(Equação 2.2)

$$S_{r_{agrupado}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (S_r)^2}{n}}$$

Em que S_r representa o desvio padrão associado às duas repetições diárias, para cada catinona sintética, cada padrão e cada dia de análise. Enquanto n retrata o número de dias em que a análise ocorreu, que neste caso é 10.

B - Desvio Máximo da Regressão que Descreve a Curva de Calibração

A componente de incerteza associada ao desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração deve ser tida em conta quando os pressupostos referentes à utilização de uma calibração do tipo monoponto não se verificam, nomeadamente a linearidade e a passagem na origem.

Esta componente foi apurada através da estimativa do maior valor de ordenada na origem resultante das 10 curvas de calibração diárias, obtidas para cada uma das três catinonas sintéticas em estudo. Não foram preparadas soluções para esta análise, uma vez que foram utilizados os resultados obtidos a partir da análise das soluções preparadas para a avaliação da linearidade do método (ver seção 2.3.3.2).

C - Massas Pesadas

A componente de incerteza associada às massas pesadas de amostra e padrão de calibração medidas numa balança analítica [$u(m_A)$ e $u(m_{Pad})$] está relacionada com a repetibilidade da balança analítica onde as mesmas foram medidas, assim como com os efeitos sistemáticos que afetam a pesagem e são quantificados pelo erro máximo de indicação. No entanto, apenas a repetibilidade é estudada experimentalmente.

O valor destas incertezas é igual entre si, uma vez que a metodologia em desenvolvimento prevê a pesagem de um padrão de referência por cada análise, que será feita na mesma balança onde será feita a pesagem das amostras com vista à quantificação de catinonas sintéticas, e igual para todas as amostras [$u(m_A) = u(m_{Pad})$].

As pesagens serão feitas pela utilização da balança analítica instalada no LPC-PJ, de características: METTLER AE 100 (max 109 mg, d=0,1mg), em balões de precipitação de 5 mL, conforme o procedimento de rotina da instituição para quantificação de substâncias por GC-FID. Assim, o estudo da repetibilidade desta balança foi realizado nas mesmas condições, nomeadamente pela pesagem de um balão de precipitação com as mesmas características, 10 vezes.

D - Volumes Medidos

A componente de incerteza associada aos volumes medidos de solvente e PI medidos com dispensadores [$u(V_{A(Solv)})$, $u(V_{A(PI)})$, $u(V_{Pad(Solv)})$ e $u(V_{Pad(PI)})$] está relacionada com a repetibilidade da instrumentação utilizada para sua medição, assim como à respetiva calibração. No entanto, apenas a repetibilidade é estudada experimentalmente.

O valor das incertezas associado à medição de solvente é igual para ambas as soluções (analito e padrão), assim como o valor das incertezas associadas à medição de solução de PI, também entre si (analito e padrão) [$u(V_{A(Solv)}) = u(V_{Pad(Solv)})$ e $u(V_{A(PI)}) = u(V_{Pad(PI)})$].

As medições serão feitas pela utilização de dispensadores instalados no LPC-PJ, de características: Dispensette® [Número-Série: 11S 08208] marca BRAND de 2 mL (Exatidão 0,01%, CV 0,05%) e um

Dispensette® S Organic [Número-Série: 16D 70349] marca BRAND de 5 mL (Exatidão 0,02%, CV 0,06%).

A repetibilidade deste tipo de instrumentos faz-se pela medição de um dado volume, para um gobelé vazio por exemplo, pesando-se e registando-se a respetiva massa, e repetindo-se o processo 10 vezes. No entanto, estes dispensadores são utilizados diariamente pelos analistas do LPC-PJ e contêm as soluções de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e de PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL), previamente preparadas. A medição de um dado volume destas soluções para apurar a repetibilidade dos instrumentos não seria viável, uma vez que são muito voláteis pelo que a massa iria variar, sendo este um fator que não é possível controlar. Não era igualmente possível a colocação de outro líquido (não volátil) no frasco onde se encontram instalados os dispensadores, uma vez que iria condicionar a rotina do laboratório. Assim, não foi possível estudar a repetibilidade destes instrumentos.

Deste modo, foi considerado o desempenho do equipamento (i.e. repetibilidade e erro médio de medição) facultado pelo fornecedor, não existindo um elemento experimental nesta matéria.

E - Grau de Pureza Padrões de Referência

A última componente de incerteza está associada ao grau de pureza dos padrões utilizados como referência para a quantificação das catinonas sintéticas em estudo [$u(Pur)$], e foi estimada pelo desvio padrão associado ao sinal instrumental de resposta desses padrões (% área), para cada uma das três catinonas sintéticas, em 10 repetições.

Não foram preparadas soluções uma vez que os sinais utilizados foram os mesmos utilizados para averiguação do grau de pureza desses compostos, pela média de 10 respostas obtidas (ver **2.3.1.2**). Assim, apenas foi necessário calcular o desvio padrão associado à repetibilidade destes sinais ($S_{r_{Pur}}$).

2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS EM AMOSTRAS REAIS

Depois de validada uma metodologia, é necessário que a mesma seja testada, nomeadamente pela aplicação da mesma a amostras reais, com vista à quantificação das catinonas sintéticas eventualmente presentes.

Foram selecionados quatro produtos resultantes de material apreendido de uma “*SmartShop*”, com suspeita de conterem pelo menos uma das catinonas sintéticas em estudo, que seriam vendidos sob as designações de Blow e Bliss. De acordo com as características do invólucro foram designados de **Blow Azul 1**, **Blow Azul 1B**, **Bliss Rosa 2** e **Blow Rosa 3**. Estes produtos foram assim submetidos ao procedimento em desenvolvimento para quantificação de catinonas sintéticas, que se inicia pela aplicação de testes colorimétricos, posterior identificação dos compostos presentes na amostra pela aplicação da técnica de GC-MS (programa ‘anfet’) e, por fim, quantificação dos analitos identificados, a partir das curvas de calibração previamente desenvolvidas.

As soluções foram preparadas pela dissolução de cerca de 25 mg da amostra sob a forma de pó disposta no interior de cada invólucro, em 4 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e com adição de 1 mL de PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL), conforme **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3 - Dados relativos à preparação das soluções resultantes de material apreendido de um “*SmartShop*”, utilizadas para testar o método de validação.

<i>Material Apreendido</i>	<i>Composto Alvo</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Volume (mL)</i>		<i>Concentração (mg/mL)</i>
			<i>Solvente</i>	<i>PI</i>	
<i>Blow Azul 1</i>	<i>Mefedrona (1)</i>	25,27	4	1	5,054
<i>Blow Azul 1B</i>	<i>Mefedrona (1)</i>	25,07			5,014
<i>Bliss Rosa 2</i>	<i>Metilona (2)</i>	25,29			5,058
<i>Blow Rosa 3</i>	<i>MDPV (3)</i>	25,17			5,034

De referir que as soluções utilizadas como solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e PI (tetracosano em solução com CHCl₃ – 0,5 mg/mL) já se encontravam previamente preparadas, no âmbito do trabalho de rotina do LPC-PJ.

2.4 ANÁLISE DE MATERIAL APREENDIDO

Ao longo do trabalho desenvolvido no âmbito do Protocolo entre a FCUL e o LPC-PJ, foram analisadas **57 amostras diferentes**, resultantes de material apreendido em Portugal, para determinar a presença ou não de substâncias psicoativas com vista à resolução de casos judiciais. Foram analisadas 29 amostras em pó, 4 amostras na forma de matriz herbal, 1 comprimido, 14 amostras contendo microselos ou autocolantes, 4 soluções líquidas e ainda outras 5 amostras que fazem parte dos exames menos comuns da casuística do LPC-PJ (1 amostra de vinho, 1 resíduo animal, 2 amostras de comida para animais e 1 amostra de torrões de açúcar).

Quando o material apreendido pelos Órgãos de Polícia Criminal (OPC) chega ao laboratório para análise, é alvo de diferentes etapas de análise, com o objetivo de responder aos quesitos do processo, que por sua vez pretendem elucidar o tribunal para que as diligências necessárias ocorram.

Todas amostras descritas foram analisadas de acordo com o tipo de matriz. No entanto, de uma forma geral, todos os tipos de matrizes foram, numa primeira fase, alvo de pesagem e descrição, para registo e documentação. De seguida, do total de cada amostra apreendida foi retirada uma porção para análise no sentido de se fazer uma identificação preliminar.

Para as amostras que se encontram na forma de **pó, matriz herbal ou comprimido**, esta identificação preliminar foi feita pela aplicação dos testes colorimétricos Marquis, Scott e Duquenois-Levine. Neste sentido, adicionou-se uma a duas gotas de reagente ao produto em análise, o que resultou numa coloração diferente consoante o grupo funcional do composto maioritário, permitindo apurar a classe de substâncias que estaria, à partida, presente, conforme **Tabela 2.4**.

Tabela 2.4 - Testes colorimétricos aplicados a amostras na forma de pó, matriz herbal, produto vegetal prensado ou comprimidos, para uma análise preliminar.

<i>Teste/Reagente</i>	<i>Reação/Coloração</i>	<i>Classe/Substância</i>
<i>Marquis</i>	Roxo/Violeta	Heroína (e outros opióides)
	Laranja/Castanho	Anfetaminas
	Verde/Preto	Metanfetaminas
	Sem reação ou outra coloração	NSP ou Não identificado
<i>Scott</i>	Turquesa	Cocaína
	Sem reação ou outra coloração	NSP ou Não identificado
<i>Duquenois-Levine</i>	Roxo	Canábis ou THC
	Sem reação ou outra coloração	Não identificado

De seguida, uma nova porção de amostra foi retirada e analisada por GC-MS. Esta análise foi feita pela dissolução de cerca de 5 mg de amostra, em 1 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH), com posterior injeção no equipamento. O programa aplicado foi selecionado de acordo com os resultados dos testes colorimétricos. Os cromatogramas foram analisados, permitindo determinar o número de picos existentes e respetivos R_t (assumindo-se normalmente que cada pico bem resolvido corresponde apenas a um composto), assim como fazer uma “tentativa de identificação” dos compostos presentes, pela análise do padrão de fragmentação dos espetros de massa para cada R_t, e pela comparação com os espetros de massa presentes nas bibliotecas de espetros disponíveis (ENFSI, NIST, SWGDRUG, etc...). Sempre que a identificação correspondia a um padrão existente no LPC-PJ, o R_t da substância era utilizado para confirmação da identificação.

Nenhuma das amostras prosseguiu para quantificação, uma vez que as substâncias possivelmente identificadas por GC-MS não se tratavam de substâncias descritas na tabela do mapa anexo à Portaria

n.º 94/96 [32], que define os procedimentos de diagnóstico e dos exames periciais necessários à caracterização do estado de toxicodependência. Também as amostras que não foram identificadas por GC-MS, não seriam certamente “de consumo mais frequente” pelo que não estariam descritas na tabela citada, não sendo igualmente quantificadas atualmente.

Para as amostras que não foram identificadas por GC-MS, ou para as quais persistiam dúvidas na identificação, foi preparada uma porção para análise na FCUL, por forma a proceder à sua confirmação/identificação por RMN.

Os produtos sob a forma de **pó** foram analisadas por RMN, preparando-se uma solução pela dissolução de cerca de 10 mg de amostra no solvente deuterado mais adequado, tendo em conta os resultados de GC-MS pré-existentes. O **comprimido** foi triturado e homogeneizado, e quando na forma de pó foi dissolvido no solvente deuterado adequado, e analisado por RMN após filtração. Duas das amostras sob a forma de pó, **Amostras 53 e 56 (Anexo 6.103)** foram ainda analisadas com recurso à técnica de FTIR, pela preparação de uma pastilha de KBr, sendo que **Amostra 53** foi também analisada por MS (ESI+), pela dissolução de cerca de 1 mg de amostra em 1 mL de MeOH, seguida de diluição 1/100.

As **Amostras 33 e 38 (Anexo 6.103)**, na forma de **matriz herbal**, foram extraídas diretamente com o solvente deuterado mais adequado de acordo com os resultados de GC-MS pré-existentes, e analisados por RMN. As **Amostras 2 e 3 (Anexo 6.103)**, também na forma de **matriz herbal**, foram extraídas com MeOH e de seguida analisadas por TLC (*n*-hexano/acetato de etilo 7:3). Dada a semelhança do perfil cromatográfico das amostras foi apenas selecionada a **Amostra 3**, para o isolamento dos seus compostos por cromatografia em coluna (CC). O extrato metanólico (299 mg) desta amostra foi purificado numa coluna (2 cm de diâmetro) com 24 g de sílica (GEL D431000 3525, 230-400 mesh ASTM Gel 60), tendo sido aplicado em matriz sólida [por dissolução prévia em CH₂Cl₂ e numa pequena porção de *n*-hexano em sílica (GEL D431000 3525, 230-400 mesh ASTM Gel 60), seguida de evaporação do solvente], tendo sido usadas como eluente misturas de *n*-hexano/acetato de etilo de polaridade crescente (50 mL *n*-hexano seguidos de 200 mL de cada mistura *n*-hexano/acetato de etilo 9:1, 8:2, 7:3 e 5:5). Foram recolhidas no total 50 frações (de 15 a 20 mL), posteriormente analisadas por TLC (*n*-hexano/acetato de etilo 5:5), tendo sido reunidas as frações semelhantes e evaporadas à secura. As frações resultantes F20-22 ($R_f \approx 0,79$ cm, 134,5 mg) e F40-43 ($R_f \approx 0,49$ cm, 142,1 mg) mostravam em TLC apenas uma mancha, pelo que foram analisadas por RMN em CDCl₃ e MeOD.

As amostras na forma de **microselos ou autocolantes** foram analisadas de acordo com o procedimento de rotina do LPC-PJ aplicado a estas matrizes, para verificação da presença de LSD. Assim, foi feita uma extração pela adição de 500 mg de NaHCO₃ e 5 mL de água destilada tépida a cada amostra, que se armazenou no escuro durante a noite. No dia seguinte foram adicionados 5 mL de CH₂Cl₂ a cada amostra, mexendo, para posterior filtração com recurso a um filtro de fases. De seguida, uma alíquota de cada solução foi aplicada numa placa de TLC, assim como um padrão de LSD, e a placa colocada numa tina saturada de acetona (100 mL). Os resultados foram revelados, numa primeira fase, à luz UV (254 nm), e em seguida pela aplicação de uma solução reveladora previamente preparada (solução etanólica do Reagente de Ehrlich). Não existindo resultados positivos para LSD em nenhuma das amostras, uma porção do extrato foi dissolvida em cerca de 1 mL de solvente (solução 1:1 CHCl₃/MeOH) e analisada por GC-MS. O programa aplicado foi selecionado de acordo com os resultados previamente existentes. Em duas dessas amostras, **Amostras 41 e 47 (Anexo 6.103)**, após análise por GC-MS, os resultados indicavam a possível presença de um ou mais compostos, mas persistiam dúvidas na sua identificação, pelo que foi preparada uma nova porção de cada amostra para proceder à sua identificação por RMN. Estas amostras foram analisadas pela extração direta dos microselos com diferentes solventes deuterados até ser possível a sua identificação por RMN. Para a **Amostra 41 (Anexo 6.103)** foi ainda realizada uma análise por ESI-MS.

As soluções e outras amostras menos comuns na casuística do LPC-PJ foram analisadas de acordo com a matriz, sendo variável a abordagem. No que respeita às **soluções líquidas, Amostras 7-10 (Anexo 6.103)**, por existirem suspeitas de conterem na sua composição LSD, foram numa primeira fase analisadas por TLC, pela aplicação de uma alíquota de cada solução na placa, assim como uma alíquota de uma solução padrão de LSD, sendo a placa colocada numa tina saturada de acetona (100 mL). Os resultados foram visualizados a 254 nm, e revelados de seguida com o Reagente de Ehrlich. Apesar de os resultados indicarem a presença do LSD, de acordo com o R_f verificado, existia a suspeita de se tratarem de amostras contendo um derivado deste composto, pelo que as soluções foram enviadas para análise por RMN. A análise foi feita pela dissolução de 2 gotas de amostra em DMSO- d_6 . Posteriormente, duas das amostras (**Amostras 7 e 8**) foram de novo analisadas por RMN após evaporação de todo o líquido delas constituinte, e por redissolução do resíduo resultante em DMSO- d_6 .

As amostras menos comuns na casuística do LPC-PJ – **Amostras 42-46 (Anexo 6.103)**, foram preparadas para análise por GC-MS, sendo que o **vinho, Amostra 42**, foi numa primeira fase basificado pela adição de NaOH, e posteriormente alvo de uma extração com $CHCl_3$, o alimento para animais sob a forma de **carne ‘isco’** e o **animal inteiro** apreendido (**Amostras 43 e 44**) foram lavados diretamente com MeOH nas zonas que poderiam ter estado em contacto com qualquer substância psicoativa, e a **comida para animais (Amostra 45)** foi filtrada e extraída com éter de petróleo. Por últimos, a amostra sob a forma de **torrões de açúcar (Amostra 46)** foi analisada pelo mesmo procedimento aplicado para o microsêlos e autocolantes, sendo que, não relevando um resultado positivo, o extrato foi analisado por GC-MS.

Todos os procedimentos utilizados com vista à identificação de substâncias psicoativas em **57 amostras** de material apreendido em Portugal no âmbito deste trabalho resultaram em **250 análises**, encontrando-se sumariadas no **Anexo 6.103**.

3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

O principal objetivo deste trabalho foi a validação de um método de quantificação de três catinonas sintéticas, mefedrona (1), metilona (2) e MDPV (3) (Figura 1.5), em material apreendido em Portugal por GC-FID. Este desígnio surge no âmbito de uma ação pró-ativa, na medida em que, apesar de estas substâncias não serem de momento quantificadas em Portugal, por não se considerarem “de consumo mais frequente” (ao abrigo da Portaria n.º 94/96 de 26 de Março [32]), é expetável que futuramente possam assim vir a ser consideradas, por se encontrarem em crescente difusão a nível Mundial. No decorrer dos trabalhos de validação desta metodologia, foram analisados 30 padrões de substâncias (24 catinonas sintéticas e 5 possíveis substâncias em mistura/adulterantes de produtos contendo catinonas sintéticas), e 4 amostras de material apreendido em Portugal com suspeita de conterem as 3 catinonas em estudo, culminando num total de 415 análises, cujos resultados são discutidos e apresentados na primeira parte desta seção (3.1).

Previamente à quantificação de analitos, é necessário que os mesmos sejam identificados num determinado produto apreendido, pelo que são não só de evidenciar as metodologias analíticas com vista à quantificação, mas também os procedimentos de identificação realizados diariamente no LPC-PJ que visam dar resposta aos quesitos interpostos pelo processo judiciário/judicial. Assim, este trabalho envolveu ainda a análise de 57 amostras de material apreendido em Portugal, com vista à identificação de um conjunto de substâncias psicoativas, nas mais diversas matrizes, culminando na realização de 250 análises. Das 57 amostras analisadas, foram selecionadas para serem discutidas na segunda parte desta seção (3.2), as amostras que melhor ilustram a importância da aplicação de diferentes metodologias analíticas para concluir pela identificação de uma substância em determinada amostra, e consequentemente que conduzem a uma correta aplicação da legislação referente ao controlo de drogas e NSP em Portugal.

3.1 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS POR GC-FID

O desenvolvimento de uma metodologia de quantificação de catinonas sintéticas por GC-FID é o principal objetivo deste trabalho, pelo que nesta seção são descritas todas as fases necessárias à sua validação.

Conforme referido, após identificação dos principais objetivos da metodologia em desenvolvimento, as vertentes analíticas e procedimentais devem ser determinadas.

Assim, o procedimento de quantificação foi desenvolvido tendo por base o método já implementado para quantificação de anfetaminas e metanfetaminas, na medida em que estas drogas apresentam similaridades a nível estrutural com as catinonas sintéticas. Uma vez que este é um método interno, para implementação nos trabalhos de rotina do LPC-PJ, apenas as alterações ao quotidiano do laboratório necessárias devem ser feitas. Assim, na metodologia desenvolvida, mantiveram-se todas as componentes experimentais, desde a aplicação dos testes colorimétricos, passando pela identificação dos componentes maioritários por GC-MS, à sua quantificação por GC-FID.

Os testes colorimétricos aplicados a amostras com suspeitas de conterem na sua composição NSP são os testes de Marquis e Scott, no entanto, a sua aplicação não origina, à partida, qualquer resultado positivo. Ainda assim, e conforme referido, os testes colorimétricos são testes presuntivos que apenas visam o auxílio na seleção das técnicas analíticas aplicadas para identificação dos compostos presentes numa determinada amostra.

A adição de um padrão interno (PI) nesta metodologia foi mantida, uma vez que a sua aplicação tem a grande vantagem de minimizar as variações eventualmente introduzidas ao longo do processo de

análise, compensando algumas perdas decorrentes de erros do método, quer na preparação da amostra, quer no processo de análise instrumental [88]. O tipo de PI foi também mantido (solução de tetracosano), uma vez que já se demonstrava adequado à aplicação na quantificação das anfetaminas e metanfetaminas, pelo que sendo as catinonas sintéticas similares, seria provável a manutenção da eficácia existente. De facto, o tetracosano não reage com este tipo de analitos e, apesar de deter um R_t - cerca de 16 minutos - próximo dos R_t habituais das substâncias pertencentes à classe das catinonas sintéticas, não co-elui com nenhum destes compostos, sendo superior.

Nesta seção são descritos todos os processos e resultados realizados com vista à validação do método de quantificação em apreço, desde a obtenção dos padrões necessários, passando pela verificação da seletividade do método e respetiva calibração, finalizando com a estimativa da incerteza associada aos resultados dele decorrentes. Por último são ainda descritos os resultados da análise de 3 amostras problema, resultantes de material apreendido e contendo as catinonas sintéticas em estudo, com o objetivo de testar a aplicação do método. Estes resultados foram inseridos nas 3 folhas de cálculo desenvolvidas para melhorar o futuro trabalho dos analistas do LPC-PJ.

3.1.1 OBTENÇÃO DE PADRÕES

Depois de selecionadas as três catinonas sintéticas em estudo, com vista à validação de um método de quantificação por GC-FID para futura utilização no LPC-PJ, foi necessário perceber como poderiam ser obtidas. Por serem substâncias psicoativas controladas, a sua aquisição comercial encontra-se limitada, pelo que a síntese foi a solução mais vantajosa encontrada, principalmente por razões de tempo. A mefedrona e o MDPV já se encontravam disponíveis, pelo que apenas a metilona foi sintetizada no âmbito deste trabalho, de acordo com a seção 2.3.1.1.

A partir de 2 g de cetona de partida (1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona) foi possível sintetizar 1,082 g de metilona na forma de hidrocloreto, pelo que o rendimento global da síntese foi de aproximadamente 46 %. Esta síntese envolveu 3 etapas distintas (**Figura 2.1**). A etapa da via sintética que apresentou menor rendimento (46%) foi a reação de substituição nucleofílica do tipo S_N2 , em que ocorre um ataque da metilamina (átomo de azoto) ao carbono α da bromocetona previamente formada. A velocidade deste tipo de reação é controlada pelo tipo de nucleófilo e do grupo de saída, assim como da estrutura carbonada no eletrófilo (carbono que sofre o ataque) [101]. Neste caso, apesar de o Br ser um bom grupo abandonante, o carbono alfa da bromocetona (**5**) representa um carbono secundário, o que faz diminuir a velocidade da reação S_N2 , porquanto o impedimento estereoquímico existente que dificulta a aproximação do nucleófilo (átomo de azoto) ao eletrófilo (C_α).

3.1.1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS EM ESTUDO

Para que determinadas substâncias possam ser utilizadas como padrões de referência, é necessário que seja feita uma cuidadosa caracterização, garantido a sua correta identificação e pureza [88].

A caracterização das três catinonas sintéticas foi feita por GC-MS (em soluções metanólicas), e por RMN (em DMSO- d_6). A aplicação da técnica de GC-MS com vista à caracterização de substâncias é uma mais-valia, na medida em que, permite a aplicação de uma combinação vantajosa de métodos analitos, cromatografia gasosa e espetrometria de massa, fornecendo dados como o R_t e o padrão de fragmentação, respetivamente, sendo que o padrão de fragmentação é característico dos compostos, funcionando como uma espécie de impressão digital. No entanto, apesar de a técnica de GC-MS apresentar resultados robustos e com elevada sensibilidade e especificidade, ela é uma técnica destrutiva e está limitada à análise de substâncias voláteis. Assim, cada vez mais a técnica de RMN é vista como a grande alternativa, permitindo a análise de quantidades vestigiais de amostra, num curto intervalo de tempo e originando resultados sob a forma de espetros muito distintos consoante a estrutura molecular

do composto maioritário. De facto, esta técnica é muito importante nomeadamente na distinção entre isómeros, especialmente no caso das cationonas sintéticas, e NSP de um modo global. Os resultados da análise por GC-MS para os três compostos em estudo encontram-se compilados na **Tabela 3.1**, sendo que os respetivos cromatogramas e espetros de massa se apresentam nos **Anexo 6.30** a **Anexo 6.35** - complemento **Anexo 6.3**.

Tabela 3.1 - Caracterização por GC-MS, das três cationonas em estudo na forma de sal hidrocloreto, identificando-se o tempo de retenção (R_t , minutos), e o valor de m/z dos picos base e dos principais fragmentos formados.

Composto	R_t (min.)	Principais Fragmentos (m/z)
<i>Mefedrona</i> (1)	8,26	119, 91, 77, 58 (pico base)
<i>Metilona</i> (2)	10,88	149, 121, 91, 77, 58 (pico base)
<i>MDPV</i> (3)	14,88	149, 126 (pico base), 121, 77

Verifica-se que as cationonas sintéticas **1** e **2** apresentam um R_t inferior (8,26 e 10,89 minutos, respetivamente), em relação à cationona **3** (14,88 minutos). Tal facto já seria de esperar, uma vez que as primeiras duas substâncias apresentam inferior peso molecular e polaridade relativamente elevada, tendo em conta as características não polares da coluna do GC-MS [102]. De salientar ainda que nos pico resultantes da análise por GC das moléculas **1** e **2**, se verifica a formação de um ligeiro *tailing* que poderá ser decorrente da presença de um grupo metilo ligado à amina da molécula, facto que não se verifica na molécula **3**. No MDPV, verifica-se a ocorrência de um pequeno pico com R_t ligeiramente superior ao R_t do composto maioritário (MDPV), que é característico das moléculas com um anel pirrolidino presente na função amina. Este pico é decorrente da degradação oxidativa que ocorre durante a análise de GC-MS, e que é caracterizada pela perda de dois átomos de hidrogénio das cationonas com o anel pirrolidino, dando origem ao produto de degradação 2,3-enamina (**Figura 3.1**). Verifica-se assim um espetro de massa com uma redução de 2 Da na razão m/z do pico base [103], [104].

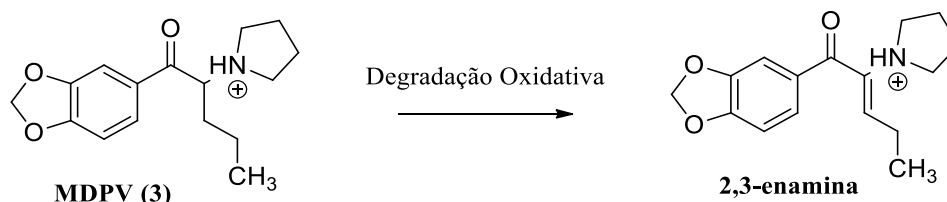


Figura 3.1 – Representação esquemática da degradação oxidativa do MDPV, que resulta na formação do produto de degradação 2,3-enamina, pela perda de dois átomos de hidrogénio.

No que respeita ao padrão de fragmentação resultante da aplicação da técnica de MS, verifica-se que o pico base para as primeiras duas substâncias (**mefedrona** e **metilona**) é o mesmo, sendo resultante da ocorrência de uma clivagem α (quebrando a ligação $C_\alpha-C_\beta$), causando a formação do ião imínio (**Figura 3.2**). O pico base do MDPV é diferente e muito superior, facto que é resultante do aumento da cadeia alifática e da presença da pirrolidina (**Figura 3.2**). Esta fragmentação é preferencial e característica nas cationonas sintéticas e, conforme comprovado, varia com a cadeia alifática e o tipo de amina presente na respetiva estrutura molecular. Esta clivagem origina ainda o ião acílio, se a carga positiva fica alojada no átomo de oxigénio, e não no átomo de azoto, como se visualiza na formação do ião imínio, que neste caso é semelhante para as cationonas **2** e **3** (m/z 149), mas diferente para a **1** (m/z 119), conforme **Figura 3.2**. Deste modo, é a partir deste fragmento que é possível distinguir o grupo substituinte eventualmente presente no anel aromático. É ainda possível verificar a formação dos iões fenílio e carbénio, resultantes da perda de uma molécula de monóxido de carbono do ião acílio e posterior perda do grupo substituinte eventualmente presente no anel aromático, respetivamente (**Figura 3.2**).

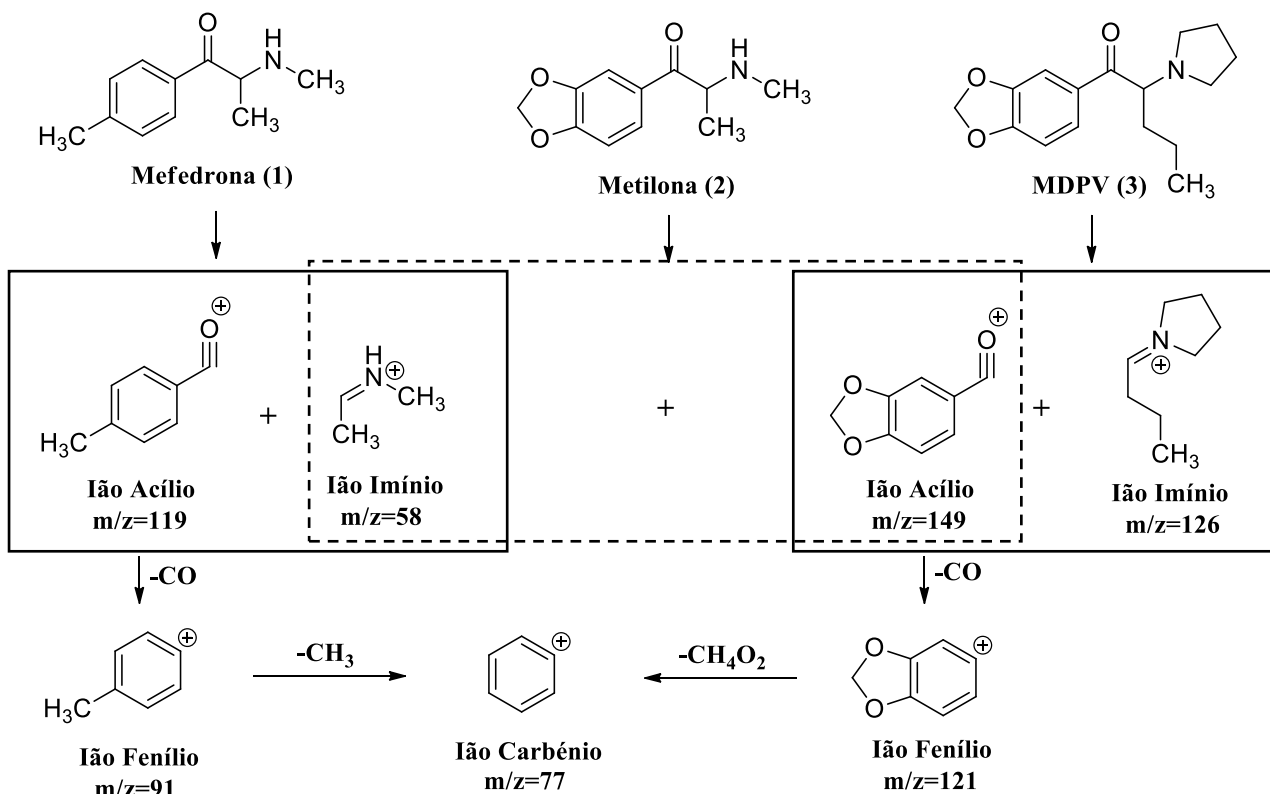


Figura 3.2 - Identificação das principais fragmentações das três catinonas sintéticas em estudo.

Os resultados obtidos a partir da análise por RMN encontram-se sumariados na **Tabela 3.2**, de acordo com a numeração descrita na **Figura 3.3**, e os espectros correspondentes em anexo (**Anexo 6.15** a **Anexo 6.29**). A identificação e caracterização das catinonas baseou-se na interpretação dos espectros 1D (RMN ¹H e ¹³C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC). Os resultados obtidos comprovam a identificação das três catinonas e estão de acordo com os dados existentes na literatura [52], [105].

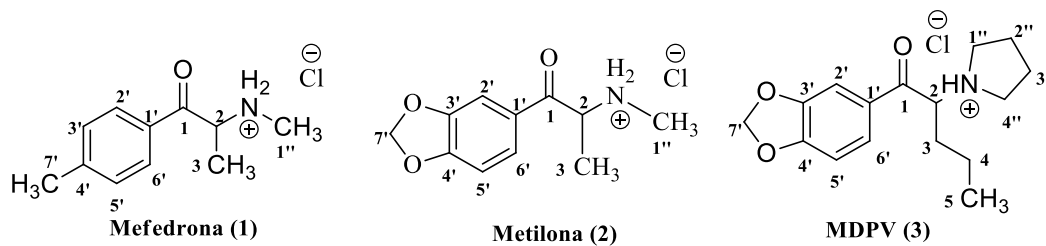


Figura 3.3 - Estrutura das três catinonas em estudo, na forma de sal de hidrócloro.

Tabela 3.2 - Caracterização por RMN das três catinonas em estudo, na forma de sal de hidrocloreto, em DMSO-*d*₆.

Posição	<i>Mefedrona</i> (1)		<i>Metilona</i> (2)		<i>MDPV</i> (3)	
	DMSO- <i>d</i> ₆		DMSO- <i>d</i> ₆		DMSO- <i>d</i> ₆	
	δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)
1	194,87	-	194,38	-	194,57	-
2	58,54	5,13, 1H, <i>m</i>	57,98	5,06, 1H, <i>m</i>	67,18	5,45, 1H, <i>m</i>
3	15,54	1,43, 3H, <i>d</i> , 7,1	15,79	1,42, 3H, <i>d</i> , 7,1	32,11	1,90, 2H, <i>m</i>
4					17,38	1,11, 2H, <i>m</i>
5					13,76	0,79, 3H, <i>t</i> , 7,2
1'	130,44	-	127,41	-	128,99	-
2'	128,97	7,93, 2H, <i>d</i> , 8,1	107,94	7,53, 1H, <i>d</i> , 1,5	107,88	7,57, 1H, <i>s</i>
3'	129,79	7,41, 2H, <i>d</i> , 8,0	148,26	-	148,40	-
4'	145,54	-	152,77	-	153,22	-
5'	129,79	7,41, 2H, <i>d</i> , 8,0	108,60	7,13, 1H, <i>d</i> , 8,2	108,67	7,16, 1H, <i>d</i> , 8,2
6'	128,97	7,93, 2H, <i>d</i> , 8,1	125,88	7,69, 1H, <i>dd</i> , 8,2; 1,6	126,27	7,77, 1H, <i>d</i> , 8,2
7'	21,33	2,40, 3H, <i>s</i>	102,53	6,19, 2H, <i>s</i>	102,71	6,20, 2H, <i>s</i>
NH	-	9,17, 1H, <i>brs</i> 9,61, 1H, <i>brs</i>	-	9,17, 1H, <i>brs</i> 9,69, 1H, <i>brs</i>	-	10,26, 1H, <i>brs</i>
1''	30,67	2,58, 3H, <i>s</i>	30,67	2,54, 3H, <i>s</i>	51,92	3,60, 1H, <i>m</i> 3,22, 1H, <i>m</i>
2''					22,85	1,98, 4H, <i>m</i>
3''						
4''					53,84	3,43, 1H, <i>m</i> 2,99, 1H, <i>m</i>

De salientar que é possível que as atribuições dos sinais correspondentes às posições 1'' e 4'' no MDPV se encontrem trocadas

A estratégia utilizada para atribuição dos sinais foi semelhante para os três compostos, tendo-se iniciado pela atribuição do carbono C-1, correspondente ao grupo carbonilo em todas as moléculas, uma vez que é o sinal com maior desvio químico e, no espectro de ¹³C APT, é correspondente a um carbono quaternário. As correlações deste carbono com os prótons H-2, H-3, H-2' e H6' são visíveis no espectro de HMBC. Os prótons H-2 e H-3, no caso da **mefedrona** e **metilona**, apresentam sinais com integração de 1 e 3, correspondendo a um multipeto e dupeto dos grupos CH e CH₃, respetivamente, existentes nessas posições. No caso do **MDPV**, os sinais da cadeia alifática foram facilmente identificados através das correlações visíveis no espectro de COSY: o multipeto a δ 5.45 ppm característico do sinal H-2 correlaciona com o multipeto a δ 1.90 ppm do próton H-3; o multipeto a δ 1.11 ppm com integração de 2 prótons correlaciona com o H-3 (δ 1.90 ppm), sendo atribuível ao próton H-4; e o triplete a δ 0.79 ppm com integração de 3 prótons, que correlaciona com o H-4, é atribuível ao próton H-5.

De seguida foram identificados os prótons aromáticos das três moléculas, sendo que estes apresentam desvios químicos relativamente elevados, porquanto o efeito de desblindagem que ocorre no anel aromático [106]. A integração e a multiplicidade destes sinais permite a identificação das substituições presentes no anel aromático da molécula. Assim, no espectro de RMN ¹H da **mefedrona**, na zona dos prótons aromáticos, existem dois dupletos com integração de 2 (H-2'/H-6' e H-3'/H-5'), o que indica uma substituição na posição 4', para além do carbonilo substituinte na posição C-1'. O facto de o C-4' ser um carbono quaternário, confirma uma substituição nesta posição do anel aromático, verificando-se que se trata de um metilo, uma vez que existe uma correlação deste carbono no HMBC com o próton H-7', um singuleto com integração de 3. Já para a **metilona** e **MDPV**, na zona dos prótons aromáticos, verifica-se a existência de um duplo dupeto, um dupeto e um singuleto, todos os sinais com integração de 1. Este padrão de multiplicidade sugere uma di-substituição nos carbonos C-3' e C-4' do anel aromático, juntamente com a substituição do carbonilo em C-1'. A análise do espectro de ¹³C APT indica que os três são quaternários com desvios químicos característicos de carbonos aromáticos [106]. Neste

sentido, o singuleto é facilmente atribuído, em ambas as moléculas, ao H-2', uma vez que não apresenta prótons imediatamente adjacentes. Pela análise do HMBC, é possível distinguir o H-5' do H-6', nomeadamente pela verificação de uma correlação do C-3' com o H-5' e do C-1 com o H-6'. A existência de um singuleto com integração para 2 prótons e desvio químico na ordem dos 6 ppm (que no HSQC corresponde a um grupo metilénico), indica que a substituição no anel aromático destas duas moléculas é correspondente a um grupo metilenodioxilo (H-7'), o que pode ser confirmado pela correlação, no espetro de HMBC, deste sinal de próton com os sinais dos carbonos C-3' e C-4'.

Para a **mefedrona** e **metilona** falta apenas a identificação do grupo ligado à amina, que é reconhecida como um metilo, na medida em que é um singuleto com integração de 3 prótons, e que apresenta correlação no HMBC com o C-2 em ambas as moléculas.

No **MDPV** verifica-se a existência de dois pares de multipletos, característicos de um grupo pirrolidino, atribuíveis aos prótons diestereotópicos de cada grupo metileno adjacente ao átomo de azoto (H-1'' e H4''), bem como um outro sinal de multipletos, com inferior desvio químico, atribuível aos prótons dos dois grupos metileno, que relaciona com um único sinal de ¹³C (H-2''/H-3''). Por último, foram atribuídos os sinais da restante cadeia alifática da molécula **MDPV**, que são facilmente identificados através das correlações visíveis no espetro de COSY. O multipletos a δ 1,11 ppm com integração de 2 prótons e com uma correlação no COSY com H-3 (δ 1,90 ppm), é atribuível ao H-4, e o tripletos δ 0,79 ppm com integração de 3 prótons e com uma correlação no COSY com H-4, é atribuível ao H-5.

A existência, nas três moléculas, de dois prótons no caso da **mefedrona** e **metilona**, ou um próton no caso do **MDPV**, com desvio químico característico de prótons de aminas [106], permite concluir que as catinonas sintéticas se encontram protonadas.

3.1.1.2 GRAU DE PUREZA E ESTABILIDADE

O grau de pureza destas catinonas foi estimado por GC-FID, pela análise de 10 injeções das soluções de concentração 5 mg/mL, de cada substância. Os resultados das 30 análises encontram-se discriminados no **Anexo 6.36**. Os resultados revelaram que os três compostos apresentam um grau de pureza superior a 98 %, conforme **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 - Grau de pureza, das 3 catinonas em análise para a validação do método de quantificação.

<i>Composto</i>	Grau de Pureza (%)
<i>Mefedrona (1)</i>	99,87 (\pm 0,08)
<i>Metilona (2)</i>	98,25 (\pm 0,11)
<i>MDPV (3)</i>	99,28 (\pm 0,12)

Foi igualmente verificada a estabilidade das três catinonas sintéticas, quando em solução, pela análise das mesmas soluções utilizadas para avaliação do grau de pureza, armazenadas dentro e fora do frigorífico. Uma porção de solução foi armazenada no interior do frigorífico, a uma temperatura de aproximadamente 10 °C e analisada 17 dias após a sua preparação, e uma outra porção foi armazenada fora do frigorífico, à temperatura ambiente do laboratório, aproximadamente 21 °C, tendo sido analisada passados 8 e 14 dias da preparação da solução original. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 3.4**, e os espetros resultantes da análise por GC-FID estão disponíveis no **Anexo 6.37** e **Anexo 6.38**. De salientar que o grau de pureza, neste caso, foi medido apenas pela análise de 1 injeção.

Tabela 3.4 - Compilação dos resultados obtidos para a avaliação da estabilidade dos três compostos em estudo em diferentes condições de armazenamento (dentro e fora do frigorífico).

Composto	Grau de Pureza (%)			
	Preparação Solução	Fora do Frigorífico (Temperatura ambiente, 21 °C)		Dentro do Frigorífico (Temperatura interior, 10 °C)
		0 dias	8 dias	14 dias
Mefedrona (1)	99,87	99,56	99,56	99,92
Metilona (2)	98,25	97,98	97,27	98,44
MDPV (3)	99,28	98,62	98,13	99,04

Verifica-se que, quando as catinonas sintéticas são armazenadas em solução fora do frigorífico, isto é, à temperatura ambiente do laboratório (21 °C), e analisadas 8 dias após a sua preparação, ocorre um decréscimo no grau de pureza. Quando as mesmas soluções são analisadas 14 dias após a respetiva preparação, verifica-se, para o caso da **mefedrona** a manutenção aproximada do grau de pureza, e para a **metilona** e **MDPV** um novo decréscimo. As figuras no **Anexo 6.37** permitem a constatação visual deste decréscimo no grau de pureza, desde a análise realizada para a avaliação do grau de pureza (30/04/2018), 0 dias, até à passagem dos 8 e 14 dias após a preparação das soluções (08/05/2018 e 14/05/2018), nomeadamente pelo aparecimento de picos resultantes de impurezas formadas. De facto, também o formato do sinal instrumental se altera com o decorrer dos dias após preparação das soluções, verificando-se um alargamento do sinal e, no caso da **metilona** e **MDPV**, a formação de diferentes picos na zona de sinal que, previamente, continha apenas um sinal de resposta definido (**Anexo 6.37**).

Assim, verifica-se que, caso as soluções fossem preparadas dias antes da respetiva análise, e armazenadas fora do frigorífico, a quantificação das catinonas sintéticas em amostras de material apreendido ficaria comprometida.

No que respeita aos resultados obtidos a partir da análise de uma porção da solução inicialmente utilizada para o estudo do grau de pureza, 17 dias após a respetiva preparação e armazenada no interior do frigorífico (10 °C), verifica-se a manutenção aproximada do grau de pureza dos compostos. Para a **mefedrona** e **metilona**, não se verifica o aparecimento de picos resultantes de impurezas formadas, conforme visível nas imagens do **Anexo 6.38**. É de salientar que, apesar de se verificar um ligeiro aumento no valor de % de área do pico maioritário, este não revela, necessariamente, um aumento no grau de pureza do composto quando em solução armazenada no interior do frigorífico, uma vez que este resultado é decorrente de apenas 1 repetição, enquanto o grau de pureza do composto foi avaliado através da análise de 10 repetições, conforme mencionado (resultados em **Anexo 6.36**). Já para o **MDPV**, observa-se o aparecimento de um pico (R_t 3,30 minutos), mas que não é significativo, resultando numa ligeira alteração na integração do cromatograma, da qual resulta um ténue decréscimo no grau de pureza (**Anexo 6.38**). O formato do pico para as três catinonas em estudo mantém-se.

Deste modo, o que é aconselhável, e que de facto já acontece nos trabalhos de rotina do LPC-PJ, é a preparação das soluções imediatamente antes da realização da análise, para que não seja necessário armazenar todas as soluções no interior de um frigorífico, garantindo a estabilidade dos compostos eventualmente presentes nas amostras em estudo.

Uma avaliação mais completa da robustez do método não seria necessária, uma vez que o procedimento em validação é para aplicação na rotina do LPC-PJ, não se verificando alterações significativas que devessem ser estudadas.

3.1.2 SELETIVIDADE

A seletividade de um método é descrita como a capacidade do mesmo para identificar, diferenciar e quantificar o analito em estudo, numa mistura ou matriz complexa, sem interferência de outros componentes também presentes. Este termo não deve ser confundido com a designação especificidade. Um método é específico quando produz uma resposta instrumental apenas para determinada substância,

enquanto um método seletivo produz várias respostas para várias substâncias, conseguindo distinguir a resposta de um analito, de todas as restantes [87], [88], [90].

Uma vez que este trabalho pretende validar um método para quantificação de diferentes substâncias, três catinonas sintéticas em particular, é necessário estudar a sua seletividade de forma a evitar a quantificação de outros compostos eventualmente presentes nas matrizes de material apreendido. A seletividade de um método permite garantir que um pico de resposta é exclusivamente do composto de interesse [88]. Conforme sugerido pela IUPAC, é particularmente importante verificar a interferência de compostos que à partida poderão estar presentes na amostra [90].

Assim, e uma vez que as catinonas sintéticas aparecem frequentemente misturadas com outras catinonas sintéticas, o estudo da seletividade foi feito, numa primeira fase pela análise de todas as catinonas sintéticas disponíveis – 24 padrões (listagem no **Anexo 6.3**), previamente sintetizadas ou resultantes de material apreendido em Portugal, de modo a apurar quais as que teriam um tempo de retenção próximo do tempo de retenção das três catinonas em estudo (**Figura 3.4**). Neste sentido, o objetivo seria verificar se existiam sinais analíticos que interferissem com os sinais de resposta correspondentes aos da mefedrona, metilona e MDPV.

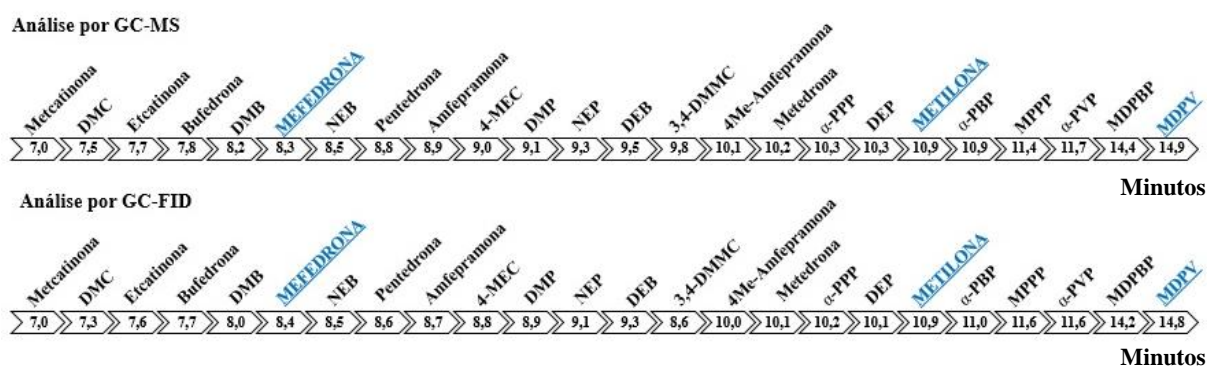


Figura 3.4 - Compilação esquemática dos tempos de retenção (minutos) das 24 catinonas sintéticas analisadas para a primeira fase do estudo da seletividade do método em validação.

Das 24 catinonas sintéticas analisadas, foram selecionadas as 6 que apresentavam um sinal de resposta com R_t mais próximo dos sinais de resposta correspondentes aos da mefedrona, metilona e MDPV (**Figura 3.5**).



Figura 3.5 - Discriminação dos tempos de retenção (minutos) das 6 catinonas sintéticas selecionadas como possíveis interferentes para as substâncias em estudo, após análise por GC-FID.

Depois de selecionadas as catinonas sintéticas citadas, foi analisada uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas – 5 das possíveis interferentes + 3 catinonas em estudo, por GC-FID e GC-MS. Uma vez que a catinona sintética MDPBP não se encontrava disponível aquando da preparação da solução citada, foi analisada mais tarde uma nova solução contendo apenas esta catinona e o MDPV, de modo a apurar a sua eventual interferência na quantificação do MDPV.

A apreciação dos resultados obtidos a partir da análise por GC-FID da mistura de interferentes (**Figura 3.6**) foi feita individualmente para cada uma das três catinonas sintéticas em estudo.

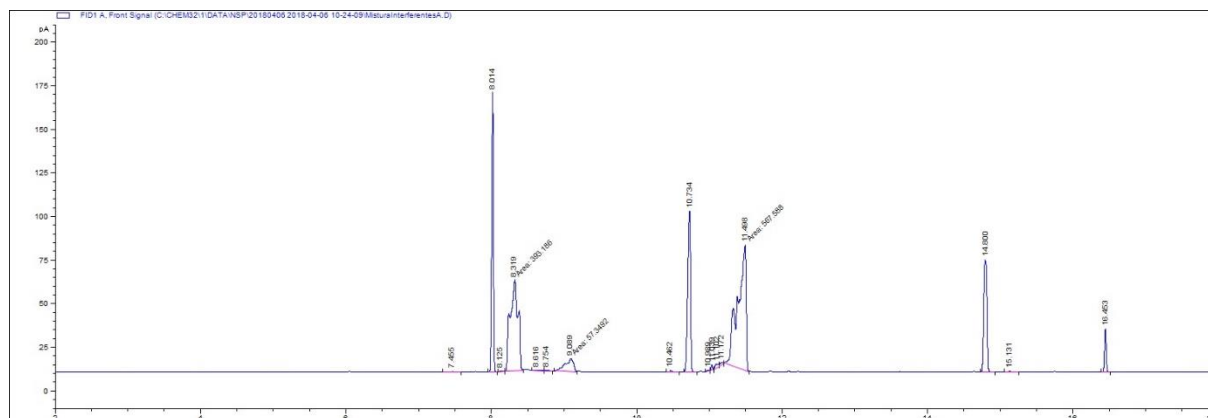


Figura 3.6 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, 5 possíveis interferentes e 3 catinonas sintéticas em estudo, para validação do método de quantificação.

Na zona do cromatograma resultante da análise desta mistura, com R_t entre 7 e 10 minutos, verifica-se a existência de 3 picos maioritários (R_t 8,0; 8,3 e 9,1 minutos). Dos picos referidos, os dois que apresentam maior tempo de retenção, apresentam um formato alargado (largura superior a 0,1 minutos), pelo que fraca resolução, enquanto o primeiro pico (R_t 8,0 minutos), apresenta-se bem resolvido (**Anexo 6.39**). Pela observação dos cromatogramas resultantes da análise individual da catinonas DMB, mefedrona e NEB, verifica-se que, os respetivos R_t são de aproximadamente 8,0; 8,4 e 8,5 minutos, respetivamente (**Anexo 6.40**). Deste modo, e uma vez que a análise por GC-FID apenas permite identificar, de forma não efetiva, os compostos com base no R_t , é possível afirmar que, muito provavelmente, o pico com R_t 8,0 minutos, na mistura de interferentes, será correspondente à catinona sintética DMB. Assim, conclui-se que os restantes picos, os dois mais alargados nesta zona, serão correspondentes à mefedrona e NEB, no entanto, devido à sua fraca resolução, não é possível afirmar que cada pico seja exclusivamente de cada catinona. Portanto, o composto NEB é um interferente nesta metodologia de quantificação da mefedrona por GC-FID, pelo que, quando a amostra em análise conter estas duas substâncias em simultâneo, a mefedrona não deverá ser quantificada usando esta metodologia.

No que respeita à zona do cromatograma com R_t entre 10 e 12 minutos, verifica-se a existência de apenas 2 picos maioritários (R_t 10,7 e 11,5 minutos). O primeiro pico desta zona apresenta melhor resolução do que o segundo, pelo que, à primeira vista, poderia corresponder a apenas um composto (**Anexo 6.39**). No entanto, pela observação dos cromatogramas resultantes da análise individual da catinonas metilona, α -PBP, MPPP e α -PVP, verifica-se que, os respetivos R_t são de aproximadamente 10,9; 11,0; 11,6 e 11,6 minutos, respetivamente, e que todos os picos são alargados (**Anexo 6.41**). Assim, sabemos que nesta zona estão os picos correspondentes às quatro catinonas sintéticas citadas, pelo que é muito provável que, existindo apenas dois picos no cromatograma resultante da análise da mistura de interferentes, estes sejam co-eluições destas quatro substâncias. Neste sentido, as catinonas sintéticas α -PBP, MPPP e α -PVP devem ser consideradas interferentes nesta metodologia de quantificação das metilona por GC-FID, pelo que, quando a amostra em análise possuir na sua composição estas quatro substâncias em simultâneo, a metilona não deverá ser quantificada usando esta metodologia.

Por último, da análise feita à zona do cromatograma com R_t entre 14 e 17 minutos, verificam-se dois picos maioritários, que são facilmente identificados como correspondentes ao MDPV (R_t 14,8 minutos) e ao PI adicionado à solução (R_t 16,5 minutos) (**Anexo 6.39**).

Conforme referido, foi ainda analisada uma solução contendo o MDPBP e MDPV, verificando-se a existência de três picos maioritários estreitos e bem definidos, que são facilmente identificados como correspondentes a estas duas catinonas (R_t 14,7 e 14,1 minutos, respetivamente) e ao PI adicionado à solução (R_t 16,4 minutos) (**Anexo 6.42**). Assim, conclui-se que, nenhuma das catinonas sintéticas analisadas como possíveis interferentes à metodologia, é efetivamente considerada um interferente à metodologia de quantificação do MDPV.

Uma vez que existem catinonas sintéticas que interferem com a quantificação da mefedrona e metilona, não devendo estas ser quantificadas quando presentes numa mistura com os respetivos interferentes, é necessário perceber se as mesmas são identificadas por GC-MS quando em solução. Assim, a solução de mistura de possíveis interferentes foi também analisada por GC-MS, de modo a garantir que, quando existe uma mistura de catinonas sintéticas, elas são devidamente identificadas. Os resultados indicam que, apesar de existirem co-eluições no cromatograma decorrente da análise por GC-MS, nomeadamente entre a mefedrona e a NEB (**Anexo 6.43**), todas as catinonas presentes na mistura são devidamente identificadas e distinguidas entre si, pela análise do respetivo padrão de fragmentação decorrente da análise por MS (**Anexo 6.44** a **Anexo 6.52**).

Conforme referido, numa segunda fase do estudo da seletividade, foi avaliada a eventual interferência de alguns das mais recorrentes substâncias encontradas em mistura com catinonas sintéticas, e os adulterantes mais comuns adicionados a produtos de mercado que contêm catinonas sintéticas: anfetamina, metanfetamina, MDMA, cafeína e lidocaína. Neste sentido, foi igualmente verificada a possibilidade de estes compostos interferirem na quantificação de catinonas sintéticas.

Primeiramente, foram analisados os resultados obtidos a partir da análise por GC-MS de duas soluções contendo anfetamina (5,0 mg/mL) e metanfetamina (5,0 mg/mL), apurando-se que os respetivos tempos de retenção são de 4,4 e 5,0 minutos (**Anexo 6.53** a **Anexo 6.56**). Estes são valores muito inferiores aos R_t correspondentes às catinonas sintéticas em estudo, pelo que foi possível concluir desde logo que os compostos em apreço não interferem na quantificação da mefedrona, metilona e MDPV. Em seguida, foi analisada uma solução contendo MDMA (1,7 mg/mL), por GC-MS, apurando-se que o tempo de retenção deste composto é de aproximadamente 9,1 minutos (**Anexo 6.57** e **Anexo 6.58**). Uma vez que este é um valor mais próximo do R_t das catinonas sintéticas, nomeadamente da metilona, porquanto a sua estrutura análoga a esta catinona, foram ainda analisados os resultados resultantes da análise por GC-FID. No entanto, verifica-se que o R_t do MDMA quando analisado por GC-FID, pela aplicação da mesma metodologia em validação para quantificação de catinonas sintéticas e análise no mesmo programa ('ANFET1'), é de 9,2 minutos, não interferindo com nenhum dos compostos em estudo (**Anexo 6.59**).

Por último, foram ainda analisadas duas soluções contendo padrões de cafeína (2,3 mg/mL) e lidocaína (2,6 mg/mL), por GC-MS, apurando-se que os respetivos tempos de retenção são de 12,2 e 12,6 minutos (cafeína - **Anexo 6.60** e **Anexo 6.61**; lidocaína - **Anexo 6.63** e **Anexo 6.64**). Uma vez que estes R_t se encontram numa zona mais próxima dos R_t das catinonas sintéticas em estudo, as mesmas soluções foram também analisadas por GC-FID, de modo a verificar o seu comportamento decorrente desta análise. Da análise aos cromatogramas obtidos, verifica-se que os R_t são de 12,1 e 12,6 minutos, para a cafeína e lidocaína respetivamente, sendo os picos muito bem definidos e estreitos (**Anexo 6.62** e **Anexo 6.65**), pelo que é possível concluir não interferem na quantificação da mefedrona, metilona e MDPV.

Em suma, é possível concluir que a catinona NEB é um interferente à quantificação da **mefedrona (1)** por GC-FID, na medida em que os sinais de resposta (picos de cromatograma) co-eluem, não sendo possível distingui-los, pelo que, quando a amostra em análise contiver estas duas substâncias em simultâneo, a mefedrona não deverá ser quantificada usando esta metodologia. O mesmo acontece para as catinonas α -PBP, MPPP e α -PVP, interferentes da **metilona (2)**. No que respeita ao **MDPV (3)**, verificou-se que nenhuma das 21 catinonas sintéticas estudadas funciona como interferente à sua quantificação pela aplicação desta metodologia. As restantes substâncias analisadas, quer da classe das anfetaminas, quer os adulterantes mais frequentes de produtos com catinonas sintéticas, não demonstraram interferir com a quantificação das três catinonas em estudo pela aplicação da metodologia em apreço.

3.1.3 CALIBRAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

A escolha de um modelo de calibração que descreva uma resposta instrumental adequada à quantificação de um analito é necessária, pelo que a relação entre a concentração do analito na amostra e a resposta analítica correspondente deve ser avaliada [99]. A função utilizada para descrever esta relação é habitualmente designada de curva de calibração [86], [88].

Para que a curva de calibração possa ser utilizada para calcular o teor de determinado analito numa amostra, é necessário que a resposta instrumental que lhe deu origem seja descrita através de modelos de regressão matemáticos. O objetivo de uma análise de regressão é encontrar um modelo que permite prever os valores assumidos por uma variável independente (x) quando as variáveis dependentes (y) são conhecidas, definindo determinado tipo de relação entre as variáveis [107]. Para estimar o resultado de um método de quantificação com incerteza associada, tendo por base um modelo de regressão, é essencial que se tenha em conta a tendência média do sinal instrumental em função do teor de analito (linearidade), assim como o comportamento da dispersão da resposta instrumental na gama de trabalho (homoscedasticidade). A dispersão da resposta instrumental é feita pela avaliação da homogeneidade de variâncias, e esta avaliação irá condicionar a seleção do modelo de regressão aplicado. Por sua vez o modelo de regressão é avaliado quanto à finalidade do seu ajuste aos dados experimentais [87], [90], [91]. Para que determinado método possa fornecer resultados analíticos diretamente proporcionais à concentração de um analito em determinada amostra, numa determinada gama de trabalho, é necessário que a curva de calibração seja linear. No modelo de regressão linear simples, a relação entre as variáveis é estabelecida por uma linha reta, o que facilita a aplicação do método de quantificação. No entanto, assumir erradamente a linearidade do modelo de calibração, poderá trazer erros sistemáticos significativos ao resultado da quantificação [91].

Depois de verificado se a curva de calibração na gama de trabalho em estudo é adequada, é então necessário decidir como deve ser implementada a quantificação do ponto de vista metodológico. Uma das estratégias tem por base a consideração do número de padrões a empregar, o que dará origem a calibrações multiponto ou monoponto [108]. A calibração multiponto é na maioria das vezes aplicada, envolvendo o uso de diferentes pontos de calibração para calcular o teor de determinado analito numa amostra. Já a calibração monoponto, envolve o uso de uma única solução de referência para quantificação do analito alvo. Se for possível a aplicação da calibração monoponto, esta deve ser a opção a tomar, o que vai permitir uma diminuição da carga de trabalho, assim como a economia significativa de recursos e tempo [109]. O uso de uma calibração do tipo monoponto assume que a resposta instrumental é linear e pressupõe que a regressão que descreve a curva de calibração passe na origem [108], [109]. Quando este pressuposto não se verifica, é necessário que o erro associado à falta do mesmo seja tido em conta, ponderando-se o desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração do tipo monoponto em relação à origem, no eixo das ordenadas [96].

3.1.3.1 GAMA DE TRABALHO E HOMOSCEDASTICIDADE

A gama de trabalho pode ser definida como o intervalo entre os valores da extremidade mínima e máxima de concentração esperada para determinado analito, durante o qual o método fornece resultados com uma incerteza aceitável. A extremidade mínima é limitada pelo limite de deteção (LD), mas não deve ser confundida com essa designação [84], [86], [94]. O LD é definido como sendo a concentração mínima de analito a partir da qual é possível obter um sinal de resposta que pode ser distinguida de zero, de uma forma confiável [89], [90].

Na metodologia a desenvolver foi assumido para todas as catinonas que a solução de 0,02 mg/mL seria o extremo mínimo apropriado, e a solução de 5 mg/mL seria o extremo máximo apropriado (conforme seção 2.3.3.1).

Neste sentido, depois de selecionados os extremos mínimo e máximo da gama de trabalho a utilizar, tendo em conta o método de rotina para quantificação por GC-FID, foi numa primeira fase necessário avaliar a adequação do extremo mínimo, tendo por base a folha de *Excel* disponibilizada por Bettencourt *et al.* [94]. Os resultados das 60 análises de GC-FID obtidas por 20 injeções de cada solução de concentração 0,02 mg/mL das catinonas sintéticas em estudo encontram-se discriminados no **Anexo 6.66**.

Para que os resultados sejam avaliados estatisticamente de forma correta, a presença de *outliers* (valores aberrantes) deve ser verificada. A presença destes valores pode condicionar o comportamento da variância dos dados assim como a adequação do ajuste, podendo afetar a validação do método em estudo. Um dos testes que pode ser utilizado para rastrear valores aberrantes é o Teste de *Grubbs*, que foi implementado na folha de *Excel* utilizada para verificação do LD [91], [94], [110]. A aplicação deste teste aos 60 resultados obtidos da análise das soluções de concentração mínima para cada catinona (extremos mínimos), permitiu detetar apenas um *outlier* para o composto mefedrona (repetição 19, conforme identificado no **Anexo 6.66**), que foi de imediato desprezado.

Assim sendo, os resultados indicam que, para os três compostos em estudo, o LD estimado tendo em conta os sinais obtidos para área relativa no extremo mínimo de concentração da gama de trabalho selecionada, sob condições de repetibilidade, é muito inferior ao valor dessa mesma concentração, conforme sumariado na **Tabela 3.5**. Deste modo, é possível concluir que o extremo mínimo definido para a gama de trabalho é adequado.

Tabela 3.5 - Compilação das concentrações correspondentes aos extremos mínimos da gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo, assim como do LD estimado, comprovando-se a sua adequação.

<i>Composto</i>	<i>Concentração (mg/mL)</i>	<i>LD estimado (mg/mL)</i>
Mefedrona (1)	0,032	0,000613
Metilona (2)	0,024	0,003120
MDPV (3)	0,032	0,005365

Após avaliada a presença de valores aberrantes, e atestada a utilização do extremo mínimo da gama de trabalho selecionada, segue-se a avaliação da homogeneidade de variâncias da resposta instrumental. [87]. Um dos testes que permite avaliar o comportamento de variâncias em diferentes níveis de concentração é o Teste F. A aplicação deste teste permite verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores das variâncias nos extremos da gama de trabalho [91], [94].

O teste F utiliza os sinais replicados de calibradores com a menor e maior concentração da gama de trabalho, pelo que os resultados das 60 análises das 20 injeções de três soluções com concentrações de 5 mg/mL (extremo máximo) de cada uma das catinonas em estudo (**Anexo 6.67**), foram inseridos na folha de *Excel* citada [94], em simultâneo com os resultados para o extremo mínimo já mencionados (**Anexo 6.66**). Depois de obtidos os sinais de resposta instrumental, o teste envolve a comparação da variância nestes extremos calculando a razão entre os valores que lhes são correspondentes, e um valor crítico tabelado ($F_{crítico}$) para n-1 graus de liberdade das variâncias ($v_{máximo}$ e $v_{mínimo}$) e um nível de confiança de 99%. A variância é dada pelo desvio padrão ao quadrado (S_I^2 , em que S_I é o desvio padrão).

(Equação 3.1)

$$\frac{S_{I_{máximo}}^2}{S_{I_{mínimo}}^2} \leq F_{crítico}^{99\%}{}_{v_{máximo}:v_{mínimo}}$$

Se a razão de variâncias for menor ou igual ao valor de $F_{crítico}$, verificando-se a (**Equação 3.1**), significa que as diferenças de variância não são consideradas estatisticamente significativas, pelo que a dispersão da resposta instrumental ao longo da gama de trabalho é constante, sendo a resposta considerada homoscedástica. Se o inverso acontecer, então a resposta será heteroscedástica [94].

De salientar que também para a aplicação deste teste é necessária a verificação da presença de *outliers*. Neste caso, e uma vez que a presença destes valores já tinha sido averiguada para os sinais de resposta correspondentes ao extremo mínimo da gama de trabalho, apenas foi necessário proceder à verificação dos mesmos para o extremo máximo. Também na zona de aplicação do Teste F da folha de *Excel* utilizada para esse efeito o Teste de *Grubbs* foi implementado. Também neste extremo apenas foram identificados *outliers* para o composto mefedrona (repetições 3, 7 e 12, conforme identificado no **Anexo 6.67**), sendo estes valores desprezados.

Assim sendo, os resultados indicam que, para os três compostos em estudo, a resposta instrumental é heteroscedástica, na medida em que o valor da razão das variâncias em todos os compostos, é muito superior ao valor de $F_{crítico}$, conforme sumariado na **Tabela 3.6**. Deste modo, é possível concluir que existem diferenças de variância estatisticamente significativas, o que deverá ser tido em conta na seleção do modelo de regressão a aplicar para o estudo da linearidade.

Tabela 3.6 - Compilação da razão entre as variâncias no extremo mínimo e máximo, para cada catinona em estudo, e dos valores de $F_{crítico}$, valor tabelado para n-1 graus de liberdade.

<i>Composto</i>	$\frac{S_{I_{máximo}}^2}{S_{I_{mínimo}}^2}$	$F_{crítico}^{99\%}_{v_{máximo}:v_{mínimo}}$
Mefedrona (1)	46661,10	$F_{crítico}^{99\%}_{16;18} = 3,64$
Metilona (2)	3003,23	$F_{crítico}^{99\%}_{19;19} = 3,43$
MDPV (3)	540,07	$F_{crítico}^{99\%}_{19;19} = 3,43$

3.1.3.2 LINEARIDADE

Como descrito, a validação de um método de quantificação pressupõe a avaliação da linearidade da resposta instrumental, na gama de trabalho em estudo. A linearidade pode ser descrita como a capacidade de um método para fornecer resultados analíticos (variável dependente) diretamente proporcionais à concentração de um analito em determinada amostra (variável independente), numa determinada gama de trabalho [88], [90], [111].

A avaliação da linearidade de uma função de calibração é uma questão de extrema importância para o desenvolvimento de um método analítico. O cálculo do coeficiente de correlação é frequentemente utilizado para o teste à linearidade de uma função de calibração, no entanto, este teste pode ser enganoso e não deve ser usado, exclusivamente, para avaliação da linearidade [112].

No estudo da linearidade assume-se a homoscedasticidade dos resultados, isto é, assume-se que a dispersão das medições é a mesma para cada padrão de calibração, pelo que será independente da concentração de analito. Assim, a dispersão pode ser caracterizada por um único desvio padrão. No entanto, tal nem sempre se verifica. Quando o desvio padrão das medições aumenta ligeiramente com a concentração dos padrões de calibração, os resultados são heteroscedásticos, e o desvio padrão deve ser expresso para cada padrão separadamente [112].

Quando a suposição de homoscedasticidade não é atendida para os dados analíticos, uma maneira simples e eficaz de verificar a linearidade é pela avaliação da adequação do modelo de regressão linear ponderado. Este modelo parte do pressuposto de que a incerteza associada ao eixo (x) é desprezável relativamente à precisão da resposta instrumental, ponderando a variação da dispersão da resposta instrumental a cada nível de analito ao longo da gama de trabalho. Assim, é selecionada a reta de regressão que minimiza os residuais ponderados [100].

Um dos testes estatísticos para avaliar a qualidade do ajuste de modelos ponderados a dados heteroscedásticos é o Teste χ^2 (Chi-Quadrado). Este teste permite determinar a existência de diferenças significativas entre os valores esperados e os valores observados, nomeadamente pelo cálculo do somatório ponderado dos quadrados das diferenças entre a média dos valores obtidos a partir da resposta

instrumental e o valor previsto pelo modelo de regressão dessa resposta, nos diferentes pontos de calibração estudados [100].

Assim, a linearidade da resposta instrumental para a gama de concentrações, Padrão 1 (0,02 mg/mL), Padrão 2 (1,25 mg/mL), Padrão 3 (2,5 mg/mL), Padrão 4 (1,75 mg/mL) e Padrão 5 (5 mg/mL), foi avaliada através da aplicação deste teste de qualidade de ajuste, para um intervalo de confiança de 99%.

Para tal, foram construídas curvas diárias durante 10 dias, para cada uma das três catinonas sintéticas em estudo, com 5 padrões de calibração cada, tendo cada solução de padrão sido analisada em duas repetições diárias. Os resultados das 300 análises realizadas nesse sentido encontram-se discriminados nos **Anexo 6.68**, **Anexo 6.69** e **Anexo 6.70**. Para cada dia e cada composto, foi feita a média das repetições diárias (**Anexo 6.71**, **Anexo 6.72** e **Anexo 6.73**), sendo estes valores utilizados para a construção de 10 curvas de calibração (equações das retas em **Anexo 6.74**).

Estes resultados (média das repetições diárias) foram submetidos ao Teste χ^2 , previamente implementado numa folha de *Excel*, no âmbito de um trabalho previamente publicado [100], para verificar a sua adequação ao modelo de regressão linear ponderado.

Para a **metilona** e **MDPV**, o teste aplicado indica uma linearidade da resposta instrumental entre o Padrão 1 (0,02 mg/mL) e o Padrão 4 (3,75 mg/mL), isto é, excluindo o Padrão 5 (5 mg/mL), considerando os 5 primeiros sinais de réplicas de padrão por nível de concentração (sinais destacados nos **Anexo 6.72** e **Anexo 6.73**). Para a **mefedrona**, o teste aplicado indica igualmente um ajuste ao modelo de regressão linear ponderado entre o Padrão 1 e 4, mas considerando os 5 últimos sinais de réplicas de padrão por nível de concentração (sinais destacados no **Anexo 6.71**).

Esta avaliação foi concretizada pela utilização de apenas 5 réplicas, uma vez que as 10 réplicas detetam desvios à linearidade que não são relevantes quando utilizada uma calibração monoponto, obtida com um sinal de calibração.

Deste modo, a gama de trabalho na qual se verifica linearidade de resultados e que deve ser aplicada no âmbito da metodologia em desenvolvimento, é entre o extremo mínimo de 0,02 mg/mL (Padrão 1) e o extremo máximo de 3,75 mg/mL (Padrão 4), não devendo ser pesada uma massa de amostra superior a 18,75 mg na aplicação desta metodologia na rotina do LPC-PJ. No entanto, é de salientar que este valor de massa é o limite máximo assumindo que o grau de pureza da substância é de 100 %. Se for necessário pesar uma massa de amostra superior a 18,75 mg, esta metodologia apenas poderá ser utilizada para quantificar a substância nela presente, se o sinal de resposta do aparelho for igual ou inferior ao sinal de resposta do Padrão 4. De facto, a maioria das amostras analisadas na rotina do LPC-PJ apresentam um grau de pureza inferior a 50 %, pelo que é muito provável que o sinal de resposta das amostras de material apreendido em Portugal, seja efetivamente inferior ao sinal de resposta do Padrão 4.

3.1.4 ESTIMATIVA DA INCERTEZA

A etapa final da validação de uma metodologia analítica, e que representa o culminar do processo, é a estimativa da incerteza associada ao método em desenvolvimento [88]. O termo incerteza (de medição) é definido no Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) como um parâmetro não negativo associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda. A designação mensuranda define a grandeza que se pretende medir no âmbito do desenvolvimento de uma metodologia [86], [92].

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para avaliar a incerteza de medição, sendo que de uma maneira geral devem ser definidos os valores alvo das características de desempenho de medição, que podem ser convertidos numa “incerteza alvo”, caso essas características reflitam os efeitos aleatórios e sistemáticos mais relevantes que afetam as medições. De acordo com o VIM, o termo “incerteza alvo”

pode definir-se como uma incerteza de medição, especificada como um limite superior, e decidida com base na utilização prevista dos resultados da medição. Esta permite resumir todas as fontes de incerteza, e representa a incerteza máxima admissível [86], [93]. Uma das estratégias mais perceptíveis para avaliação da incerteza de medição é a abordagem sub-analítica, ou “*bottom-up*”, que diferencia todos os procedimentos de medição envolvidos na metodologia em componentes individuais de incerteza, cada qual responsável por efeitos aleatórios e sistemáticos, quantificando-os e combinando o seu efeito – incerteza combinada [92], [94], [95]. No caso da incerteza de medição ser superior à “incerteza alvo”, é necessária uma otimização no sentido de reduzir a incerteza de medição, tornando-a adequada para o uso pretendido. A abordagem “*bottom-up*” produz modelos mais adequados para esta otimização, podendo ser estabelecida uma ligação direta com os efeitos analíticos que poderão reduzir a incerteza global do método [93].

Apesar de este tipo de abordagem requerer o domínio de cálculos complexos, nomeadamente com vista à determinação da incerteza combinada da metodologia em validação, existem métodos desenvolvidas com o intuito de simplificar a sua aplicação. J. Kragten desenvolveu um método simples e rápido para ajudar os analistas nesta matéria, pela reprodução numérica da lei da propagação da incerteza, criando um modelo de folha de cálculo que pretende minimizar o risco de erros [96].

A avaliação da incerteza envolve diferentes fases. A primeira consiste na definição da mensuranda, que engloba a determinação da relação matemática entre esta e os parâmetros dos quais depende. Em seguida procede-se à determinação, quantificação e combinação das fontes de incerteza. E, por último, calcula-se a incerteza expandida que permite associar um nível de confiança elevado ao resultado final, devendo o resultado ser reportado de acordo com a metodologia em desenvolvimento.

3.1.4.1 ESPECIFICAÇÃO DA MENSURANDA

A definição da mensuranda representa a primeira etapa com vista à obtenção de uma estimativa de incerteza associada a um resultado de medição. Para tal, é necessário exprimir de forma clara e inequívoca, qual a grandeza que se pretende medir, definindo uma expressão algébrica quantitativa que relaciona o valor da mensuranda aos parâmetros dos quais esta depende [92].

Uma vez que o objetivo do presente trabalho é a validação de um método de quantificação de cationas sintéticas por GC-FID, a mensuranda é a fração mássica de cationas sintéticas em estudo (analito), eventualmente presentes em amostras de material apreendido em Portugal. Por norma, as cationas sintéticas são vendidas sob a forma de pó, pelo que o método em validação tem em conta este tipo de matriz.

O procedimento analítico em desenvolvimento consiste na análise de cationas sintéticas, quando em solução (solvente e padrão interno), por GC-FID, com vista à obtenção de sinais de resposta que permitam a determinação da respetiva concentração, após calibração, e em simultâneo um padrão da cationa sintética que se pretende quantificar, nas mesmas condições de análise (conforme **Figura 3.7**).

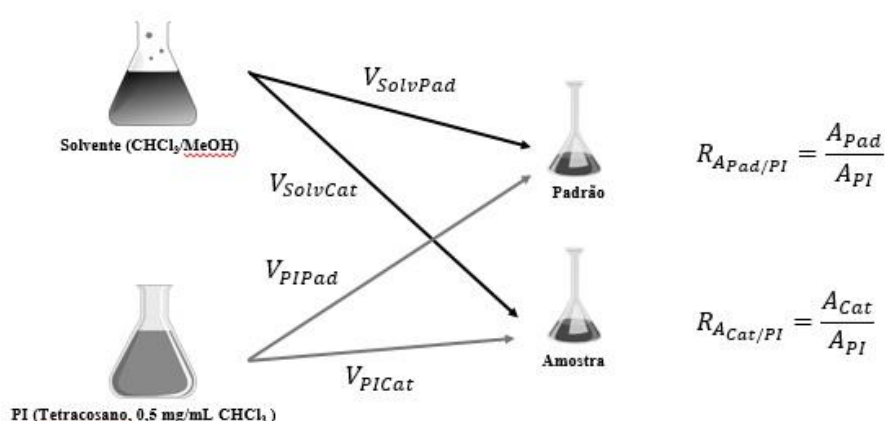


Figura 3.7 - Esquema do procedimento analítico em desenvolvimento, que consiste na análise de duas soluções em simultâneo por GC-FID, uma para a catinona sintética que se pretende quantificar e uma para o padrão que lhe é correspondente, com vista à obtenção dos sinais de resposta que permitam a determinação da concentração da catinona sintética alvo por extrapolação. Em que $V_{SolvPad}$ e $V_{SolvCat}$ representam o volume de solvente adicionado ao padrão e catinona alvo, respetivamente, V_{PIPad} e V_{PICat} representam o volume de PI adicionado ao padrão e catinona alvo, respetivamente, A_{Pad} , A_{Cat} e A_{PI} as áreas de sinais de resposta do padrão, catinona alvo e PI, respetivamente, e $R_{APad/PI}$ e $R_{ACat/PI}$ as respetivas razões.

A fração mássica de um analito ($W_{analito}$) pode ser expressa através do quociente entre a massa de analito ($m_{analito}$) e a massa total da amostra (m_A). No caso em apreço, o analito é correspondente à catinona sintética que se pretende quantificar, pelo que $m_{analito} = m_{Cat}$, e que se encontra presente numa determinada amostra com massa m_A ((Equação 3.2).

(Equação 3.2)

$$W_{analito} = \frac{m_{analito}}{m_{amostra}} \Leftrightarrow W_{Cat} = \frac{m_{Cat}}{m_A}$$

Uma vez que a massa de analito pode ser calculada a partir da multiplicação entre a concentração e o volume da solução, é possível converter a (Equação 3.2 na (Equação 3.3, em que C_{Cat} representa a concentração de catinona sintética em estudo, e o $V_{Cat(solv)}$ e o $V_{Cat(PI)}$ identificam o volume de solvente e PI, respetivamente, adicionados à solução da amostra que contem a catinona (ver Figura 3.7).

(Equação 3.3)

$$W_{Cat} = \frac{C_{Cat} \times (V_{Cat(solv)} + V_{Cat(PI)})}{m_A}$$

Neste caso, o volume de solução da catinona sintética que se pretende quantificar, que estará presente numa amostra de material apreendido em Portugal, é igual ao volume total de solução dessa amostra, uma vez que se trata da mesma solução. Assim, a soma do volume de solvente e PI adicionados é semelhante, podendo apenas ser alterada a descrição, convertendo a (Equação 3.3 na seguinte:

(Equação 3.4)

$$W_{Cat} = \frac{C_{Cat} \times (V_{A(solv)} + V_{A(PI)})}{m_A}$$

Depois de obtida a regressão linear que permitiu a calibração do método de quantificação em estudo, é possível afirmar que a área de um sinal de resposta é diretamente proporcional à concentração do composto que lhe deu origem (de acordo com o esquema da Figura 3.8).

Uma vez que o procedimento experimental em validação inclui a adição de um padrão interno (PI), esta premissa deve ser reformulada, sendo então possível afirmar que a razão entre a área de um sinal

de resposta e a área do sinal de resposta do PI é diretamente proporcional à concentração do composto que deu origem ao primeiro sinal. Assim, define-se que a razão entre a área do sinal de resposta do padrão e a área do sinal de resposta do PI, bem como a razão entre a área do sinal de resposta da catinona sintética alvo e a área do sinal de resposta do PI, são diretamente proporcionais à concentração do padrão e concentração da catinona sintética alvo na amostra, respetivamente (conforme **Figura 3.8** e (**Equação 3.5**)). Assim, é possível chegar à equação que permite determinar a concentração de analito, numa determinada amostra, através do método de quantificação por utilização de uma regressão de calibração ((**Equação 3.5**)).

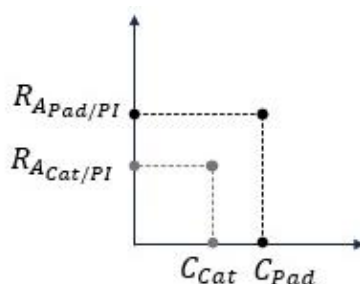


Figura 3.8 - Esquema da proporção existente entre a razão entre a área do sinal de resposta do padrão de calibração e a área do sinal de resposta do PI e a concentração de padrão, assim como entre a razão entre área do sinal de resposta da catinona sintética alvo e a área do sinal de resposta do PI e a concentração de catinona sintética. Em que C_{Cat} e C_{Pad} representam a concentração de catinona sintética alvo e de padrão, respetivamente, e $R_{A_{Pad}/PI}$ e $R_{A_{Cat}/PI}$ representam a razão das áreas entre o sinal de resposta do padrão e catinona sintética, respetivamente, e o sinal de resposta do PI.

(Equação 3.5)

$$\frac{R_{A_{Pad}/PI}}{C_{Pad}} = \frac{R_{A_{Cat}/PI}}{C_{Cat}} \Leftrightarrow C_{Cat} = \frac{R_{A_{Cat}/PI} \times C_{Pad}}{R_{A_{Pad}/PI}}$$

No entanto, deve ainda ser tido em conta um parâmetro da qual a incerteza associada ao valor de fração mássica depende, quando obtida pela utilização do tipo de calibração monoponto. Este tipo de calibração assume que a regressão que descreve a curva de calibração passa na origem, no entanto, quando este pressuposto não se verifica, é necessário que o erro associado à falta do mesmo seja tida em conta, ponderando-se o desvio máximo da regressão em relação à origem, no eixo das ordenadas.

Assim, deve ser ponderado o erro associado ao desvio máximo existente entre o valor da concentração do analito estimada pela utilização da reta ótima (mais confiável) de calibração da resposta instrumental “real” (C_{Cat}), e a concentração estimada a partir de uma curva que mimetiza resposta instrumental mais divergente esperada (\bar{C}_{Cat}). Este erro pode ser estimado pela diferença entre o valor de a (ordenada na origem na reta ótima), e a ordenada na origem da curva que mimetiza a resposta instrumental mais divergente, a_{max} , conforme **Figura 3.9**.

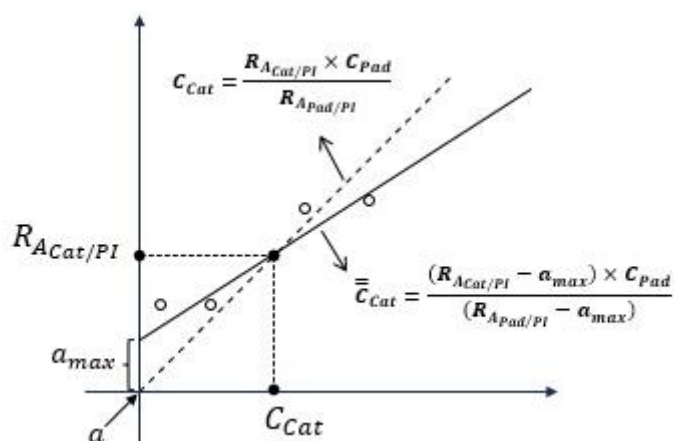


Figura 3.9 - Representação esquemática da reta ótima (mais confiável) de calibração da resposta instrumental “real” – tracejada, e da reta que mimetiza a resposta instrumental mais divergente esperada, pela aplicação de uma calibração do tipo monoponto – linha contínua.

Assim:

(Equação 3.6)

$$C_{Cat} = \frac{R_{A_{Cat/PI}} \times C_{Pad}}{R_{A_{Pad/PI}}} \Rightarrow \bar{C}_{Cat} = \frac{(R_{A_{Cat/PI}} - a_{max}) \times C_{Pad}}{(R_{A_{Pad/PI}} - a_{max})}$$

Pelo que na (Equação 3.4) é possível substituir C_{Cat} ((Equação 3.5)) pela expressão obtida na (Equação 3.6, de \bar{C}_{Cat} , obtendo-se a seguinte equação:

(Equação 3.7)

$$W_{Cat} = \frac{(R_{A_{Cat/PI}} - a_{max}) \times C_{Pad} \times (V_{A(Solv)} + V_{A(PI)})}{(R_{A_{Pad/PI}} - a_{max}) \times m_A}$$

A partir desta equação é ainda possível dissecar a representação de C_{Pad} , uma vez que este valor pode ser obtido através do quociente entre a massa de padrão e o volume da solução (solvente e padrão interno). No entanto, uma vez que determinado composto apenas pode ser utilizado como padrão de referência após cuidadosa caracterização, garantindo a sua identidade e pureza, um dos fatores que deve ser tido em conta para o cálculo de C_{Pad} é o grau de pureza (Pur). Assim, equação correta para a sua determinação é:

(Equação 3.8)

$$C_{Pad} = \frac{m_{Pad} \times Pur}{V_{Pad(Solv)} + V_{Pad(PI)}}$$

Substituindo na (Equação 3.7) a C_{Pad} pela expressão obtida na (Equação 3.8, obtém-se a seguinte equação:

(Equação 3.9)

$$W_{Cat} = \frac{(R_{A_{Cat/PI}} - a_{max}) \times m_{Pad} \times Pur \times (V_{A(Solv)} + V_{A(PI)})}{(R_{A_{Pad/PI}} - a_{max}) \times m_A \times (V_{Pad(Solv)} + V_{Pad(PI)})}$$

Esta expressão geral permite calcular a fração mássica da catinona em estudo, numa determinada amostra, uma vez que todos os elementos podem ser obtidos a partir da análise feita de acordo com o procedimento analítico desenvolvido. Permite ainda auxiliar na identificação das fontes de incerteza das quais depende o valor da fração mássica determinado pela aplicação da metodologia em desenvolvimento.

3.1.4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA

A etapa seguinte diz respeito à determinação das fontes de incerteza, que no fundo é realizada em simultâneo com a especificação da mensuranda, na medida em que essa grandeza deve ser definida em relação aos parâmetros das quais depende.

Conforme perceptível na (Equação 3.9, as fontes de incerteza que afetam a medição e, por sua vez, a determinação da fração mássica de catinona sintética numa determinada amostra, são: **A** - Incerteza associada à razão das áreas dos sinais obtidos a partir da análise instrumental [$u(R_{ACat/PI})$ e $u(R_{APad/PI})$]; **B** - Incerteza associada à ponderação do desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração, porquanto a não verificação do pressuposto de que a mesma passa na origem, e que é necessário à utilização de uma calibração monoponto [$u(a_{max})$]; **C** - Incerteza associada às massas pesadas de amostra e padrão de calibração medidas numa balança analítica [$u(m_A)$ e $u(m_{Pad})$]; **D** - Incerteza associada aos volumes medidos de solvente e PI medidos com dispensadores [$u(V_{A(Solv)})$, $u(V_{A(PI)})$, $u(V_{Pad(Solv)})$ e $u(V_{Pad(PI)})$]; e **E** - Incerteza associada ao grau de pureza dos padrões de referência utilizados [$u(Pur)$].

Uma das maneiras que melhor permite a compreensão de todas as componentes de incerteza que poderão estar associadas à mensurando, é a elaboração de um diagrama de Ishikawa, ou diagrama de causa/efeito. Este consiste num vetor principal, que converge para a mensuranda, e no qual confluem vetores secundários que representam as diferentes componentes, demonstrando como se relacionam entre si e indicando a sua influência na incerteza do resultado. Os vetores secundários podem por sua vez conter ramificações. A compilação das fontes de incerteza pela elaboração deste diagrama ajuda inclusivamente a evitar a contagem da mesma componente duplamente [92], [100].

O diagrama de causa/efeito para a metodologia de quantificação de catinonas sintéticas em estudo encontra-se na Figura 3.10.

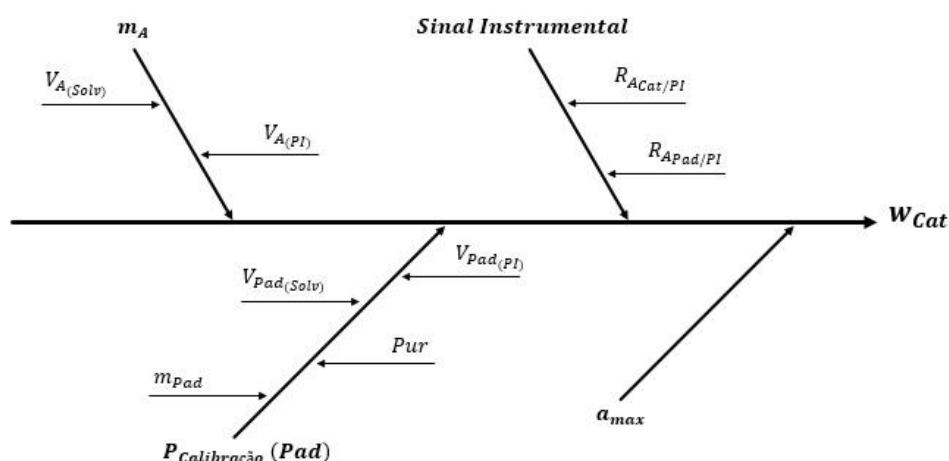


Figura 3.10 - Diagrama de causa/efeito para a metodologia de quantificação de catinonas sintéticas em estudo, sendo possível constatar a grandeza correspondente à mensuranda, w_{Cat} , bem como todos os parâmetros de incerteza dos quais depende (ver seção 3.1.4.1).

De acordo com o Guia para a Quantificação de Incertezas em Métodos Analíticos, publicado pela Eurachem [92], existem ainda algumas fontes de incerteza que poderiam ser tidas em conta, como a temperatura ou o efeito da matriz. No entanto, para a metodologia desenvolvida estas componentes não afetam a estimativa da incerteza global, uma vez que a temperatura do laboratório onde o procedimento será realizado não sofre alterações consideráveis, sendo climatizado a 21 °C. De facto, sendo esta metodologia apenas para aplicação neste laboratório, todas as eventuais discrepâncias na temperatura que ocorram, terão influência na amostra, mas também no padrão de calibração que será analisado em simultâneo, pelo que não influencia diretamente os resultados obtidos no âmbito da quantificação da catinona sintética alvo. No que respeita aos efeitos da matriz, tais não se verificam, na medida em que as amostras que habitualmente contêm catinonas sintéticas se encontram sob a forma de pó, que é facilmente dissolvido no solvente utilizado, o que corresponde a uma matriz muito simples, não causando efeitos significativos.

É ainda de evidenciar que existe uma outra componente de incerteza que poderia ser incluída nos parâmetros que poderiam influenciar a grandeza em estudo. Conforme descrito, quando a fração mássica é obtida pela utilização do tipo de calibração monoponto, assume-se que a regressão que descreve a curva de calibração passa na origem (ver seção 3.1.4.1), mas também que a regressão é linear. No entanto, este parâmetro não deve ser inserido como componente de incerteza, uma vez que a linearidade foi previamente comprovada.

3.1.4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DE INCERTEZA

Depois de identificadas as fontes de incerteza das quais a mensuranda depende, a incerteza decorrente dessas fontes deve ser quantificada. Conforme referido, existem diferentes estratégias que podem ser utilizadas nesse sentido, no entanto, neste trabalho foi aplicada uma abordagem “*bottom-up*”, que diferencia cada fonte de incerteza individualmente, sendo posteriormente combinadas [92].

Com o objetivo de simplificar a disposição dos resultados obtidos para cada componente de incerteza e, de seguida, facilitar os cálculos necessários à estimativa da incerteza combinada do método em validação (ver seção 3.1.4.4), foi concebida uma folha de cálculo, para cada catinona em estudo, tendo por base o trabalho de J. Kragten, publicado em 1994 (**Anexo 6.75**, **Anexo 6.76** e **Anexo 6.77**) [96]. Esta folha de cálculo permite simplificar os cálculos para o analista, na medida em que, no final, será apenas necessário preencher os espaços indicados, com os resultados da análise realizada, na rotina do LPC-PJ.

A - Sinal Instrumental

A primeira componente identificada diz respeito ao sinal instrumental obtido a partir do aparelho de GC-FID, nomeadamente pela incerteza associada à razão das áreas dos sinais obtidos instrumentalmente [$u(R_{A_{Cat/PI}})$ e $u(R_{A_{Pad/PI}})$]. Esta componente foi estimada pela repetibilidade da resposta instrumental, que representa uma das medidas que permite a avaliação da precisão de uma metodologia analítica.

O termo precisão designa a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Esta é uma componente essencial na avaliação da incerteza geral de um método, no entanto, é de salientar que a avaliação da precisão de um método analítico não é suficiente para estimar a incerteza da medição, sendo necessário ter em conta as restantes fontes de incerteza [92]. Uma das medidas existentes para avaliar essa dispersão, é o estudo da repetibilidade, que exprime a variabilidade observada em condições operacionais tão estáveis quanto possível, isto é, dentro de um mesmo laboratório, durante um curto período, com o mesmo operador e equipamento [87], [92].

A avaliação das restantes medidas para avaliação da precisão de uma metodologia analítica em validação, reprodutibilidade e precisão intermédia, não foi necessária para o caso em apreço, uma vez

que o método em validação é para futura aplicação no mesmo laboratório do LPC-PJ, pelo mesmo analista, e sob as mesmas condições analíticas.

Assim, esta incerteza foi determinada através do cálculo do desvio padrão associado à repetibilidade da resposta instrumental, que foi avaliada através da análise dos cinco padrões de calibração selecionados, em duplicado, ao longo de 10 dias não seguidos, para cada uma das três catinonas sintéticas em estudo. Os resultados da razão das áreas relativas (razão entre a área do sinal de resposta da catinona sintética e a área do sinal de resposta do PI), a partir da análise de 2 repetições por padrão de calibração e por dia, são os mesmos utilizados para avaliação da linearidade do método, e encontram-se compilados entre o **Anexo 6.68** e **Anexo 6.73**.

Para cada uma das catinonas sintéticas em estudo, e para cada padrão de calibração na gama de trabalho estudada, foi calculado o desvio padrão associado às 2 repetições diárias realizadas (S_r). Estes resultados encontram-se sumariados nos **Anexo 6.78** a **Anexo 6.80**. Em seguida, com o intuito de estimar a variância dos resultados nos 10 dias de análise, foi calculado o desvio padrão agrupado ($S_{r\text{agrupado}}$), também para cada uma das catinonas sintéticas e para cada padrão de calibração na gama de concentração estudada. Os resultados encontram-se sumariados na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 - Valores de desvio padrão agrupado calculado a partir dos resultados de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração na gama de trabalho, analisadas ao longo de 10 dias (ver seção 2.3.4.1).

<i>Catinona Sintética</i>	<i>S_ragrupado</i>			
	Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Padrão 2 (1,270 mg/mL)	Padrão 3 (2,586 mg/mL)	Padrão 4 (3,800 mg/mL)
Mefedrona (1)	0,0023	0,0383	0,0824	0,2520
	Padrão 1 (0,024 mg/mL)	Padrão 2 (1,274 mg/mL)	Padrão 3 (2,584 mg/mL)	Padrão 4 (3,758 mg/mL)
Metilona (2)	0,0008	0,0890	0,1403	0,1595
	Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Padrão 2 (1,244 mg/mL)	Padrão 3 (2,536 mg/mL)	Padrão 4 (3,744 mg/mL)
MDPV (3)	0,0010	0,0153	0,0460	0,1297

Os valores correspondentes ao $u(R_{A_{\text{pad}}/PI})$, para cada composto e cada padrão de calibração, são calculados através do quociente entre o valor respectivo de $S_{r\text{agrupado}}$ e a $\sqrt{2}$, porquanto as duas réplicas diárias analisadas (**Equação 3.10**). Na folha de cálculo concebida (exemplo **Anexo 6.75**), este valor é selecionado de acordo com o padrão de referência utilizado aquando da análise de uma amostra problema que se pretende quantificar. O padrão de referência utilizado será por sua vez selecionado de acordo com a concentração da solução da amostra que o analista pretende estudar, com vista à quantificação de determinado analito.

(Equação 3.10)

$$u(R_{A_{\text{pad}}/PI}) = \frac{S_{r\text{agrupado}}}{\sqrt{2}}$$

Tabela 3.8 - Valores de incerteza associados à razão da área do sinal do Padrão de Calibração e a área do sinal do PI adicionado à solução.

<i>Catinona Sintética</i>	<i>u(R_{A_{pad}/PI})</i>			
	Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Padrão 2 (1,270 mg/mL)	Padrão 3 (2,586 mg/mL)	Padrão 4 (3,800 mg/mL)
Mefedrona (1)	0,0016	0,0271	0,0583	0,1782
	Padrão 1 (0,024 mg/mL)	Padrão 2 (1,274 mg/mL)	Padrão 3 (2,584 mg/mL)	Padrão 4 (3,758 mg/mL)
Metilona (2)	0,0006	0,0630	0,0992	0,1128
	Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Padrão 2 (1,244 mg/mL)	Padrão 3 (2,536 mg/mL)	Padrão 4 (3,744 mg/mL)
MDPV (3)	0,0007	0,0108	0,0325	0,0917

Verifica-se que o erro associado a esta componente aumenta com o aumento da concentração do padrão de calibração, sendo que é muito menor em toda a gama de concentrações para a catinona sintética 3.

Os valores de $u(R_{A_{Cat/PI}})$ são selecionados de acordo com os resultados de $R_{A_{Cat/PI}}$ obtidos no âmbito da análise da amostra na qual se encontra o analito que se pretende quantificar. Quando os valores obtidos para $R_{A_{Cat/PI}}$ são inferiores aos valores médios diários obtidos para o Padrão de Calibração 1 no âmbito da produção das curvas de calibração, de cada uma das catinonas sintéticas em estudo, o valor de $u(R_{A_{Cat/PI}})$ será igual ao valor da incerteza associada à razão da área do sinal desse padrão com o PI ($u(R_{A_{Pad1/PI}})$), se os valores obtidos para $R_{A_{Cat/PI}}$ são superiores aos valores médios diários obtidos para o Padrão de Calibração 1 e inferiores aos valores médios diários obtidos para o Padrão de Calibração 2 no âmbito da produção das curvas de calibração, de cada uma das catinonas sintéticas em estudo, o valor de $u(R_{A_{Cat/PI}})$ será igual ao valor da incerteza associada à razão da área do sinal desse padrão com o PI ($u(R_{A_{Pad2/PI}})$), e assim sucessivamente conforme **Tabela 3.9**.

Tabela 3.9 – Sumário das condições que permitem apurar aos valores de incerteza associados à razão da área do sinal do analito (catinona sintética alvo) e a área do sinal do PI adicionado à solução. Em que $\overline{A_{Pad/PI}}$ (diária) representa a média diária das áreas dos sinais obtidos correspondentes aos padrões de referência (Pad1 – 5).

<i>Se:</i>	<i>Então:</i>
$R_{A_{Cat/PI}} \leq \overline{A_{Pad1/PI}} (diária)$	$u(R_{A_{Cat/PI}}) = u(R_{A_{Pad1/PI}})$
$\overline{A_{Pad1/PI}} (diária) < R_{A_{Cat/PI}} \leq \overline{A_{Pad2/PI}} (diária)$	$u(R_{A_{Cat/PI}}) = u(R_{A_{Pad2/PI}})$
$\overline{A_{Pad2/PI}} (diária) < R_{A_{Cat/PI}} \leq \overline{A_{Pad3/PI}} (diária)$	$u(R_{A_{Cat/PI}}) = u(R_{A_{Pad3/PI}})$
$\overline{A_{Pad3/PI}} (diária) < R_{A_{Cat/PI}} \leq \overline{A_{Pad4/PI}} (diária)$	$u(R_{A_{Cat/PI}}) = u(R_{A_{Pad4/PI}})$
$R_{A_{Cat/PI}} > \overline{A_{Pad4/PI}} (diária) e \geq \overline{A_{Pad5/PI}} (diária)$	$u(R_{A_{Cat/PI}}) = u(R_{A_{Pad5/PI}})$

Apesar de a gama de trabalho aplicada no âmbito da metodologia em desenvolvimento, ser entre o Padrão 1 (0,02 mg/mL) e o Padrão 4 (3,75 mg/mL), a folha de *excel* está preparada para a seleção do Padrão 5. No entanto, uma vez que não se verifica linearidade aquando da utilização deste último Padrão, o mesmo não deverá ser utilizado, não devendo os valores de $R_{A_{Cat/PI}}$ ser superiores a $\overline{A_{Pad4/PI}}$ (diária).

B - Desvio Máximo da Regressão que Descreve a Curva de Calibração

A segunda componente de incerteza identificada diz respeito ao desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração [$u(a_{max})$]. Esta é uma componente que deve ser tida em conta quando os pressupostos referentes à utilização de uma calibração do tipo monoponto não se verificam.

Conforme referido, a utilização de uma calibração do tipo monoponto pressupõe que a regressão que descreve a curva de calibração originada seja linear e passe na origem [108], [109]. No entanto, quando este pressuposto não se verifica, é necessário que o erro associado à falta do mesmo seja tida em conta, ponderando-se o desvio máximo da regressão em relação à origem, no eixo das ordenadas (conforme esquemas nas **Figura 3.9** e **Figura 3.11**).

O valor de $u(a_{max})$ é então correspondente ao maior valor de ordenada na origem resultante das 10 curvas de calibração diárias, obtidas para cada uma das três catinonas sintéticas em estudo, menos o valor de a (ordenada na origem na reta ótima), que é igual a zero.

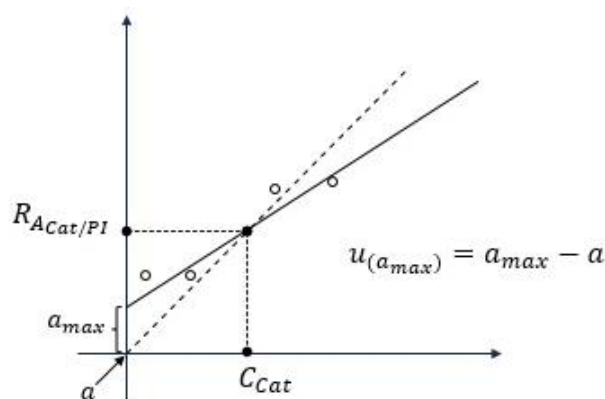


Figura 3.11 - Representação esquemática de $u(a_{max})$, correspondente ao desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração a partir de apenas um ponto (monoponto) em relação à origem, no eixo das ordenadas.

Os resultados de $u(a_{max})$ para cada catinona em estudo encontram-se sumariados na **Tabela 3.10**, tendo sido obtidos pela diferença entre o maior valor de ordenada na origem resultante das 10 curvas de calibração diárias e zero, de acordo com as equações das retas litadas em **Anexo 6.74**.

Tabela 3.10 - Valores $u(a_{max})$ que representam a incerteza associada ao desvio máximo da regressão que descreve a curva de calibração, para cada uma das três catinonas em estudo.

Catinona Sintética	$u(a_{max})$
Mefedrona (1)	0,2921
Metilona (2)	0,5515
MDPV (3)	0,2594

C - Massas Pesadas

A componente em seguida identificada diz respeito à incerteza associada às massas pesadas de amostra e padrão de calibração medidas numa balança analítica [$u(m_A)$ e $u(m_{Pad})$].

Fatores como o procedimento de pesagem, que pode alterar com a mudança de analista, os princípios físicos como a temperatura do laboratório, ou a instrumentação em si onde a pesagem é feita, podem afetar a qualidade de uma pesagem, devendo, à partida, ser tidos em conta aquando da quantificação da incerteza que lhe está associada. No entanto, para o caso em apreço, e conforme já referido, o procedimento será para execução no mesmo laboratório e pelo mesmo analista, de uma forma rotineira, pelo que os dois primeiros fatores podem ser desprezados.

Deste modo, a única componente a ter em conta no âmbito do desenvolvimento deste procedimento para quantificação de catinonas sintéticas por GC-FID, é a instrumentação, no caso, a balança analítica utilizada. A incerteza linear associada às massas medidas é então estimada pela combinação linear das componentes de dois elementos de incerteza, a que está associada à calibração da balança ($u_{balança}^{calib}$) e a que está associada à repetibilidade da mesma ($u_{balança}^{rep}$), através da seguinte equação:

(Equação 3.11)

$$u(m) = \sqrt{(u_{balança}^{calib})^2 + (u_{balança}^{rep})^2}$$

Por sua vez a incerteza associada à calibração da balança ($u_{balança}^{calib}$) é calculada a partir do quociente entre a tolerância que é fornecida pelo fabricante e $\sqrt{3}$, considerando uma distribuição retangular uniforme ((Equação 3.12).

(Equação 3.12)

$$u_{balança}^{calib} = \frac{tolerância}{\sqrt{3}}$$

Enquanto a incerteza associada à repetibilidade da balança ($u_{balança}^{rep}$) é estimada a partir do cálculo do desvio padrão da repetibilidade da mesma ($S_{r_{balança}}$), conforme (Equação 3.13).

(Equação 3.13)

$$u_{balança}^{rep} = S_{r_{balança}}$$

No entanto, é ainda necessário ter em conta que as massas em apreço são estimadas por diferença, isto é, após efetuada a tara do componente onde a amostra será pesada ($massa = massa_{bruta} - massa_{tara}$). Assim, as incertezas citadas anteriormente, devem ser contabilizadas 2 vezes, na medida em que as duas medições da massa (bruta e tara) são independentes em termos de repetibilidade da resposta da balança [100], conforme:

(Equação 3.14)

$$u(m) = \sqrt{2 \times (u_{balança}^{calib})^2 + 2 \times (u_{balança}^{rep})^2}$$

As pesagens foram feitas pela utilização da balança analítica instalada no LPC-PJ, de características: METTLER AE 100 (max 109 mg, d=0,1mg), uma vez que será esta a utilizada no âmbito do procedimento em validação. Apesar de o erro máximo de indicação fornecido pelo fabricante desta balança ser de 0,1 mg, é habitual que a tolerância utilizada seja cerca de 3 vezes superior a esse erro, uma vez que as condições em que ele é medido na fábrica (condições ótimas), não se verificam habitualmente nos laboratórios analíticos. Assim, a tolerância utilizada foi de 0,3 mg.

Os resultados obtidos para o estudo da repetibilidade desta balança encontram-se sumariados no **Anexo 6.81**, sendo que a partir destes foi calculada a média e desvio padrão ($S_{r_{balança}}$).

Os valores de $u_{balança}^{calib}$ e $u_{balança}^{rep}$ foram então calculados, assim como a incerteza associada às massas em descrição [$u(m_A) = u(m_{Pad})$], e os resultados encontram-se discriminados na **Tabela 3.11**.

Tabela 3.11 – Valores $u(m_A)$ e $u(m_{Pad})$ que representam as incertezas associadas às massas pesadas de amostra e padrão de calibração medidas numa balança analítica, bem como os valores de incerteza individuais determinados, utilizados para a calcular.

$u_{balança}^{calib}$	$u_{balança}^{rep}$	$u(m_A) = u(m_{Pad})$ $= \sqrt{2 \times (0,1732)^2 + 2 \times (6,3246 \times 10^{-5})^2}$
0,1732	$6,3246 \times 10^{-5}$	0,24495

D - Volumes Medidos

Em seguida, foi identificada a componente que diz respeito à incerteza associada aos volumes medidos de solvente e PI, medidos com dispensadores, [$u(V_{A(solv)})$, $u(V_{A(PI)})$, $u(V_{Pad(solv)})$ e $u(V_{Pad(PI)})$].

Tal como para a incerteza associada às massas pesadas, existem diferentes fatores que podem afetar a componente que diz respeito aos volumes medidos. Os principais fatores que podem afetar a incerteza associada à medição de um volume estão relacionados com a instrumentação e as condições ambientais do laboratório onde ela ocorrerá. Assim, de uma maneira geral, a incerteza associada à medição de um volume resulta da combinação da componente de incerteza associada à calibração do material e à repetibilidade do mesmo, no que respeita à instrumentação, e da componente de incerteza associada à

variação da temperatura do laboratório. A pressão não é, usualmente, tida em conta, uma vez que a variação desta condição num laboratório não produz uma variação significativa em relação ao valor de referência. No entanto, para o caso em apreço, o procedimento será para execução no laboratório do LPC-PJ, onde a temperatura é controlada, mantendo-se estável a cerca de 20°C, pelo que o fator associado à variação da temperatura pode ser desprezado.

Assim, a incerteza associada aos volumes medidos seria então estimada pela combinação das componentes de dois elementos de incerteza, relacionados com a instrumentação: a que está associada à calibração dos dispensadores ($u_{dispensador}^{calib}$) e a que está associada à repetibilidade dos mesmos ($u_{dispensador}^{rep}$), conforme **(Equação 3.15)**.

(Equação 3.15)

$$u(V) = \sqrt{2 \times (u_{dispensador}^{calib})^2 + 2 \times (u_{dispensador}^{rep})^2}$$

No entanto, para o caso em apreço, não foi possível a avaliação da repetibilidade dos dispensadores utilizados para medição dos volumes de solvente e PI, uma vez que esta avaliação deve ser feita pela medição de um determinado volume para um gobelé vazio, que é de seguida pesado, 10 vezes, para posterior estimativa do desvio padrão que lhe está associado, não sendo tal procedimento viável. Isto na medida em que, estes dispensadores são utilizados diariamente pelos analistas do LPC-PJ e contêm as soluções voláteis previamente preparadas. A medição de um dado volume destas soluções para apurar a repetibilidade dos instrumentos não seria viável, uma vez que a massa iria variar, sendo este um fator que não é possível controlar. Não era igualmente possível a colocação de outro líquido (não volátil) no frasco onde se encontram instalados os dispensadores, pois iria condicionar a rotina do laboratório. Assim, não foi possível estudar a repetibilidade destes instrumentos.

Deste modo, apenas foi tida em conta a componente de calibração do equipamento, sendo que a incerteza que lhe está associada é convencionalmente estimada pela tolerância associada ao valor nominal do seu volume fornecida pelo fabricante, considerando uma distribuição retangular uniforme **((Equação 3.16))**.

(Equação 3.16)

$$u_{dispensador}^{calib} = \sqrt{\left(\frac{V_{dispensador} \times CV(\%)}{100}\right)^2 + \left(\frac{V_{dispensador} \times Exatidão}{\sqrt{3}}\right)^2}$$

Em que $V_{dispensador}$ é correspondente ao volume do dispensador para o qual se avalia a incerteza (2 ou 5 mL), CV (%) é correspondente ao coeficiente de variação do equipamento, em %, que é fornecido pelo fabricante, assim como a exatidão de referência.

As medições foram feitas pela utilização de dispensadores de 2 e 5 mL, respetivamente para as soluções de PI e solvente, instalados no LPC-PJ.

Assim, os valores de $u(V_{A(Solv)})$, $u(V_{Pad(Solv)})$, $u(V_{A(PI)})$ e $u(V_{Pad(PI)})$ foram calculados com base nas características citadas, tendo em conta que $u(V_{A(Solv)}) = u(V_{Pad(Solv)})$ e $u(V_{A(PI)}) = u(V_{Pad(PI)})$, uma vez que o mesmo equipamento é utilizado para medição de todos os volumes de solvente, assim como o mesmo equipamento é utilizado para medição de todos os volumes de PI. Os resultados encontram-se discriminados na **Tabela 3.12**.

Tabela 3.12 - Valores $u(V_{A(solv)}) = u(V_{Pad(solv)})$ e $u(V_{A(PI)}) = u(V_{Pad(PI)})$ que representam a incerteza associada aos volumes de solução e PI, respectivamente, medidos em dispensadores de 2 e 5 mL, bem como valores de CV (%) e Exatidão (%) fornecidos pelo fabricante, e utilizados para este cálculo.

Dispensador	CV (%)	Exatidão (%)	$u(V_A) = u(V_{Pad})$
BRAND de 2 mL (PI)	0,05	0,01	$(= \sqrt{(2 \times 0,05/100)^2 + (2 \times 0,01/\sqrt{3})^2}) = 0,0116$
BRAND de 5 mL (solvente)	0,06	0,02	$(= \sqrt{(5 \times 0,06/100)^2 + (5 \times 0,02/\sqrt{3})^2}) = 0,0578$

E - Grau de Pureza Padrões de Referência

Conforme referido, determinado composto apenas pode ser utilizado como padrão de referência após cuidadosa caracterização, garantindo a sua identidade e pureza, pelo que a última fonte de incerteza identificada está associada ao grau de pureza dos padrões utilizados como referência [$u(Pur)$]. Esta componente foi estimada pelo desvio padrão associado ao sinal de resposta do padrão de referência (%) área) em 10 repetições, e é dada por:

(Equação 3.17)

$$u_{Pur} = \frac{S_{r_{Pur}}}{\sqrt{10}}$$

O desvio padrão do grau de pureza [$S_{Pur}(\%)$] foi calculado a partir dos resultados das análises previamente realizadas com vista à determinação do grau de pureza para cada um dos padrões de referência (sumariados nos Anexo 6.36), sendo que os resultados se encontram na Tabela 3.13.

Tabela 3.13 - Valores u_{Pur} para cada padrão de referência, que representam a incerteza associada ao respetivo grau de pureza, bem como valores de $S_{r_{Pur}}(\%)$, que representa o desvio padrão associado à percentagem de área dos sinais obtidos no âmbito da análise do grau de pureza, e conversão em $S_{r_{Pur}}$, utilizado para o cálculo da incerteza referida.

Padrão de Referência	$S_{r_{Pur}}(\%)$	$S_{r_{Pur}}$	u_{Pur}
Mefedrona	0,0805	0,0008	$(= 0,0008/\sqrt{10}) = 2,5452 \times 10^{-4}$
Metilona	0,1107	0,0004	$(= 0,0004/\sqrt{10}) = 3,5020 \times 10^{-4}$
MDPV	0,1186	0,0012	$(= 0,0012/\sqrt{10}) = 3,7513 \times 10^{-4}$

3.1.4.4 COMBINAÇÃO DOS COMPONENTES DE INCERTEZA

Depois de todas as componentes de incerteza se encontrarem expressas sob a forma de incertezas padrão (valores de desvios padrão), a etapa seguinte consiste em estimar a incerteza padrão combinada. De facto, é possível estimar a incerteza padrão associada ao resultado da combinação de um conjunto de variáveis segundo uma relação algébrica conhecida, com base nas incertezas padrão associadas a estas variáveis.

É possível calcular a incerteza combinada [$u_c(y)$], para um resultado de medição y (valor da mensuranda), que varia com os parâmetros independentes x_1, x_2, \dots, x_n , associados a diferentes fontes de incerteza, pela relação geral expressa na (Equação 3.18 [92]).

(Equação 3.18)

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1, n} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2 \times u(x_i)^2}$$

Em que:

(Equação 3.19)

$$\frac{\partial y}{\partial x_i} \approx \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)}$$

No entanto, a aplicação desta equação é complexa, pelo que em 1994, J. Kragten desenvolveu um método simples e rápido de aplicação da mesma, com vista ao cálculo da incerteza padrão combinada, facilitando a sua determinação e minimizando o risco de erros de cálculo [92], [96]. Assim, este método numérico foi utilizado para facilitar o cálculo da incerteza padrão combinada associada à estimativa da fração mássica de catinonas sintéticas em amostras apreendidas em Portugal $u_c(W_{Cat}(x_i))$. A (Equação 3.18 pode assim ser convertida na (Equação 3.20, em que x_i representa todas as 10 componentes de incerteza das quais a mensuranda depende (n=10).

(Equação 3.20)

$$u_c(W_{Cat}(x_i)) = \sqrt{\sum_{i=1, n=10} \left(\frac{\partial W_{Cat}}{\partial x_i} \times u(x_i) \right)^2}$$

O método de Kragten foi assim implementado em três folhas de cálculo distintas, uma para catinona sintética em estudo, com o intuito de simplificar os cálculos que permitem a obtenção da mensuranda, com uma incerteza associada, sendo apenas necessário preencher os espaços indicados, com os resultados da análise realizada na rotina do LPC-PJ (Anexo 6.75, Anexo 6.76 e Anexo 6.77). A Tabela 3.14 descreve a implementação do método de Kragten nas folhas de cálculo, com apenas 5 fontes de incerteza (x_1 a x_5).

Tabela 3.14 - Implementação esquemática do método de Kragten numa folha de cálculo, com um exemplo de 5 fontes de incerteza, para calcular a incerteza combinada associada a uma grandeza que depende dessas fontes.

	A	B	C	D	E	F
1		u_{x_1}	u_{x_2}	u_{x_3}	u_{x_4}	u_{x_5}
2	x_1	$x'_1 = x_1 + u_{x_1}$	x_1	x_1	x_1	
3	x_2	x_2	$x'_2 = x_2 + u_{x_2}$	x_2	x_2	x_2
4	x_3	x_3	x_3	$x'_3 = x_3 + u_{x_3}$	x_3	x_3
5	x_4	x_4	x_4	x_4	$x'_4 = x_4 + u_{x_4}$	x_4
6	x_5	x_5	x_5	x_5	x_5	$x'_5 = x_5 + u_{x_5}$
7	$W_{Cat} = f(x_1, x_2 \dots)$	$W_{Cat_1} = f(x'_1, x_2 \dots)$	$W_{Cat_2} = f(x_1, x'_2 \dots)$	$W_{Cat_3} = f(\dots, x'_3, x_4, \dots)$	$W_{Cat_4} = f(\dots, x_4, x'_5)$	$W_{Cat_5} = f(\dots, x_4, x'_5)$
8	Cálculo de: $\frac{\partial W_{Cat}}{\partial(x_i)}$	$(B_7 - A_7)/B_1$	$(C_7 - A_7)/C_1$	$(D_7 - A_7)/D_1$	$(E_7 - A_7)/E_1$	$(F_7 - A_7)/F_1$
9	Cálculo de: $\frac{\partial W_{Cat}}{\partial x_i} \times u(x_i)$	$B_8 \times B_1$	$C_8 \times C_1$	$D_8 \times D_1$	$E_8 \times E_1$	$F_8 \times F_1$
10	Cálculo de: $u_{W_{Cat}}$	$\sqrt{(B_9)^2 + (C_9)^2 + (D_9)^2 + (E_9)^2 + (F_9)^2}$				

3.1.4.5 CÁLCULO DA INCERTEZA EXPANDIDA

Depois de estimada a incerteza padrão combinada, deve apurar-se a incerteza expandida – ou alargada, U , na medida em que esta fornece um intervalo no qual o valor da mensuranda se encontra

num nível mais elevado de confiança. Esta é obtida pela multiplicação da incerteza padrão combinada por um fator de expansão, k ((Equação 3.21) [92], [96]).

(Equação 3.21)

$$U = k \times u_c(W_{cat}(x_i))$$

A escolha do fator de expansão é baseada no nível de confiança desejado, sendo que na maioria das vezes é definido como 2, que está relacionado com um nível de confiança de 95% [92]. Neste trabalho este foi o intervalo de confiança definido pelo que $k = 2$.

3.1.4.6 REPORTAR A INCERTEZA

A última etapa da estimativa da incerteza associada a um método em validação é a de reportar a incerteza estimada. De acordo com o Guia para a Quantificação de Incertezas em Métodos Analíticos, publicado pela *Eurachem* [92], a incerteza padrão expandida deve ser reportada do seguinte modo:

(Equação 3.22)

$$(Resultado): (x \pm U)(unidades)$$

Uma vez que a mensuranda é a fração mássica de catinona sintética em estudo numa amostra de material apreendido em Portugal, não existem unidades, pelo que a incerteza associada a essa estimada seria reportada da seguinte maneira:

(Equação 3.23)

$$(W_{cat} \pm U)$$

Multiplicando ambos os componentes por 100, os resultados seriam reportados em percentagem:

(Equação 3.24)

$$(W_{cat} \pm U) (\%)$$

A partir deste valor seria possível apurar qual a massa estimada de catinona sintética, numa determinada massa de amostra problema em análise, com a respetiva incerteza expandida associada, para um nível de confiança de 95%, aproximadamente.

Na folha de cálculo implementada (**Anexo 6.75, Anexo 6.76 e Anexo 6.77**), os dois resultados são calculados.

3.1.4.7 OUTROS ELEMENTOS IMPLEMENTADOS NA FOLHA DE CÁLCULO

Na folha de cálculo desenvolvida, foi ainda implementada uma seção para estimativa da componente de incerteza, sob a forma de %, associada a cada fonte de incerteza da qual a mensuranda depende. Esta seção de “Contagem percentual de componentes”, permite verificar qual a componente que está a afetar mais o resultado final, o que facilita a otimização do processo no sentido de eventualmente reduzir a incerteza de medição global (**Anexo 6.75, Anexo 6.76 e Anexo 6.77**).

3.1.4.8 COMPATIBILIDADE DA METODOLOGIA

A etapa final da validação de uma metodologia analítica deve envolver uma demonstração da compatibilidade da metodologia em desenvolvimento. A compatibilidade metrológica é uma propriedade de um conjunto de resultados para uma determinada mensuranda, tal que o valor absoluto da diferença entre os valores medidos de todos os pares de resultados de medição é menor que um certo múltiplo (escolhido) da incerteza-padrão desta diferença [86], [97], conforme ((Equação 3.25).

(Equação 3.25)

$$\left| W_{Cat(experimental)} - W_{Cat(calculado)} \right| \leq 3 \times \sqrt{(u_{W_{Cat(experimental)}})^2 + (u_{W_{Cat(calculado)}})^2}$$

Em que $W_{Cat(experimental)}$ é o valor da fração mássica da catinona sintética problema calculado com base na metodologia em desenvolvimento, em resultado da aplicação da folha de Excel implementada com base na aplicação do trabalho de Kragten, e $u_{W_{Cat(experimental)}}$ a respetiva incerteza, e $W_{Cat(calculado)}$ é o valor da fração mássica calculado com base nas pesagens reais de amostra e analito, e $u_{W_{Cat(calculado)}}$ a respetiva incerteza. É possível assumir que o valor de $u_{W_{Cat(calculado)}}$ é zero, na medida em que não é significativo para o resultado final.

Para verificar a compatibilidade metrológica foram assim analisadas as soluções de Padrão 3 (concentração de aproximadamente 2,5 mg/mL) para cada uma das catinonas sintéticas, que representam soluções de concentração conhecida de cada um dos analitos em estudo, como amostra problema. Estas soluções foram analisadas em simultâneo com o padrão de referência (Padrão de Calibração 4), com o intuito de determinar a fração mássica de mefedrona (1), metilona (2) e MDPV (3), na solução de Padrão de Calibração 3.

Neste sentido, todos os dados foram inseridos nas folhas de cálculo desenvolvidas no âmbito do processo de validação da metodologia para essas catinonas sintéticas (Anexo 6.97 a Anexo 6.99), sendo que os resultados se encontram discriminados na Tabela 3.15, e Tabela 3.16 em percentagem (%).

Tabela 3.15 - Compilação dos resultados finais obtidos a partir da análise da solução de Padrão 3, com vista a quantificação de mefedrona, metilona e MDPV pela aplicação da metodologia desenvolvida.

Composto	$W_{Cat(experimental)}$	$U(W_{Cat(experimental)})$	$W_{Cat(experimental)} \pm U(W_{Cat(experimental)})$
Mefedrona (1) (Padrão 3 - 2,59 mg/mL)	0,329	0,016	0,329 ± 0,016
Metilona (2) (Padrão 3 - 2,58 mg/mL)	0,338	0,027	0,338 ± 0,027
MDPV (3) (Padrão 3 - 2,54 mg/mL)	0,324	0,015	0,324 ± 0,015

Tabela 3.16 - Compilação dos resultados finais, em percentagem (%), obtidos a partir da análise da solução de Padrão 3, com vista a quantificação de mefedrona, metilona e MDPV pela aplicação da metodologia desenvolvida.

Composto	$W_{Cat(experimental)} (%)$	$U(W_{Cat(experimental)})(%)$	$W_{Cat(experimental)} \pm U(W_{Cat(experimental)})$
Mefedrona (1) (Padrão 3 - 2,59 mg/mL)	32,9	1,6	32,9 ± 1,6
Metilona (2) (Padrão 3 - 2,58 mg/mL)	33,8	2,7	33,8 ± 2,7
MDPV (3) (Padrão 3 - 2,54 mg/mL)	32,4	1,5	32,4 ± 1,5

Em seguida, determinou-se a fração mássica real de cada catinona na amostra problema (Padrão 3), sendo que os resultados obtidos se encontram sumariados na **Tabela 3.17**, e os cálculos descritos em anexo (**Anexo 6.101**).

Tabela 3.17 - Compilação dos resultados finais dos cálculos para obtenção dos valores da fração mássica de cada catinona sintética em estudo, na solução de Padrão de Calibração 3, utilizada como amostra problema, para verificar a compatibilidade metrológica.

<i>Composto</i>	<i>m_{amostra} (mg)</i>	<i>m_{analito} (mg)</i>	<i>W_{Cat(calculado)}</i>	<i>W_{Cat(calculado)} (%)</i>
Mefedrona (1) (Padrão 3 - 2,59 mg/mL)	38,53	12,93	0,336	33,6
Metilona (2) (Padrão 3 - 2,58 mg/mL)		12,92	0,335	33,5
MDPV (3) (Padrão 3 - 2,54 mg/mL)		12,68	0,329	32,9

Por último, verificou-se a compatibilidade metrológica pela substituição dos resultados obtidos, na **(Equação 3.25)**, para cada catinona sintética em estudo.

$$\text{Mefedrona (1): } |0,329 - 0,336| \leq 3 \times \sqrt{0,016^2}^* \Leftrightarrow 0,007 \leq 0,048 \text{ (Verifica-se)}$$

$$\text{Metilona (2): } |0,338 - 0,335| \leq 3 \times \sqrt{0,027^2 + 0^2}^* \Leftrightarrow 0,003 \leq 0,081 \text{ (Verifica-se)}$$

$$\text{MDPV (3): } |0,324 - 0,329| \leq 3 \times \sqrt{0,015^2 + 0^2}^* \Leftrightarrow 0,005 \leq 0,045 \text{ (Verifica-se)}$$

Confirma-se a compatibilidade metrológica para um nível de confiança de 99% entre valor estimado e o valor de referência, uma vez que o valor absoluto da diferença entre os valores dos resultados de medição é menor que incerteza expandida que lhes está associada.

3.1.5 QUANTIFICAÇÃO DE CATINONAS SINTÉTICAS EM AMOSTRAS REAIS

Depois de desenvolvida e validada a metodologia para quantificação de catinonas sintéticas por GC-FID, foi necessário proceder à sua aplicação a amostras reais, de modo a testar o desempenho do método e folha de cálculo implementada.

Conforme referido, os primeiros casos de alarme social relacionados com NSP em Portugal surgiram com a abertura das primeiras “*SmartShops*” em 2007, no entanto, só no final de 2011 ocorreu o primeiro grande episódio de intoxicação relacionado com o consumo destas substâncias [19], [54]. Ainda assim, só no início do ano de 2012 foi inserida a primeira catinona sintética na legislação aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, a mefedrona, depois dos primeiros casos de urgência relacionados com o consumo de NSP no distrito de Lisboa, e apenas no ano seguinte saiu o Decreto-Lei n.º 54/2013, que representa a legislação específica das NSP [33], [34], [55]. Nesta altura, na sequência da implementação desta legislação específica, todos os detentores de produtos vendidos em “*SmartShops*” (proprietários ou consumidores) tiveram a oportunidade de entregar voluntariamente os seus produtos à polícia, sem que lhes fosse aplicada qualquer tipo de consequência legal, num período de 15 dias após a publicação da legislação [33]. Neste sentido, muitos produtos foram entregues à polícia, na área metropolitana de Lisboa, tendo sido inventariados e devidamente catalogados.

Foram assim selecionados quatro produtos resultantes de material apreendido de uma “*SmartShop*”, com suspeita de conterem pelo menos uma das catinonas sintéticas em estudo, conforme **Tabela 3.18**, que seriam vendidos sob a forma de *Blow* e *Bliss*. De acordo com as características do invólucro foram designados de ***Blow Azul 1***, ***Blow Azul 1B***, ***Bliss Rosa 2*** e ***Blow Rosa 3*** (**Anexo 6.102**).

* Uma vez que $3 \times \sqrt{(u_{W_{Cat(experimental)}})^2} \leq 3 \times \sqrt{(u_{W_{Cat(experimental)}})^2 + (u_{W_{Cat(calculado)}})^2}$

Tabela 3.18 - Lista de material apreendido de uma "SmartShop", vendido sob a forma de Blow e Bliss com diferentes cores de invólucro, respetiva designação ao longo deste trabalho e substância suspeita de se apresentar na sua constituição.

Material Apreendido	Substância Suspeita
<i>Blow Azul 1</i>	<i>Mefedrona (1)</i>
<i>Blow Azul 1B</i>	<i>Mefedrona (1)</i>
<i>Bliss Rosa 2</i>	<i>Metilona (2)</i>
<i>Blow Rosa 3</i>	<i>MDPV (3)</i>

Inicialmente, as amostras foram sujeitas a uma triagem com recurso aos testes colorimétricos de Marquis e Scott, uma vez que já se suspeitava que contivessem na sua constituição uma ou mais NSP. Os resultados encontram-se na **Figura 3.12**.

Os testes foram feitos pela aplicação de duas gotas dos reagentes de Marquis e Scott previamente preparados (conforme descrito na seção 2.2), a uma pequena porção de cada amostra, e os resultados foram comparados com um branco (apenas a solução do reagente) e um resultado positivo pela aplicação do reagente num padrão de anfetamina, no caso do teste de Marquis, e num padrão de cocaína, no caso do teste de Scott. O registo foi feito segundos após a colocação das gotas de reagente.

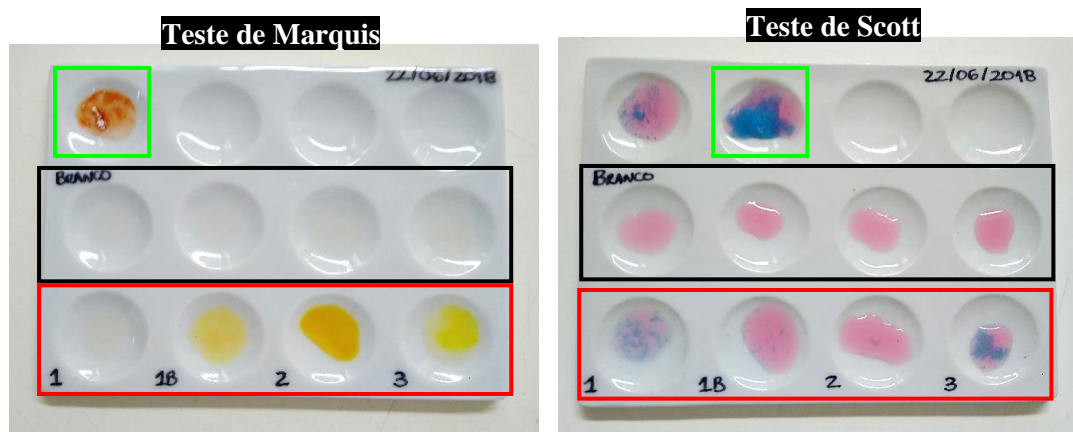


Figura 3.12 - Resultados obtidos a partir da aplicação dos testes colorimétricos de Marquis e Scott, às quatro amostras apreendidas numa "SmartShop", suspeitas de conterem NSP. O retângulo preto identifica a linha da placa onde apenas foi colocado o reagente, o retângulo a vermelho identifica a zona da placa onde efetivamente o teste foi aplicado às quatro amostras, e o retângulo verde identifica a zona onde o teste foi aplicado a um padrão de anfetamina e cocaína, para o teste de Marquis e Scott, respetivamente, pelo que com resultado positivo, facilitando a comparação com os restantes resultados.

Os resultados da aplicação do teste de Marquis revelaram-se negativos para as 4 amostras, o que indica que, à partida, não estariam presentes anfetaminas ou substâncias da mesma classe de drogas de abuso (nem substâncias da classe dos opiáceos), sendo de salientar que apesar de nas amostras *Blow Azul 1B*, *Bliss Rosa 2* e *Blow Rosa 3* se verificar uma coloração alaranjada, que poderia ser positivo para anfetaminas, é perceptível que esta coloração é muito diferente da observada para o padrão de anfetamina igualmente analisado (retângulo verde).

Já os resultados da aplicação do teste de Scott revelaram-se igualmente negativos para as 4 amostras, o que indica que à partida não continham cocaína na sua composição, sendo de salientar que apesar de nas amostras *Blow Azul 1B* e *Blow Rosa 3* se verificar uma coloração azulada em determinadas zonas, que poderia ser positivo para cocaína, é perceptível que esta coloração é muito diferente da observada para o padrão de cocaína – turquesa forte, igualmente analisado (retângulo verde).

Ainda assim, conforme referido, a aplicação destes testes não permitem o alcance de conclusões confirmatórias, pelo que só a análise posterior por GC-MS permitiu a identificação das substâncias presentes nas amostras.

Nesse sentido, foram preparadas quatro soluções, cada uma com uma concentração aproximada de 5 mg/mL, de acordo com o procedimento realizado para análise por GC-FID: **Blow Azul 1** (5,05 mg/mL), **Blow Azul 1B** (5,01 mg/mL), **Bliss Rosa 2** (5,06 mg/mL) e **Blow Rosa 3** (5,03 mg/mL). Numa primeira fase estas soluções foram analisadas por GC-MS, de modo a identificar os compostos nelas existentes. Os respetivos cromatogramas, e espetros de massa correspondentes a cada tempo de retenção, encontram-se em anexo (**Anexo 6.82** a **Anexo 6.96**), e os resultados sumariados na **Tabela 3.19**. Os cromatogramas foram analisados, verificando-se os R_t dos picos existentes, assim como os espetros de massa, pela comparação dos padrões de fragmentação com a biblioteca de espetros disponível, e ainda pela comparação com os resultados da análise dos padrões correspondentes às três catinonas em estudo.

Tabela 3.19 - Lista de material apreendido de uma "SmartShop", com identificação da substância suspeita de se apresentar na sua constituição e resultados de GC-MS que permitiram apurar a sua efetiva composição.

<i>Material Apreendido</i>	<i>Substância Suspeita</i>	<i>Resultados obtidos (GC-MS)</i>
Blow Azul 1	Mefedrona (1)	4-MEC
Blow Azul 1B	Mefedrona (1)	Mefedrona
Bliss Rosa 2	Metilona (2)	4-MEC + Metilona
Blow Rosa 3	MDPV (3)	Etcatinona + Pentedrona + 4-MEC + MDPV

Uma vez que as três catinonas sintéticas em estudo foram identificadas nas amostras **Blow Azul 1B**, **Bliss Rosa 2** e **Blow Rosa 3**, as respetivas soluções foram de seguida analisadas por GC-FID, para verificar se o método em desenvolvimento permitiria que fossem quantificadas.

Da análise aos resultados obtidos por GC-FID (**Anexo 6.94** a **Anexo 6.96**), verifica-se que os cromatogramas das amostras **Blow Azul 1B** e **Bliss Rosa 2** apresentam sinais de resposta que co-eluem na zona das catinonas sintéticas que se pretendiam quantificar. Assim, uma vez que não é possível afirmar com certeza que os sinais de resposta na zona do tempo de retenção da mefedrona e metilona são unicamente correspondentes a esses compostos, sendo inclusivamente muito alargados, não se afigura possível a determinação da fração mássica destas substâncias nas amostras em apreço.

No que respeita aos resultados obtidos a partir da análise da amostra **Blow Rosa 3**, verifica-se a existência de um pico estreito e bem definido na zona de tempo de retenção na zona do MDPV (R_t 14,8 minutos), pelo que é possível a determinação da fração mássica desta catinona sintética na amostra em apreço. De salientar que, foram pesadas 25 mg de amostra, o que seria superior à massa de amostra determinada como máxima da gama de trabalho para aplicação da metodologia em desenvolvimento (18,75 mg), no entanto, verifica-se que o sinal de resposta para o MDPV na amostra em apreço (**Blow Rosa 3**), 3,88 % (área), é muito inferior ao sinal obtido a partir da análise do Padrão 4 (extremo máximo da gama de trabalho), 31,45 % (área), pelo que a quantificação do analito nesta amostra, pela utilização desta metodologia, é concretizável.

Neste sentido, todos os dados foram inseridos na folha de cálculo desenvolvida para o MDPV no âmbito do processo de validação da metodologia (**Anexo 6.100**), sendo que os resultados se encontram discriminados na **Tabela 3.20**.

Tabela 3.20 - Compilação dos resultados finais obtidos a partir da análise de uma amostra de material apreendido (Blow Rosa 3), com vista a quantificação de MDPV, pela aplicação da metodologia desenvolvida.

<i>Amostra</i>	W_{Cat}	W_{Cat} (%)	$U_{(W_{Cat})}$	$U_{(W_{Cat})}$ (%)	$W_{Cat} \pm U_{(W_{Cat})}$	$W_{Cat} \pm U_{(W_{Cat})}$
Blow Rosa 3	0,489	48,9	0,024	2,4	$0,489 \pm 0,024$	$48,9 \pm 2,4$

De salientar que, conforme referido previamente, foi igualmente implementada na folha de cálculo desenvolvida, uma zona de “Contagem percentual de componentes”, que permite verificar qual a componente que está a afetar mais o resultado final, facilitando a otimização do processo. Assim, neste caso, verifica-se que as componentes que mais afetam o resultado são as medições de volume de

solvente, que na solução de padrão, quer na solução da amostra. De facto, os dispensadores, apesar de bastante utilizados para medição de volumes aproximados em laboratórios analíticos, não são instrumentos com sensibilidade elevada, pelo que as medições deles decorrentes estão associadas a fontes de incerteza.

Assim, verifica-se que a amostra **Blow Rosa 3** apresenta na sua composição uma percentagem de 49,8 % de MDPV, sendo que o resultado é declarado com uma incerteza expandida relativa de 2,4 %, para um nível de confiança de aproximadamente 95%.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ABUSO

Neste trabalho foram analisadas **57 amostras diferentes** resultantes de material apreendido em Portugal. Esta análise permitiu a identificação de **26 substâncias psicoativas**, incluindo substâncias das classes das catinonas e canabinóides sintéticos, anfetaminas e precursores, feniletilaminas e triptaminas, alucinogénicos, e **5 outras substâncias**, das quais uma benzodiazepina e alguns dos mais frequentes adulterantes de substâncias de abuso. Os resultados obtidos para as diferentes amostras encontram-se compilados no **Anexo 6.158**.

Quando o material apreendido chega ao laboratório para análise, é alvo de diferentes etapas de análise, com o objetivo de responder às questões colocadas, que por sua vez pretendem elucidar o tribunal para que as diligências necessárias ocorram. Numa primeira fase, todas as amostras são analisadas macroscopicamente, sendo alvo de pesagem e descrição, para registo e documentação. De seguida, as abordagens divergem de acordo com a matriz em análise. Para as amostras que se encontram na forma de **pó, matriz herbal** ou **comprimido**, a análise inicia-se pela aplicação de testes colorimétricos, com o intuito de apurar a classe de substância que estará, à partida presente na amostra. Segue-se uma análise por GC-MS para identificação ou confirmação dos resultados consequentes da aplicação dos testes colorimétricos, sendo que o programa aplicado é selecionado de acordo com esses resultados. Após identificação, no caso de ser solicitada a quantificação da substância presente no material apreendido, e caso esta se encontre descrita na tabela do mapa anexo à Portaria n.º 94/96 [32], que define os procedimentos de diagnóstico e dos exames periciais necessários à caracterização do estado de toxicodependência, uma nova porção de amostra é enviada para análise por GC-FID. No caso de se tratar de uma amostra contendo cocaína é ainda feito um teste de forma a perceber em que forma se encontra. Se se tratar de cocaína na forma de sal cloridrato, a substância formará um precipitado quando lhe são adicionadas 3 gotas de HNO₃ e 3 gotas de KNO₃. Se nenhum precipitado se formar, são adicionadas a uma outra porção 3 gotas de HNO₃ seguidas de 3 gotas de BaCl₂, e caso se forme então um precipitado, significa que a cocaína se encontra na forma de sulfato. Este teste é igualmente aplicado para anfetaminas ou metanfetaminas, que na maioria dos casos se encontram sob a forma de sal cloridrato.

Quando se tratam de amostras na forma de **microselos** ou **autocolantes**, uma vez que o mais provável é conterem LSD, é feita uma extração e aplicação de TLC, conforme descrito na seção 2.4. A aplicação desta técnica é, tal como os testes colorimétricos para as matrizes previamente citadas, uma etapa preliminar e que não permite uma conclusão final de resultados. Assim, em seguida, decorre uma análise por GC-MS para identificação ou confirmação dos resultados consequentes da aplicação da TLC, sendo que o programa aplicado é selecionado de acordo com esses resultados. Se, mais uma vez, for necessário proceder à quantificação das substâncias identificadas, e as mesmas se encontrarem ao abrigo da legislação citada (Portaria n.º 94/96), segue-se a análise por GC-FID.

As **soluções** e outras **amostras menos comuns** na casuística do LPC-PJ são analisadas de acordo com a matriz, sendo variável a abordagem.

A identificação por GC-MS é feita pela análise dos cromatogramas resultantes, verificando-se o R_t dos picos existentes, assim como dos espectros de massa, pela comparação dos padrões de fragmentação com a biblioteca de espectros disponível. No entanto, esta técnica não permite a distinção entre a maioria dos isômeros, a não ser que os padrões de referência se encontrem disponíveis, o que muitas vezes não acontece. O grande desafio analítico da aplicação desta técnica para identificação de substâncias desconhecidas é precisamente a falta de padrões de referência, nomeadamente no que respeita à análise de NSP. A grande alternativa é a técnica de RMN, que dá origem a espectros distintivos inclusivamente quando se tratam de isômeros, permitindo determinar a estrutura da molécula sem a necessidade de um padrão de referência. Assim, quando as substâncias não são identificadas por GC-MS no âmbito dos trabalhos de rotina do LPC-PJ, uma porção de amostra é analisada por RMN, por forma a proceder à sua identificação.

O presente trabalho envolveu a identificação de várias substâncias, nas mais diversas matrizes (**Anexo 6.158**). As amostras que melhor ilustram a importância da aplicação de diferentes metodologias analíticas para concluir pela identificação de uma substância em determinada amostra, são discutidas nesta seção.

A primeira amostra selecionada (seção **3.2.1**) diz respeito a uma matriz herbal que, na fase inicial de avaliação macroscópica foi desde logo, e tendo por base a experiência dos analistas que laboram no LPC-PJ, identificada como não sendo, muito provavelmente, um produto com origem na canábida. A relação entre a experiência dos analistas do LPC-PJ e a utilização de diferentes técnicas complementares, com vista à confirmação da identidade de determinada substância, é comprovada como sendo fulcral na análise de uma amostra de rotina.

De seguida, duas amostras foram selecionadas com o intuito de evidenciar que nem sempre as formas mais comuns de difusão de determinadas substâncias são as encontradas, evidenciando que o mercado das substâncias de abuso tem evoluído, com o principal intuito de contornar a legislação e os meios de combate e deteção existentes. Na seção **3.2.2** é descrita a identificação de LSD em soluções etanólicas, que contrasta com um exame de microselos, a forma mais comum de difusão de LSD, onde não foi identificado esse composto, mas sim uma NSP, o 25I-NBOH.

A amostra descrita na seção **3.2.3** pretende mais uma vez evidenciar a importância das técnicas de confirmação na identificação de substâncias. Os resultados colorimétricos preliminares aplicados a esta amostra, sob a forma de pó, pareciam indicar a presença de cocaína, no entanto, os resultados de GC-MS indicaram a presença de uma catinona sintética, cujo padrão de fragmentação seria semelhante ao padrão de uma ‘nova’ catinona sintética previamente identificada, no âmbito da colaboração do LPC-PJ com a FCUL, garantido a disponibilização de um novo padrão de referência.

A seguinte amostra diz respeito à identificação de um pré-pré-precursor da classe das anfetaminas (ver seção **3.2.4**), identificado por GC-MS com uma correspondência de apenas 56% decorrente da comparação do R_t e padrão de fragmentação, mas que posteriormente foi confirmada pela aplicação da técnica de RMN, e evidenciando novamente a importância da complementação de técnicas analíticas.

Por último, foi descrita na seção **3.2.5** uma das amostras menos comuns da casuística do LPC-PJ, mas que permitiu chegar a conclusões que permitiram o auxílio dos tribunais, nomeadamente pela aplicação da toxicologia à temática forense.

3.2.1 CANABINÓIDES SINTÉTICOS – MATRIZES HERBAIS

Os produtos com origem na canábida continuam a corresponder à maioria do material apreendido em Portugal, representando mais de metade do total de apreensões na casuística do LPC-PJ. No entanto, nem sempre o princípio ativo presente nas matrizes herbais é o THC, composto responsável pela maioria dos efeitos da canábida. Por vezes, as substâncias presentes neste tipo de material são os canabinóides sintéticos, desenvolvidos com o objetivo de mimetizar os efeitos do THC, atuando como agonistas sintéticos dos recetores de canabinóides (CB1 e CB2). Os canabinóides sintéticos são a maior classe de

NSP monitorizada pelo EMCDDA, sendo comercializados como substitutos legais da canábis e vendidos como “misturas herbáceas para fumar” [12].

Assim, um dos exames analisados no decurso do trabalho dizia respeito a uma amostra na forma de matriz herbal, chegando ao LPC-PJ para análise com a suspeita de se tratar de canábis (**Amostra 3** dos **Anexo 6.103** e **Anexo 6.158**). Após análise primária macroscópica apurou-se que, muito provavelmente, não seria proveniente da planta de canábis tradicionalmente apreendida, pelo que foi em seguida enviada para análise por GC-MS. A análise por GC-MS identificou dois compostos maioritários, com R_t 6,5 e 29,8 minutos, com picos base de razão m/z 232.2 e 233.2, respetivamente. O cromatograma e respetivos espectros de massa correspondentes aos dois compostos maioritários identificados encontram-se em anexo (**Anexo 6.104** a **Anexo 6.106**). Os padrões de fragmentação foram comparados com a biblioteca de espectros do equipamento, evidenciando uma correspondência de 95 e 99% com os canabinóides sintéticos 5F-PB22 (R_t 6,5 minutos) e 5F-AKB48 (R_t 29,8 minutos), respetivamente (biblioteca *SWGDRUG*).

Para confirmação dos resultados indicados pela análise por GC-MS, foi retirada uma toma de 1,235 g do material de exame, para análise por RMN no laboratório da FCUL. Uma vez que se tratava de uma possível mistura de canabinóides sintéticos, difíceis de identificar por RMN em mistura, foi necessário proceder à sua purificação, por cromatografia em coluna a partir do extrato metanólico da matriz herbal (conforme seção 2.4). Os compostos purificados foram de seguida analisados por RMN em $CDCl_3$ e MeOD (espectros em anexo, **Anexo 6.107** ao **Anexo 6.126**). A determinação das estruturas dos compostos apresentadas na **Figura 3.13** e a sua caracterização apresentada na **Tabela 3.21**, baseou-se na interpretação dos espectros 1D (RMN 1H e ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), e por comparação com os dados existentes na literatura para o 5F-PB22 e 5F-AKB48 [113]–[115]. Estes resultados permitiram confirmar a identificação previamente realizada por GC-MS, e obter compostos puros que poderão servir de padrões qualitativos nas análises de rotina no LPC-PJ.

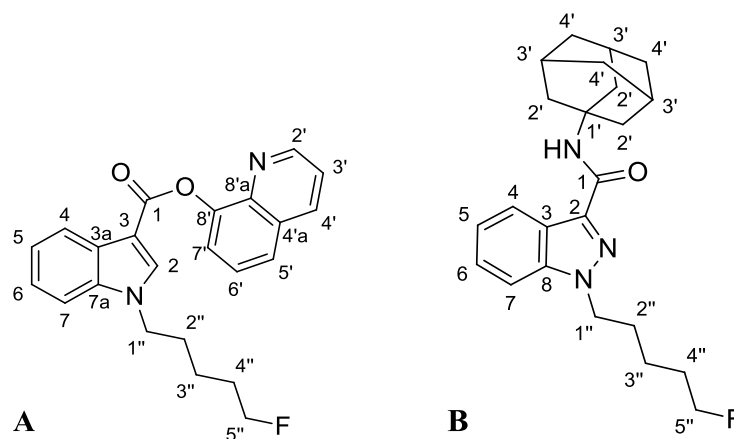


Figura 3.13 - Estruturas dos canabinóides sintéticos 5F-PB22 (A) e 5F-AKB48 (B), identificados em material apreendido em Portugal.

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Tabela 3.21 - Caracterização por RMN ¹H e ¹³C em CDCl₃ e MeOD dos canabinóides sintéticos 5F-PB22 e 5F-AKB48, identificado a partir da análise de material apreendido em Portugal.

Posição	5F-PB22 (A)				Posição	5F-AKB48 (B)			
	CDCl ₃		MeOD			CDCl ₃		MeOD	
	δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)		δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)
1	163,22	-	165,14	-	1	161,97	-	163,99	-
2	135,41	8,18, 1H, <i>s</i>	137,67	8,35, 1H, <i>s</i>	2	138,05	-	138,78	-
3	106,00	-	106,40	-	3	122,76	-	123,71	-
3a	127,29	-	128,56	-	4	123,10	8,40, 1H, <i>d</i> , 8,2	123,20	8,19, 1H, <i>d</i> , 8,2
4	122,16	8,31, 1H, <i>d</i> , 7,2	122,38	8,14, 1H, <i>d</i> , 8,0	5	122,33	7,27, 1H, <i>m</i>	123,59	7,25, 1H, <i>t</i> , 7,5
5	122,94	7,33, 1H, <i>m</i>	123,11	7,25, 1H, <i>t</i> , 7,5	6	126,58	7,41, 1H, <i>m</i>	127,90	7,43, 1H, <i>t</i> , 7,7
6	122,09 <i>J</i> _{CF} =2,9Hz	7,30, 1H, <i>m</i>	124,03	7,32, 1H, <i>t</i> , 7,7	7	108,95	7,40, 1H, <i>m</i>	110,92	7,60, 1H, <i>d</i> , 8,6
7	109,94	7,42, 1H, <i>m</i>	111,67	7,59, 1H, <i>m</i>	8	140,79	-	142,39	-
7a	136,66	-	138,27	-	1'	51,81	-	53,07	-
2'	150,56	8,92, 1H, <i>dd</i>	151,44	8,84, 1H, <i>dd</i>	2'	41,81	2,23, 6H, <i>s</i>	42,66	2,20, 6H, <i>s</i>
3'	121,57	7,43, 1H, <i>m</i>	123,08	7,58, 1H, <i>m</i>	3'	29,49	2,16, 3H, <i>brs</i>	30,99	2,12, 3H, <i>brs</i>
4'	136,04	8,21, 1H, <i>d</i> , 8,3	138,15	8,43, 1H, <i>d</i> , 8,4	4'	36,40	1,79, 6H, <i>m</i>	37,48	1,78, 6H, <i>s</i>
4'a	129,57	-	131,22	-	1''	48,99	4,41, 2H, <i>m</i>	50,01	4,47, 2H, <i>t</i> , 6,9
5'	125,61	7,76, 1H, <i>d</i> , 7,4	127,03	7,90, 1H, <i>d</i> , 7,8	2''	29,87 <i>J</i> _{CF} =19,7Hz	1,77, 2H, <i>m</i>	30,47	1,97, 2H, <i>m</i>
6'	126,31	7,59, 1H, <i>m</i>	127,78	7,68, 1H, <i>m</i>	3''	29,33	2,00, 3H, <i>m</i>	31,02 <i>J</i> _{CF} =19,8Hz	1,69, 2H, <i>m</i>
7'	122,06	7,64, 1H, <i>m</i>	123,69	7,65, 1H, <i>m</i>	4''	22,62 <i>J</i> _{CF} =5,02Hz	1,47, 2H, <i>m</i>	23,67 <i>J</i> _{CF} =5,2Hz	1,41, 2H, <i>m</i>
8'	147,57	-	148,46	-	5''	83,71 <i>J</i> _{CF} =164,7Hz	4,45, 2H, <i>dt</i> , 45,1; 5,9	84,63 <i>J</i> _{CF} =163,9Hz	4,38, 2H, <i>dt</i> , 47,6, 5,9
8'a	141,89	-	142,77	-					
1''	47,04	4,24, 2H, <i>t</i> , 7,1	47,86	4,37, 2H, <i>m</i>					
2''	29,62	2,00, 2H, <i>m</i>	30,80	2,00, 2H, <i>m</i>					
3''	22,87 <i>J</i> _{CF} =5,0Hz	1,53, 2H, <i>m</i>	23,77 <i>J</i> _{CF} =5,2Hz	1,50, 2H, <i>m</i>					
4''	29,95 <i>J</i> _{CF} =19,8Hz	1,75, 2H, <i>m</i>	31,14 <i>J</i> _{CF} =19,8Hz	1,75, 2H, <i>m</i>					
5''	83,67 <i>J</i> _{CF} =165,0Hz	4,46, 2H, <i>dt</i> , 59,3; 5,9	85,66 <i>J</i> _{CF} =164,0Hz	4,43, 2H, <i>dt</i> , 47,9; 6,0					

Conforme comprovado, apesar de o THC ser o constituinte que maioritariamente se encontra em matrizes herbais resultantes de material apreendido em Portugal, tal nem sempre se verifica, podendo estar presentes outras substâncias como os canabinóides sintéticos.

O 5F-PB22 e 5F-AKB48 são canabinóides sintéticos, produzidos com o intuito de mimetizar os efeitos do THC, a principal substância responsável pelos efeitos da canábis, enquanto agonistas sintéticos dos recetores canabinóides CB1e CB2 [12]. O 5F-PB22 foi reportado pela primeira vez em 2013, sendo muitas vezes vendido em mistura com produtos vegetais, para melhor e maior disseminação [116]. O canabinóide sintético 5F-AKB48, também designado de 5F-APINACA, é um análogo fluorado no carbono terminal da cadeira lateral do grupo pirrole do canabinóide sintético AKB48 (ou APINACA), foi um dos cinco canabinóides sintéticos mais apreendido em 2016 [117].

Nenhuma destas substâncias se encontra discriminada nas tabelas anexas da legislação portuguesa que diz respeito à lei de combate à droga [20]. No entanto, o 5F-AKB48 encontra-se descrito na lista II

da Convenção das Nações Unidas sobre as Substâncias Psicotrópicas, de 1971 [23], pelo que, este canabinóide sintético encontra-se sujeito a controlo ao abrigo do Artigo 3.º do Decreto-Lei n.º 15/93, citado, que refere que estão sujeitas a controlo as “(...) plantas, substâncias e preparações referidas nas convenções relativas a estupefacientes ou substâncias psicotrópicas (...)”. O 5F-PB-22, apesar de não discriminado nas Convenções referentes à temática das substâncias de abuso, é considerado de elevado risco para a saúde pública, tendo sido recomendada a sua adição à mesma lista (II da Convenção sobre as Substâncias Psicotrópicas), pela União Europeia, no início do presente ano [118], pelo que é uma NSP monitorizada pelo EMCDDA [6].

É de salientar que ambos os canabinóides sintéticos se encontram mencionados na Proposta de Lei n.º 143/XIII/3.^a [119], que pretende publicar a vigésima terceira alteração à Lei de Combate à Droga [20], transpondo a Diretiva (EU) 2017/2103 [6], como estando em falta na legislação nacional das novas substâncias indicadas pela Comissão dos Estupefacientes das Nações Unidas entre 2015 e 2018. Isto evidencia o risco que lhes está associado, existindo um alerta para estas substâncias não só a nível nacional, mas também a nível internacional.

Já o THC, apesar de igualmente descrito na lista II da Convenção das Nações Unidas sobre as Substâncias Psicotrópicas, de 1971 [23], encontra-se também sujeito a controlo ao abrigo do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro, estando inserido na Tabela II-B desse diploma [20].

Neste sentido, apesar de um dos compostos identificados, o 5F-AKB48, estar sujeito a controlo nacional, a distinção entre a presença de canabinóides sintéticos e THC torna-se importante, na medida em que a pena associada a cada uma das substâncias é diferente.

3.2.2 LSD – O COMPOSTO OPIÓIDE MAIS COMUM

O LSD (dietilamida do ácido lisérgico) (**Figura 3.14**) é uma potente droga psicoativa, sendo o alucinogénio semi-sintético mais conhecido e tendo sido sintetizada em 1938 por Albert Hoffman. Esta substância não ocorre na natureza, no entanto, o LSA (amida do ácido lisérgico), um análogo próximo é encontrado nas sementes de diferentes plantas, podendo ser extraída facilmente [120], [121]. O uso recreativo tornou-se popular entre os anos 1960 e 1980, mas agora é menos comum. De facto, de uma perspetiva geral, os níveis de prevalência do consumo de LSD na Europa mantêm-se baixos e estáveis [12], [122].

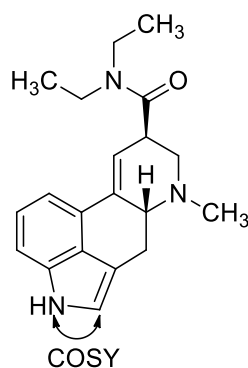


Figura 3.14 - Estrutura do composto LSD, identificado em soluções etanólicas de material apreendido em Portugal.

A forma mais comum de difusão desta substância é sob a forma de microselos, isto é, pequenos quadrados de papel embebidos em soluções do composto [122]. No entanto, conforme comprovado no decorrer deste trabalho, tal evidência não é assim tão linear. Neste capítulo é descrita a identificação de LSD em soluções etanólicas (**Amostras 7-10 dos Anexo 6.103 e Anexo 6.158**), que contrasta com um exame de microselos onde não foi identificado esse composto, mas sim uma NSP, o 25I-NBOH (**Amostra 41 dos Anexo 6.103 e Anexo 6.158**).

O primeiro exame dizia respeito a 4 soluções que chegaram ao LPC-PJ para análise em frascos de vidro (**Amostras 7-10**). Numa primeira fase as amostras foram analisadas por TLC, sendo que os resultados indicaram que muito provavelmente as soluções continham LSD (R_f semelhante ao padrão aplicado). No entanto, uma vez que existia a suspeita de se tratarem de amostras contendo um derivado deste composto, com um grupo alquila no átomo de azoto do grupo pirrole (**Figura 3.14**), as soluções foram analisadas por RMN, conforme descrito na seção 2.4. Os resultados indicaram tratar-se de 4 soluções com a mesma constituição, sendo o composto maioritário o etanol, concluindo-se que se tratavam de soluções etanólicas com a mesma composição (**Figura 3.15**). Foram desde logo identificados sinais minoritários compatíveis com a presença de LSD ou derivados.

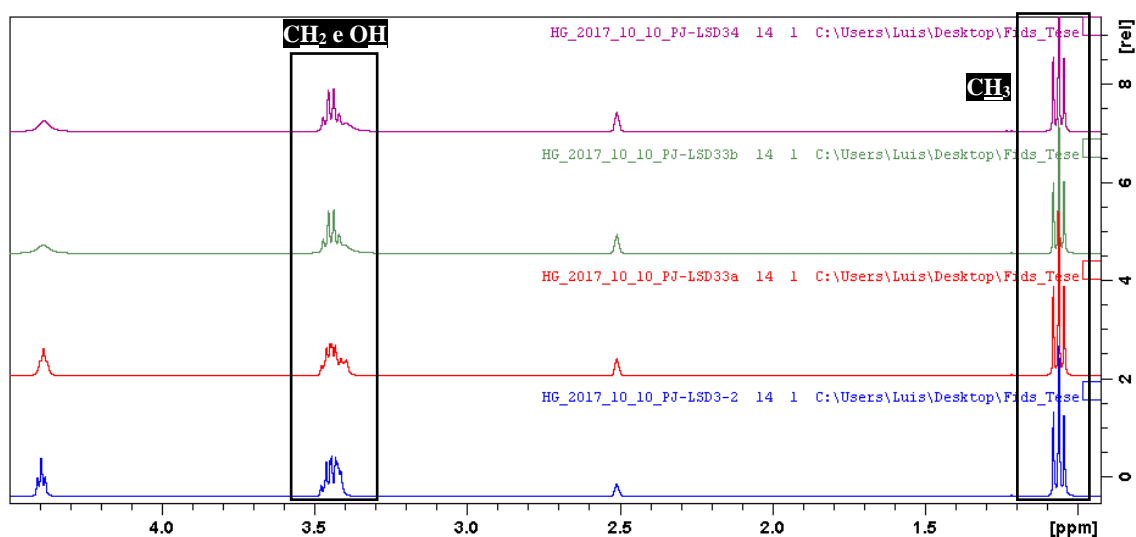


Figura 3.15 - Análise RMN ^1H em DMSO- d_6 das 4 soluções etanólicas, verificando-se os sinais compatíveis com a presença maioritária de etanol, e comprovando-se a similaridade das soluções.

As amostras foram evaporadas à secura, para que o composto presente ficasse mais concentrado, permitindo uma análise melhorada por RMN. Os resultados de RMN ^1H , COSY e HSQC (**Anexo 6.127** a **Anexo 6.129**) permitiram identificar o LSD, misturado com outras substâncias não identificadas, nas amostras analisadas. A confirmação de que não se tratava de um derivado do LSD na amina citada, foi verificada pela análise do espectro de COSY, que permitiu verificar uma correlação entre o próton de amina (NH - 10.72 ppm) e o próton imediatamente adjacente (CH - 7.06 ppm), conforme identificado na **Figura 3.14**.

Neste caso em apreço era muito importante a distinção entre o LSD e um dos seus derivados, na medida em que, apesar de o LSD se encontrar sujeito a controlo ao abrigo do Decreto-Lei n.º 15/93, por se encontrar descrito na Tabela II-A desse diploma, podendo a sua apreensão dar origem a consequências jurídicas, os seus derivados não estão. Assim, as técnicas analíticas aplicadas permitiram auxiliar o tribunal, na medida em que permitiram concluir que a substância presente nas soluções etanólicas em análise seria o LSD.

O segundo exame, que dizia respeito a uma amostra de microselos, foi analisada numa primeira fase no LPC-PJ (**Amostra 41** dos **Anexo 6.103** e **Anexo 6.158**), de acordo com o procedimento tipicamente utilizado para este tipo de amostra, uma vez que é grande a probabilidade de se tratar de LSD ser elevada (ver seção 2.4).

Os resultados da análise por TLC não se revelaram positivos pela comparação com o padrão de LSD aplicado, e após revelação à luz UV e com recurso à solução reveladora utilizada. Assim, o extrato foi enviado para análise por GC-MS. Os resultados indicaram a presença de 3 compostos maioritários que, de acordo com o espectro de massa, poderiam corresponder aos compostos 2C-H (R_t 11,04 min), 2C-C (R_t 12,92 min) e 2C-I (R_t 14,83 min), conforme **Anexo 6.130** e **Anexo 6.133**. No entanto, esta análise

carecia de confirmação e, uma vez tratarem-se de compostos que podem ser utilizados como precursores de algumas substâncias de abuso ilícitas, o composto presente na amostra poderia ser outro, que se poderia ter decomposto no decorrer da análise por GC-MS ou no processo de extração dos microselos, dando origem a estes três compostos. Deste modo, uma segunda amostra foi preparada extraindo diretamente 3 microselos com MeOD. Ambas as amostras foram analisadas por RMN.

Os resultados de RMN permitiram concluir que os sinais seriam compatíveis com a presença de um composto maioritário, identificado como sendo o 25I-NBOH (**Figura 3.16** e **Tabela 3.22**), tendo a respetiva caracterização sido baseada na interpretação dos espetros 1D (RMN ^1H e ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC).

Uma vez que os dados existentes na literatura para caracterização deste composto por RMN são em DMSO- d_6 , foi ainda feita caracterização do mesmo extrato em DMSO- d_6 , conforme **Figura 3.16** e **Tabela 3.22**. Os espetros encontram-se disponíveis nos **Anexo 6.134** a **Anexo 6.143**. Os resultados em DMSO- d_6 foram então comparados com os dados disponíveis na literatura, concluindo-se que o composto maioritário presente nesta amostra seria o 25I-NBOH.

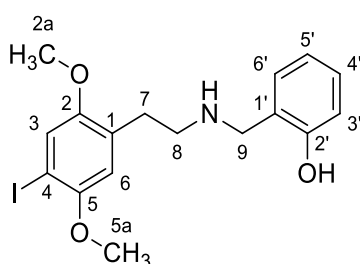


Figura 3.16 - Estrutura do composto 25I-NBOH, identificado a partir em microselos, material apreendido em Portugal.

Tabela 3.22 - Caracterização por RMN ^1H e ^{13}C em dois solventes diferentes, do composto 25I-NBOH identificado a partir em microselos, material apreendido em Portugal.

Posição	MeOD		DMSO- d_6	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$, m, J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$, m, J (Hz)
1	128,10	-	127,01	-
2	153,55	-	151,89 ^b	-
2a	56,57	3,77, 3H, s	56,19 ^c	3,73, 3H, s
3	122,92	7,32, 1H, s	121,37	7,31, 1H, s
4	84,41	-	83,70	-
5	154,22	-	152,00 ^b	-
5a	57,45	3,80, 3H, s	56,82 ^c	3,76, 3H, s
6	114,81	6,82, 1H, s	115,36	6,89, 1H, s
7	29,37	2,94, 2H, t, 7,4	27,39	2,87, 2H, t, 7,5
8	48,21	3,10, 2H, t, 7,4	46,39	2,98, 2H, t, 7,4
9	49,30	4,10, 2H, s	46,39	4,02, 2H, s
1'	^a	^a	119,6	-
2'	157,78	-	156,39	-
3'	116,33	6,84, 1H, d, 7,0	113,81	6,88, 1H, d, 5,5
4'	131,48	7,22, 1H, t, 6,7	129,88	7,19, 1H, t, 7,2
5'	120,70	6,86, 1H, t, 4,7	118,94	6,81, 1H, t, 7,3
6'	131,91	7,21, 1H, d, 7,0	130,88	7,28, 1H, d, 7,5

^a Carbono não se encontra visível no espetro.

^b Não é possível a atribuição destes carbonos, uma vez que as correlações são semelhantes entre ambos.

^c Estes sinais poderão estar trocados, caso os carbonos identificados com ^b também estejam.

O 25I-NBOH está entre as mais recentes NSP a emergir no mercado ilícito de substâncias de abuso, pertencendo à classe dos derivados das fenetilaminas. Esta substância faz parte da série NBOH, que é

considerada como um novo ramo da família das fenetilaminas psicadélicas substituídas no anel por dois grupos metoxilo (2,5-dimetoxilo), reconhecidas por 2C. A série NBOH representa compostos estruturalmente semelhantes aos da série NBOMe, que são amplamente conhecidos e controlados, porquanto os casos de intoxicação descritos, tendo inclusivamente originado mortes [123]. A **Figura 3.17** permite verificar as diferenças existentes entre as diferentes séries de fenetilaminas, com uma substituição de um átomo de Iodo (I) na posição 4 do anel aromático, conforme se constatou no composto previamente identificado.

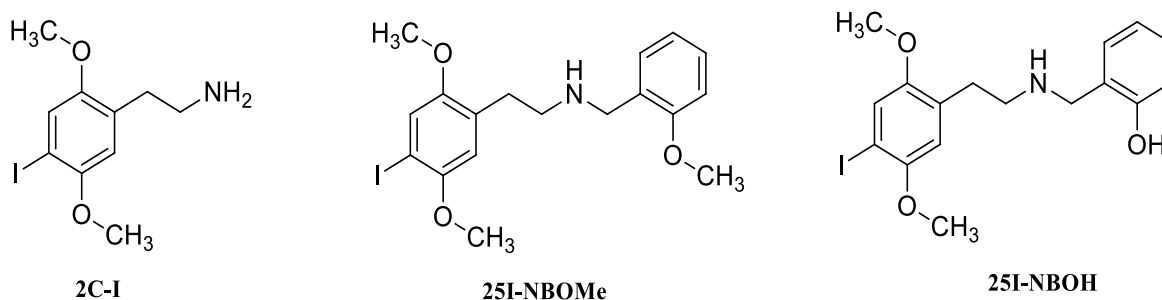


Figura 3.17 - Estrutura de três compostos da classe das fenetilaminas substituídas no anel aromático por dois grupos metoxilo, e uma substituição na posição 4 por um átomo de I, integrantes de diferentes séries.

A identificação das substâncias da série NBOH não deve ser suportada apenas por análises de GC-MS, uma vez que a maioria dos compostos desta série representam moléculas termolábeis que, no decorrer desta análise, se degradam frequentemente em substâncias da família 2C [123]. De facto, foi o que aconteceu no decorrer da análise por GC-MS da amostra em estudo (**Amostra 41** dos **Anexo 6.103** e **Anexo 6.158**), sendo que os resultados obtidos sugeriam a presença de três compostos dessa família, 2C-H, 2C-C e 2C-I. Assim, apenas depois da análise por RMN, e pela comparação dos resultados obtidos com os dados existentes na literatura, foi possível concluir pela presença do composto 25I-NBOH.

A distinção entre substâncias destas séries de fenetilaminas é crucial para as conclusões jurídicas que terão lugar no decorrer das análises, na medida em que apesar de os compostos 2C-I e 25I-NBOMe serem abrangidos pelas disposições de direito penal nacional e internacional aplicáveis ao tráfico ilícito de drogas [6], [20], o 25I-NBOH não é abrangido.

3.2.3 CATINONAS SINTÉTICAS – A IMPORTÂNCIA DAS TÉCNICAS DE CONFIRMAÇÃO

As catinonas sintéticas são uma das mais comuns classes de NSP estando quimicamente relacionadas com a catinona, um estimulante psicoativo que ocorre naturalmente na planta Khat (*Catha edulis*) [12]. Uma das catinonas sintéticas que primeiro surgiu em Portugal, nomeadamente na ilha da Madeira, foi a mefedrona, que seria conhecida como “*Bloom*”. No entanto, e de facto esse é um dos grandes riscos associados às NSP, nem sempre um produto com a mesma designação tem a mesma composição química. Tal é comprovado pela análise feita a uma das amostras que chegou ao LPC-PJ para análise, proveniente dessa ilha, e com a suspeita de se tratar de “*Bloom*” (**Amostra 40** dos **Anexo 6.103** e **Anexo 6.158**).

Como recorrente, e uma vez que a amostra se encontrava sob a forma de pó (cristais acastanhados), os primeiros testes aplicados foram os colorimétricos. Existindo suspeita de NSP, foram aplicados os testes de Marquis e Scott, sendo que quando aplicado o primeiro teste, o resultado foi negativo (sem reacção), e o segundo teste originou uma coloração azul clara (turquesa). Quando o teste de Scott dá origem a esta coloração, o resultado é, muito provavelmente, positivo para a presença de cocaína. De

facto, a coloração de um resultado positivo para cocaína é muito característica, resultando num azul turquesa distinguível, na maioria das vezes, dos restantes tons de azul pelos analistas do LPC-PJ.

No entanto, os testes colorimétricos são apenas testes de *screening*, isto é, testes presuntivos utilizados apenas para iniciar o processo de análise, fornecendo apenas dados preliminares sobre a presença de um dado composto, não sendo confirmativos. Na realidade, a análise macroscópica à amostra em apreço, não sugeria que se tratasse de cocaína, na medida em que, habitualmente, este produto se encontra na forma de pó branco/bege. Os cristais de considerável tamanho e coloração acastanhada não sugeriam a presença de cocaína.

Neste sentido, a amostra foi analisada por GC-MS, conforme explanado na seção 2.4. Como previsto, e apesar da coloração azul-turquesa que sugeria a presença de cocaína, os resultados da análise por GC-MS confirmaram a presença de um composto maioritário de R_t 14.23 minutos e um espectro de massa compatível com a presença da catinona sintética, α -PHP (Figura 3.18), na medida em que o padrão de fragmentação era semelhante ao desta substância. Os resultados desta análise encontram-se em anexo (Anexo 6.144 e Anexo 6.145).

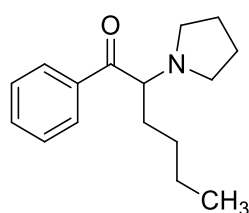


Figura 3.18 - Estrutura da catinona α -PHP, identificado num invólucro de “Bloom”, material apreendido em Portugal.

Não foi necessária uma análise por RMN, uma vez que a substância foi desde logo identificada por comparação com a biblioteca de espectros disponível no equipamento de GC-MS. De facto, uma das razões pela qual não foi necessário confirmar os resultados previamente obtidos, nomeadamente pela utilização da técnica de RMN para a identificação da catinona sintética α -PHP, está relacionada com a existência de um padrão de referência desta substância, obtido no âmbito dos trabalhos de colaboração entre o LPC-PJ e a FCUL. A existência deste padrão permitiu uma correspondência elevada entre os padrões de fragmentação da amostra e do padrão de referência já disponível, bem como pela semelhança de tempos de retenção. Está aqui evidenciada a importância da obtenção de padrões, nomeadamente de NSP, por via sintética ou purificação de amostras decorrentes de material apreendido.

A cocaína é uma substância produzida a partir das folhas de coca, uma planta cultivada principalmente na Bolívia, Colômbia e no Peru, da categoria das drogas estimulantes, sendo uma das principais drogas ilícitas derivadas de plantas [12]. Todas as formas desta substância encontram-se descritas na Tabela I-B da legislação aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas (Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro [20]), pelo que é uma substância controlada. De facto, a cocaína é uma droga, ao abrigo da Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho [6], na medida em que se encontra descrita na lista de estupefacientes incluídos no Quadro I da Convenção Única das Nações Unidas sobre os Estupefacientes, de 1961, alterada pelo Protocolo de 1972 [22]. No que respeita à catinona sintética α -PHP, apesar de não se encontrar na lista publicada pela Portaria n.º 154/2013 [34], no âmbito do Decreto-Lei n.º 54/2013 [33] proíbe a produção, exportação, propaganda, distribuição, venda ou dispensa das NSP, ela é considerada um derivado da catinona sintética α -PVP já descrita nessa mesma legislação, pelo que esta substância é controlada ao abrigo do artigo 3.º desse diploma. Assim, a sua apreensão origina uma sanção, em termos de contraordenação, sendo diferente da posse de cocaína, que, por ser uma droga controlada, poderá conduzir a uma pena de prisão.

3.2.4 PRECURSORES – UM PROBLEMA EM ASCENSÃO

Os precursores são substâncias químicas essenciais à produção, legítima ou ilegítima, de produtos como medicamentos, perfumes ou cosméticos, ou de drogas como anfetaminas, heroína ou cocaína, respetivamente. A sua disponibilidade tem um grande impacto no mercado das drogas sintéticas, na medida em que os seus produtores tentam a utilização de novas técnicas de produção com vista a contornar os mecanismos de controlo existentes [59]. Na EU, a interceção de substâncias controladas e não controladas como precursores para a produção de drogas ilícitas está especialmente relacionada com o fabrico de anfetaminas [60]. No decorrer deste trabalho, chegaram ao LPC-PJ diversas amostras que, conforme posteriormente comprovado, se tratavam de substâncias que são habitualmente utilizadas como precursores de substâncias ilícitas, como as anfetaminas.

Uma dessas amostras chegou ao LPC-PJ sob a forma de pó que possuía na etiqueta a informação de que continha “Sulfato de Bário” na sua composição (**Amostra 53 dos Anexo 6.103 e Anexo 6.158**). Os testes colorimétricos aplicados (teste de Marquis e Scott) não se revelaram conclusivos (não se revelaram positivos para qualquer substância) e os resultados GC-MS indicavam a presença de um composto minoritário (R_t de 5.9 minutos), cujo padrão de fragmentação seria semelhante ao do precursor BMK (fenilacetona), e um composto maioritário (R_t de 9.5 minutos), cujo padrão de fragmentação sugeria tratar-se do composto 1-metoxi-2-fenil-1,3-butanodiona, por comparação com a biblioteca de espetros disponível, mas apenas com um grau de correspondência de 56% (biblioteca de espetros *Wiley*) (**Anexo 6.146 a Anexo 6.148**).

Uma vez que os resultados decorrentes da análise por GC-MS indicavam a presença provável de precursores, e persistindo a hipótese de os mesmos se terem formado a partir da fragmentação de uma outra molécula no decorrer da análise, uma porção de amostra foi analisada e caracterizada por RMN em DMSO-*d*₆. Os resultados indicaram a presença de um composto maioritário, sendo que os sinais seriam compatíveis com a presença de 2-fenil-3-oxo-butanato de metilo, conforme **Figura 3.19** e **Tabela 3.23**, tendo a respetiva caracterização sido baseada na interpretação dos espetros 1D (RMN ¹H e ¹³C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), em concomitância com os resultados das análises de GC-MS, FTIR e MS (ESI+) complementares realizadas. Os resultados encontram-se em anexo (**Anexo 6.149 a Anexo 6.155**).

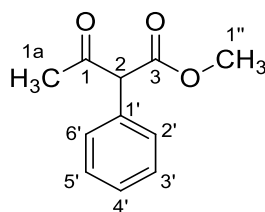


Figura 3.19 - Estrutura do composto 2-fenil-3-oxo-butanato de metilo, identificado a partir da análise de material apreendido em Portugal.

Tabela 3.23 - Caracterização por RMN ¹H e ¹³C em DMSO-*d*₆, do composto butirato de metil-3-oxo-fenilo.

Posição	DMSO- <i>d</i> ₆	
	δ ¹³ C	δ ¹ H, m, J (Hz)
<i>I</i>	201,93	-
<i>Ia</i>	29,04	2,13, 3H, <i>s</i>
<i>2</i>	63,94	5,16, 1H, <i>s</i>
<i>3</i>	169,05	-
<i>I'</i>	133,10	-
<i>2'/6'</i>	129,48	7,33, 2H, <i>m</i>
<i>3'/5'</i>	128,61	7,38, 2H, <i>m</i>
<i>4'</i>	127,94	7,34, 1H, <i>m</i>
<i>I''</i>	52,32	3,66, 3H, <i>s</i>

O composto identificado, butirato de metil-3-oxo-2-fenilo (1-metoxi-2-fenil-1,3-butanodiona), é um pré-pré-precursor das anfetaminas e metanfetaminas, nomeadamente funcionando como precursor do BMK que, por sua vez, é o mais frequente precursor utilizado na síntese das anfetaminas. O BMK é controlado desde 2004 [124], no entanto, tal como acontece para as NSP, também o mercado de precursores, principalmente no que respeita à produção de anfetaminas, está em constante evolução, originando a introdução de novos químicos não controlados [12]. Assim, este precursor tem já vários precursores conhecidos, como o APAAN, APAA ou o composto aqui identificado, butirato de metil-3-oxo-2-fenilo (ver seção 1.3 e Figura 1.4).

Apesar de o BMK ser controlado, estando inclusivamente descrito na tabela I da Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas de 1988, muitos dos seus precursores não estão ainda sob controlo. Assim, ainda que a identificação deste composto não dê origem a consequências jurídicas, porquanto o mesmo não ser alvo de controlo legal, ela é muito importante nomeadamente para auxiliar os mecanismos de controlo e avaliação de risco, com vista à eventual alteração das tabelas, incluindo pré-pré-precursos que vão sendo identificados em material apreendido.

É ainda de salientar que o composto identificado por RMN, foi inicialmente identificado pela aplicação da técnica de GC-MS, ainda que com uma correspondência de apenas 56% decorrente da comparação do R_t e padrão de fragmentação. Isto evidencia que apesar de por vezes a correspondência decorrente da comparação dos resultados de GC-MS da amostra com a biblioteca de espectros existente no equipamento não ser consideravelmente elevada, não significa que o resultado não se encontre correto, pelo que está mais uma vez comprovada a importância da complementação de técnicas analíticas.

3.2.5 OUTROS TÓXICOS – EXAMES MENOS COMUNS NA CASUÍSTA DO LPC/PJ

Apesar de muito pouco comuns na casuística do LPC-PJ, por vezes chegam ao laboratório exames sob a forma de produtos alimentares ou mesmo animais mortos, com suspeitas de conterem substâncias tóxicas.

Um dos exames analisado neste sentido seria uma amostra de vinho (**Amostra 42** dos **Anexo 6.103** e **Anexo 6.158**), com suspeitas de conter na sua constituição alguma substância tóxica, nomeadamente depressivos. Conforme referido (seção 2.4), os exames menos comuns são analisados de acordo com a matriz em que se encontram pelo que, neste caso, foi feita uma extração com CHCl_3 , após basificação com NaOH e posterior separação de fases. Após evaporação à secura, o extrato foi analisado por GC-MS.

Os resultados indicaram a presença de um composto maioritário, (**Figura 3.20**), com R_t 13.9 minutos, e um espectro de massa compatível com a presença do composto lorazepam, por comparação com a biblioteca de espectros disponível. Os resultados desta análise encontram-se em anexo (**Anexo 6.156** e **Anexo 6.157**).

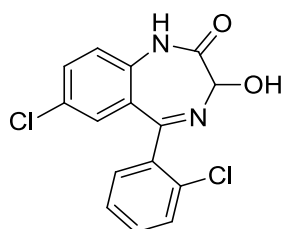


Figura 3.20 - Estrutura molecular do composto lorazepam, uma benzodiazepina identificada a partir da análise de material apreendido em Portugal.

O lorazepam é um depressor do SNC pertencente à classe das benzodiazepinas, e o seu consumo está associado a sintomas como relaxação muscular, sedação e tranquilizante. Apesar de não ser uma substância controlada do ponto de vista legal, é um medicamento sujeito a receita médica que apenas deve ser tomado sob vigilância médica ou farmacêutica.

Ainda assim, a identificação desta substância pode dar origem a consequências penais, na medida em que foi identificada numa amostra de vinho para consumo de diferentes trabalhadores de uma entidade empregadora, podendo ter sido colocado com intenções de reduzir o rendimento de trabalho dos mesmos. Deste modo, as conclusões possibilitaram o auxílio dos tribunais, nomeadamente pela aplicação da toxicologia à temática forense.

4 CONCLUSÃO

A identificação e quantificação de NSP é um tema de grande relevância, na medida em que a sua crescente difusão associada ao aparecimento de novas moléculas, dificulta o trabalho das entidades que procedem à sua análise, não permitindo muitas vezes uma resposta tão rápida quanto desejável. Nesse sentido, foi desenvolvida e validada uma metodologia para quantificação de 3 catinonas sintéticas por GC-FID, a mefedrona, metilona e o MDPV, com vista à sua aplicação nos trabalhos de rotina do LPC-PJ.

O método em desenvolvimento teve por base a metodologia analítica de GC-FID já existente no LPC-PJ para a quantificação de anfetaminas e metanfetaminas, por serem substâncias com estrutura semelhante à das catinonas sintéticas. Fez assim sentido a manutenção desta técnica aquando da implementação da quantificação de catinonas sintéticas, não alterando a rotina do laboratório, trazendo mais-valias e devendo ser igualmente eficaz. A correta validação de metodologias analíticas é muito importante, especialmente no âmbito da temática da toxicologia forense, na medida em que falsos resultados analíticos podem levar à condenação de um inocente ou à libertação de um culpado. A validação de uma metodologia deve então englobar a definição de um procedimento analítico, demonstrando que o mesmo possui recursos consistentes e adequados para atingir os objetivos a que se propõe. Neste trabalho, a validação da metodologia em desenvolvimento englobou duas fases de extrema importância: a calibração do método e a estimativa da incerteza associada ao resultado. Para tal, sintetizou-se a metilona (com um rendimento global de 42%), e caracterizaram-se as 3 catinonas em estudo por diversas técnicas analíticas (GC-MS, GC-FID, RMN), tendo-se determinado que apresentavam uma pureza superior a 98 %. A avaliação da estabilidade dos compostos em solução demonstrou que estes sofrem decomposição quando a solução é armazenada à temperatura ambiente (21 °C) e que, quando armazenadas no frigorífico (10 °C), a decomposição dos compostos é praticamente nula no tempo estudado. Assim, apesar de ser possível evitar uma decomposição considerável dos compostos pela conservação das soluções a 10 °C, é aconselhável que as mesmas sejam preparadas imediatamente antes da injeção no equipamento analítico, de modo a garantir o rigor dos resultados.

As análises de GC-MS e GC-FID de 21 padrões de catinonas sintéticas (metcatinona, bufedrona, pentedrona, metedrona, 3,4-DMMC, DMC, DMB, DMP, etcatinona, NEB, NEP, 4-MEC, amfepramona, DEB, DEP, 4Me-amfepramona, α -PPP, α -PBP, α -PVP, MPPP, MDPBP) e de 5 outras substâncias (anfetamina, metanfetamina, MDMA, cafeína, lidocaína), efetuadas com vista ao estudo da seletividade do método, demonstraram que apenas as catinonas NEB, α -PBP, MPPP e α -PVP poderiam ser interferentes na metodologia de quantificação. Deste modo, verificou-se que, para as substâncias estudadas e para a metodologia de GC-FID implementada, a mefedrona tem como interferente a catinona NEB, a metilona os compostos α -PBP, MPPP e α -PVP, e o MDPV não tem interferentes. Isto significa que a metodologia apenas poderá ser aplicada na ausência destes interferentes.

As análises de GC-FID das 5 soluções padrão testadas (0,02 mg/mL-5,0 mg/mL) permitiram verificar que o método apenas é linear na gama de trabalho entre 0,02 mg/mL e 3,75 g/mL, para um intervalo de confiança de 99%. Depois de verificada a linearidade, com vista à redução da carga de trabalho, bem como economizar recursos e tempo, foi implementada uma calibração do tipo monoponto, sendo que a solução padrão a utilizar para quantificar o analito, foi selecionada de acordo com o sinal de resposta do analito na amostra. A utilização de uma toma de amostra com valor superior a 18,75 mg, apenas será possível, desde que o sinal de resposta para o analito em quantificação na amostra problema seja inferior ao sinal do mesmo analito no padrão do extremo superior da gama, de concentração 3,75 mg/mL.

De modo a facilitar a aplicação da abordagem utilizada para estimar a incerteza global associada ao resultado, assim como simplificar o trabalho do analista e minimizar o risco de erros, foram implementadas 3 folhas de cálculo, uma para cada catinona em estudo, tendo por base o método numérico de Kragten. Cada folha de cálculo implementada permite a estimativa da componente de

incerteza, sob a forma de percentagem, associada a cada fonte de incerteza da qual a mensuranda depende, o que facilita a otimização da metodologia no que respeita aos componentes com maior influência na incerteza associada ao resultado final.

A compatibilidade metrológica da metodologia em desenvolvimento foi confirmada, para um nível de confiança de 99%, pela quantificação por GC-FID das 3 catinonas numa amostra problema de concentração conhecida por analito, verificando-se que o valor absoluto da diferença entre os valores dos resultados de medição é menor que a incerteza expandida que lhes está associada.

Por último, a metodologia foi aplicada a 4 amostras reais de material proveniente de uma “*SmartShop*”. Para esta avaliação, é de extrema importância referir que, previamente à quantificação de substâncias pela aplicação da técnica de GC FID, a amostra problema deve ser analisada por GC-MS, com vista à identificação dos compostos maioritários. Da análise destas 4 amostras por GC-MS, verificou-se que apenas 3 delas continham as catinonas em estudo. No entanto, apenas foi possível aplicar a metodologia implementada numa destas amostras, Blow Rosa 3, com vista à quantificação de MDPV por GC-FID, uma vez que as restantes amostras, Blow Azul 1B (contendo mefedrona) e Bliss Rosa 2 (contendo metilona), possuíam na sua composição interferentes à metodologia. Assim, verificou-se que na amostra Blow Rosa 3, a percentagem de MDPV é de $49,8 \pm 2,4$ %, para um nível de confiança de 95 %.

Os resultados mostraram que o método é simples, rápido, eficaz e de custos reduzidos, originando resultados com um grau de incerteza baixo, permitindo a quantificação das catinonas sintéticas selecionadas em amostras de material apreendido em Portugal, quando não existem interferentes, estando a metodologia pronta a ser aplicada nos trabalhos de rotina do LPC-PJ.

No que respeita à identificação de substâncias psicoativas em material apreendido em Portugal, com vista à resolução de casos judiciais, foram analisadas 57 amostras de diversas matrizes (pós, matrizes herbais, comprimidos, soluções líquidas, microselos e autocolantes, resíduos de comida, animais, vinho e torrões de açúcar), através de diversas metodologias analíticas (testes colorimétricos, TLC, CC, GC-MS, GC-FID, RMN, MS, FTIR), identificando-se 26 substâncias psicoativas diferentes, das classes das catinonas sintéticas, canabinóides sintéticos, anfetaminas e seus precursores, feniletilaminas e triptaminas, alucinogénicos, benzodiazepinas, e alguns dos adulterantes mais frequentes de substâncias de abuso (codeína, lidocaína, morfina e cafeína), evidenciando a complementaridade das várias técnicas, com vista à identificação inequívoca e a uma correta monitorização das substâncias. Destas substâncias, são de salientar as identificadas em pormenor neste trabalho, nomeadamente os canabinóides sintéticos, 5F-PB22 e 5F-AKB48, presentes em matrizes herbais, o LSD incorporado em soluções etanólicas contrapondo com os microselos contendo o 25I-NBOH, a catinona sintética α -PHP identificada numa amostra com suspeita de cocaína, o butirato de metil-3-oxo-2-fenilo, um dos mais recentes precursores de substâncias da classe das anfetaminas, e a benzodiazepina lorazepam presente numa amostra de vinho.

As análises desenvolvidas no âmbito deste trabalho evidenciam a importância da sua aplicação à temática da toxicologia forense, permitindo uma identificação e monitorização de substâncias psicoativas, auxiliando na resposta aos quesitos do processo, que por sua vez pretendem elucidar o tribunal para que as diligências necessárias ocorram. A identificação de NSP, nomeadamente pela aplicação de diferentes técnicas analíticas que se complementam, permite ainda auxiliar as entidades europeias e internacionais no âmbito do controlo de risco que lhes está associado e no controlo das novas substâncias em constante difusão no mercado.

Por último, e uma vez que as catinonas sintéticas não representam a única classe de NSP no mercado das substâncias de abuso, de futuro, devem ser igualmente implementadas metodologias analíticas com vista à quantificação de outras classes de substâncias, iniciando-se pela quantificação de canabinóides sintéticos, a classe predominante das NSP apreendidas em Portugal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. de F. Pinheiro *et al.*, *Ciências Forenses ao Serviço da Justiça*. PACTOR, 2013.
- [2] J. I. Khan, T. J. Kennedy, and D. R. (Jr.) . Christian, *Basic Principles of Forensic Chemistry*. 2012.
- [3] F. T. Peters, D. K. Wissenbach, F. P. Busardo, E. Marchei, and S. Pichini, “Method Development in Forensic Toxicology” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 23, no. 36, pp. 1–13, 2018.
- [4] “inmlcf - Serviço de Química e Toxicologia Forenses.” [Online]. Available: http://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=129:servico-de-quimica-e-toxicologia-forenses&catid=37&Itemid=292. [Accessed: 02-Sep-2018].
- [5] “Exames Periciais - Informações - Polícia Judiciária.” [Online]. Available: <https://www.policijudiciaria.pt/lpc-exames-periciais/>. [Accessed: 02-Sep-2018].
- [6] “Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2017.” [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32017L2103>.
- [7] “Decisão-quadro 2004/757/JAI do Conselho, de 25 de Outubro de 2004.” [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32004F0757>.
- [8] “Regulamento (CE) n. o 1920/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de Dezembro de 2006.” .
- [9] M. H. Baumann *et al.*, “Behavioural, Pharmacokinetic, Metabolic, and Hyperthermic Profile of 3,4-Methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) in the Wistar Rat” vol. 9, 2018.
- [10] A. M. Weinstein, P. Rosca, L. Fattore, and E. D. London, “Synthetic cathinone and cannabinoid designer drugs pose a major risk for public health” *Front. Psychiatry*, vol. 8, no. 156, 2017.
- [11] EMCDDA, “High-risk drug use and new psychoactive substances” Luxembourg, 2017.
- [12] Observatório Europeu da Droga e Toxicoddependência, “Relatório Europeu sobre Drogas 2018: Tendências e evoluções” Luxemburgo, 2018.
- [13] M. L. Soria, “New psychoactive substances : Popular and dangerous” *Spanish J. Leg. Med.*, vol. 44, no. 2, pp. 64–72, 2018.
- [14] United Nations Office on Drugs and Crime, “World Drug Report 2017: 4-Market Analysis of Synthetic Drugs: Amphetamine-type stimulants, new psychoactive substances” 2017.
- [15] R. Brennan and M. C. van Hout, “Miaow miaow: A review of the new psychoactive drug mephedrone” *Drugs and Alcohol Today*, vol. 12, no. 4, pp. 241–253, 2012.
- [16] J. P. Kelly, “Cathinone Derivatives: A Review of their Chemistry, Pharmacology and Toxicology” *Drug Test. Anal.*, vol. 3, pp. 439–453, 2011.
- [17] S. de B. Sanchez, “Sur un homologue de l'éphédrine” *Soc. Chim. Fr.*, vol. 45, pp. 284–296, 1929.
- [18] “EMCDDA | Mission.” [Online]. Available: <http://www.emcdda.europa.eu/about/mission>. [Accessed: 30-Jun-2018].
- [19] V. G. Calado, “Novas Substâncias Psicoativas. O caso da Salvia Divinorum” 2013.
- [20] “Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de Janeiro.” [Online]. Available: http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=181&tabela=leis.
- [21] EMCDDA, “Portugal Drug Report 2018” 2018.
- [22] “Convenção Única das Nações Unidas sobre o Estupefacientes, de 1961, alterada pelo Protocolo de 1972.” [Online]. Available: <http://www.ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-unica-de-1961-sobre-os-estupefacientes-0>.
- [23] “Convenção das Nações Unidas sobre as Substâncias Psicotrópicas, de 1971.” [Online]. Available: http://www.sicad.pt/BK/Institucional/Legislacao/Lists/SICAD_LEGISLACAO/Attachments/858/convencao_1971.pdf.
- [24] “Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas de 1988.” [Online]. Available: <http://www.ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-das-nacoes-unidas-contr-o-traffic-ilicito-de-estupefacientes-e-substancias-1>.
- [25] “Decisão 2005/387/JAI do Conselho, de 10 de Maio de 2005.” [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32005D0387>.

- [26] EMCDDA, “Monitoring new drugs” Luxembourg, 2006.
- [27] “Regulamento (UE) 2017/2101 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2017.” [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32006R1920>
- [28] “Estratégia Nacional para o combate às Drogas de 1999.” [Online]. Available: http://www.sicad.pt/BK/Publicacoes/Lists/SICAD_PUBLICACOES/Attachments/48/ENcomissao.pdf.
- [29] “Plano Nacional de Redução de Comportamentos Aditivos e das Dependências 2013-2020.” [Online]. Available: http://www.sicad.pt/BK/Institucional/Coordenacao/Documents/Planos/SICAD_Plano_Nacional_Reducacao_CAD_2013-2020.pdf
- [30] “Plano de Ação para a Redução dos Comportamentos Aditivos e das Dependências 2013-2016.” [Online]. Available: http://www.sicad.pt/BK/Institucional/Coordenacao/Documents/Planos/SICAD_Plano_Acao_Reducacao_CAD_2013-2016.pdf
- [31] “Lei n.º 30/2000, de 29 de Novembro.” [Online]. Available: http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=186&tabela=leis.
- [32] “Portaria n.º 94/96 de 26 de Março.” [Online]. Available: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/545980/details/maximized>.
- [33] “Decreto-Lei n.º 54/2013 de 17 de Abril.” [Online]. Available: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/260418/details/maximized>.
- [34] “Portaria n.º 154/2013 de 17 de Abril.” [Online]. Available: https://dre.pt/pesquisa/-/search/260421/details/maximized?print_preview=print-preview.
- [35] “Decreto Legislativo Regional n.º 28/2012/M, de 25 de Outubro.” [Online]. Available: http://www.sicad.pt/BK/Institucional/Legislacao/Lists/SICAD_LEGISLACAO/Attachments/839/DLR_28_2012_M.pdf.
- [36] “Lei n.º 13/2012, de 26 de Março.” [Online]. Available: http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=1655&tabela=leis&so_miolo=
- [37] United Nations Office on Drugs and Crime, “The Challenge of New Psychoactive Substances (A Report from the Global SMART Programme)” Vienna, 2013.
- [38] EMCDDA, “Health and social responses to drug problems. A European Guide.” 2017.
- [39] United Nations Office on Drugs and Crime, “World Drug Report 2018: 3-Analysis of Drug Markets” 2018.
- [40] N. Hohmann, G. Mikus, and D. Czock, “Effects and Risks Associated with Novel Psychoactive Substances” *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 111, no. 9, pp. 139–147, 2014.
- [41] H. Pathan and J. Williams, “Basic opioid pharmacology: an update” *Br. J. Pain*, vol. 6, no. 1, pp. 11–16, 2012.
- [42] A. El-Menyar, A. Mekkodathil, H. Al-Thani, and A. Al-Motarreb, “Khat use: History and Heart Failure” *Oman Med. J.*, vol. 30, no. 2, pp. 77–82, 2015.
- [43] J. S. Elmore *et al.*, “Pharmacokinetic Profiles and Pharmacodynamic Effects for Methylone and Its Metabolites in Rats” *Neuropsychopharmacology*, vol. 42, no. 10, pp. 649–660, 2017.
- [44] M. Majchrzak, R. Celinski, P. Ku, T. Kowalska, and M. Sajewicz, “The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review” *Forensic Toxicol.*, vol. 36, pp. 33–50, 2018.
- [45] L. Dell’Acqua, G. Roda, S. Arnoldi, C. Rusconi, L. Turati, and V. Gambaro, “Improved GC method for the determination of the active principles of *catha edulis*” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 929, pp. 142–148, 2013.
- [46] J. F. Hyde, E. Browning, and R. Adams, “Synthetic Homologs of d,l-Ephedrine” *Chem. Lab. Univ. Illinois*, vol. 50, pp. 2287–229, 1928.
- [47] M. G. Bossong, J. P. Van Dijk, and R. J. M. Niesink, “Methylone and mCPP, two new drugs of abuse?” *Addict. Biol.*, vol. 10, pp. 321–323, 2005.
- [48] P. Jacob and A. T. Shulgin, “WO1996039133A1,” 1996.
- [49] O. Cottencin, B. Rolland, and L. Karila, “New Designer Drugs (Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones): Review of Literature” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 20, no. 25, pp. 4106–4111, 2014.

- [50] “Decreto-Lei n.º 69/2001, de 24 de Fevereiro.” [Online]. Available: http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=181&tabela=lei_velhas&nversao=7&so_miolo=
- [51] E. Y. Santali, A. K. Cadogan, N. N. Daeid, K. A. Savage, and O. B. Sutcliffe, “Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of 4’-methylmethcathinone (mephedrone): A new ‘legal high’” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 56, pp. 246–255, 2011.
- [52] F. Westphal, T. Junge, P. Rosner, F. Sonnichsen, and F. Schuster, “Mass and NMR spectroscopic characterization of 3,4-methylenedioxypropylvalerone: A designer drug with alfa-pyrrolidinophenone structure” *Forensic Sci. Int.*, vol. 190, pp. 1–8, 2009.
- [53] C. C. Wang, P. Hartmann-Fischbach, T. R. Krueger, T. L. Wells, A. R. Feineman, and J. C. Compton, “Rapid and sensitive analysis of 3,4-methylenedioxypropylvalerone in equine plasma using liquid chromatography-Tandem mass spectrometry” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 36, pp. 327–333, 2012.
- [54] SICAD, “PORTUGAL: Point New Developments, Trends and in-depth information” 2012.
- [55] V. G. Calado and L. Dias, “Novas Substâncias Psicoativas em Portugal. Passado, presente e futuro.” 2015. [Online]. Available: http://www.sicad.pt/BK/EstatisticaInvestigacao/EstudosConcluidos/Lists/SICAD_ESTUDOS/Attachments/12/NSP_2015_comunicacao.pdf.
- [56] R. A. Glennon and M. Dukat, “Synthetic Cathinones: A Brief Overview of Overviews with Applications to the Forensic Sciences” *Ann. Forensic Res. Anal.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–7, 2017.
- [57] D. M. Calinski, D. F. Kisor, and J. E. Sprague, “A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on drug pharmacokinetics” *Psychopharmacology (Berl.)*, 2018.
- [58] L. Karila, J. Billieux, A. Benyamina, C. Lançon, and O. Cottencin, “The effects and risks associated to mephedrone and methylone in humans: A review of the preliminary evidences” *Brain Res. Bull.*, vol. 126, pp. 61–67, 2016.
- [59] “What are drug precursors? - European Commission.” [Online]. Available: https://ec.europa.eu/taxation_customs/business/customs-controls/drug-precursors-control/what-are-drug-precursors_en. [Accessed: 27-Aug-2018].
- [60] EMCDDA & Europol, “EU Drug Markets Report” 2016. [Online]. Available: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2374/TD0416161ENN_1.PDF
- [61] Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência, “Relatório Europeu sobre Drogas - Tendências e Evoluções” 2017. [Online]. Available: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001PTN.pdf>
- [62] International Narcotics Control Board, “Precursors 2017” 2018. [Online]. Available: https://www.incb.org/incb/en/precursors/technical_reports/2017.html
- [63] E. Emke, D. Vughs, A. Kolkman, and P. De Voogt, “Wastewater-based epidemiology generated forensic information: Amphetamine synthesis waste and its impact on a small sewage treatment plant” *Forensic Sci. Int.*, vol. 286, pp. e1–e7, 2018.
- [64] M. Philp and S. Fu, “A review of chemical ‘spot’ tests: A presumptive illicit drug identification technique” *Drug Test. Anal.*, vol. 10, pp. 95–108, 2018.
- [65] M. Hsu, D. Chen, and R. H. Liu, “Detection of abused drugs in urine by GC-MS” *J. Food Drug Anal.*, vol. 17, no. 4, pp. 233–245, 2014.
- [66] V. Gambaro, S. Arnoldi, M. L. Colombo, L. Dell’Acqua, K. Guerrini, and G. Roda, “Determination of the active principles of Catha Edulis: Quali-quantitative analysis of cathinone, cathine, and phenylpropanolamine” *Forensic Sci. Int.*, vol. 217, no. 1–3, pp. 87–92, 2012.
- [67] D. Zuba, “Identification of cathinones and other active components of ‘legal highs’ by mass spectrometric methods” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 32, pp. 15–30, 2012.
- [68] V. Sandgren *et al.*, “Prediction of designer drugs: Synthesis and spectroscopic analysis of synthetic cathinone analogs that may appear on the Swedish drug market” *Drug Test. Anal.*, pp. 1–23, 2018.
- [69] A. M. Leffler, P. B. Smith, A. de Armas, and F. L. Dorman, “The analytical investigation of synthetic street drugs containing cathinone analogs” *Forensic Sci. Int.*, vol. 234, pp. 50–56, 2014.
- [70] I. Rasanen, M. Kyber, I. Szilvay, J. Rintatalo, and I. Ojanpera, “Straightforward single-calibrant

- quantification of seized designer drugs by liquid chromatography-chemiluminescence nitrogen detection” *Forensic Sci. Int.*, vol. 237, pp. 119–125, 2014.
- [71] K. M. Mohamed, A. H. Al-hazmi, A. M. Alasiri, and M. E. Ali, “A GC-MS Method for Detection and Quantification of Cathine , Cathinone , Methcathinone and Ephedrine in Oral Fluid” no. 16, pp. 1–6, 2016.
- [72] K. Mathys and R. Brenneisen, “Determination of (S)-(-)-cathinone and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection” *J. Chromatogr.*, vol. 593, pp. 79–85, 1992.
- [73] D. Ammann, J. M. McLaren, D. Gerostamoulos, and J. Beyer, “Detection and Quantification of New Designer Drugs in Human Blood: Part 2 - Designer Cathinones” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 36, no. 6, pp. 381–389, 2012.
- [74] J. Beyer, F. T. Peters, T. Kraemer, and H. H. Maurer, “Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization” *J. Mass Spectrom.*, vol. 42, pp. 150–160, 2007.
- [75] S. A. B. Shah *et al.*, “Quantitative analysis of mephedrone using liquid chromatography tandem mass spectroscopy: Application to human hair” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 61, pp. 64–69, 2012.
- [76] J. C. Alvarez, I. Etting, E. Abe, A. Villa, and N. Fabresse, “Identification and quantification of 4-methylethcathinone (4-MEC) and 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV) in hair by LC-MS/MS after chronic administration” *Forensic Sci. Int.*, vol. 270, pp. 39–45, 2017.
- [77] M. Wiergowski *et al.*, “Identification of novel psychoactive substances 25B-NBOMe and 4-CMC in biological material using HPLC-Q-TOF-MS and their quantification in blood using UPLC – MS/MS in case of severe intoxications” *J. Chromatogr. B*, vol. 1041–1042, no. April 2015, pp. 1–10, 2017.
- [78] T. G. Rosano, P. Y. Ohouo, and M. Wood, “Screening with Quantification for 64 Drugs and Metabolites in Human Urine using UPLC–MS-MS Analysis and a Threshold Accurate Calibration” *J. Anal. Toxicol.*, pp. 1–11, 2017.
- [79] P. Amaratunga, B. L. Lemberg, and D. Lemberg, “Quantitative Measurement of Synthetic Cathinones in Oral Fluid” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 37, pp. 622–628, 2013.
- [80] S. Matsuta, N. Shima, H. Kamata, and H. Kakehashi, “Metabolism of the designer drug alfa-pyrrolidinobutiophenone (alfa-PBP) in humans: Identification and quantification of the phase I metabolites in urine” *Forensic Sci. Int.*, vol. 249, pp. 181–188, 2015.
- [81] M. Grapp, C. Kaufmann, and M. Ebbecke, “Toxicological investigation of forensic cases related to the designer drug 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV): Detection , quantification and studies on human metabolism by GC–MS” *Forensic Sci. Int.*, vol. 273, pp. 1–9, 2017.
- [82] K. A. Alsenedi and C. Morrison, “Analytical Methods Determination of amphetamine-type stimulants (ATSs) and synthetic cathinones in urine using solid phase micro-extraction fibre tips and gas chromatography-mass spectrometry” *Anal. Methods*, vol. 10, pp. 1431–1440, 2018.
- [83] O. I. G. Khreit, C. Irving, E. Schmidt, J. A. Parkinson, N. Nic Daeid, and O. B. Sutcliffe, “Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of the components found in the evolved ‘legal high’ NRG-2” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 61, pp. 122–135, 2012.
- [84] Eurachem Guide, “The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics” 2014.
- [85] International Organization for Standardization, “ISO/IEC 17025:2017(en), General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v1:en>. [Accessed: 06-May-2018].
- [86] Joint Committee For Guides In Metrology, “International Vocabulary of Metrology - Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM)” 2012.
- [87] RELACRE, “Guia 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química” 2000.
- [88] M. Ribani, C. Bottoli, C. Collins, I. Jardim, and L. Melo, “Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos” *Quim. Nova*, vol. 27, no. 5, pp. 771–780, 2004.
- [89] F. T. Peters and H. H. Maurer, “Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review” *Accred Qual Assur*, vol. 7, pp. 441–449, 2002.
- [90] M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, “Harmonized guidelines for single-laboratory

- validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)” 2002.
- [91] W. Penninckx and C. Hartmann, “Validation of the Calibration Procedure in Atomic Absorption Spectrometric” vol. 11, no. April, pp. 237–246, 1996.
- [92] S. L. R. Ellison, A. Williams, and (Eds), “Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement” 2012.
- [93] R. B. Silva, A. Williams, and (Eds), “Eurachem/CITAC Guide: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement” 2015.
- [94] R. J. N. Bettencourt and D. Silva, “Spreadsheet for designing valid least-squares calibrations: A tutorial” *Talanta*, vol. 148, pp. 177–190, 2016.
- [95] R. J. N. B. Da Silva, J. R. Santos, and M. F. G. F. C. Camões, “A new terminology for the approaches to the quantification of the measurement uncertainty” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 10, no. 12, pp. 664–671, 2006.
- [96] J. Kragten, “Calculating Standard Deviations and Confidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique” *Analyst*, vol. 119, pp. 2161–2165, 1994.
- [97] K. Heydorn, “Metrological compatibility-a key issue in future accreditation” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 15, no. 11, pp. 643–645, 2010.
- [98] S. D. McDermott *et al.*, “The analysis of substituted cathinones. Part 2: An investigation into the phenylacetone based isomers of 4-methylmethcathinone and N-ethylcathinone” *Forensic Sci. Int.*, vol. 212, no. 1–3, pp. 13–21, 2011.
- [99] F. T. Peters, O. H. Drummer, and F. Musshoff, “Validation of new methods” *Forensic Sci. Int.*, vol. 165, no. 2–3, pp. 216–224, 2007.
- [100] R. J. N. Bettencourt da Silva, “Modelação do Desempenho de Métodos Analíticos Complexos - Tese de Doutorado em Química” 2011.
- [101] P. P. Santos, *Química Orgânica, Volume I*. 2ª Ed. Lisboa: ISTPress, 2011.
- [102] G. Frison, M. Gregio, L. Zamengo, F. Zancanaro, S. Frasson, and R. Sciarone, “Gas chromatography/mass spectrometry determination of mephedrone in drug seizures after derivatization with 2,2,2-trichloroethyl chloroformate” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 35, pp. 387–390, 2011.
- [103] K. Tsujikawa, K. Kuwayama, T. Kanamori, Y. T. Iwata, and H. Inoue, “Thermal degradation of α -pyrrolidinopentiophenone during injection in gas chromatography/mass spectrometry” *Forensic Sci. Int.*, vol. 231, no. 1–3, pp. 296–299, 2013.
- [104] S. Kerrigan, M. Savage, C. Cavazos, and P. Bella, “Thermal degradation of synthetic cathinones: Implications for forensic toxicology” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [105] C. R. Maheux, C. R. Copeland, and M. M. Pollard, “Characterization of Three Methcathinone Analogs: 4-Methylmethcathinone, Methylone, and bk-MBDB” *Microgram J.*, vol. 7, no. 2, pp. 42–49, 2010.
- [106] E. Pretsch, P. Bühlmann, and C. Affolter, *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. 2000.
- [107] A. M. Almeida, M. M. Castel-Branco, and A. C. Falcão, “Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 774, no. 2, pp. 215–222, 2002.
- [108] L. Cuadros-Rodríguez, L. Gámiz-Gracia, E. M. Almansa-López, and J. M. Bosque-Sendra, “Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 20, no. 11, pp. 620–636, 2001.
- [109] M. M. Khamis, N. Klemm, D. J. Adamko, and A. El-Aneed, “Comparison of accuracy and precision between multipoint calibration, single point calibration, and relative quantification for targeted metabolomic analysis” *Anal. Bioanal. Chem.*, pp. 1–15, 2018.
- [110] F. E. Grubbs, “Sample Criteria for Testing Outlying Observations” *Ann. Math. Stat.*, vol. 21, no. 1, pp. 27–58, 1950.
- [111] D. M. Silveira, P. A. S. Salgueiro, M. F. G. F. C. Camões, and R. J. N. Bettencourt da Silva, “Development of metrological models for internal standard single-point and multi-point calibrations for the assessment of tear gas weapons compliance with legislation” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 17, no. 2, pp. 115–127, 2012.
- [112] Analytical Methods Committee, “Is my calibration linear?” *Analyst*, vol. 119, no. 11, pp. 2363–2366, 1994.

- [113] N. Langer, R. Lindigkeit, H.-M. Schiebel, U. Papke, L. Ernst, and T. Beuerle, “Identification and quantification of synthetic cannabinoids in ‘spice-like’ herbal mixtures: Update of the German situation for the spring of 2015” *Forensic Sci. Int.*, 2015.
- [114] A. S. Y. Tang, S. W. X. Loh, H. B. Koh, S. Tan, A. T. W. Yap, and S. H. Zhang, “Differentiation and identification of 5F-PB-22 and its isomers” *Forensic Sci. Int.*, vol. 279, pp. 53–59, 2017.
- [115] G. Assemat, F. Dubocq, S. Balayssac, C. Lamoureux, M. Malet-Martino, and V. Gilard, “Screening of ‘spice’ herbal mixtures: From high-field to low-field proton NMR” *Forensic Sci. Int.*, vol. 279, pp. 88–95, 2017.
- [116] World Health Organization (WHO), “5F-PB-22 Critical Review Report” no. November, pp. 6–10, 2017.
- [117] World Health Organization (WHO), “5F-APINACA (5F-AKB-48) Review Report” 2016.
- [118] Comissão Europeia, “Proposta de Decisão do Conselho 2018/0011” 2018.
- [119] Assembleia da República, “XIII LEGISLATURA - 4.ª SESSÃO LEGISLATIVA (2018-2019).” [Online]. Available: <http://app.parlamento.pt/darpages/dardoc.aspx?doc=6148523063446f764c324679626d56304c334e706447567a4c31684a53556c4d5a5763765245465353556b765245465353556c42636e463161585a764c7a517577716f6c4d6a42545a584e7a77364e764a5449775447566e61584e7359585270646d457655335>.
- [120] T. Passie, J. H. Halpern, D. O. Stichtenoth, H. M. Emrich, and A. Hintzen, “The pharmacology of lysergic acid diethylamide: A review” *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 14, no. 4, pp. 295–314, 2008.
- [121] J. H. Halpern, “Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 102, no. 2, pp. 131–138, 2004.
- [122] “EMCDDA | LSD profile (chemistry, effects, other names, synthesis, mode of use, pharmacology, medical use, control status).” [Online]. Available: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/lsd>. [Accessed: 26-Aug-2018].
- [123] J. Coelho Neto *et al.*, “Preventing misidentification of 25I-NBOH as 2C-I on routine GC–MS analyses,” *Forensic Toxicol.*, vol. 35, no. 2, pp. 415–420, 2017.
- [124] “Regulamento (CE) n.º 273/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 11 de Fevereiro de 2004.” [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32004R0273>.

6 ANEXOS

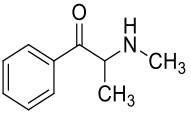
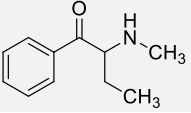
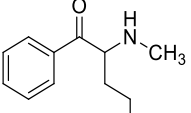
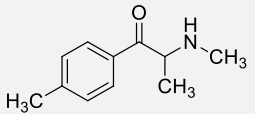
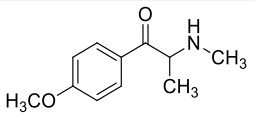
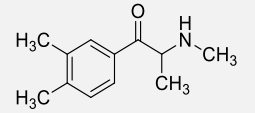
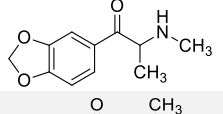
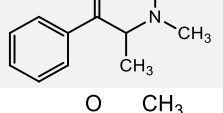
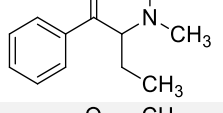
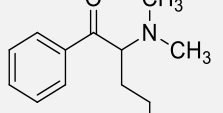
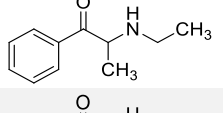
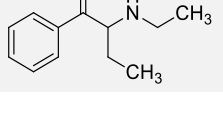
Anexo 6.1 - Lista de solventes adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

<i>Solvente</i>	<i>Marca [CAS]</i>	<i>Características</i>
<i>CDCl₃</i>	<i>SigmaAldrich</i> [CAS N°. 865-49-6]	99,8%, Densidade: 1,500 g/mL MM = 120,38 g/mol
<i>CHCl₃</i>	<i>Merck</i> [CAS N°. 67-66-3]	Densidade: 1,48 g/mL MM = 119,38 g/mol
<i>D₂O</i>	<i>SigmaAldrich</i> [CAS N°. 7789-20-0]	99,9%, Densidade: 1,107 g/mL MM = 20,03 g/mol
<i>DMSO-d₆</i>	<i>Eurisotop</i> [CAS N°. 2206-27-1]	99,80%, Densidade: 1,190 g/mL MM = 84,17 g/mol
<i>MeOD</i>	<i>SigmaAldrich</i> [CAS N°. 811-98-3]	99,8%, Densidade: 0,888 g/mL MM = 36,07 g/mol
<i>MeOH</i>	<i>Merck</i> [CAS N°. 67-56-1]	Densidade: 0,792 g/mL MM = 32,04 g/mol
<i>CH₂Cl₂</i>	<i>SigmaAldrich</i> [CAS N°. 75-09-2]	>99,9%, Densidade: 1,325 g/mL MM = 84,93 g/mol
<i>THF</i>	<i>Carlo Erba</i> [CAS N°. 109-99-9]	>99,9%, Densidade: 0,89 g/mL MM = 72,11 g/mol
<i>Acetona</i>	<i>Carlo Erba</i> [CAS N°. 67-64-1]	Densidade: 0,79 g/mL MM = 58,01 g/mol
<i>Éter Etilico</i>	<i>Honeywell</i> [CAS N°. 60-29-7]	Densidade: 0,71 g/cm ³ MM = 74,12 g/mol
<i>Acetato de etilo</i>	<i>Carlo Erba</i> [CAS N°. 144-78-6]	Densidade: 0,90 g/cm ³ MM = 88,10 g/mol
<i>Benzeno</i>	<i>Merck</i> [CAS N°. 71-43-2]	Densidade: 0,88 g/cm ³ MM = 78,11 g/mol
<i>Éter de petróleo</i>	<i>Technical</i> [CAS N°. 64742-49-0]	Densidade: 0,68 kg/m ³
<i>n-hexano</i>	<i>Carlo Erba</i> [CAS N°. 110-54-3]	Densidade: 0,65 kg/m ³ MM = 86,18 g/mol

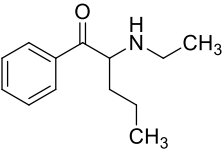
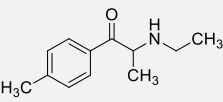
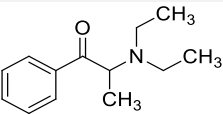
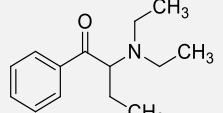
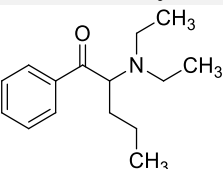
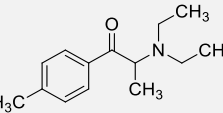
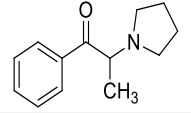
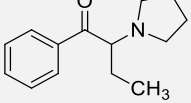
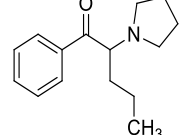
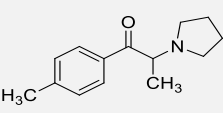
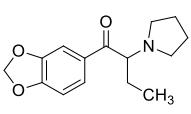
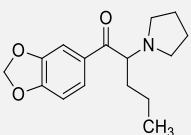
Anexo 6.2 - Lista de reagentes, adquiridos comercialmente e preparados previamente, utilizados sem purificação prévia.

<i>Reagente</i>	<i>Marca [CAS]</i>	<i>Características</i>
<i>(3',4'-metilenodioxo)propiofenona</i>	<i>AlfaAeser</i> [CAS N.º 28281-18-4]	98%, Densidade: 1,210 g/cm ³ MM=178,18 g/mol
<i>Br₂</i>	[CAS N.º. 7726-95-6]	Densidade: 3,12 g/cm ³
<i>HBr</i>	[CAS N.º. 10035-10-6]	48%, Densidade: 1,488 g/cm ³ MM=80,92 g/mol
<i>H₂SO₄</i>	[CAS N.º. 7664-93-9]	96%, Densidade: 1,840 g/cm ³ MM=98,02 g/mol
<i>Metilamina</i>	<i>SigmaAldrich</i> [CAS N.º 74-89-5]	Solução 2M em THF MM=31,06 g/mol
<i>NaCl</i>	[CAS N.º. 7647-14-5]	Densidade: 2,16 g/cm ³ MM=58,44 g/mol
<i>NaHCO₃</i>	<i>Merck</i> [CAS N.º 144-55-8]	Densidade: 2,22 g/cm ³ MM=84,01 g/mol

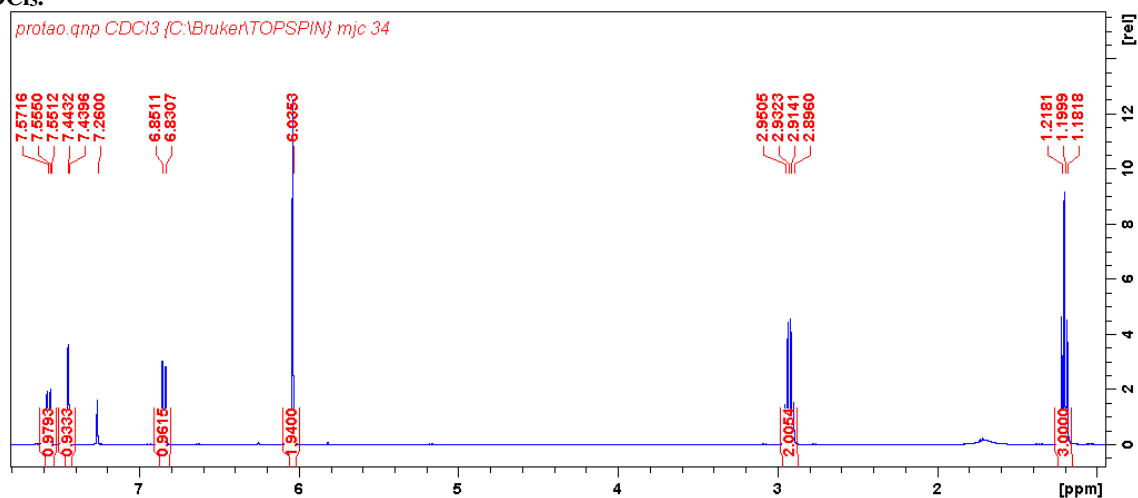
Anexo 6.3 - Catinonas sintéticas utilizadas para o estudo de interferentes do método. Estas encontram-se na forma de hidrocloreto, apesar de as estruturas se encontrarem na forma de base livre.

Número	Nome	Estrutura	GC-MS		GC-FID
			tr (min.)	Picos m/z	tr (min.)
1	Metcatinona		7,02	P. Base:58 105, 77, 56, 51, 42	6,95
2	Bufedrona		7,83	P. Base:72 148, 105, 77, 57, 44	7,70
3	Pentedrona		8,76	P. Base:86 148, 105, 77, 51, 44	8,55
4	Mefedrona (1)		8,26	P. Base:58 162, 119, 105, 91, 65, 42	8,39
5	Metedrona		10,21	P. Base:58 135, 107, 77, 42	10,00
6	3,4-DMMC		9,81	P. Base:58 133, 105, 77, 42	8,62
7	Metilona (2)		10,88	P. Base:58 149, 121, 91, 77, 42	10,85
8	DMC		7,50	P. Base:72 162, 105, 77, 56, 42	7,27
9	DMB		8,24	P. Base:86 162, 105, 77, 71, 51, 42	8,03
10	DMP		9,13	P. Base:100 162, 105, 77, 71, 58, 42	8,92
11	Etcatinona		7,71	P. Base:72 162, 105, 77, 56, 44	7,58
12	NEB		8,45	P. Base:86 162, 105, 77, 70, 58, 41	8,47

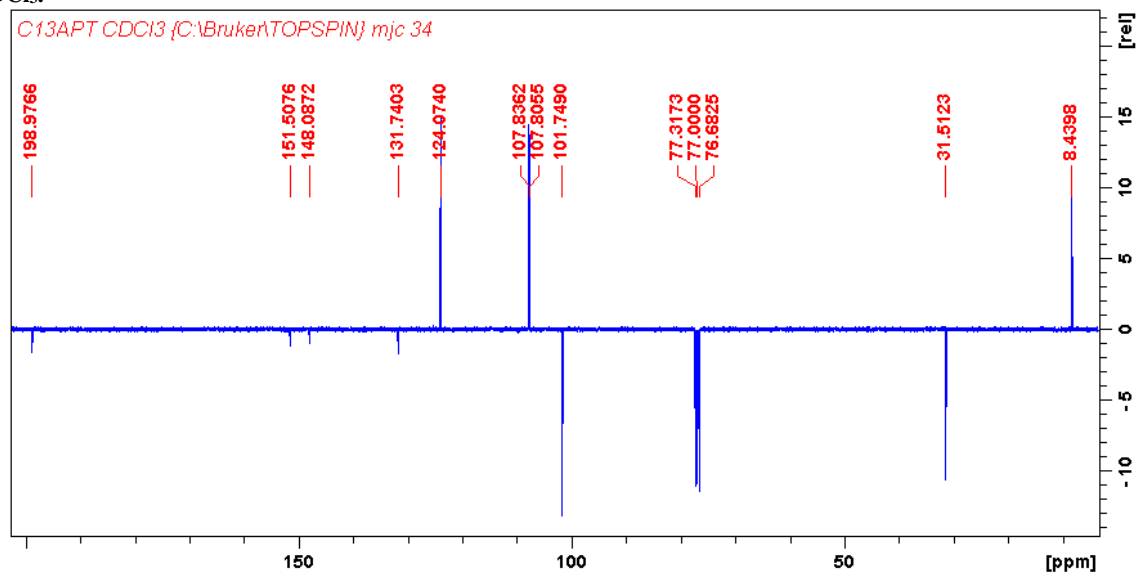
Anexo 6.3 (Continuação) - Catíoninas sintéticas utilizadas para o estudo de interferentes do método. Estas encontram-se na forma de hidróclorato, apesar de as estruturas se encontrarem na forma de base livre.

Número	Nome	Estrutura	GC-MS		GC-FID
			tr (min.)	Picos m/z	tr (min.)
13	NEP		9,31	P. Base:100 162, 105, 77, 58, 44	9,12
14	4-MEC		9,04	P. Base:58 191, 119, 105, 91, 65, 44	8,84
15	Amfepramona		8,93	P. Base:100 206, 105, 77, 72, 44	8,69
16	DEB		9,52	P. Base:114 190, 105, 86, 77, 58, 41	9,33
17	DEP		10,31	P. Base:128 190, 105, 91, 77, 56, 42	10,08
18	4Me-Amfepramona		10,13	P. Base:100 190, 119, 91, 72, 56, 44	9,95
19	α -PPP		10,27	P. Base:98 105, 77, 69, 56, 51, 41	10,24
20	α -PBP		10,92	P. Base:112 105, 96, 77, 70, 55, 41	10,97
21	α -PVP		11,66	P. Base:126 232, 188, 105, 84, 77, 55, 42	11,58
22	MPPP		11,38	P. Base:98 216, 119, 91, 65, 56, 41	11,58
23	MDPBP		14,41	P. Base:112 232, 149, 121, 96, 55, 41	14,15
24	MDPV (3)		14,88	P. Base:126 273, 232, 149, 121, 96, 65, 55, 42	14,81

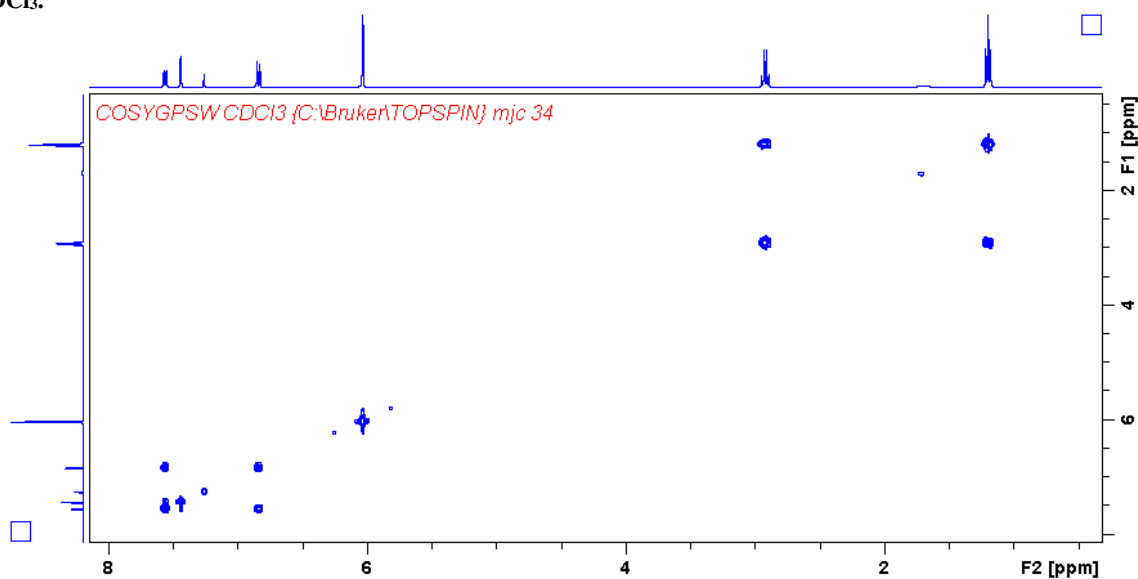
Anexo 6.4 - Espectro de RMN ^1H do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl_3 .



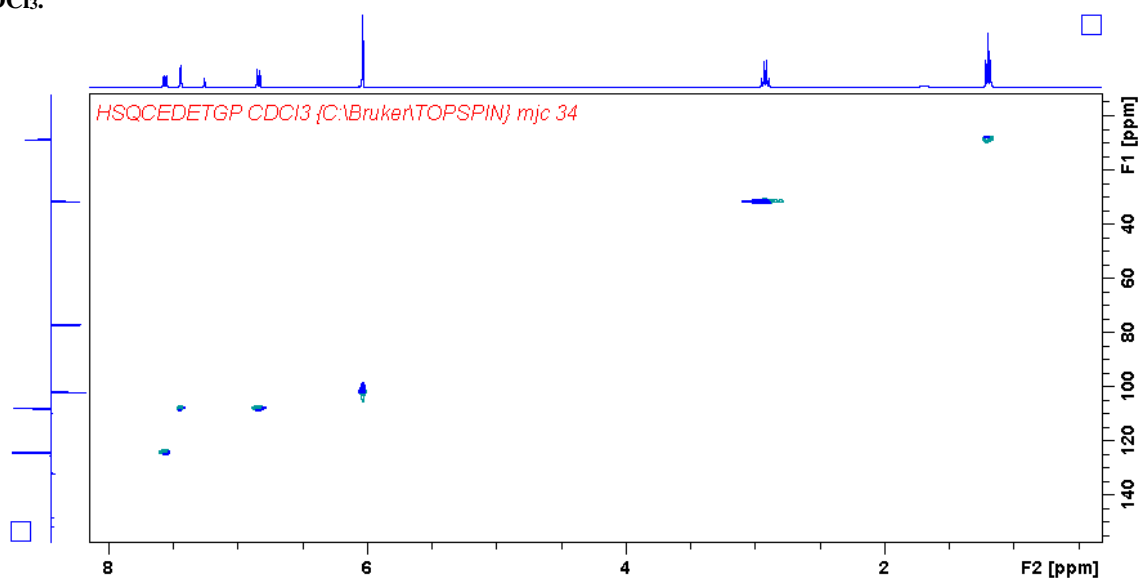
Anexo 6.5 - Espectro de RMN ^{13}C do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl_3 .



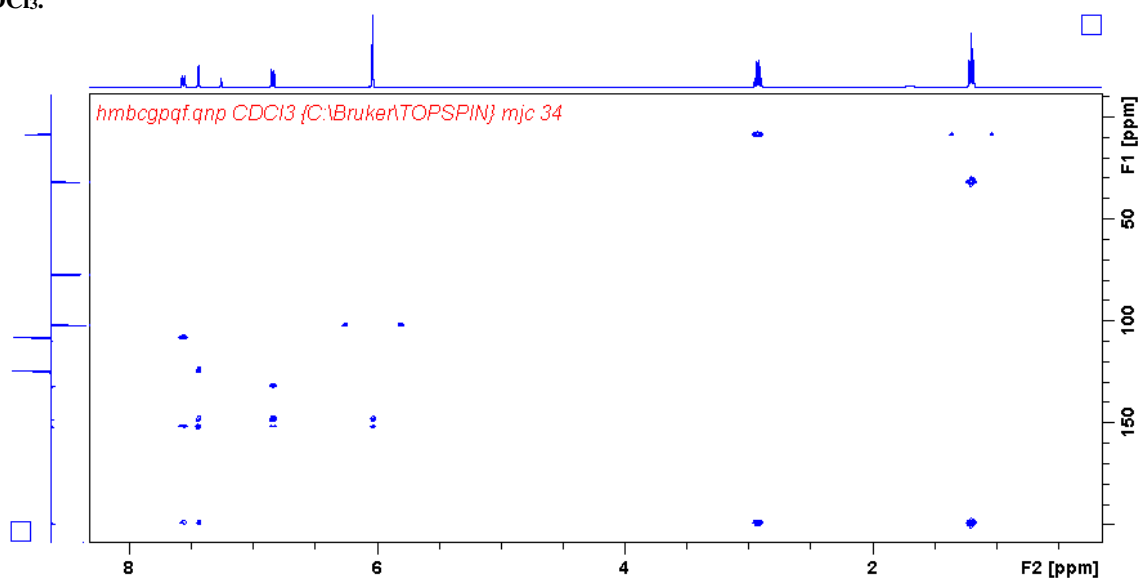
Anexo 6.6 - Espectro de COSY do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl₃.



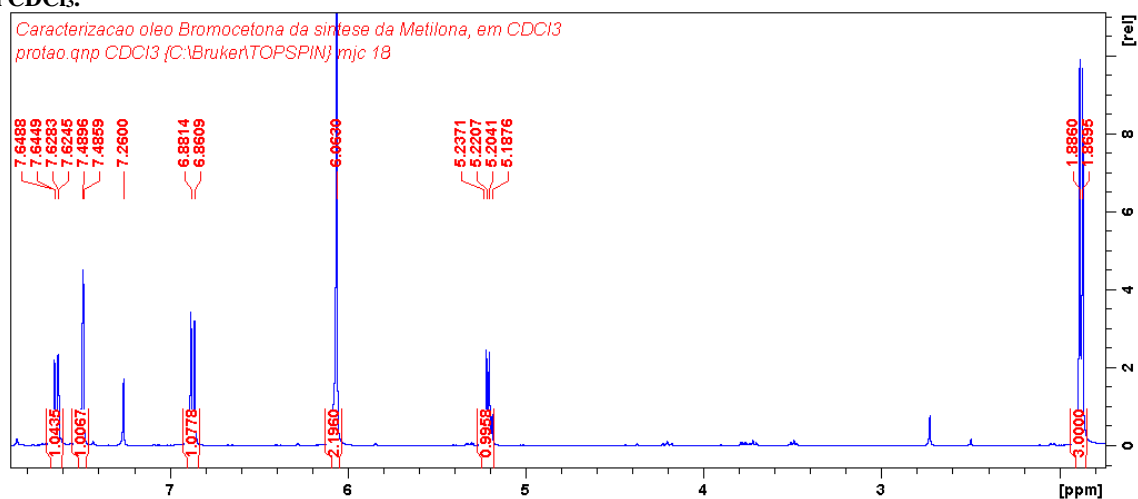
Anexo 6.7 - Espectro de HSQC do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl₃.



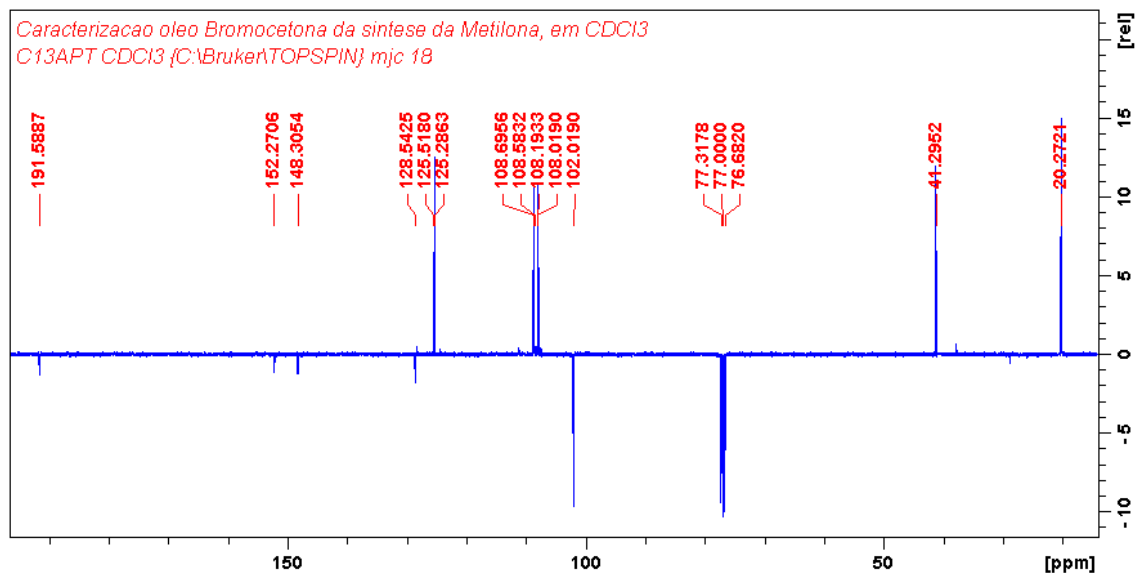
Anexo 6.8 - Espectro de HMBC do composto de partida utilizado na síntese da metilona, 1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (4), obtido a partir da análise de cerca de 8 mg de composto dissolvidos em CDCl₃.



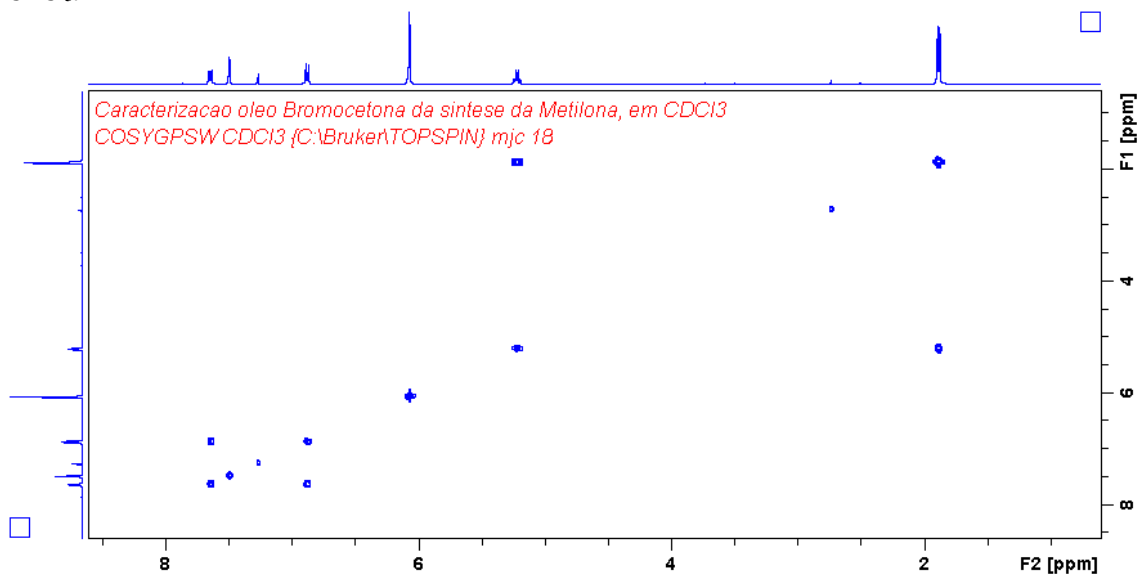
Anexo 6.9 - Espectro de RMN ¹H do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl₃.



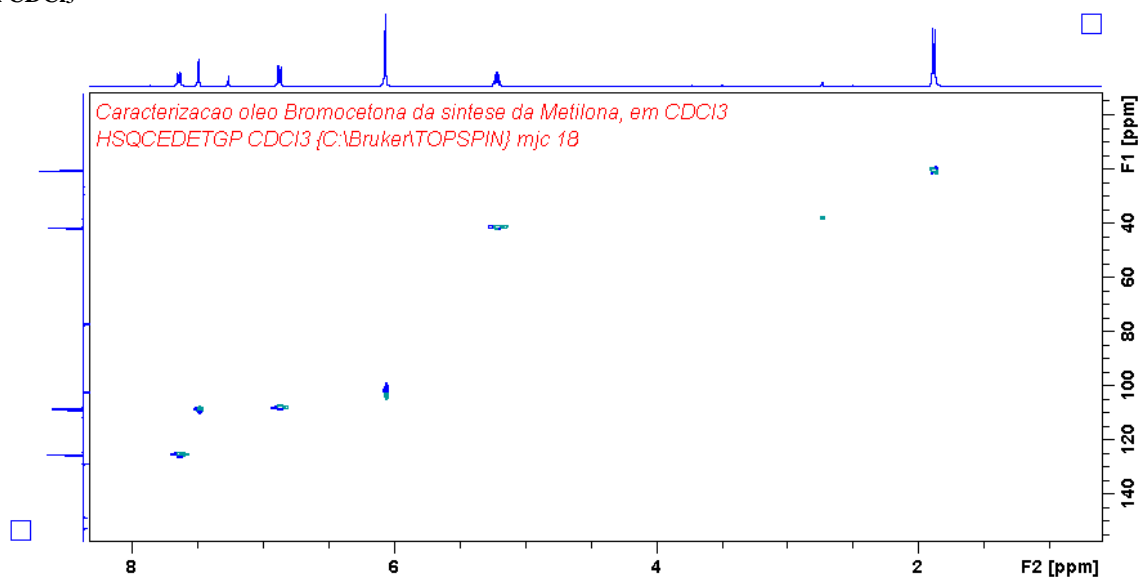
Anexo 6.10 - Espectro de RMN ^{13}C do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3 .



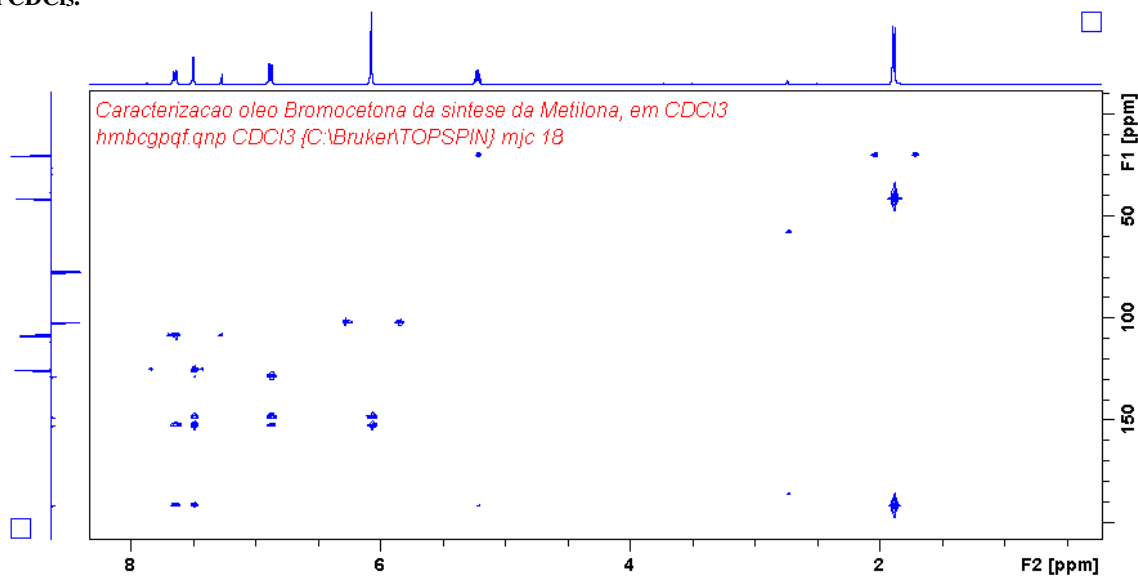
Anexo 6.11 - Espectro de COSY do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3 .



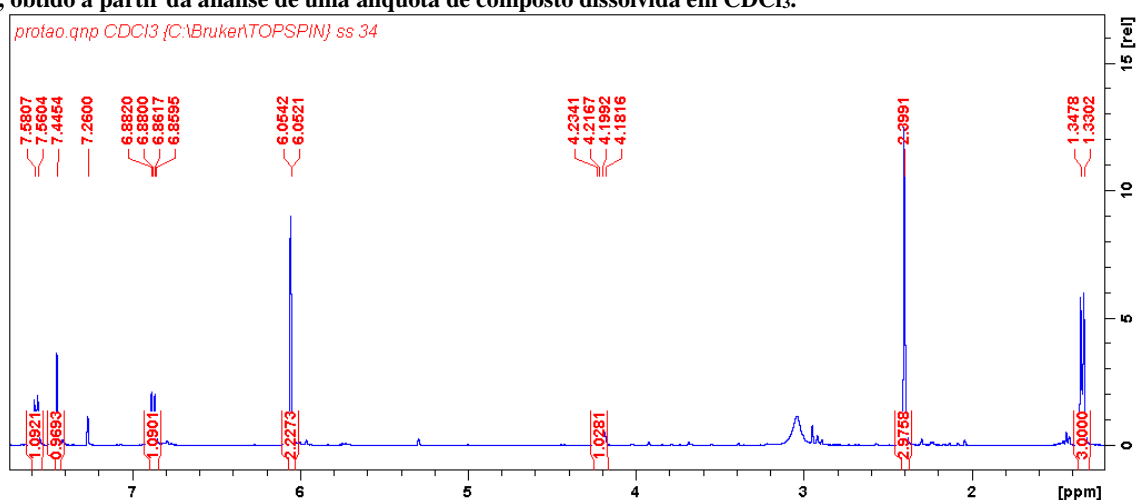
Anexo 6.12 - Espetro de HSQC do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl₃



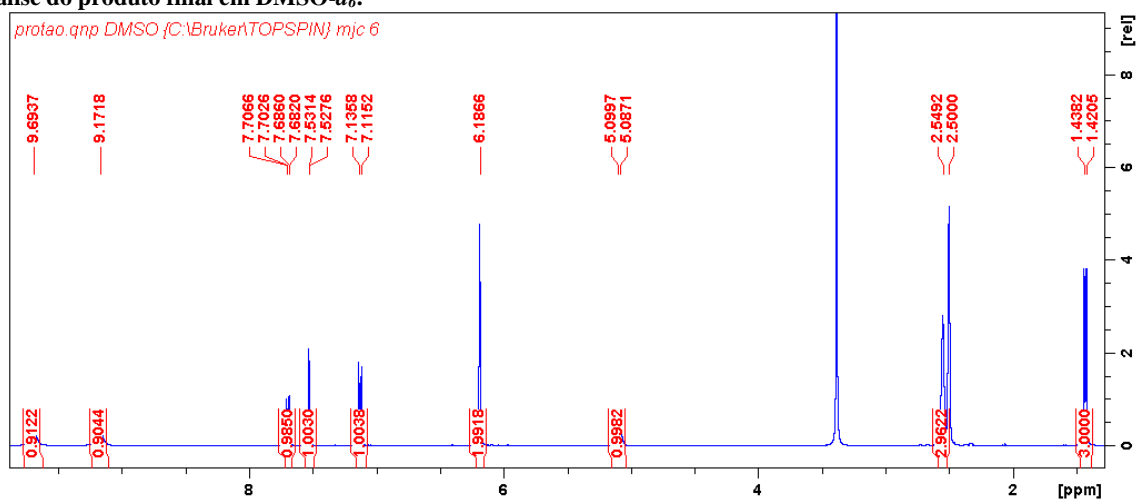
Anexo 6.13 - Espetro de HMBC do composto intermediário da síntese da metilona, 2-bromo-1-(3,4-metilenodioxifenil)propano-1-ona (5), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl₃.



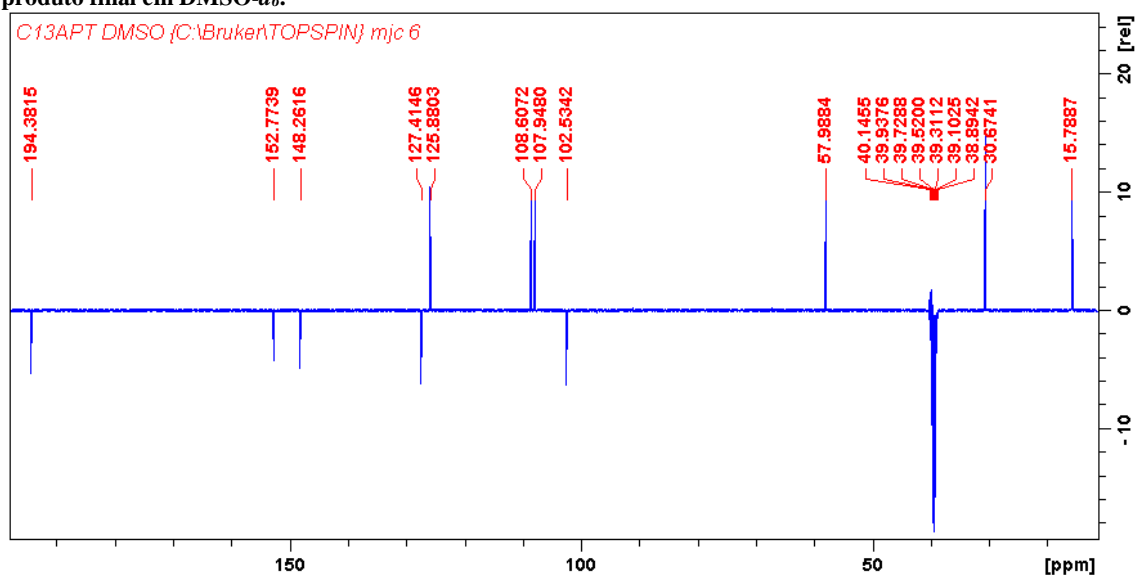
Anexo 6.14 - Espectro de RMN ^1H do composto intermediário da síntese da metilona, a metilona na forma de base livre (6), obtido a partir da análise de uma alíquota de composto dissolvida em CDCl_3 .



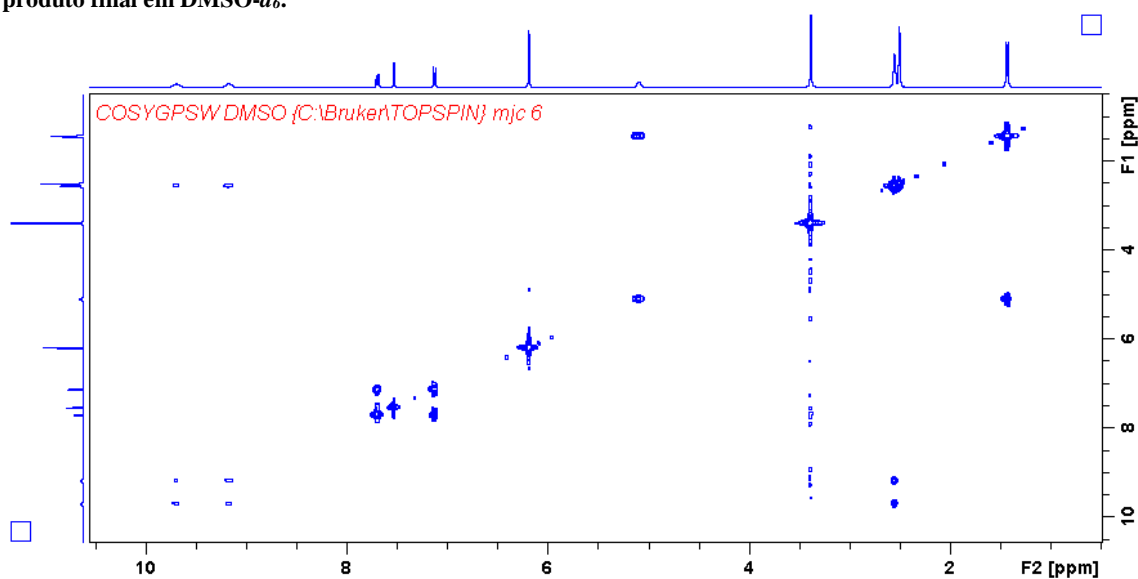
Anexo 6.15 - Espectro de RMN ^1H da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em $\text{DMSO}-d_6$.



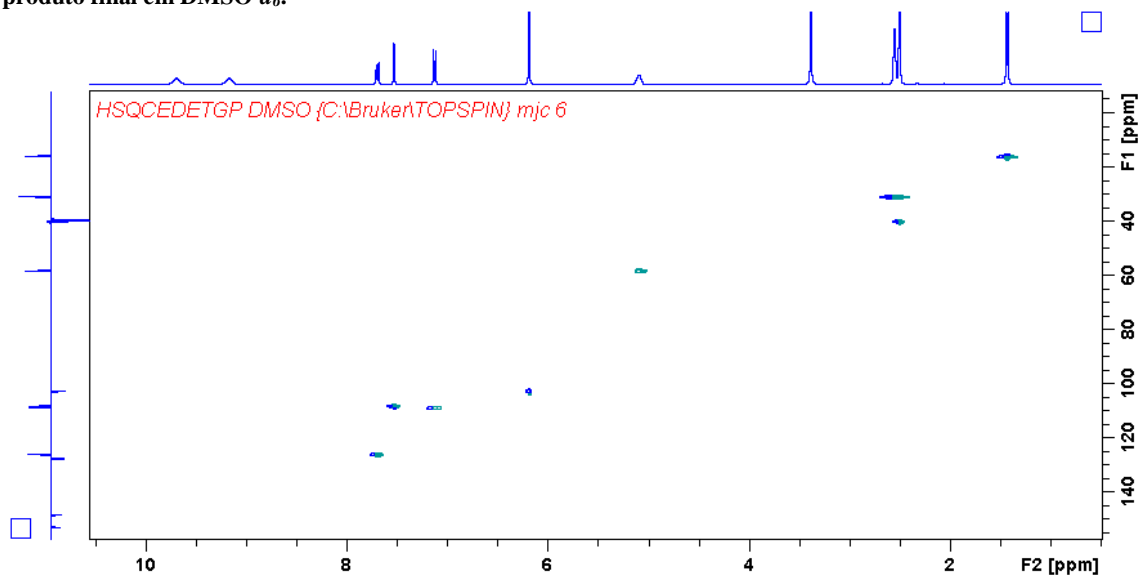
Anexo 6.16 - Espectro de RMN ^{13}C da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em $\text{DMSO}-d_6$.



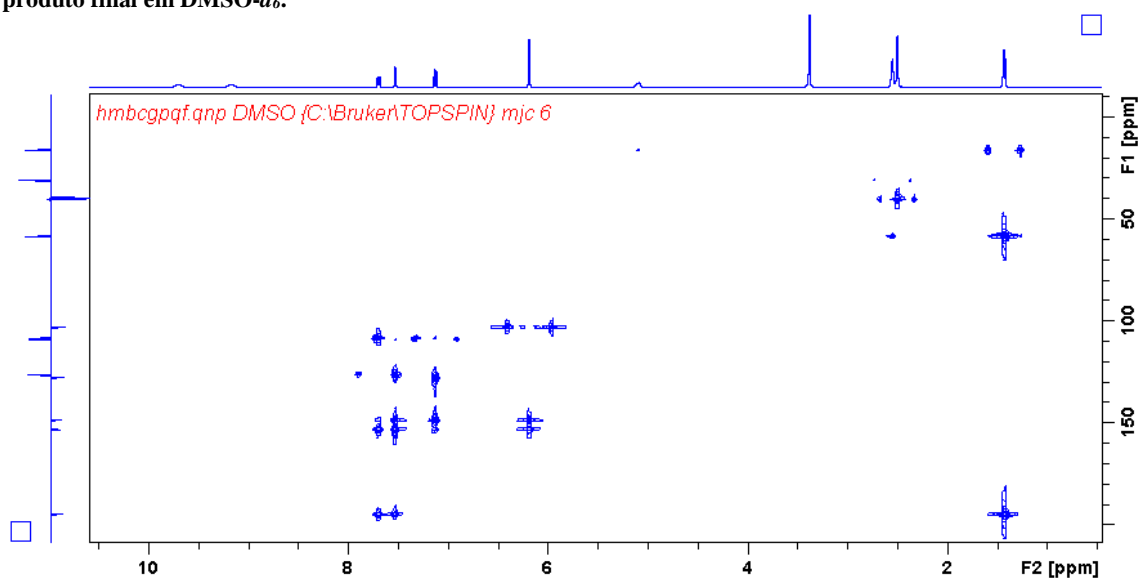
Anexo 6.17 - Espectro de COSY da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em DMSO- d_6 .



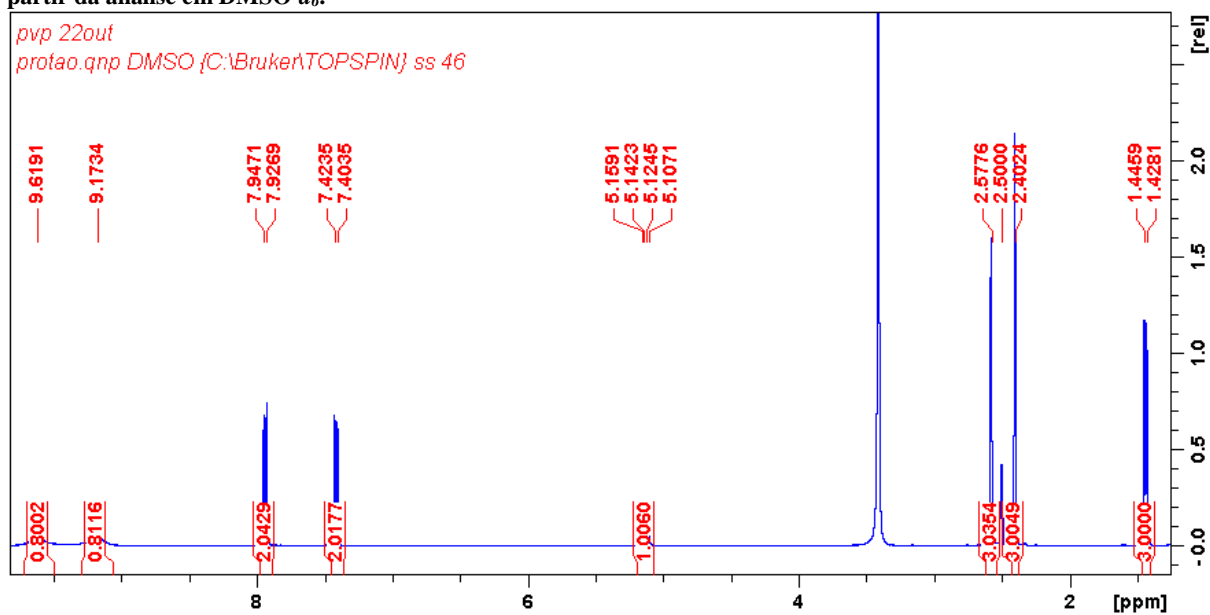
Anexo 6.18 - Espectro de HSQC da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em DMSO- d_6 .



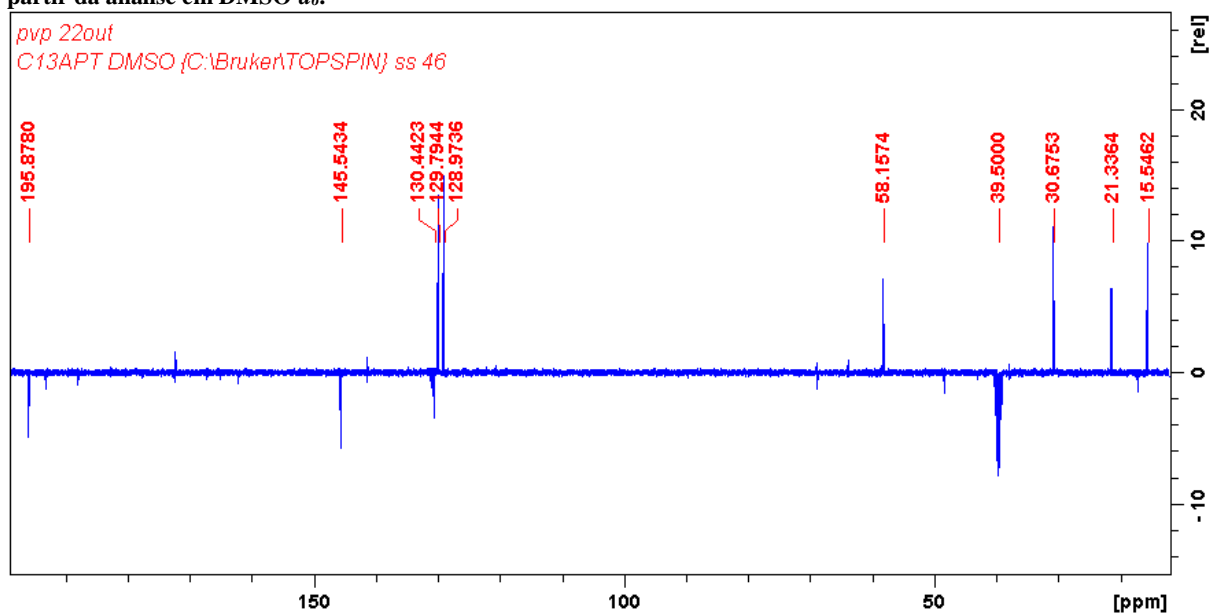
Anexo 6.19 - Espectro de HMBC da metilona na forma de sal de hidrocloreto (2) sintetizada, obtido a partir da análise do produto final em DMSO- d_6 .



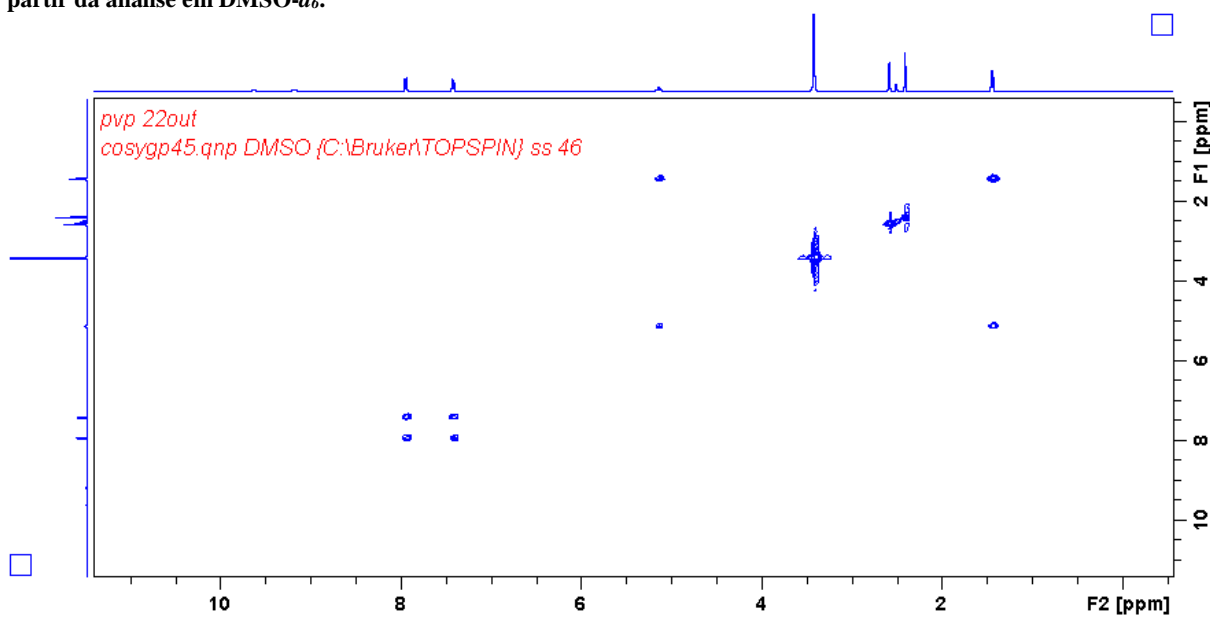
Anexo 6.20 - Espectro de RMN ^1H da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



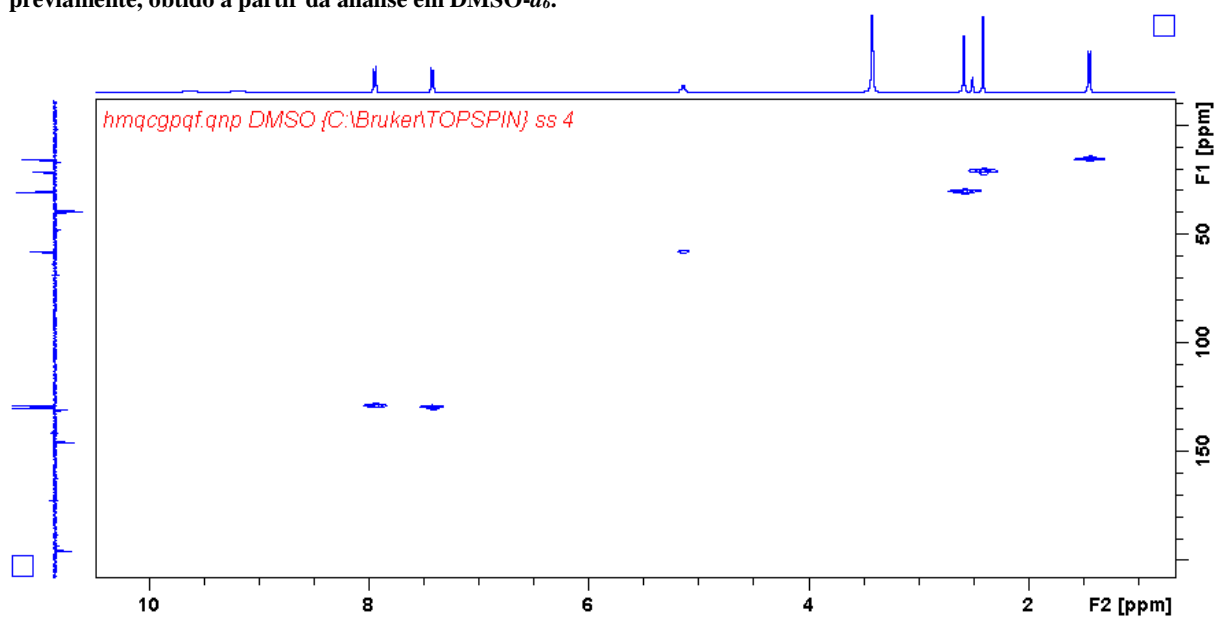
Anexo 6.21 - Espetro de RMN ^{13}C da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em $\text{DMSO-}d_6$.



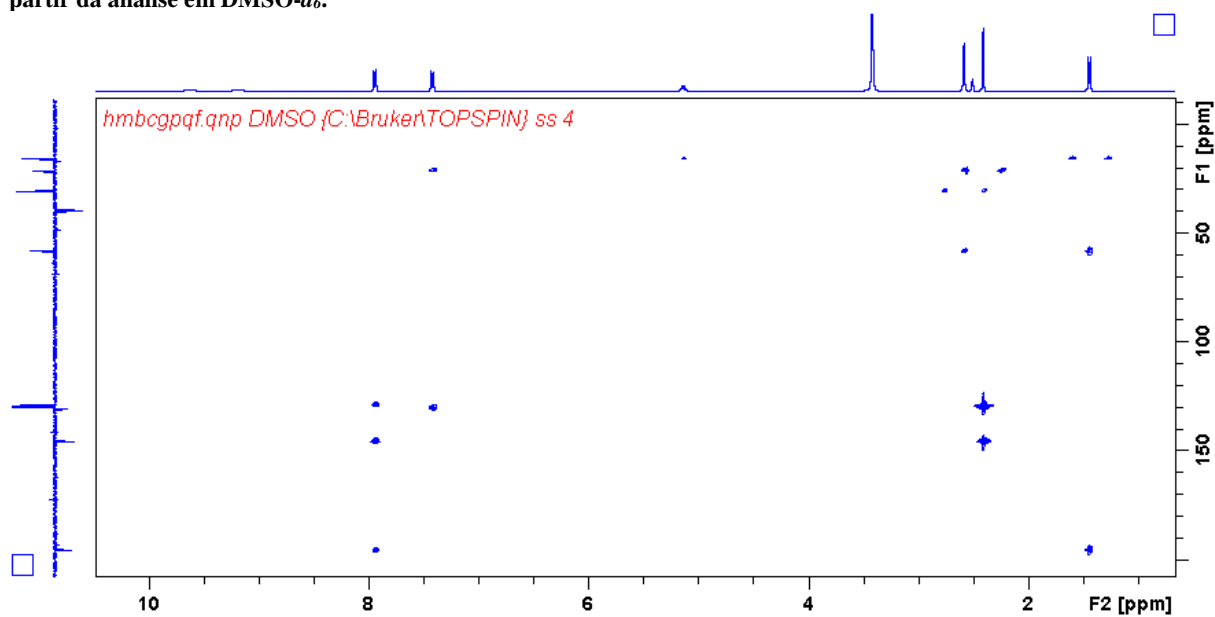
Anexo 6.22 - Espetro de COSY da mefedrona na forma de sal de hidrocloreto (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em $\text{DMSO-}d_6$.



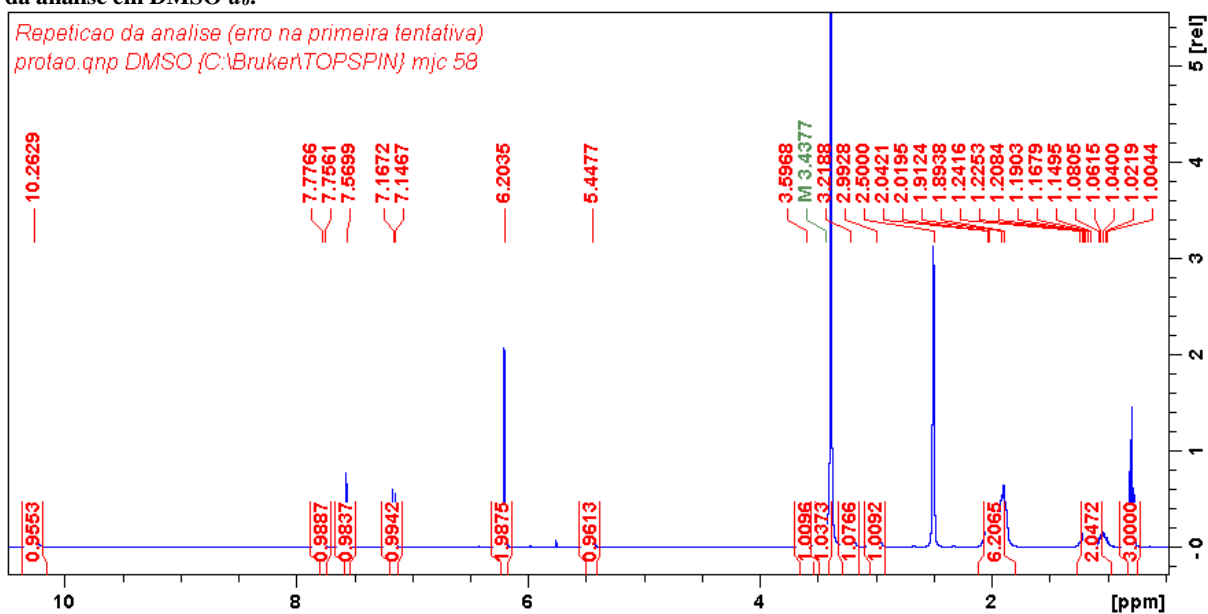
Anexo 6.23 - Espectro de HMQC, equivalente a HSQC, da mefedrona na forma de sal de hidrócloro (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO-*d*₆.



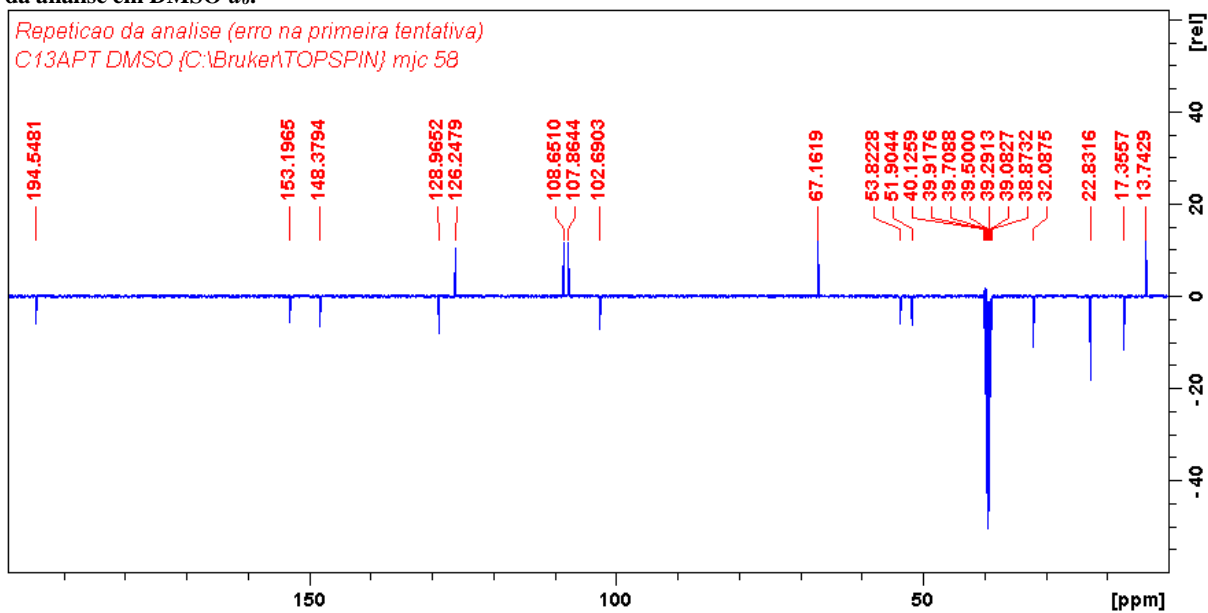
Anexo 6.24 - Espectro de HMBC da mefedrona na forma de sal de hidrócloro (1) sintetizada previamente, obtido a partir da análise em DMSO-*d*₆.



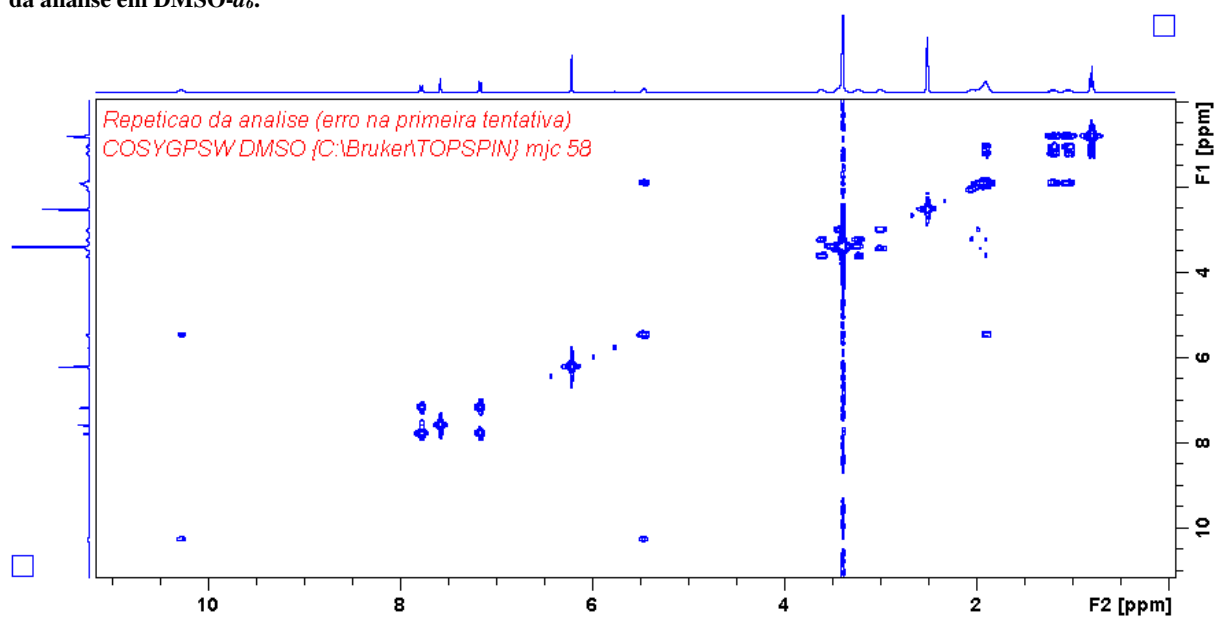
Anexo 6.25 - Espetro de RMN ^1H do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



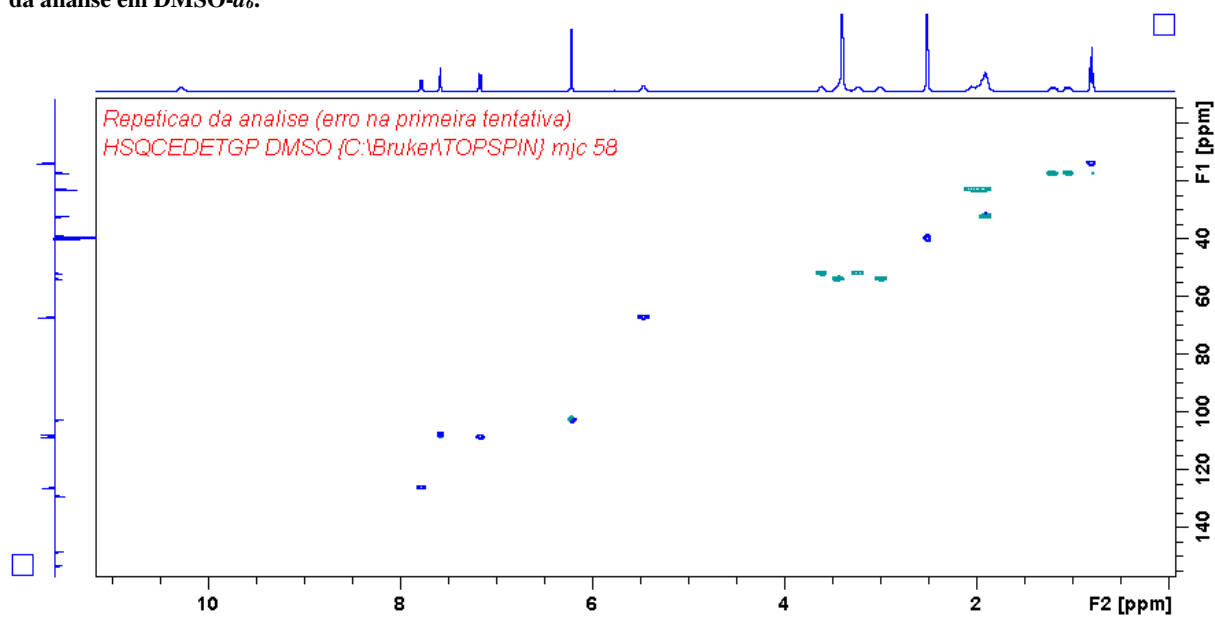
Anexo 6.26 - Espetro de RMN ^{13}C do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



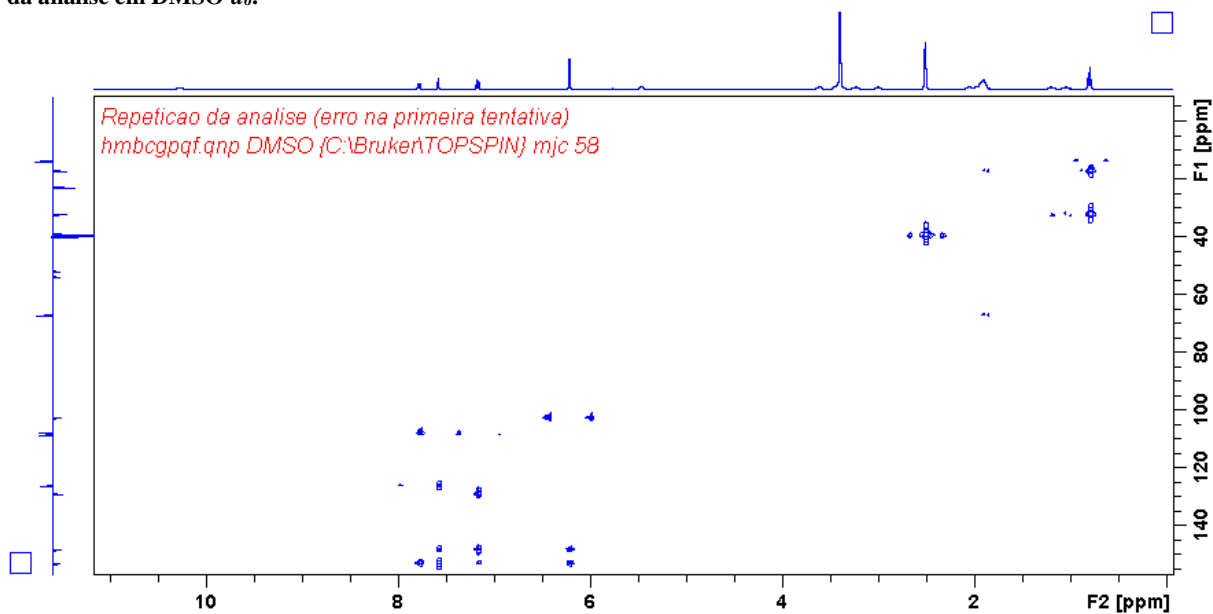
Anexo 6.27 - Espetro de COSY do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO-*d*₆.



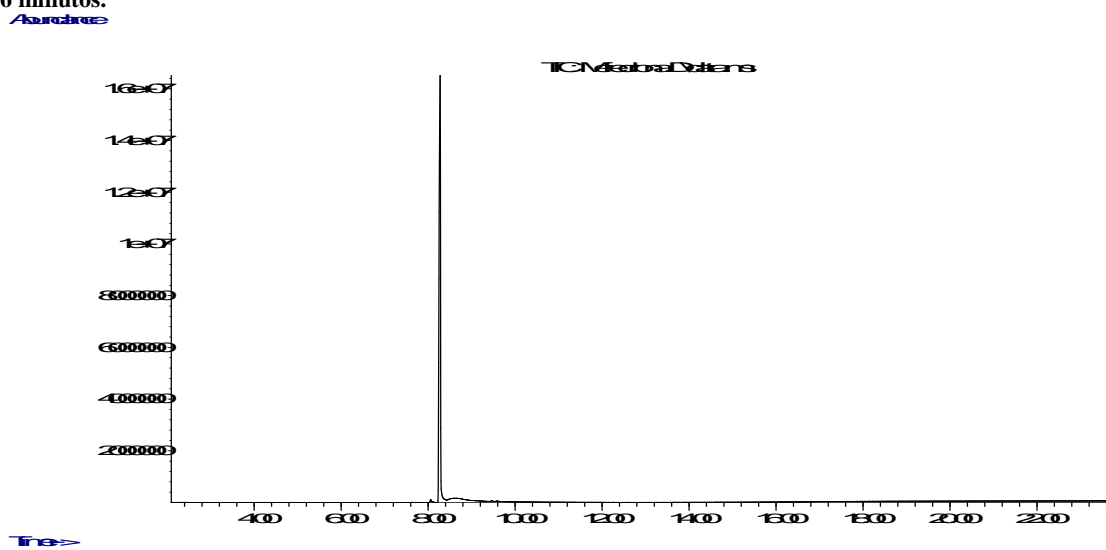
Anexo 6.28 - Espetro de HSQC do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO-*d*₆.



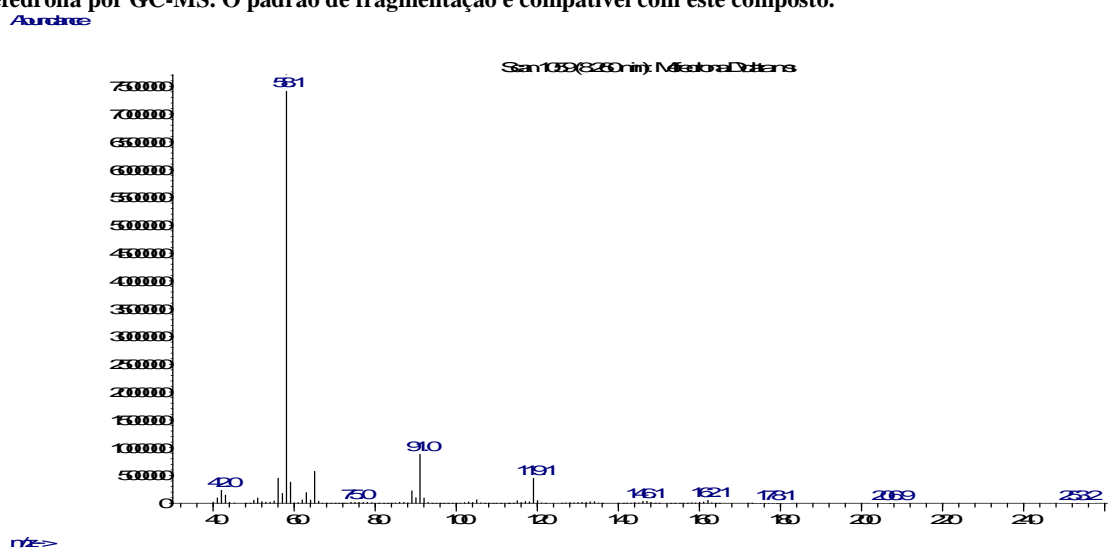
Anexo 6.29 - Espectro de HMBC do MDPV na forma de sal de hidrocloreto (3) sintetizado previamente, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



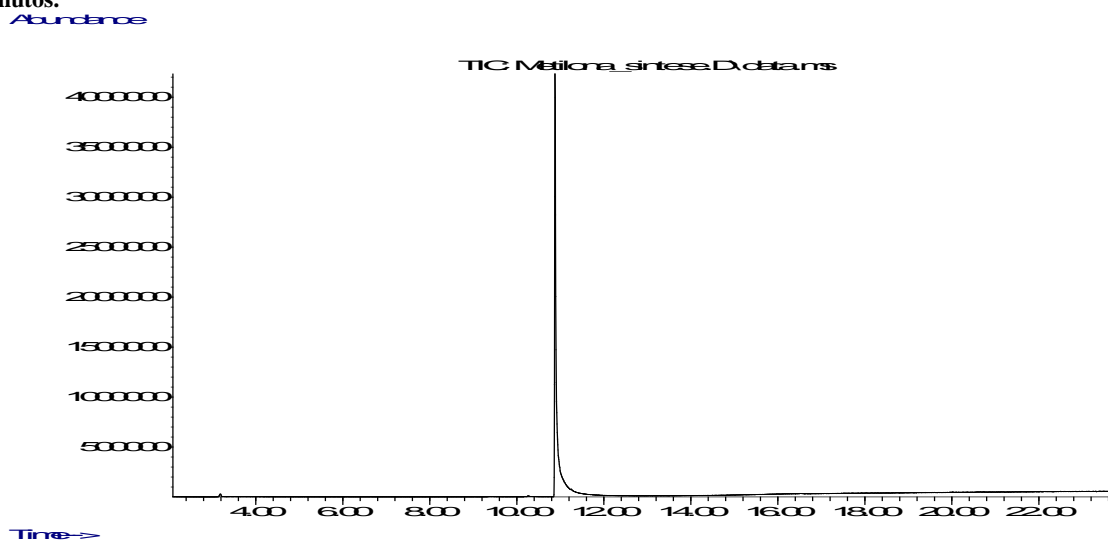
Anexo 6.30 - Cromatograma resultante da análise da mefedrona por GC-MS, revelando um pico maioritário com R_t 8.26 minutos.



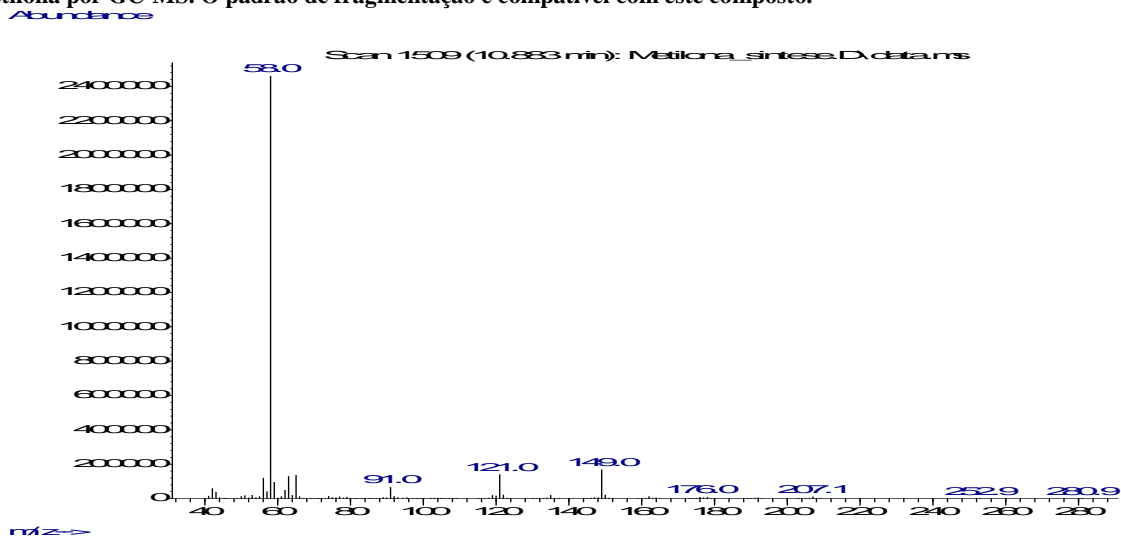
Anexo 6.31 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.26 minutos, resultante da análise do padrão de mefedrona por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com este composto.



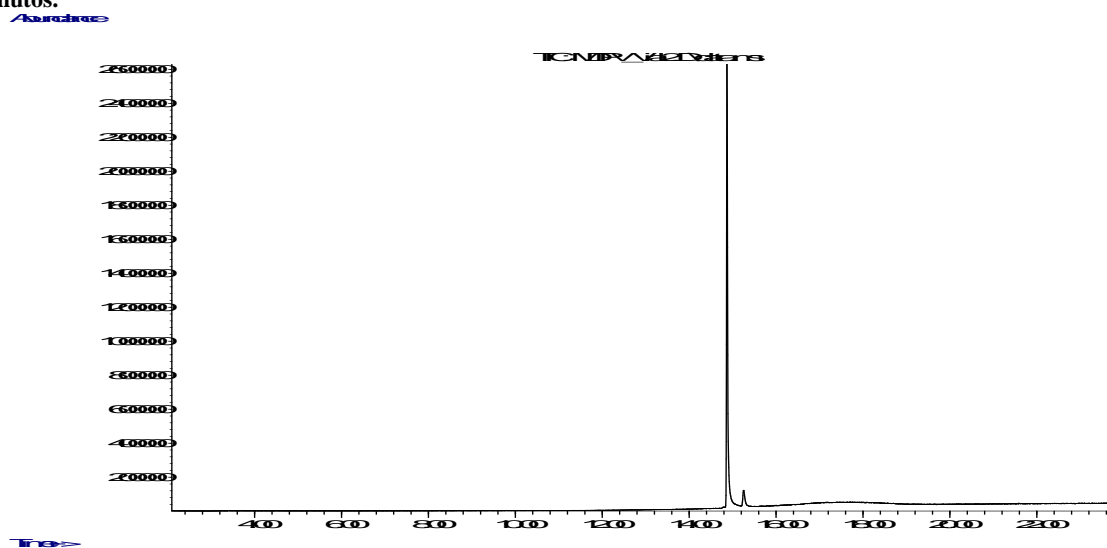
Anexo 6.32 - Cromatograma resultante da análise da metilona por GC-MS, revelando um pico maioritário com R_t 10.88 minutos.



Anexo 6.33 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 10.88 minutos, resultante da análise do padrão de metilona por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com este composto.



Anexo 6.34 - Cromatograma resultante da análise da MDPV por GC-MS, revelando um pico maioritário com R_t 14.88 minutos.



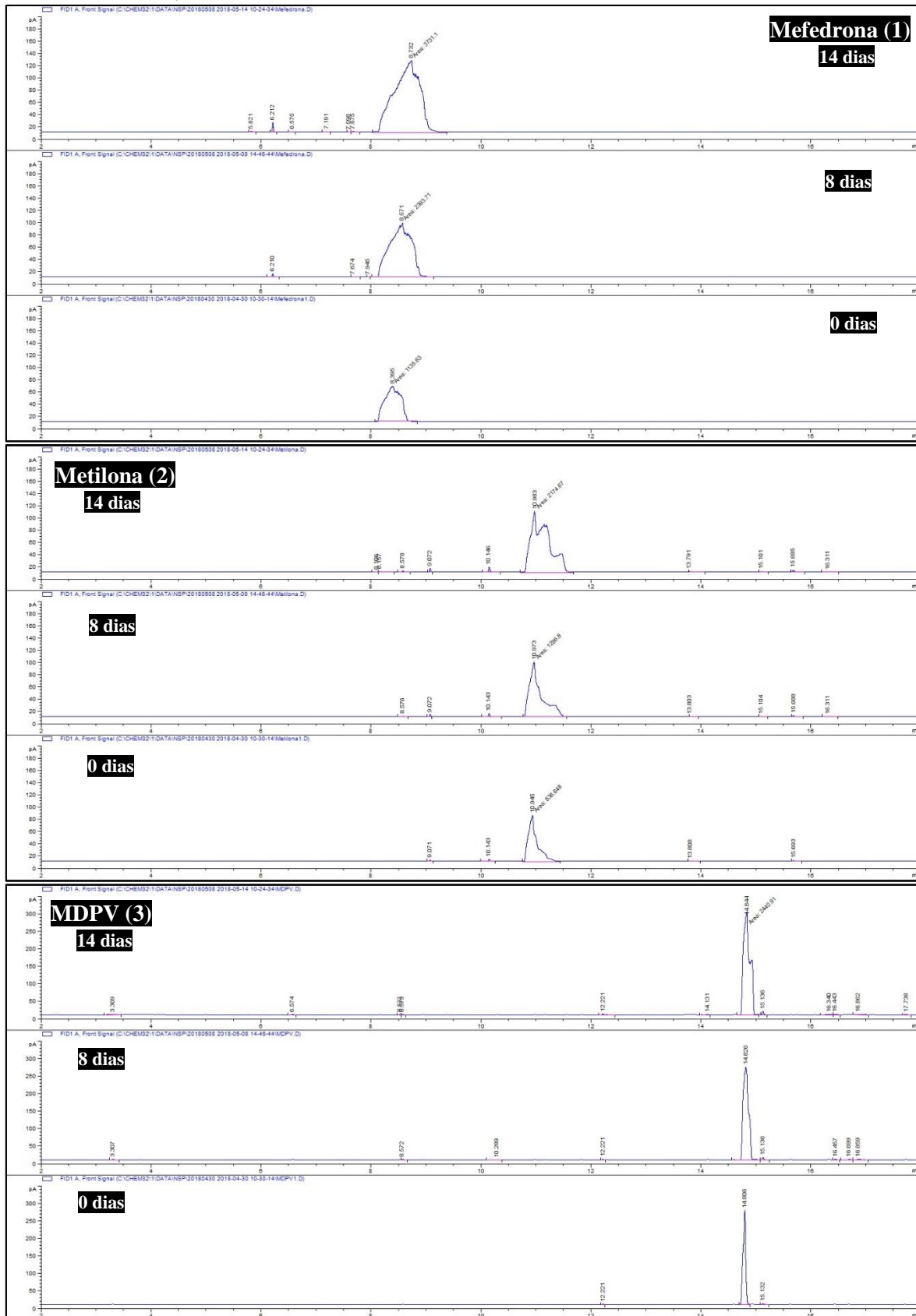
Anexo 6.35 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.88 minutos, resultante da análise do padrão de MDPV por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com este composto.



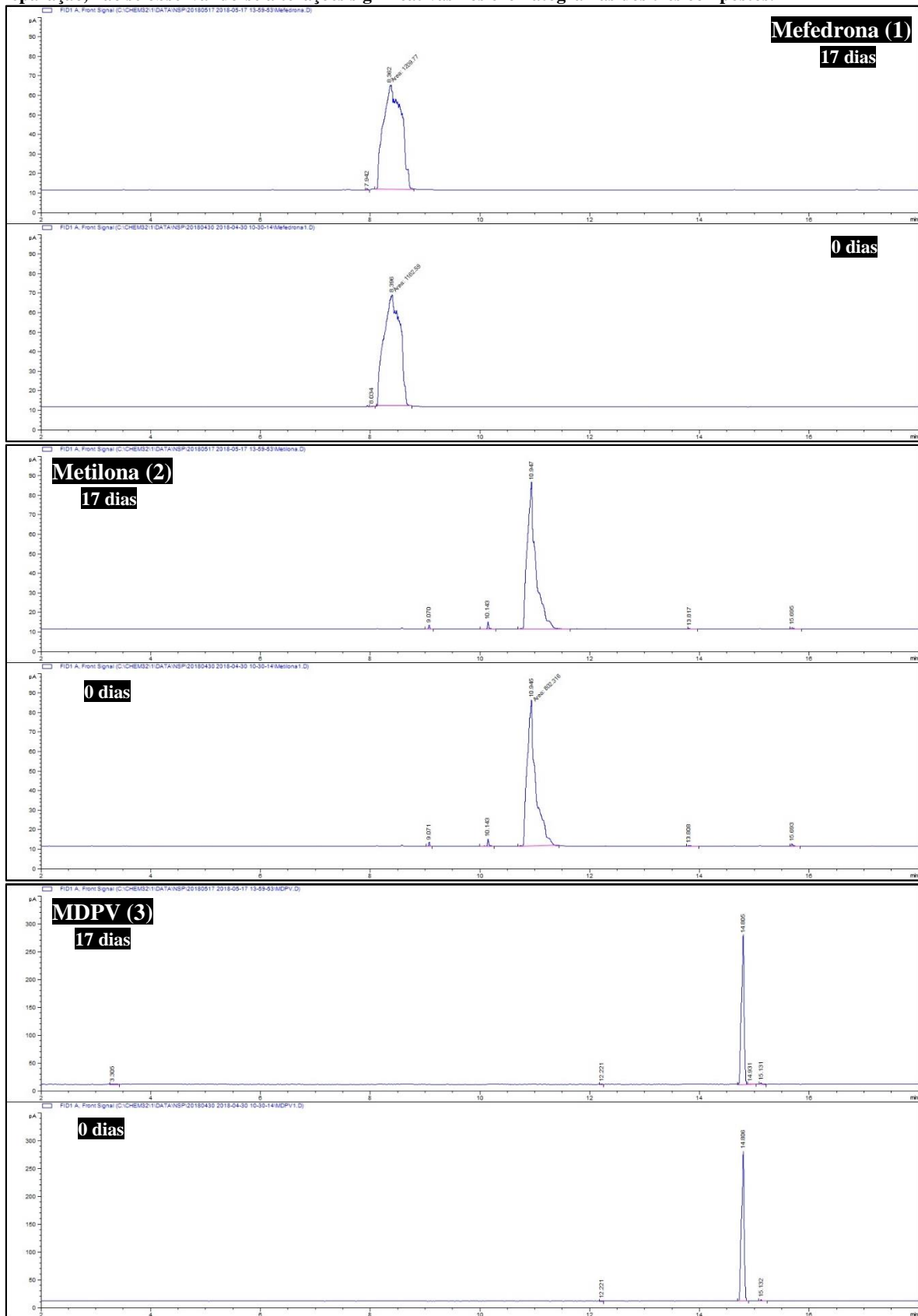
Anexo 6.36 - Resultados obtidos a partir das 30 análises por GC-FID realizadas para estudo do grau de pureza das três catinonas sintéticas selecionadas.

Composto	R _t (min.)	Área (%)	Média		Desvio Padrão		CV (%)	
			R _t (min.)	Área (%)	R _t (min.)	Área (%)	R _t (min.)	Área (%)
<i>Mefedrona (1)</i>	8,397	99,92	8,392	99,87	0,010	0,08	0,123	0,08
	8,392	99,91						
	8,378	100,00						
	8,376	99,83						
	8,410	99,91						
	8,389	99,84						
	8,395	99,89						
	8,395	99,91						
	8,402	99,81						
	8,386	99,71						
<i>Metilona (2)</i>	10,945	98,41	10,940	98,25	0,005	0,11	0,044	0,11
	10,941	98,45						
	10,941	98,18						
	10,934	98,39						
	10,931	98,25						
	10,942	98,15						
	10,936	98,08						
	10,944	98,22						
	10,945	98,26						
	10,940	98,16						
<i>MPDV (3)</i>	14,806	99,15	14,807	99,28	0,002	0,12	0,011	0,12
	14,805	99,36						
	14,809	99,25						
	14,805	99,39						
	14,808	99,38						
	14,805	99,13						
	14,807	99,37						
	14,807	99,08						
	14,807	99,32						
	14,809	99,35						

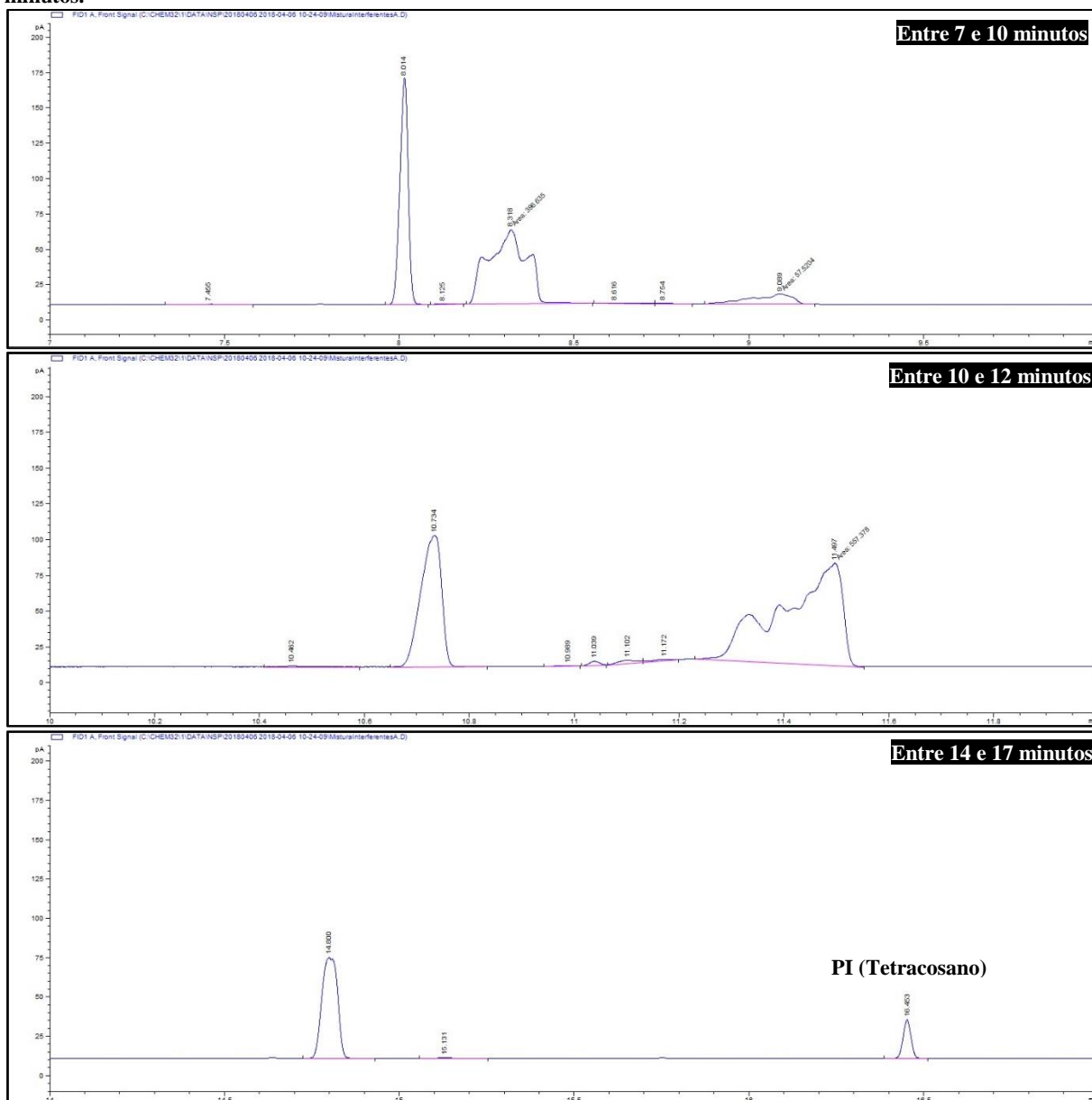
Anexo 6.37 - Compilação dos cromatogramas obtidos por GC-FID, a partir da análise das soluções utilizadas para apurar o grau de pureza, bem como verificação da estabilidade dos três compostos em estudo quando em solução, armazenadas fora do frigorífico (temperatura ambiente). Verifica-se um decréscimo no grau de pureza, decorrente do aparecimento de impurezas resultantes da degradação dos compostos quando em solução fora do frigorífico, após 8 e 14 dias da sua preparação.

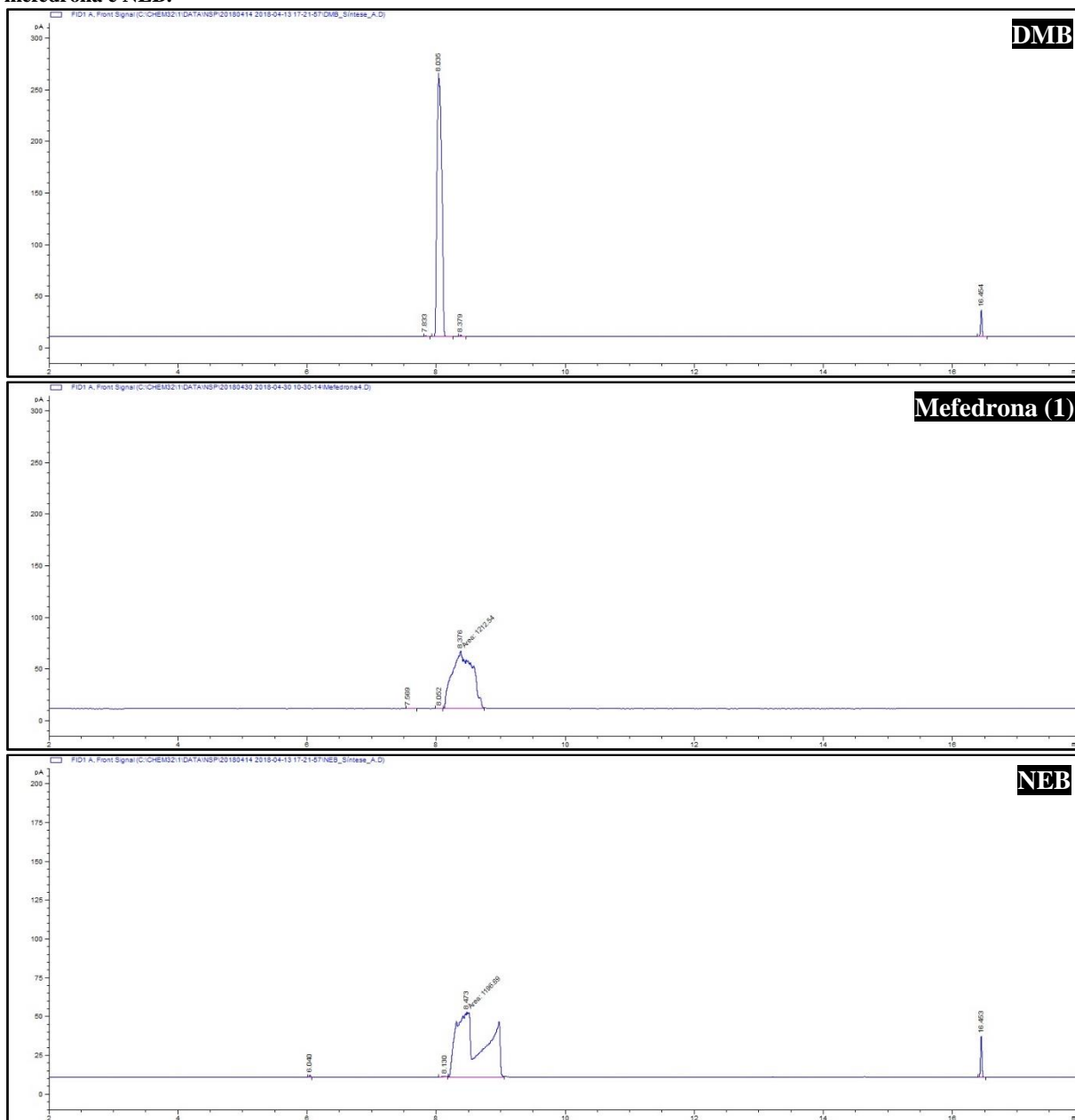


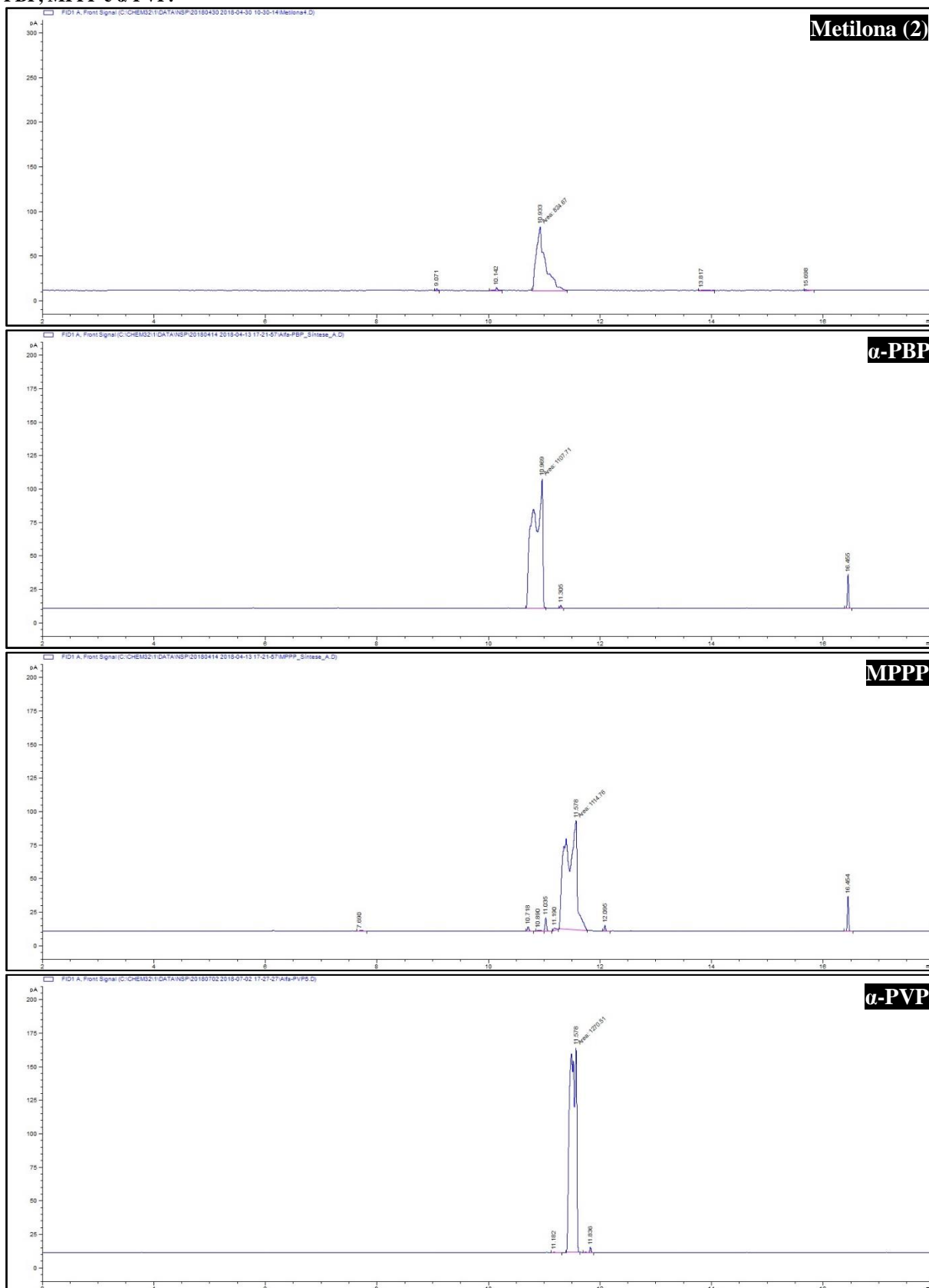
Anexo 6.38 - Compilação dos cromatogramas obtidos por GC-FID a partir da análise das soluções utilizadas para apurar o grau de pureza, bem como verificação da estabilidade dos três compostos em estudo quando em solução, armazenadas no interior do frigorífico. Verifica-se a manutenção aproximada do grau de pureza, após 17 dias da sua preparação, não se observando alterações significativas nos cromatogramas dos três compostos.



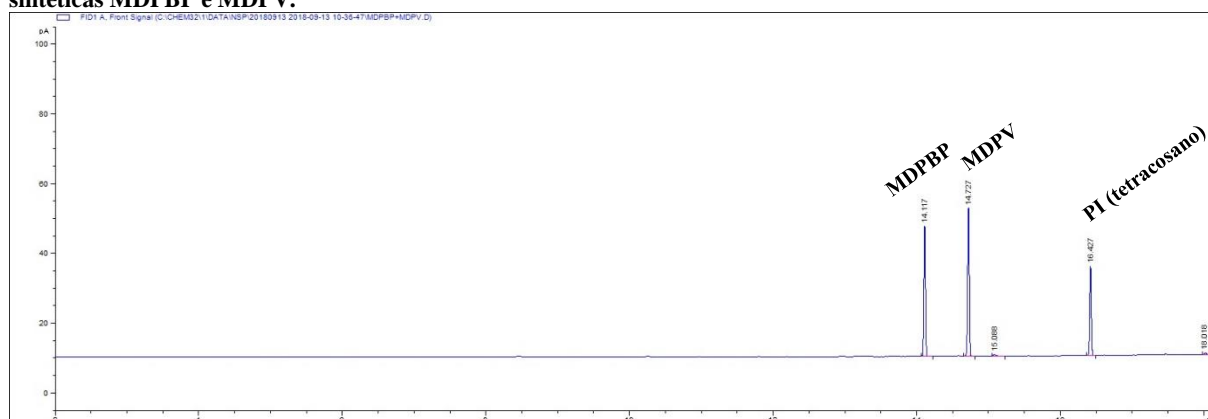
Anexo 6.39 - Porções do cromatograma resultante da análise por GC-FID de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo, nas zonas entre os 7-10, 10-12 e 14-18 minutos.



Anexo 6.40 - Cromatogramas correspondentes à análise individual por GC-FID, das catinonas sintéticas DMB, mefedrona e NEB.

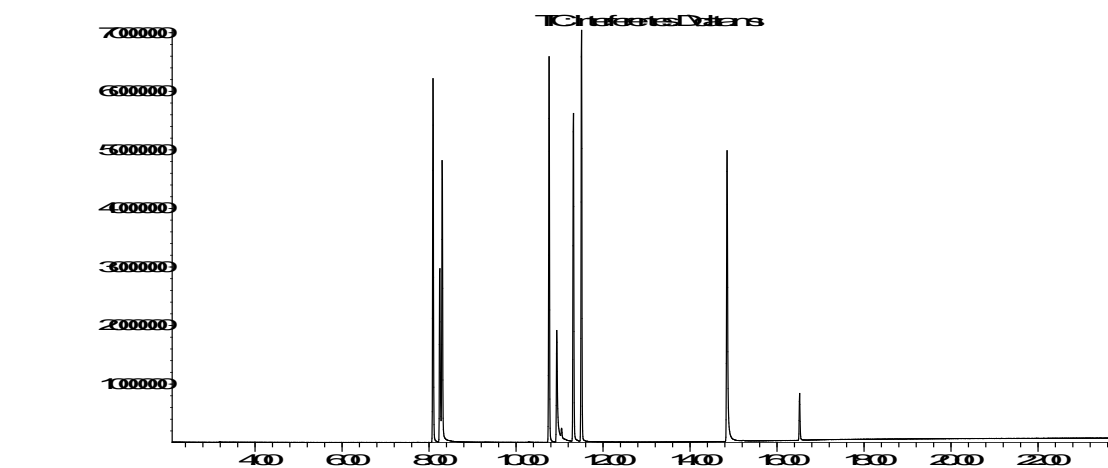
Anexo 6.41 - Cromatogramas correspondentes à análise individual por GC-FID, das catinonas sintéticas metilona, α -PBP, MPPP e α -PVP.

Anexo 6.42 - Cromatograma correspondentes à análise individual por GC-FID da solução contendo as catinonas sintéticas MDPBP e MDPV.

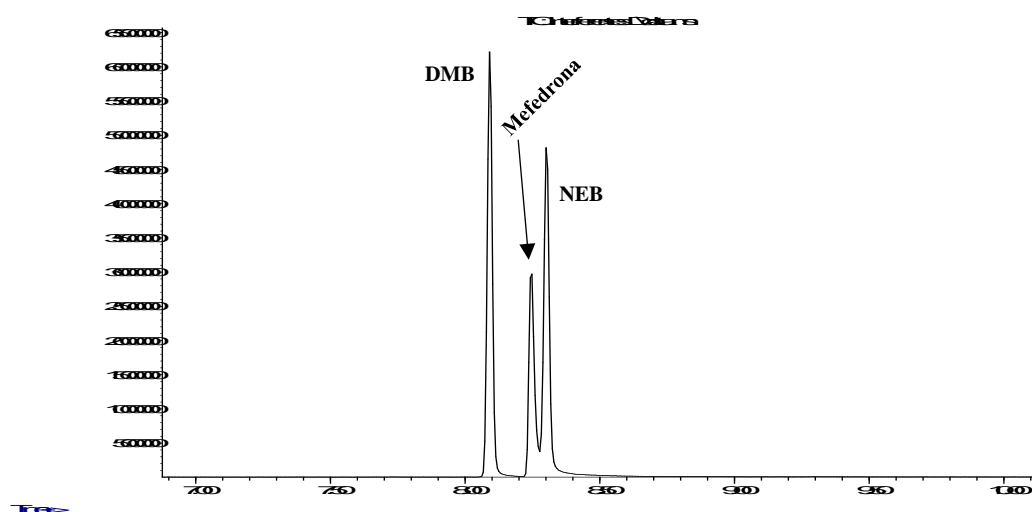


Anexo 6.43 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo, com pormenor das zonas maior abundância de picos (perto de 8, 11 e 15 minutos), devidamente identificadas.

[Anexo 6.43](#)

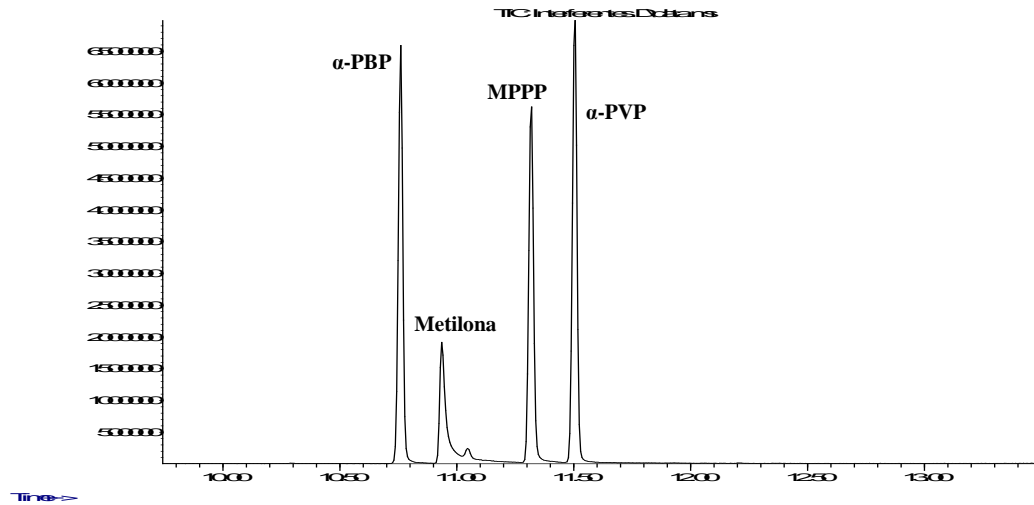


[Anexo 6.43](#)

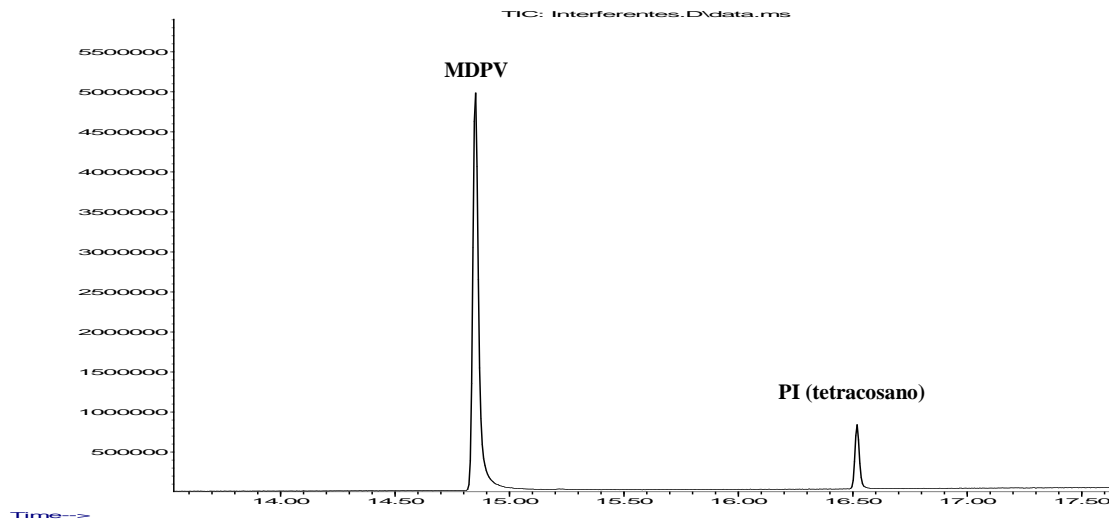


Anexo 6.43 (Continuação) - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo, com pormenor das zonas maior abundância de picos (perto de 8, 11 e 15 minutos), devidamente identificadas.

Abundance

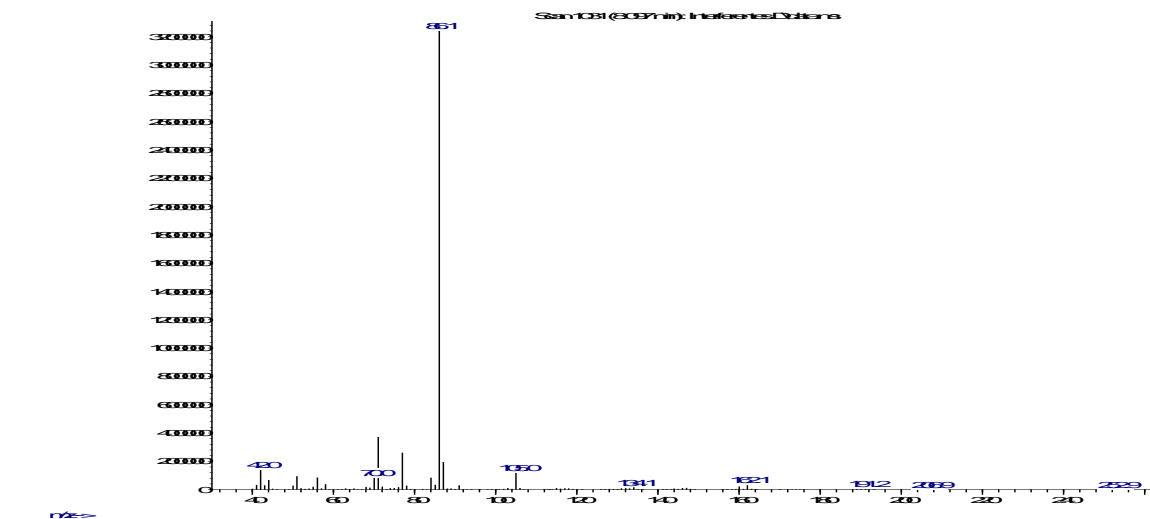


Abundance

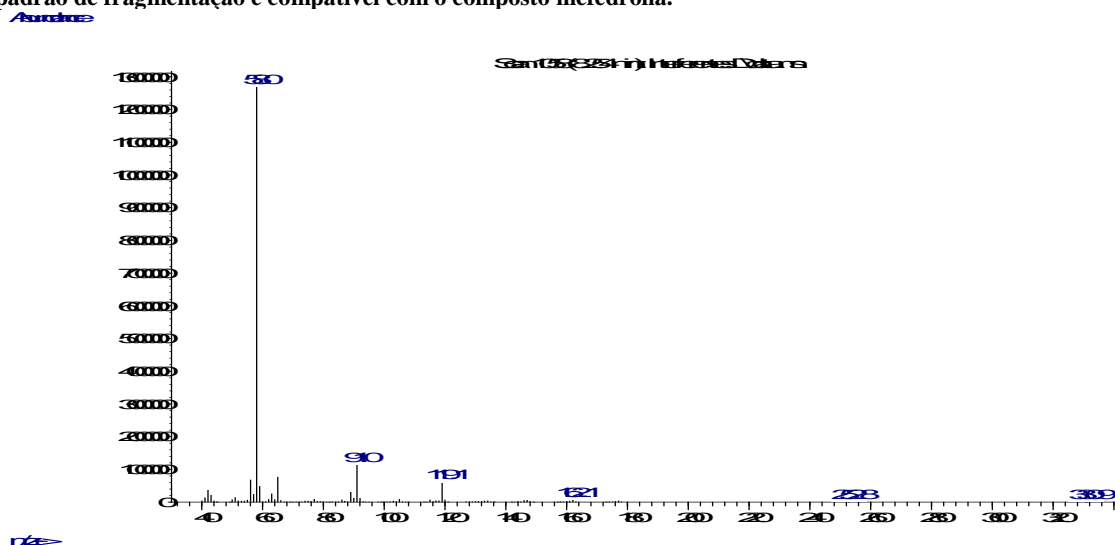


Anexo 6.44 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.10 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto DMB.

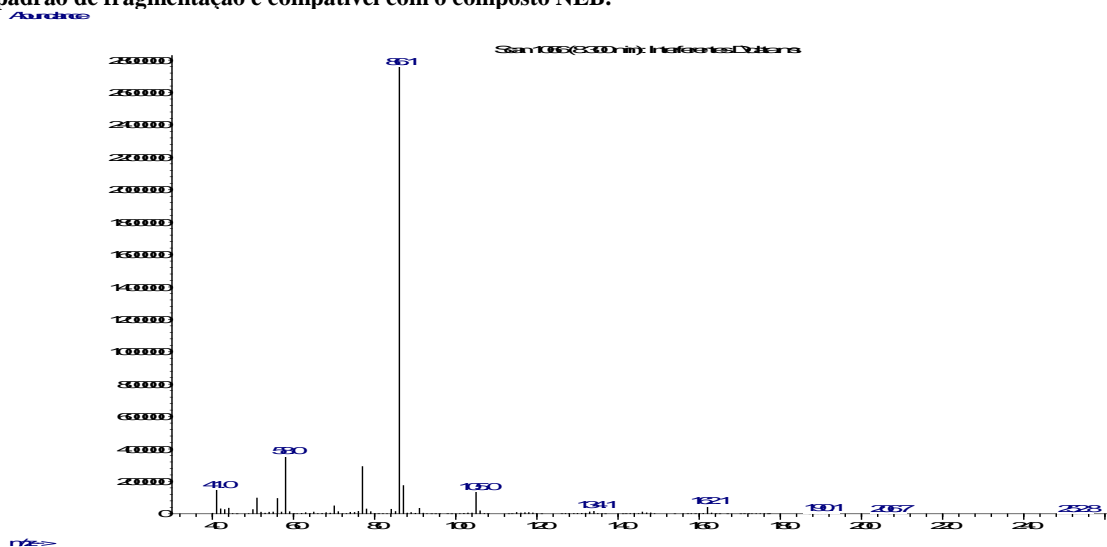
Abundance



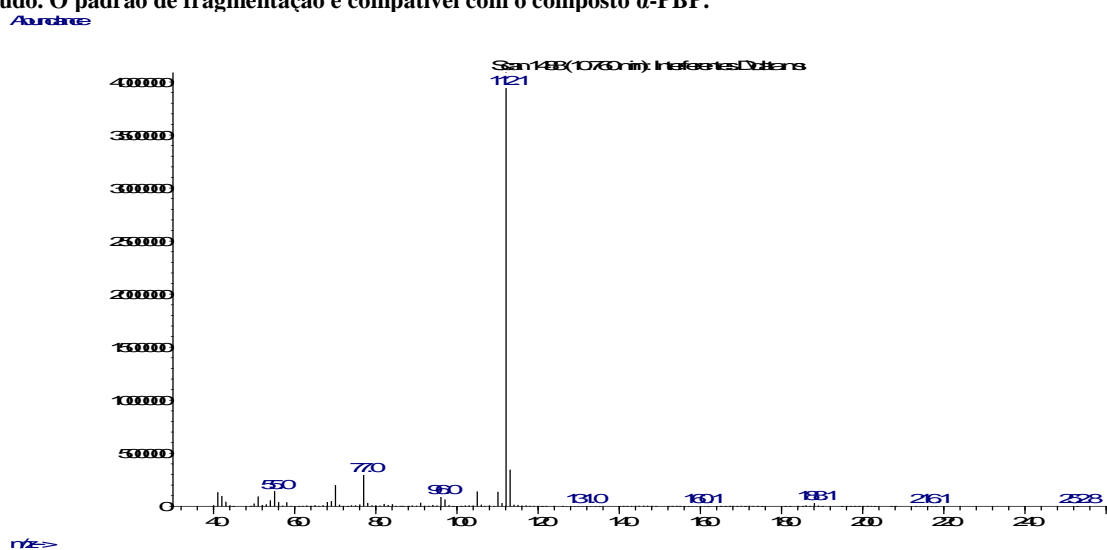
Anexo 6.45 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.25 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto mefedrona.



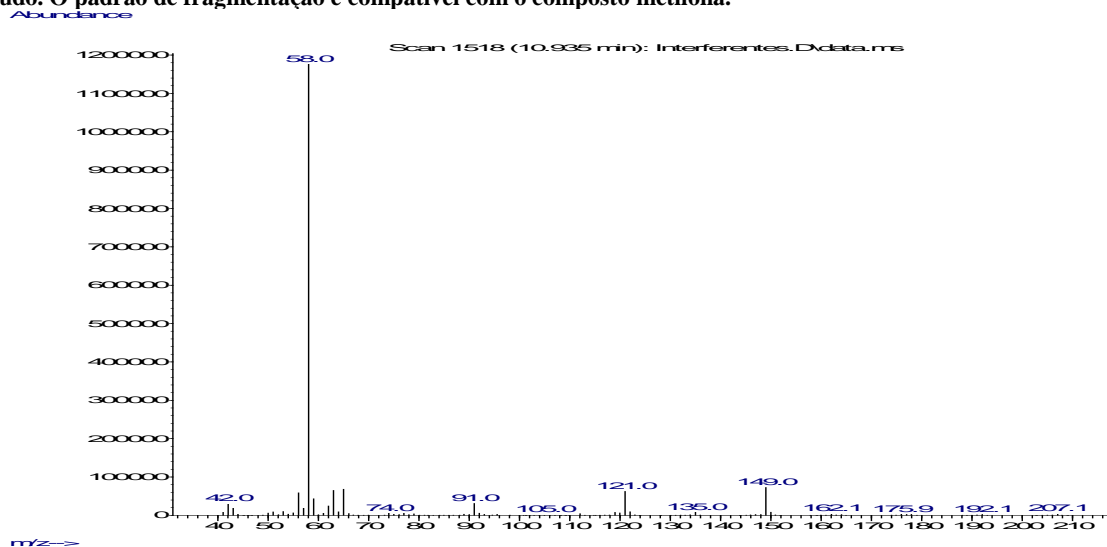
Anexo 6.46 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.30 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto NEB.



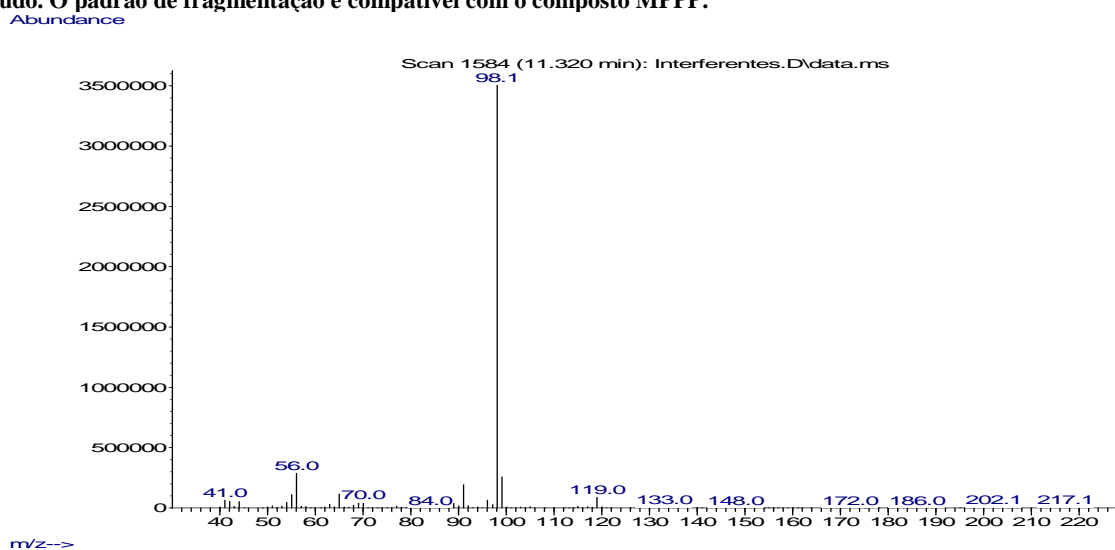
Anexo 6.47 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 10.76 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto α -PBP.



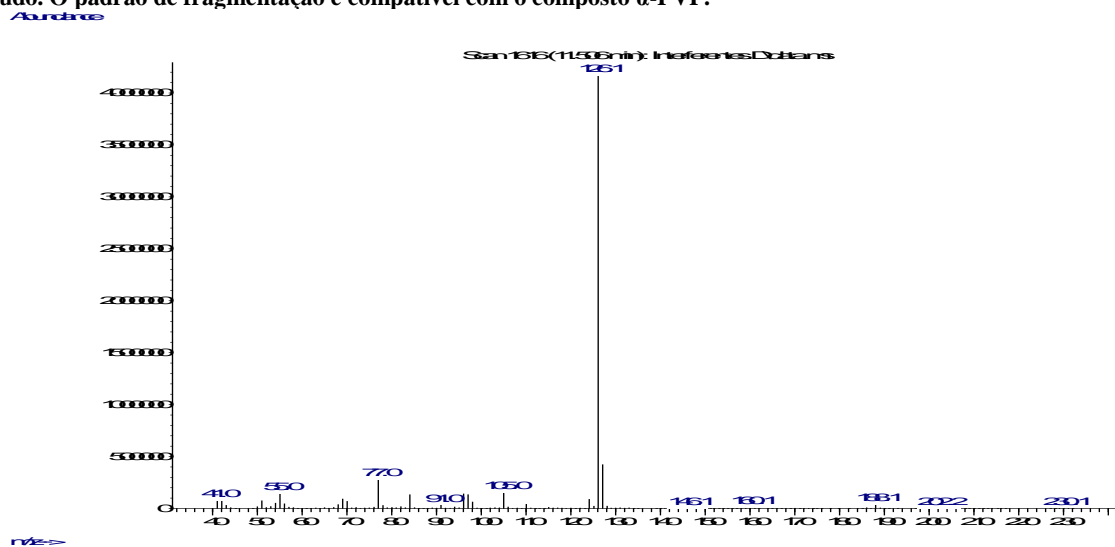
Anexo 6.48 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 10.94 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto metilona.



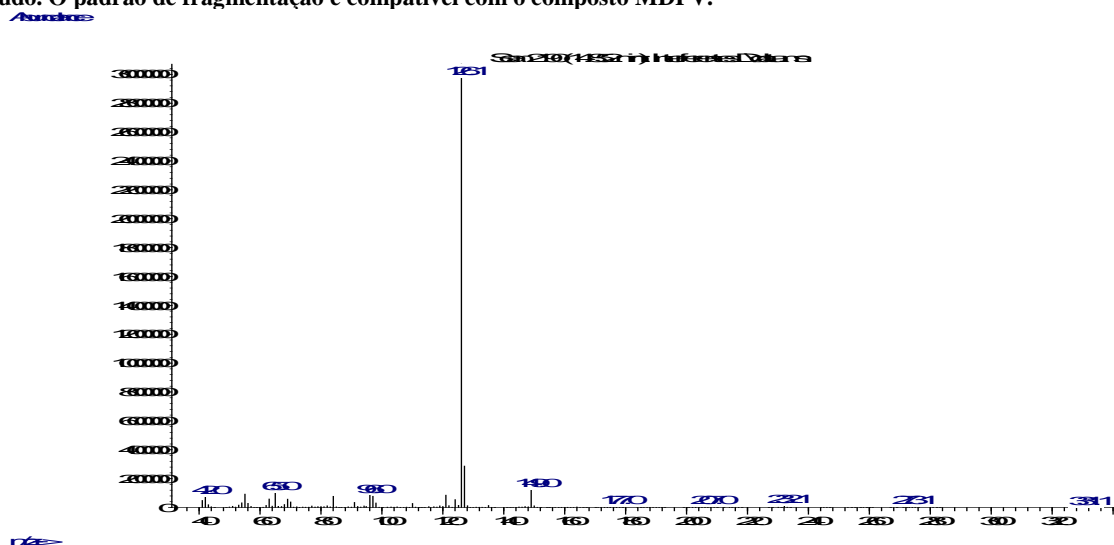
Anexo 6.49 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.32 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 cationas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 cationas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto MPPP.



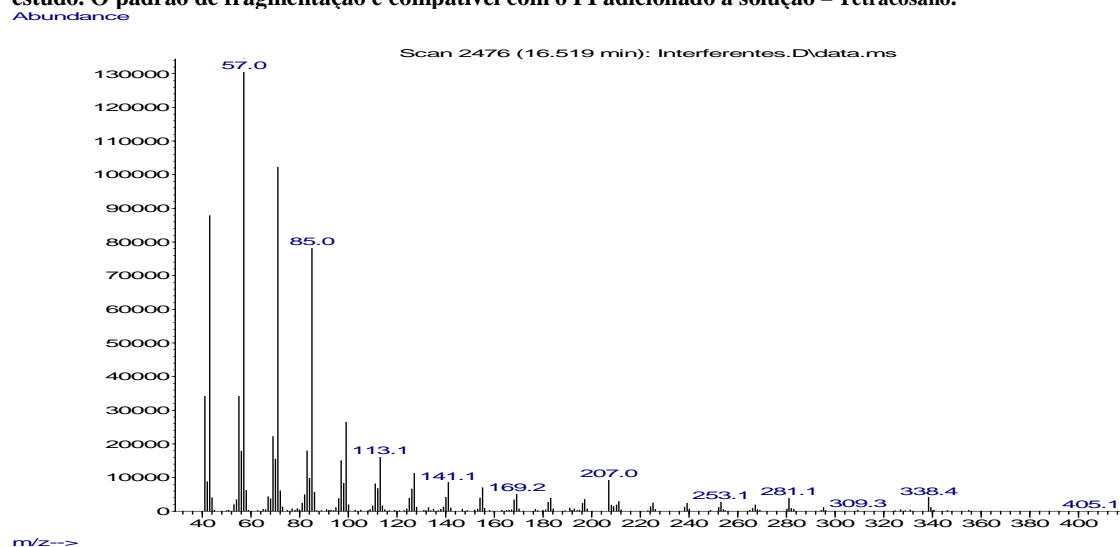
Anexo 6.50 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.51 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 cationas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 cationas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto α -PVP.



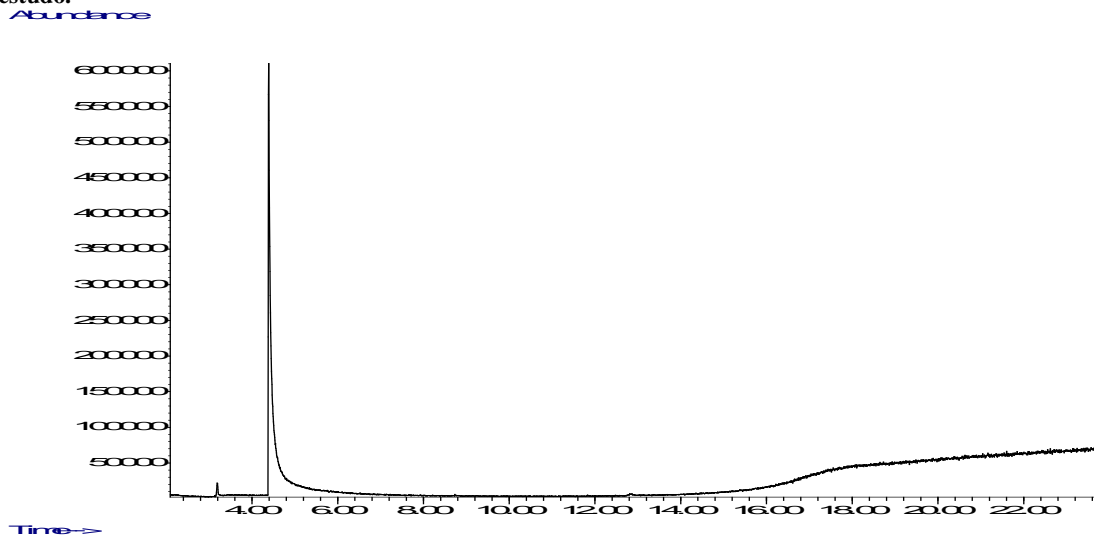
Anexo 6.51 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.85 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o composto MDPV.



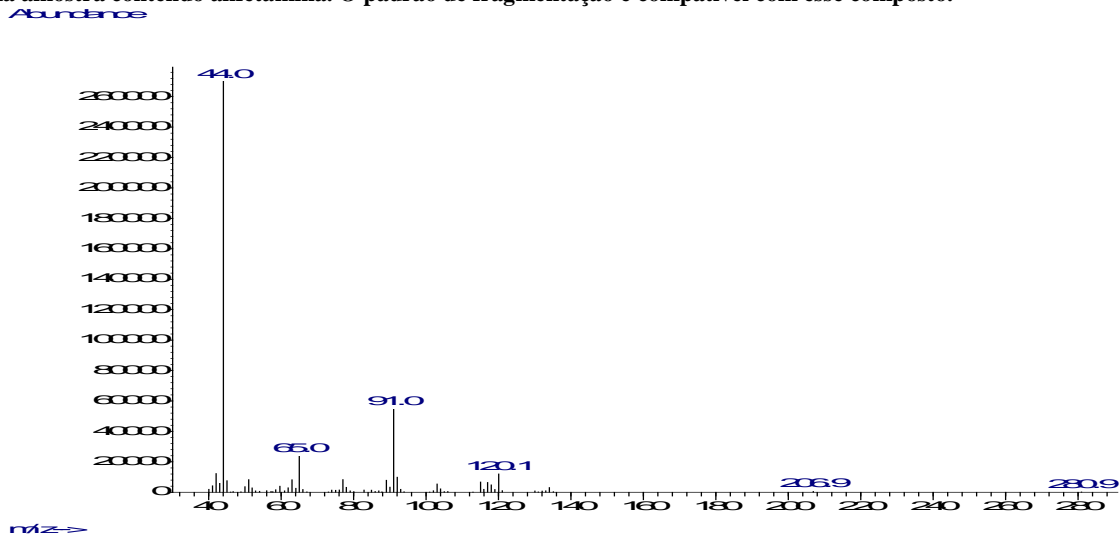
Anexo 6.52 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 16.52 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma solução contendo uma mistura de 8 catinonas sintéticas, das quais 5 possíveis interferentes e 3 catinonas em estudo. O padrão de fragmentação é compatível com o PI adicionado à solução – Tetracosano.



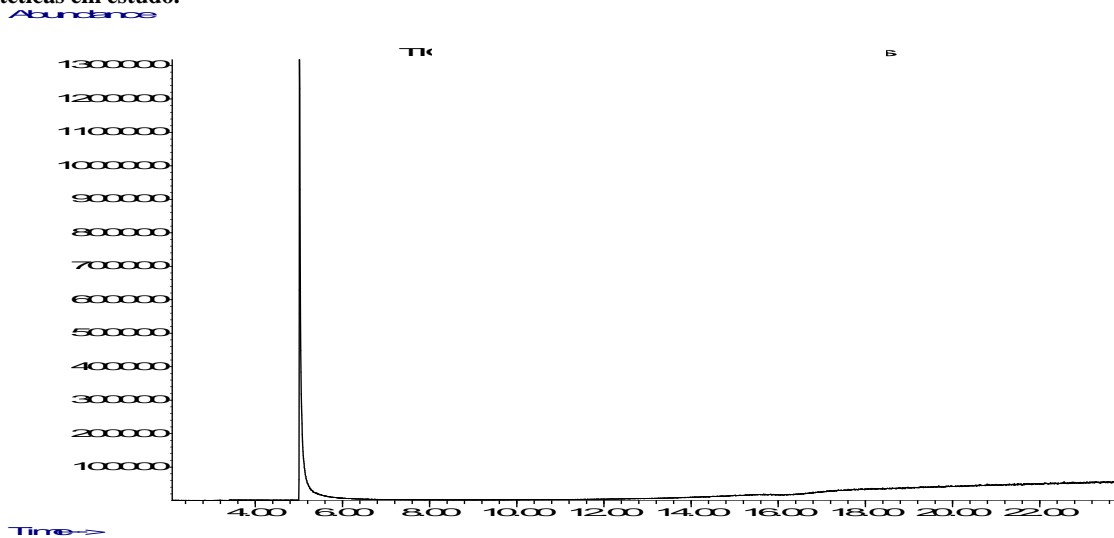
Anexo 6.53 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo anfetamina, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 4.40 minutos, não interferindo com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



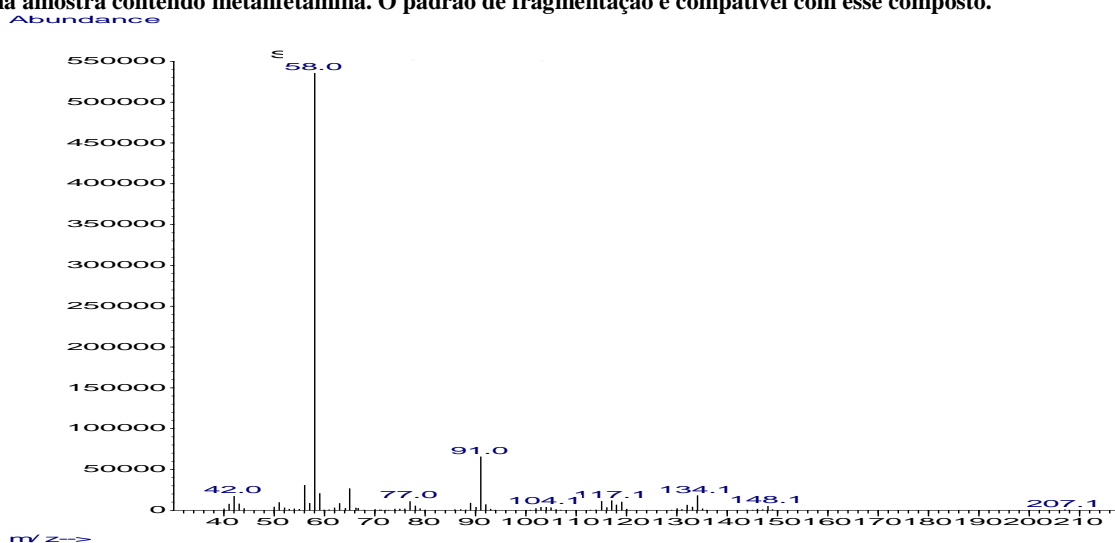
Anexo 6.54 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 4.40 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo anfetamina. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.



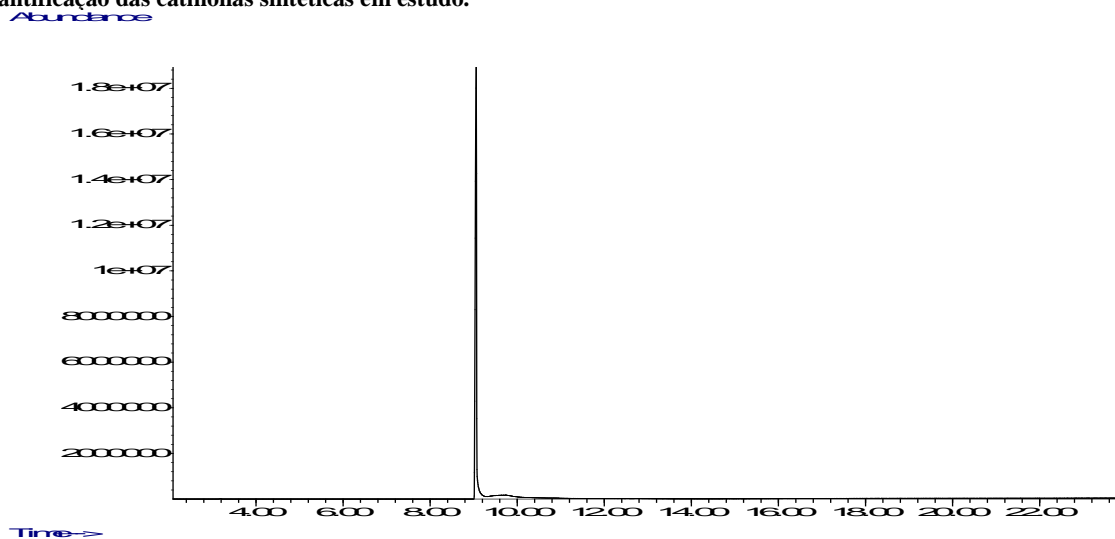
Anexo 6.55 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo metanfetamina, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 5.03 minutos, não interferindo com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



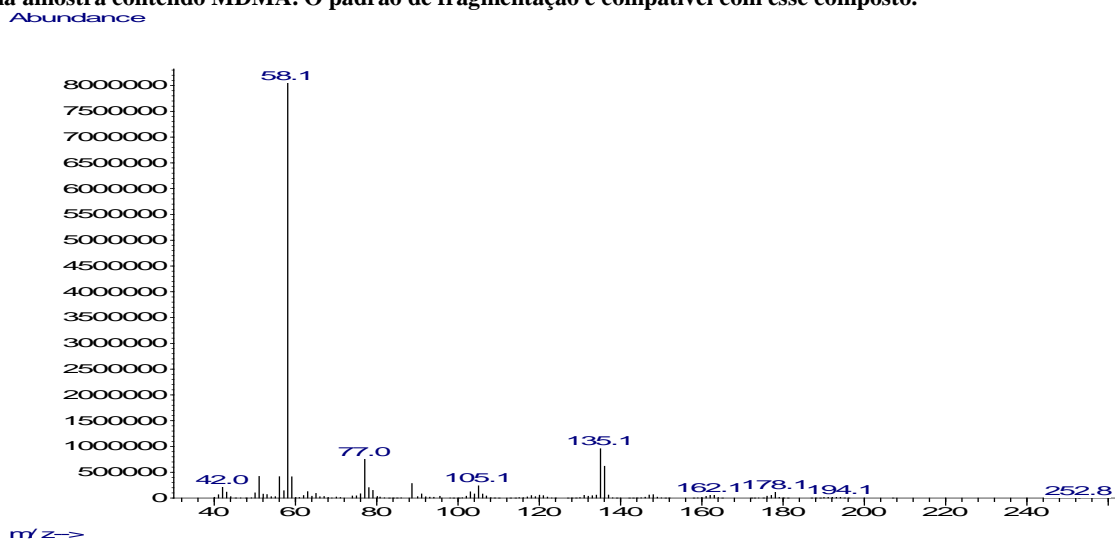
Anexo 6.56 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 5.03 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo metanfetamina. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.



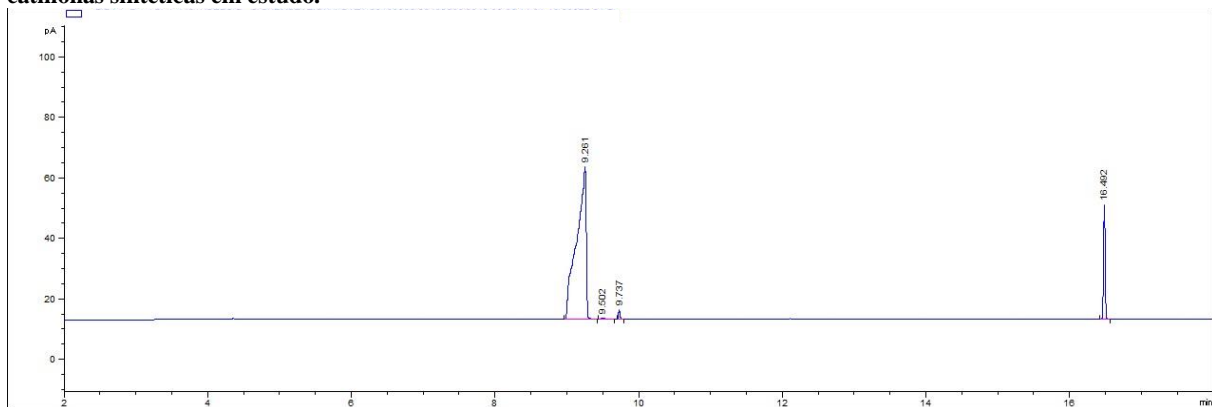
Anexo 6.57 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo MDMA, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 9.05 minutos. Após análise por GC-FID confirmou-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



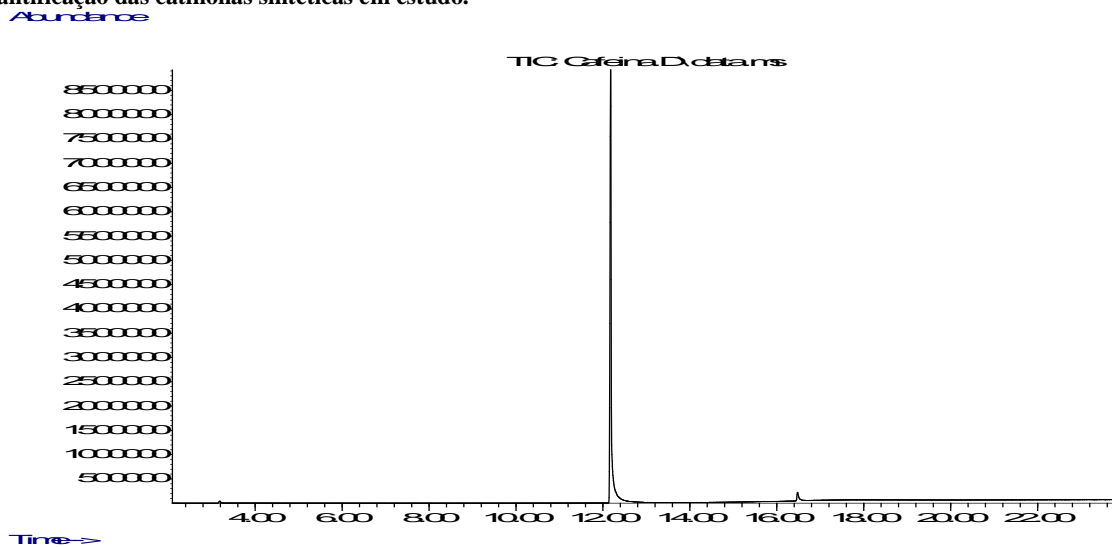
Anexo 6.58 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 9.05 minutos, resultante da análise por GC-MS de uma amostra contendo MDMA. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.



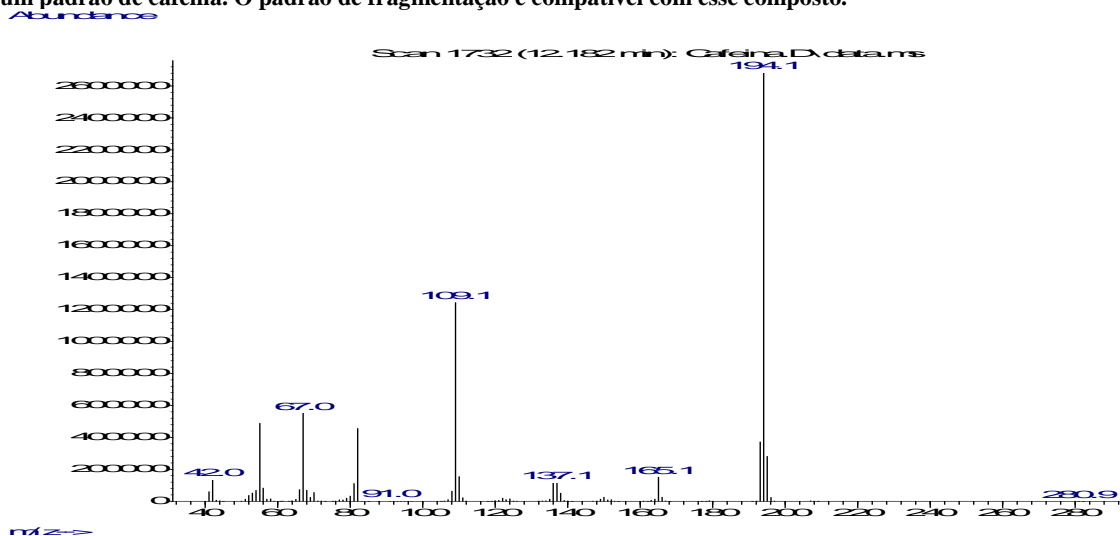
Anexo 6.59 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de uma amostra contendo MDMA, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 9.26 minutos, confirmando-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



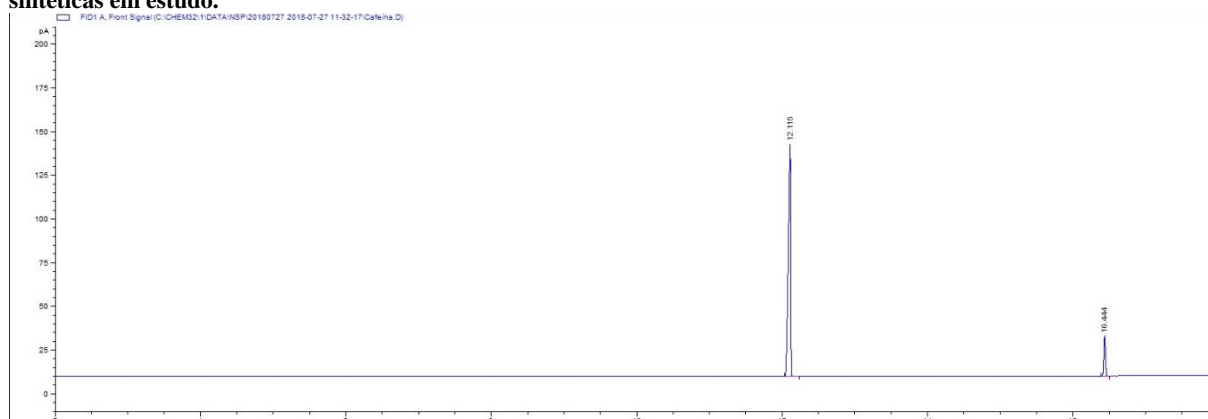
Anexo 6.60 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de um padrão de cafeína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.18 minutos. Após análise por GC-FID confirmou-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



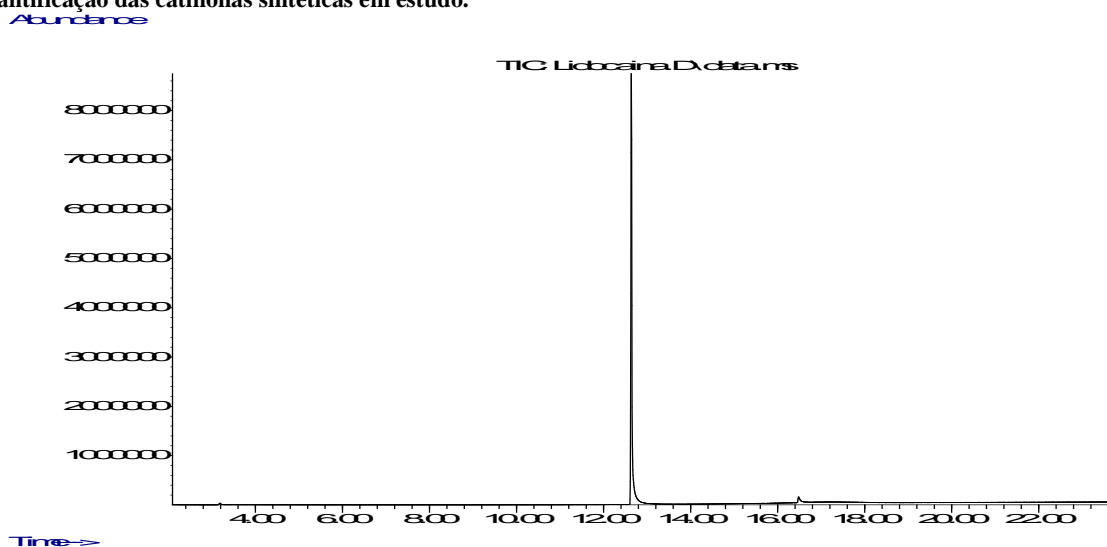
Anexo 6.61 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 12.18 minutos, resultante da análise por GC-MS de um padrão de cafeína. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.



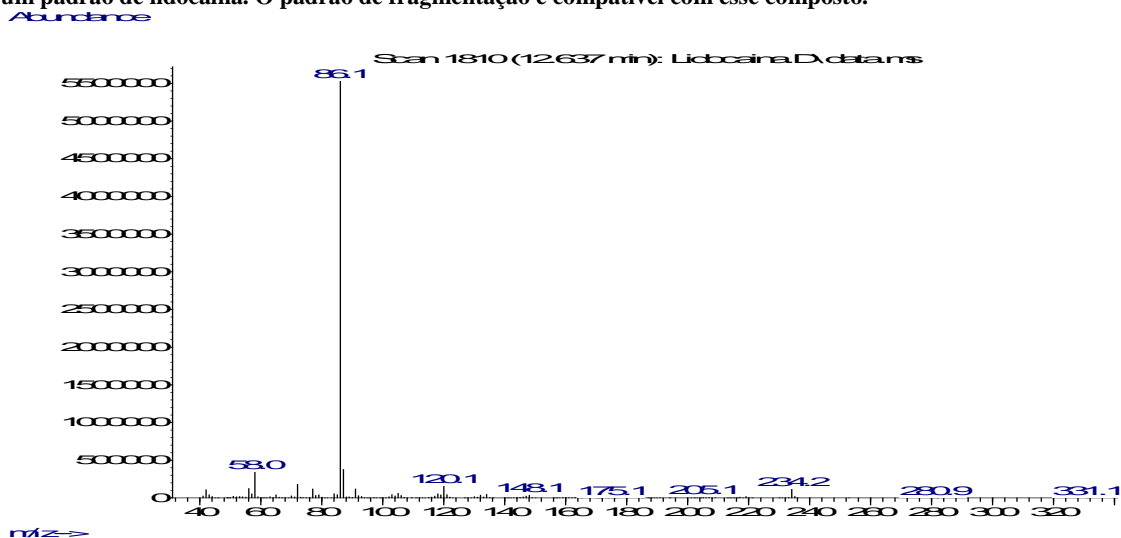
Anexo 6.62 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de padrão de cafeína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.12 minutos, confirmando-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



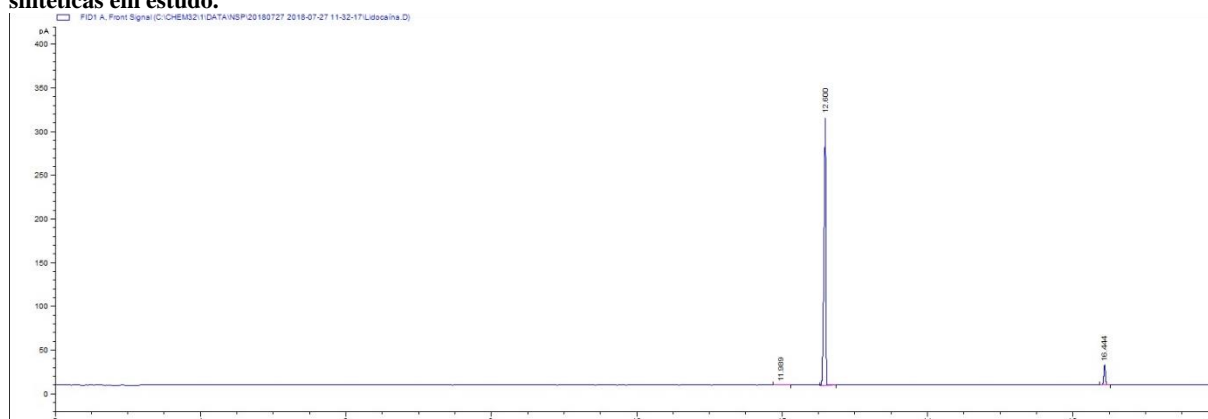
Anexo 6.63 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS de um padrão de lidocaína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.64 minutos. Após análise por GC-FID confirmou-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



Anexo 6.64 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 12.64 minutos, resultante da análise por GC-MS de um padrão de lidocaína. O padrão de fragmentação é compatível com esse composto.



Anexo 6.65 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID de padrão de lidocaína, verificando-se que o tempo de retenção correspondente é de 12.60 minutos, confirmando-se que não interfere com a quantificação das catinonas sintéticas em estudo.



Anexo 6.66 - Resultados obtidos a partir das análises por GC-FID realizadas para verificação da adequação do extremo mínimo da gama de trabalho, assim como para o estudo da homoscedasticidade do sinal instrumental na gama de trabalho selecionada. O único outlier identificado encontra-se realçado, sendo correspondente à 19ª repetição para a mefedrona (1), tendo sido desprezado.

Composto	Concentração (mg/mL)	Repetição	Área relativa $\left(\frac{A_{\text{analito}} (\%)}{A_{\text{PI}} (\%)}\right)$	Repetição	Área relativa $\left(\frac{A_{\text{analito}} (\%)}{A_{\text{PI}} (\%)}\right)$
Mefedrona (1)	0,032	1	0,28617	11	0,28265
		2	0,28136	12	0,27919
		3	0,28264	13	0,28223
		4	0,28172	14	0,28340
		5	0,28105	15	0,28007
		6	0,28342	16	0,28328
		7	0,28093	17	0,28229
		8	0,28290	18	0,28208
		9	0,28122	19	0,29182
		10	0,28307	20	0,28450
Metilona (2)	0,024	1	0,15200	11	0,15281
		2	0,15203	12	0,15288
		3	0,15434	13	0,15322
		4	0,16673	14	0,16137
		5	0,17072	15	0,15185
		6	0,15307	16	0,15305
		7	0,15139	17	0,15326
		8	0,15114	18	0,15387
		9	0,16750	19	0,15360
		10	0,15983	20	0,15424
MDPV (3)	0,032	1	0,183036	11	0,201349
		2	0,182428	12	0,201889
		3	0,185828	13	0,202157
		4	0,185588	14	0,207095
		5	0,205579	15	0,204973
		6	0,185892	16	0,202833
		7	0,203506	17	0,212034
		8	0,202430	18	0,185495
		9	0,201264	19	0,185943
		10	0,203989	20	0,203244

Anexo 6.67 - Resultados obtidos a partir das análises por GC-FID do extremo máximo da gama de trabalho, realizadas para o estudo da homoscedasticidade do sinal instrumental na gama de trabalho selecionada. Os *outliers* identificados encontram-se realçados, sendo correspondentes à 3ª, 7ª e 12ª repetições para a mefedrona (1), tendo sido desprezados.

<i>Composto</i>	<i>Concentração (mg/mL)</i>	<i>Repetição</i>	<i>Área relativa</i> $(A_{\text{analito}}(\%)/A_{\text{PI}}(\%))$	<i>Repetição</i>	<i>Área relativa</i> $(A_{\text{analito}}(\%)/A_{\text{PI}}(\%))$
Mefedrona (1)	5,080	1	31,85584	11	31,04152
		2	31,91684	12	12,77730
		3	16,61802	13	31,75961
		4	31,61694	14	31,55629
		5	30,81310	15	30,96718
		6	31,25843	16	30,95239
		7	16,31281	17	31,47501
		8	31,26004	18	31,46601
		9	31,23126	19	31,17588
		10	31,18344	20	31,80775
Metilona (2)	5,064	1	11,72289	11	10,85474
		2	10,96850	12	10,50360
		3	11,15209	13	11,14922
		4	10,79755	14	10,92636
		5	10,76567	15	10,56149
		6	10,79229	16	10,27715
		7	10,82178	17	10,79440
		8	11,09915	18	10,70290
		9	10,41845	19	10,38250
		10	10,63265	20	10,76814
MDPV (3)	5,036	1	24,863249	11	24,403903
		2	24,948309	12	24,480640
		3	24,385044	13	24,971819
		4	24,844481	14	24,999227
		5	24,496257	15	24,499844
		6	24,467041	16	24,468348
		7	24,443094	17	24,622339
		8	24,522202	18	24,655294
		9	24,462155	19	24,657825
		10	24,514735	20	25,077415

Anexo 6.68 - Resultados obtidos a partir da análise por GC-FID de 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, ao longo de 10 dias não consecutivos, para posterior construção das curvas de calibração diárias. Os resultados, para a mefedrona (1), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).

Mefedrona (1)										
Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>
	0,283	0,279	0,282	0,282	0,280	0,277	0,277	0,277	0,268	0,272
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>
0,276	0,278	0,278	0,278	0,275	0,275	0,283	0,275	0,274	0,273	
Padrão 2 (1,270 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	7,766	7,778	7,873	7,812	7,856	7,800	7,876	7,881	7,809	7,830
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
7,821	7,682	7,830	7,873	7,879	7,884	7,990	7,974	8,022	8,004	
Padrão 3 (2,586 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	16,066	15,813	16,192	16,088	16,262	16,285	16,239	16,116	16,458	16,392
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
15,970	15,998	15,950	15,922	16,216	16,296	16,389	16,480	16,506	16,350	
Padrão 4 (3,800 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	23,853	23,614	23,895	23,843	24,100	24,180	23,779	24,058	23,291	23,621
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
23,950	23,711	23,830	23,901	23,828	23,928	23,251	24,202	24,007	24,209	
Padrão 5 (5,080 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	29,987	30,487	30,601	30,257	30,315	30,717	31,011	30,957	31,909	31,757
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
30,095	31,207	30,528	30,725	30,508	30,883	30,787	31,021	31,376	31,307	

Anexo 6.69 - Resultados obtidos a partir da análise por GC-FID de 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, ao longo de 10 dias não consecutivos, para posterior construção das curvas de calibração diárias. Os resultados, para a metilona (2), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).

Metilona (2)										
Padrão 1 (0,024 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>
	0,154	0,155	0,152	0,153	0,151	0,151	0,151	0,151	0,147	0,147
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>
0,151	0,148	0,152	0,154	0,151	0,151	0,150	0,151	0,150	0,151	
Padrão 2 (1,274 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	3,241	3,185	3,015	2,729	2,985	3,083	2,846	3,051	3,095	3,113
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
3,125	3,048	3,130	3,111	3,131	3,148	3,062	3,126	3,090	3,195	
Padrão 3 (2,584 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	6,777	6,549	6,426	6,050	6,560	6,604	6,214	6,476	6,454	6,580
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
6,587	6,495	6,567	6,520	6,626	6,633	6,595	6,641	6,727	6,409	
Padrão 4 (3,758 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	9,307	9,084	9,148	9,146	9,150	9,225	9,011	9,308	8,813	9,121
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
9,414	9,226	9,428	9,242	9,264	9,460	8,645	8,991	9,121	8,915	
Padrão 5 (5,064 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	10,689	10,317	10,486	10,712	10,223	10,649	10,561	10,350	10,496	10,405
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
10,926	10,742	10,947	10,615	10,435	10,694	10,332	10,603	10,637	10,013	

Anexo 6.70 - Resultados obtidos a partir da análise por GC-FID de 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, ao longo de 10 dias não consecutivos, para posterior construção das curvas de calibração diárias. Os resultados, para o MDPV (3), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).

MDPV (3)										
Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>
	0,187	0,187	0,188	0,186	0,185	0,188	0,187	0,186	0,184	0,185
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>
0,186	0,184	0,186	0,186	0,186	0,184	0,184	0,186	0,187	0,186	
Padrão 2 (1,244 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	6,192	6,206	6,262	6,219	6,248	6,249	6,263	6,267	6,261	6,284
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
6,222	6,223	6,225	6,264	6,264	6,273	6,357	6,339	6,375	6,367	
Padrão 3 (2,536 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	12,459	12,404	12,513	12,439	12,600	12,618	12,582	12,544	12,647	12,684
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
12,472	12,391	12,463	12,362	12,575	12,629	12,661	12,742	12,762	12,695	
Padrão 4 (3,744 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	18,512	18,515	18,666	18,628	18,693	18,708	18,542	18,977	18,546	18,579
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
18,558	18,579	18,650	18,711	18,658	18,725	18,639	18,888	18,672	18,944	
Padrão 5 (5,036 mg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
	23,892	23,923	23,956	24,080	24,148	24,268	24,336	24,422	24,960	25,122
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>	<i>Rep2</i>	<i>Rep1</i>
24,508	24,647	24,174	24,182	24,151	24,331	24,248	24,278	24,524	24,816	

Anexo 6.71 - Valores médios das 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, para construção das curvas de calibração diárias utilizadas e verificação de linearidade. Os resultados, para a mefedrona (1), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).

Mefedrona (1)										
Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,281	0,282	0,278	0,277	0,270	<u>0,277</u>	<u>0,278</u>	<u>0,275</u>	<u>0,279</u>	<u>0,273</u>
Padrão 2 (1,270 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	7,772	7,843	7,828	7,879	7,820	<u>7,752</u>	<u>7,851</u>	<u>7,881</u>	<u>7,982</u>	<u>8,013</u>
Padrão 3 (2,586 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	15,939	16,140	16,274	16,178	16,425	<u>15,984</u>	<u>15,936</u>	<u>16,256</u>	<u>16,435</u>	<u>16,428</u>
Padrão 4 (3,800 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	23,733	23,869	24,140	23,918	23,456	<u>23,830</u>	<u>23,865</u>	<u>23,878</u>	<u>23,727</u>	<u>24,108</u>
Padrão 5 (5,080 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	30,237	30,429	30,516	30,984	31,833	30,651	30,627	30,695	30,904	31,341

Anexo 6.72 - Valores médios das 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, para construção das curvas de calibração diárias utilizadas e verificação de linearidade. Os resultados, para a metilona (2), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).

Metilona (2)										
Padrão 1 (0,024 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>0,154</u>	<u>0,152</u>	<u>0,151</u>	<u>0,151</u>	<u>0,147</u>	0,150	0,153	0,151	0,150	0,150
Padrão 2 (1,274 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>3,213</u>	<u>2,872</u>	<u>3,034</u>	<u>2,949</u>	<u>3,104</u>	3,086	3,120	3,140	3,094	3,142
Padrão 3 (2,584 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>6,663</u>	<u>6,238</u>	<u>6,582</u>	<u>6,345</u>	<u>6,517</u>	6,541	6,544	6,629	6,618	6,568
Padrão 4 (3,758 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>9,195</u>	<u>9,147</u>	<u>9,188</u>	<u>9,159</u>	<u>8,967</u>	9,320	9,335	9,362	8,818	9,018
Padrão 5 (5,064 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	10,503	10,599	10,436	10,456	10,451	10,834	10,781	10,565	10,468	10,325

Anexo 6.73 - Valores médios das 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, para construção das curvas de calibração diárias utilizadas e verificação de linearidade. Os resultados, para o MDPV (3), são correspondentes à Área Relativa, calculada pela razão entre a Área da resposta do analito (%) e a Área da resposta do PI (%).

MDPV (3)										
Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>0,187</u>	<u>0,187</u>	<u>0,187</u>	<u>0,187</u>	<u>0,184</u>	0,185	0,186	0,185	0,185	0,186
Padrão 2 (1,244 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>6,199</u>	<u>6,240</u>	<u>6,248</u>	<u>6,265</u>	<u>6,273</u>	6,222	6,244	6,269	6,348	6,371
Padrão 3 (2,536 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>12,431</u>	<u>12,476</u>	<u>12,609</u>	<u>12,563</u>	<u>12,666</u>	12,431	12,413	12,602	12,701	12,728
Padrão 4 (3,744 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	<u>18,513</u>	<u>18,647</u>	<u>18,700</u>	<u>18,759</u>	<u>18,563</u>	18,569	18,681	18,691	18,764	18,808
Padrão 5 (5,036 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	23,907	24,018	24,208	24,379	25,041	24,578	24,178	24,241	24,263	24,670

Anexo 6.74 - Equações das retas que dão origem às das curvas de calibração diárias para cada catinona, decorrente da análise por GC-FID ao longo de 10 dias não consecutivos, de 5 soluções de Padrões de calibrações, com duas injeções diárias, intercaladas de brancos.

<i>Dia/Catinona</i>	Mefedrona (1)	Metilona (2)	MDPV (3)
<i>Dia 1</i>	$y = 6,01x + 0,25$ $R^2 = 0,9993$	$y = 2,12x + 0,55$ $R^2 = 0,9884$	$y = 4,78x + 0,21$ $R^2 = 0,9995$
<i>Dia 2</i>	$y = 6,04x + 0,28$ $R^2 = 0,9993$	$y = 2,16x + 0,31$ $R^2 = 0,999$	$y = 4,80x + 0,22$ $R^2 = 0,9995$
<i>Dia 3</i>	$y = 6,08x + 0,28$ $R^2 = 0,9990$	$y = 2,13x + 0,48$ $R^2 = 0,9882$	$y = 4,84x + 0,21$ $R^2 = 0,9996$
<i>Dia 4</i>	$y = 6,13x + 0,18$ $R^2 = 0,9997$	$y = 2,13x + 0,39$ $R^2 = 0,9903$	$y = 4,87x + 0,18$ $R^2 = 0,9997$
<i>Dia 5</i>	$y = 6,24x + 0,03$ $R^2 = 0,9999$	$y = 2,11 + 0,48$ $R^2 = 0,9908$	$y = 4,96x + 0,06$ $R^2 = 0,9999$
<i>Dia 6</i>	$y = 6,08x + 0,16$ $R^2 = 0,9996$	$y = 2,20x + 0,41$ $R^2 = 0,9920$	$y = 4,89x + 0,09$ $R^2 = 0,9999$
<i>Dia 7</i>	$y = 6,08x + 0,20$ $R^2 = 0,9995$	$y = 2,19x + 0,43$ $R^2 = 0,9913$	$y = 4,83x + 0,18$ $R^2 = 0,9996$
<i>Dia 8</i>	$y = 6,09x + 0,26$ $R^2 = 0,9995$	$y = 2,15x + 0,50$ $R^2 = 0,9880$	$y = 4,84x + 0,21$ $R^2 = 0,9996$
<i>Dia 9</i>	$y = 6,01x + 0,29$ $R^2 = 0,9997$	$y = 2,10x + 0,50$ $R^2 = 0,9910$	$y = 4,84x + 0,26$ $R^2 = 0,9995$
<i>Dia 10</i>	$y = 6,20x + 0,21$ $R^2 = 0,9998$	$y = 2,09x + 0,54$ $R^2 = 0,9884$	$y = 4,91x + 0,19$ $R^2 = 0,9998$

Anexo 6.78 - Valores de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas ao longo de 10 dias não consecutivos, que permitem determinar a componente de incerteza associada ao sinal instrumental para o composto mefedrona (1).

Mefedrona (1)										
Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0025	0,0002	0,0022	0,0002	0,0030	0,0020	0,0004	0,0003	0,0053	0,0004
Padrão 2 (1,270 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0083	0,0429	0,0394	0,0044	0,0145	0,0988	0,0301	0,0034	0,0117	0,0123
Padrão 3 (2,586 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,1794	0,0737	0,0162	0,0871	0,0469	0,0204	0,0198	0,0565	0,0643	0,1099
Padrão 4 (3,800 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,1686	0,0368	0,0565	0,1975	0,2338	0,1692	0,0502	0,0707	0,6721	0,1429
Padrão 5 (5,080 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,3536	0,2429	0,2843	0,0384	0,1080	0,7863	0,1393	0,2652	0,1658	0,0484

Anexo 6.79 - Valores de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas ao longo de 10 dias não consecutivos, que permitem determinar a componente de incerteza associada ao sinal instrumental para o composto metilona (2).

Metilona (2)										
Padrão 1 (0,024 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0002	0,0002	0,0003	0,0003	0,0003	0,0016	0,0017	3,4181 $\times 10^{-5}$	0,0009	0,0007
Padrão 2 (1,274 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0396	0,2022	0,0691	0,1448	0,0129	0,0542	0,0142	0,0123	0,0459	0,0740
Padrão 3 (2,584 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,1611	0,2658	0,0312	0,1853	0,0892	0,0655	0,0330	0,0049	0,0323	0,2245
Padrão 4 (3,758 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,1578	0,0013	0,0531	0,2101	0,2174	0,1329	0,1314	0,1389	0,2447	0,1458
Padrão 5 (5,064 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,2633	0,1592	0,3012	0,1489	0,0643	0,1298	0,2349	0,1829	0,1919	0,4413

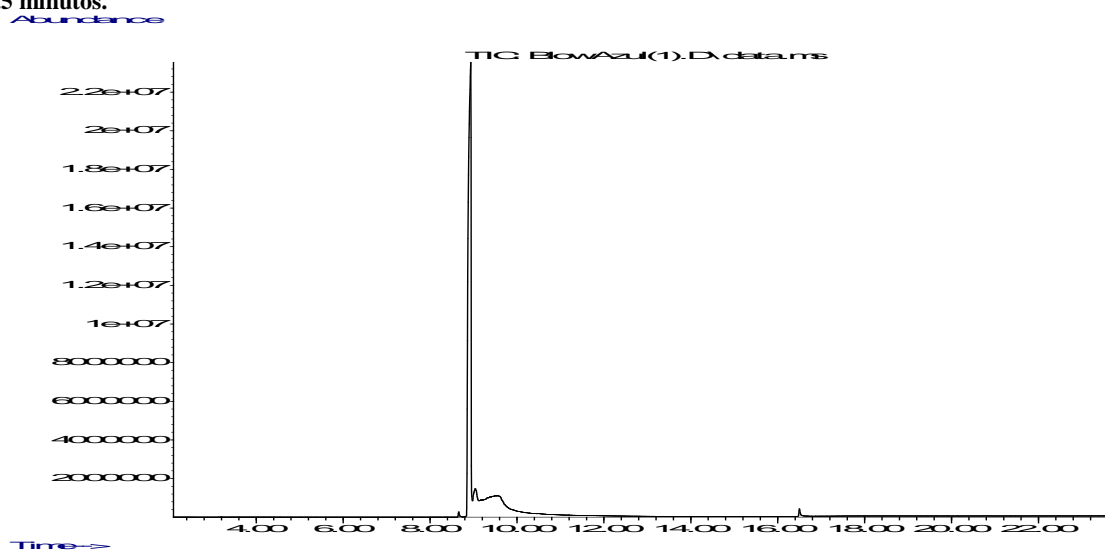
Anexo 6.80 - Valores de desvio padrão entre as 2 repetições por Padrão de Calibração e por dia, analisadas ao longo de 10 dias não consecutivos, que permitem determinar a componente de incerteza associada ao sinal instrumental para o composto MDPV (3).

MDPV (3)										
Padrão 1 (0,032 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0003	0,0013	0,0017	0,0008	0,0005	0,0011	0,0005	0,0012	0,0011	0,0007
Padrão 2 (1,244 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0098	0,0308	0,0005	0,0036	0,0161	0,0003	0,0279	0,0062	0,0134	0,0056
Padrão 3 (2,536 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0386	0,0522	0,0132	0,0269	0,0260	0,0572	0,0715	0,0378	0,0576	0,0471
Padrão 4 (3,744 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0024	0,0264	0,0105	0,3077	0,0240	0,0147	0,0432	0,0467	0,1756	0,1927
Padrão 5 (5,036 mg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
	0,0223	0,0876	0,0849	0,0610	0,1148	0,0979	0,0055	0,1275	0,0218	0,2058

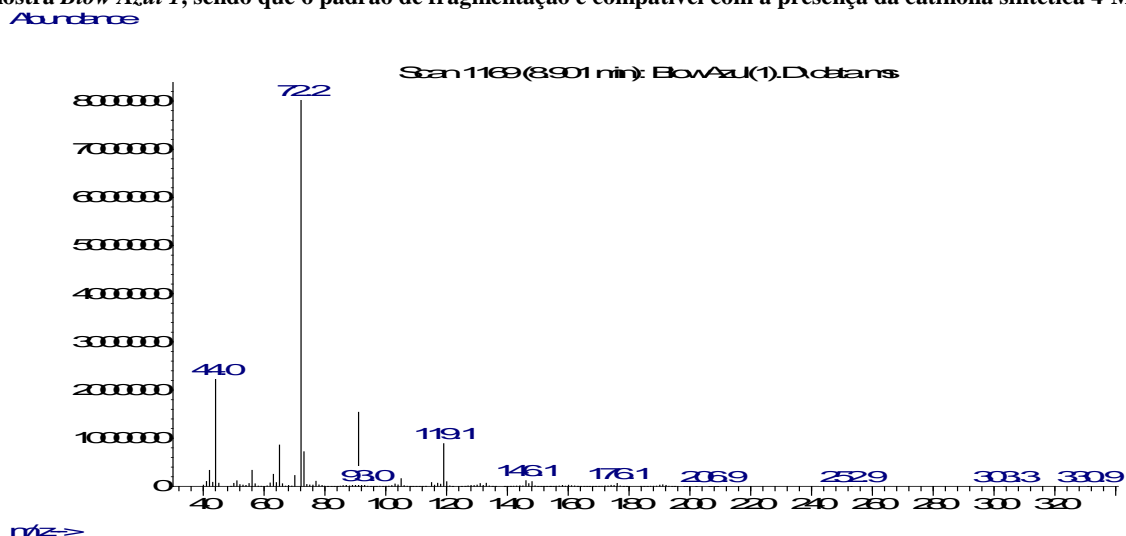
Anexo 6.81 – Compilação dos valores obtidos com vista ao estudo da repetibilidade da balança analítica instalada no LPC-PJ, para posterior determinação da incerteza associada às massas pesadas.

<i>Repetibilidade Balança LPC-PJ: METTLER AE 100</i>			
<i>Repetições</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Média (mg)</i>	<i>Desvio Padrão ($S_{r_{balança}}$)</i>
1	6,5802	6,5803	$6,3246 \times 10^{-5}$
2	6,5803		
3	6,5803		
4	6,5803		
5	6,5803		
6	6,5803		
7	6,5804		
8	6,5803		
9	6,5804		
10	6,5804		

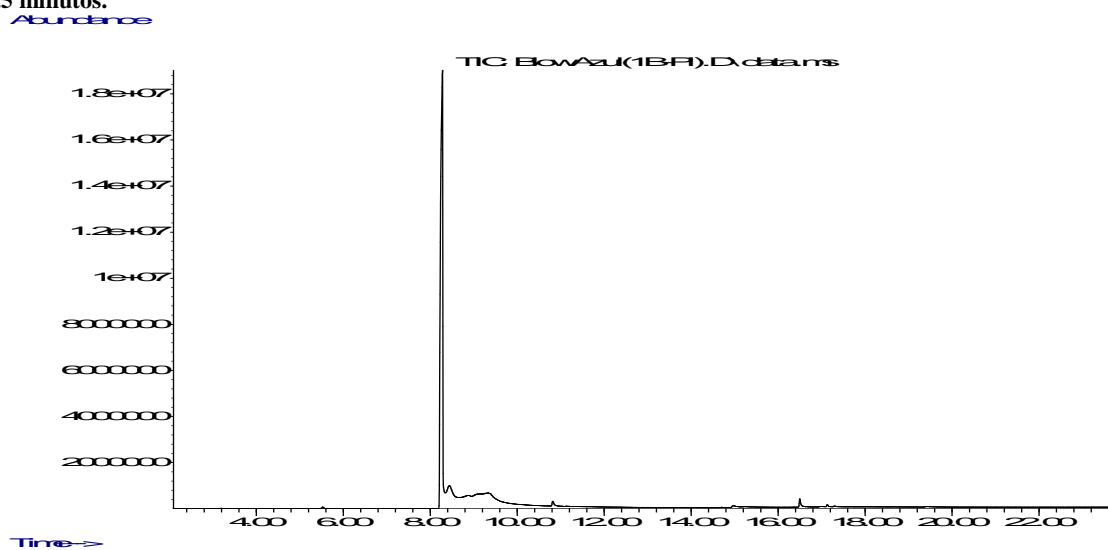
Anexo 6.82 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Azul 1*, resultante de material apreendido numa “*SmartShop*”, verificando-se um pico maioritário com tr de 8.9 minutos, e ainda o pico do PI de tr 16.5 minutos.



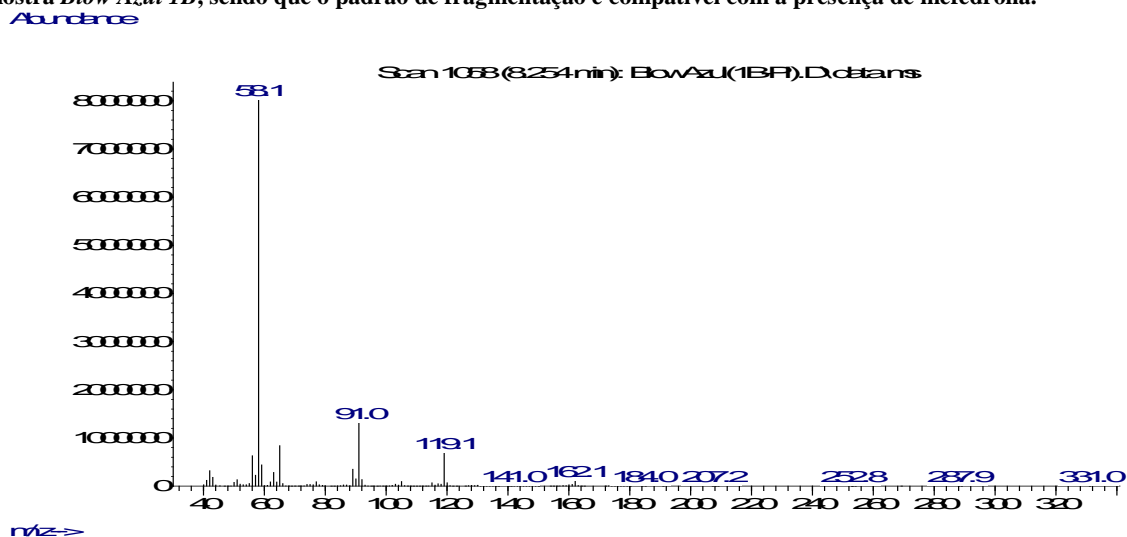
Anexo 6.83 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.9 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Azul 1*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da catinona sintética 4-MEC.



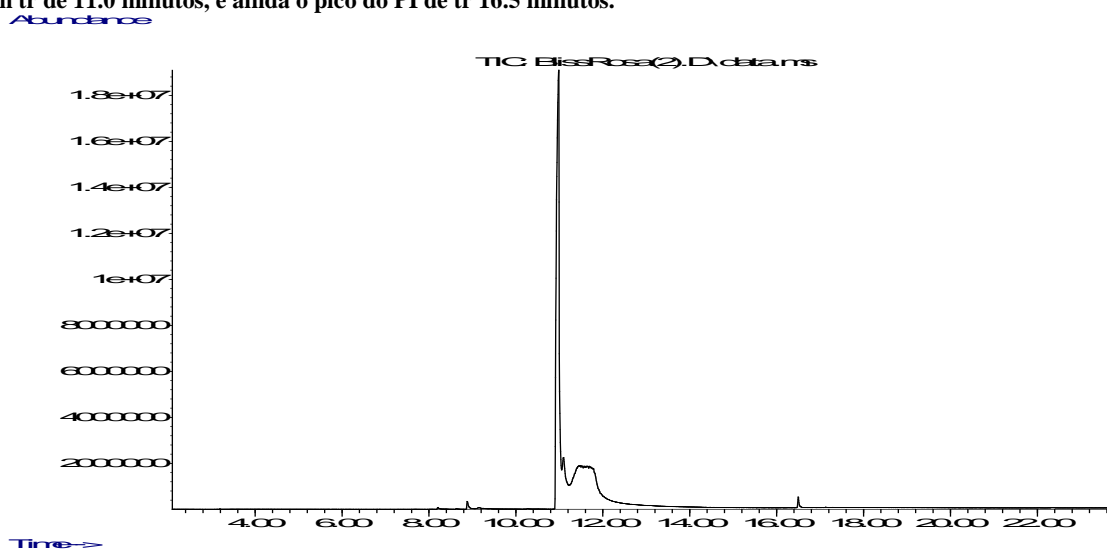
Anexo 6.84 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Azul 1B*, resultante de material apreendido numa "SmartShop", verificando-se um pico maioritário com tr de 8.3 minutos, e ainda o pico do PI de tr 16.5 minutos.



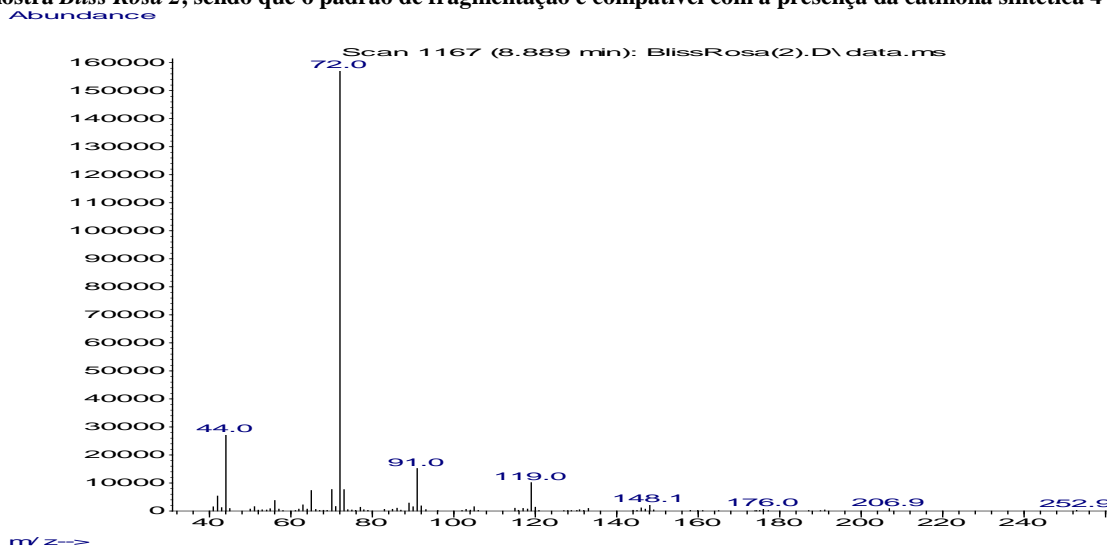
Anexo 6.85 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.3 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Azul 1B*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença de mefedrona.



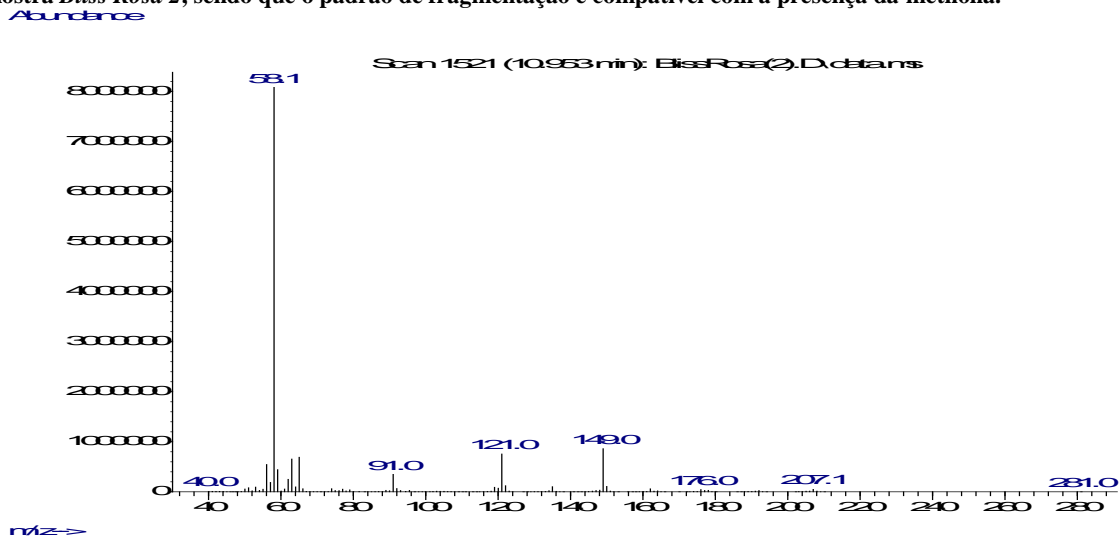
Anexo 6.86 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra *Bliss Rosa 2*, resultante de material apreendido numa "SmartShop", verificando-se a existência de um pequeno pico de tr 8.9 minutos, um pico maioritário com tr de 11.0 minutos, e ainda o pico do PI de tr 16.5 minutos.



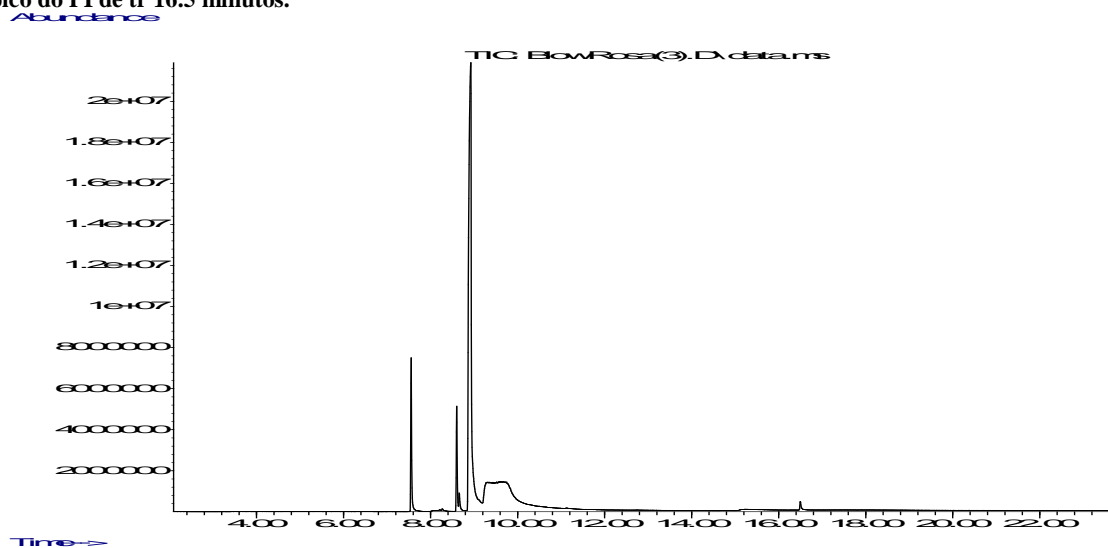
Anexo 6.87 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.9 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Bliss Rosa 2*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da catinona sintética 4-MEC.



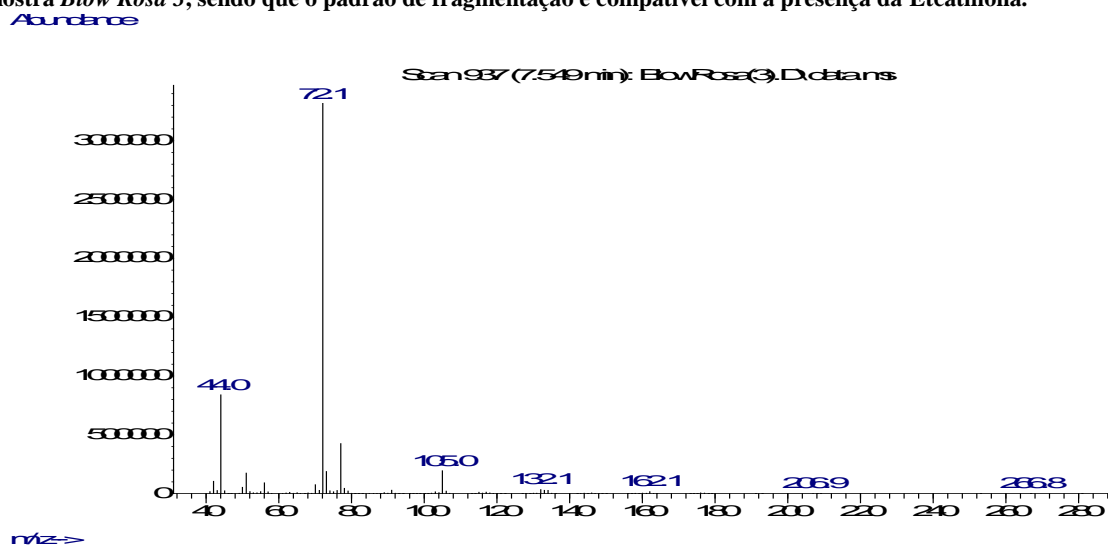
Anexo 6.88 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.0 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Bliss Rosa 2*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da metilona.



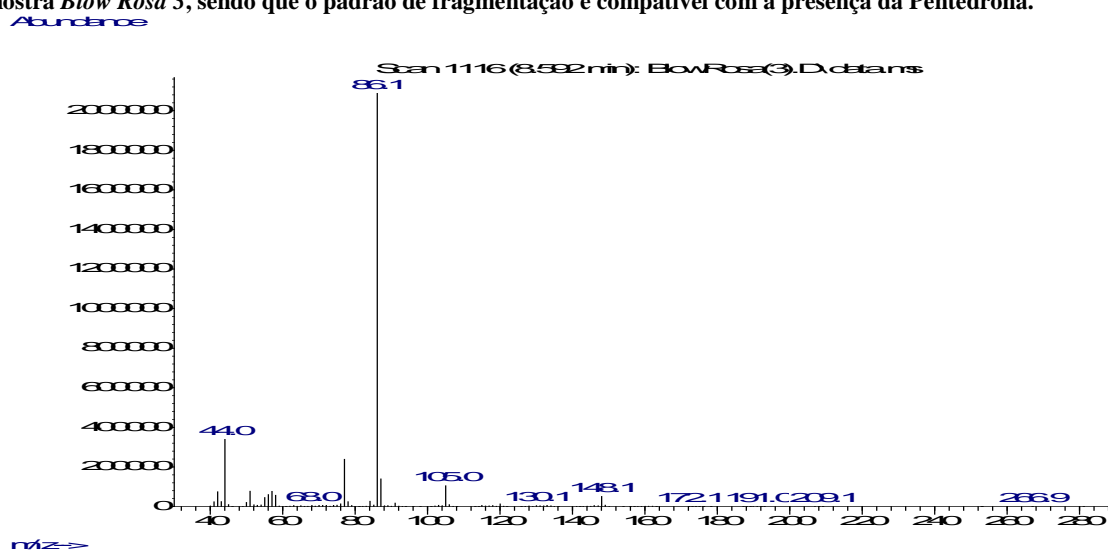
Anexo 6.89 - Cromatograma resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Rosa 3*, resultante de material apreendido numa "SmartShop", verificando-se a presença de 3 picos significativos, com tr de 7.5, 8.6 e 8.9 minutos. Verifica-se ainda uma zona com um pico muito alargado e reduzida abundância, na zona de tr 15.4 minutos, e por fim o pico do PI de tr 16.5 minutos.



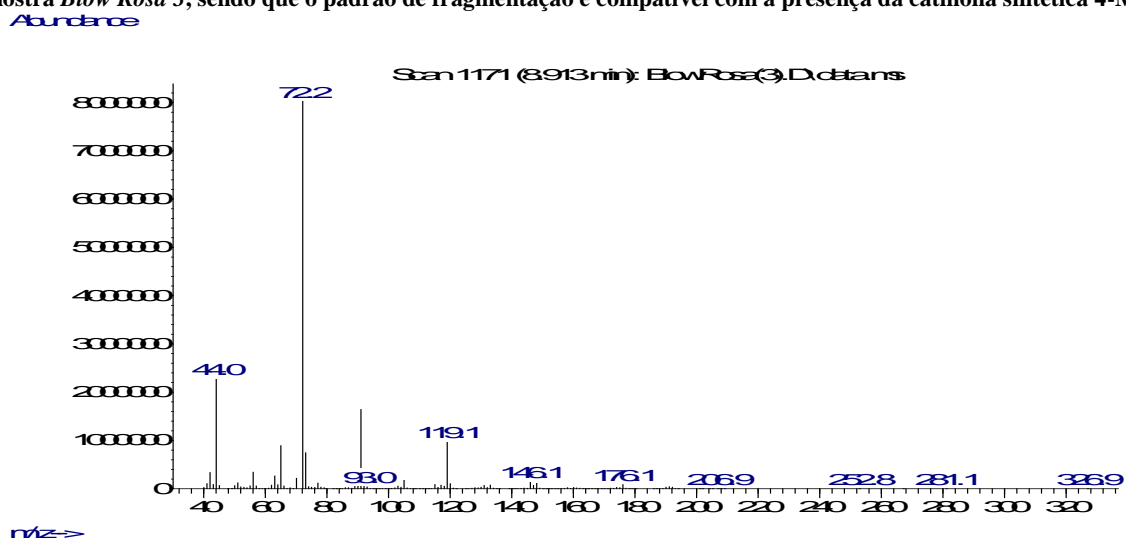
Anexo 6.90 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 7.5 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Rosa 3*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da Ectatinona.



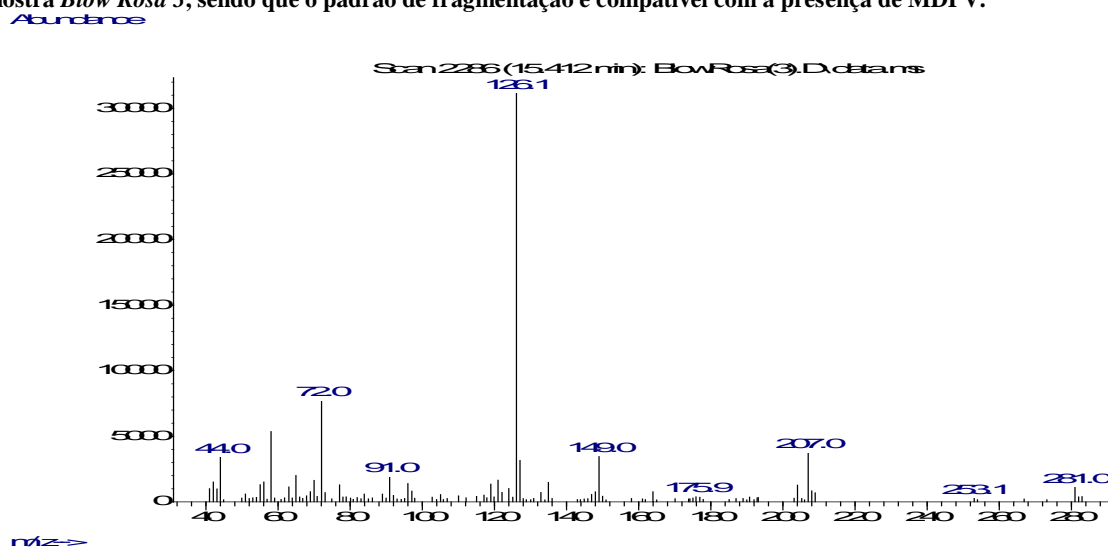
Anexo 6.91 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.6 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Rosa 3*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da Pentedrona.



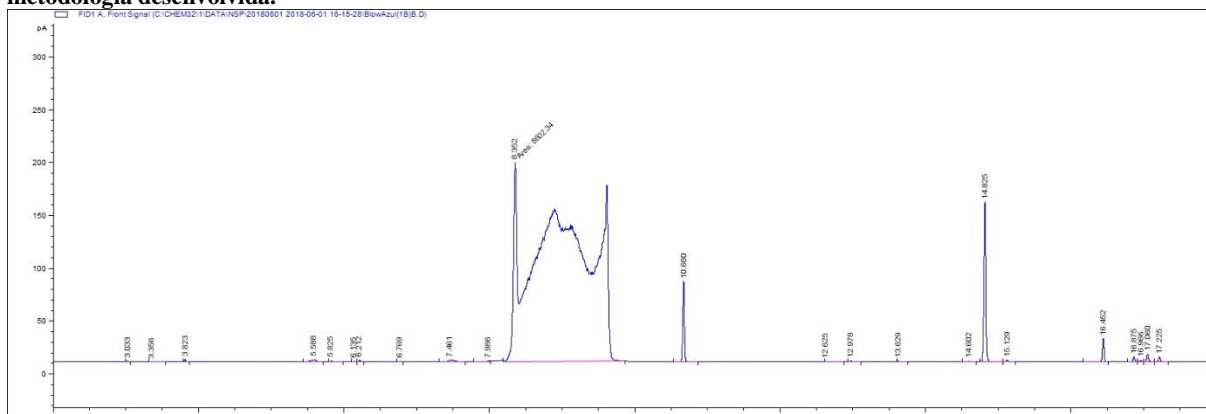
Anexo 6.92 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 8.9 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Rosa 3*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença da catinona sintética 4-MEC.



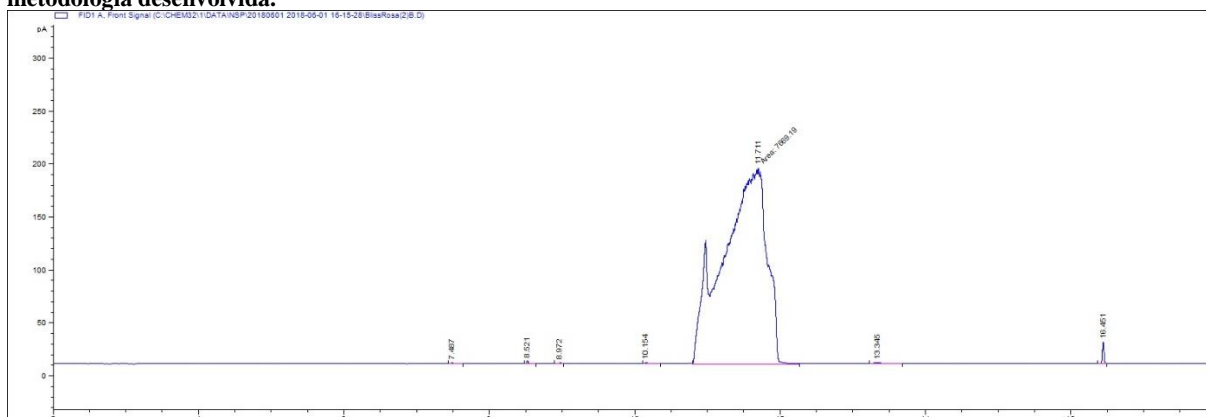
Anexo 6.93 - Espetro de massa correspondente ao tempo de retenção 15.4 minutos, resultante da análise por GC-MS da amostra *Blow Rosa 3*, sendo que o padrão de fragmentação é compatível com a presença de MDPV.



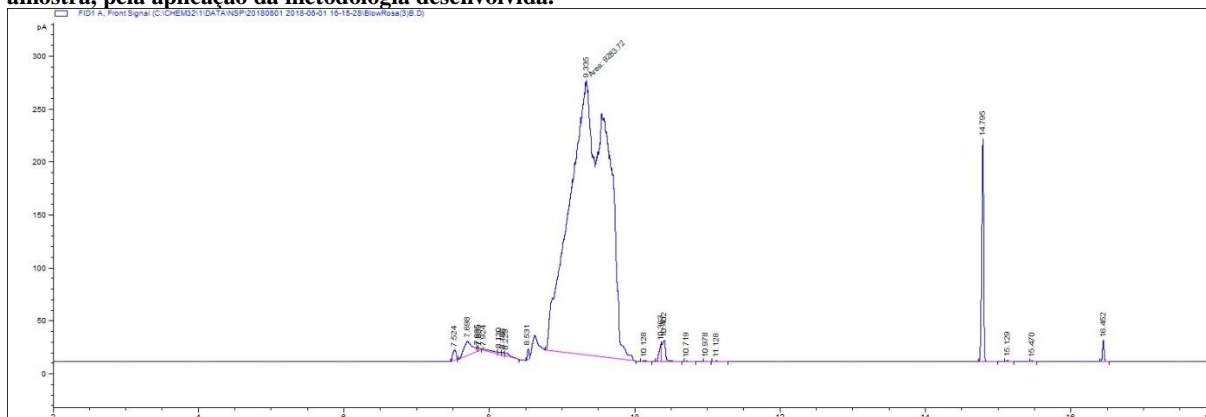
Anexo 6.94 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID da amostra *Blow Azul 1B*, resultante de material apreendido numa “*SmartShop*”, verificando-se que na zona do t_r da mefedrona – na ordem dos 8 minutos (catinona sintética que se pretendia quantificar), existe um pico muito alargado, não sendo possível afirmar com certeza de que será apenas correspondente a esta catinona. Deste modo, a mefedrona não deve ser quantificada pela aplicação da metodologia desenvolvida.



Anexo 6.95 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID da amostra *Bliss Rosa 2*, resultante de material apreendido numa “*SmartShop*”, verificando-se que na zona do t_r da metilona – na ordem dos 11 minutos (catinona sintética que se pretendia quantificar), existe um pico muito alargado, não sendo possível afirmar com certeza de que será apenas correspondente a esta catinona. Deste modo, a metilona não deve ser quantificada pela aplicação da metodologia desenvolvida.



Anexo 6.96 - Cromatograma resultante da análise por GC-FID da amostra *Blow Rosa 3*, resultante de material apreendido numa “*SmartShop*”, verificando-se que na zona do t_r do MDPV – na ordem dos 14 minutos (catinona sintética que se pretendia quantificar), existe um pico estreito e bem definido, pelo que é possível quantificar o MDPV nesta amostra, pela aplicação da metodologia desenvolvida.



Anexo 6.97 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de facilitar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo de aplicação para determinação da fração de mefedrona na solução de Padrão 3, que neste caso funcionou como amostra problema, para testar a aplicação desta metodologia.

Pad1	Preencher células		Réplica1		Réplica2		Réplica1		Réplica2		Média	
Pad2	Selecionar:	mg/mL	A_Pad	A_PI	A_Pad	A_PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI (med)	
Pad3	Pad4	3,8	41,07526	1,69737	40,35311	1,67176	24,19935547	24,13809997	24,16872772			
Pad4	Pad5	A_Cat	A_PI	A_Cat	A_PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI (med)				
Pad5	+	Resultado	0,329±0,016	40,40554	2,51843	40,28498	2,48097	16,04394007	16,23759255	16,14076631		
-												
			u(RA_Cat/PI)	u(RA_Pad/PI)	u(a _max)	u(m_Pad (mg))	u(m_A (mg))	u(Pur)	u(VA_PI (mL))	u(VA_Solv (mL))	u(VPad_PI (mL))	u(VPad_Solv (mL))
	Valor	0,05825742	0,178173512	0,292065384	0,244948991	0,244948991	0,000254516	0,011590226	0,057812917	0,011590226	0,057812917	0,057812917
	RA_Cat/PI	16,14076631	16,19902373	16,14076631	16,14076631	16,14076631	16,14076631	16,14076631	16,14076631	16,14076631	16,14076631	16,14076631
	RA_Pad/PI	24,16872772	24,16872772	24,34690123	24,16872772	24,16872772	24,16872772	24,16872772	24,16872772	24,16872772	24,16872772	24,16872772
	a _max	0	0	0	0,292065384	0	0	0	0	0	0	0
	m_Pad (mg)	19	19	19	19	19,24494899	19	19	19	19	19	19
	m_A (mg)	38,53	38,53	38,53	38,53	38,53	38,77494899	38,53	38,53	38,53	38,53	38,53
	Pur	0,99871025	0,99871025	0,99871025	0,99871025	0,99871025	0,99871025	0,998964766	0,99871025	0,99871025	0,99871025	0,99871025
	VA_PI (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1,011590226	1	1	1
	VA_Solv (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4,057812917	4	4
	VPad_PI (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,011590226	1
	VPad_Solv (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,057812917
	w_Cat	0,328900444	0,330087556	0,326493512	0,326899421	0,333140646	0,326822715	0,328984263	0,32966285	0,332703383	0,328139801	0,325140974
	(dw_Cat)/(d(xi))	0,020377003	-0,013508924	-0,006851284	0,01731055	-0,008482292	0,329325191	0,065780089	0,065780089	-0,06562796	-0,065028195	-0,065028195
	(dw_Cat)/(d(xi))*u(xi)	0,001187112	-0,002406932	-0,002001023	0,004240202	-0,002077729	8,38187E-05	0,000762406	0,003802939	-0,000760643	-0,00375947	-0,00375947
	u=	0,007953976										
	U(95 %)=	0,015907953										
	U' (95 %)=	4,83671%										
	Resultado:	0,329±0,016										
	Contagem percentual de componentes:	2,227%	9,157%	6,329%	28,419%	6,824%	0,011%	0,919%	22,860%	0,915%	22,340%	Soma
												100%

Anexo 6.98 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de facilitar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo de aplicação para determinação da fração de metilona na solução de Padrão 3, que neste caso funcionou como amostra problema, para testar a aplicação desta metodologia.

Pad1	Preencher células											
Pad2												
Pad3			Réplica1		Réplica2		Réplica1		Réplica2		Média	
Pad4	Selecionar:	mg/mL	A_Pad	A_PI	A_Pad	A_PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI (med)	
Pad5	Pad4	3,758	15,73082	1,69737	16,22993	1,67176	9,267761301	9,708289467	9,488025384	9,488025384	9,488025384	
			A_Cat	A_PI	A_A	A_PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI (med)		
+	Amostra	0,338±0,027	16,76983	2,51843	16,7079	2,48097	6,658843009	6,734422423	6,696632716	6,696632716		
-												
			u(RA_Cat/PI)	u(RA_Pad/PI)	u(a _max)	u(m_Pad (mg))	u(m_A (mg))	u(Pur)	u(VA_PI (mL))	u(VA_Solv (mL))	u(VPad_PI (mL))	u(VPad_Solv (mL))
	Valor	0,112800549	0,112800549	0,551511188	0,244948991	0,244948991	0,000350201	0,011590226	0,057812917	0,011590226	0,057812917	0,057812917
	RA_Cat/PI	6,696632716	6,809433265	6,696632716	6,696632716	6,696632716	6,696632716	6,696632716	6,696632716	6,696632716	6,696632716	6,696632716
	RA_Pad/PI	9,488025384	9,488025384	9,600825933	9,488025384	9,488025384	9,488025384	9,488025384	9,488025384	9,488025384	9,488025384	9,488025384
	a _max	0	0	0	0,551511188	0	0	0	0	0	0	0
	m_Pad (mg)	18,79	18,79	18,79	18,79	19,03494899	18,79	18,79	18,79	18,79	18,79	18,79
	m_A (mg)	38,53	38,53	38,53	38,53	38,53	38,77494899	38,53	38,53	38,53	38,53	38,53
	Pur	0,98246812	0,98246812	0,98246812	0,98246812	0,98246812	0,982818321	0,98246812	0,98246812	0,98246812	0,98246812	0,98246812
	VA_PI (mL)	1	1	1	1	1	1	1,011590226	1	1	1	1
	VA_Solv (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4,057812917	4	4	4
	VPad_PI (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1,011590226	1	1
	VPad_Solv (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,057812917	4
	w_Cat	0,338163617	0,34385977	0,334190517	0,329464453	0,342571964	0,336027371	0,338284156	0,338947496	0,342073662	0,337381552	0,334298266
	(∂w_Cat)/(∂(xi))	0,050497561	-0,035222346	-0,015773323	0,017996999	-0,008721188	0,344198056	0,067632723	0,067632723	-0,06747631	-0,066859653	-0,066859653
	(∂w_Cat)/(∂(xi))*u(xi)	0,005696153	-0,0039731	-0,008699164	0,004408347	-0,002136246	0,000120538	0,000783879	0,003910045	-0,000782066	-0,003865352	-0,003865352
	u=	0,013393066										
	U(95 %)=	0,026786132										
	U' (95 %)=	7,92106%										
	Resultado:	0,338±0,027										
												Soma
	Contagem percentual de componentes:	18,089%	8,800%	42,189%	10,834%	2,544%	0,008%	0,343%	8,523%	0,341%	8,329%	100%

Anexo 6.100 - Folha de Cálculo desenvolvida com o intuito de facilitar o trabalho do analista, nomeadamente no que respeita ao cálculo das incertezas associadas a cada fonte, bem como da incerteza combinada e expandida. Exemplo de aplicação para determinação da fração mássica de MDPV na amostra *Blow Rosa 3*, resultante de material apreendido numa “SmartsShop”.

Pad1	Preencher células											
Pad2												
Pad3			Réplica1		Réplica2		Réplica1		Réplica2		Média	
Pad4	Selecionar:	mg/mL	A_Pad	A_PI	A_Pad	A_PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI	RA_Pad/PI (med)	
Pad5	Pad4	3,744	31,64297	1,69737	31,26328	1,67176	18,64235258	18,7008183	18,67158544			
+			A_Cat	A_PI	A_Cat	A_PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI	RA_Cat/PI (med)		
-	Amostra	0,489±0,024	3,87321	0,31375	3,89143	0,3144	12,34489243	12,37732188	12,36110716			
			u(RA_Cat/PI)	u(RA_Pad/PI)	u(a _max)	u(m_Pad (mg))	u(m_A (mg))	u(Pur)	u(VA_PI (mL))	u(VA_Solv (mL))	u(VPad_PI (mL))	u(VPad_Solv (mL))
	Valor	12,36110716	0,032514323	0,091733815	0,259437403	0,244948975	0,244948975	0,000375128	0,011590226	0,057812917	0,011590226	0,057812917
	RA_Cat/PI	12,36110716	12,39362148	12,36110716	12,36110716	12,36110716	12,36110716	12,36110716	12,36110716	12,36110716	12,36110716	12,36110716
	RA_Pad/PI	18,67158544	18,67158544	18,76331926	18,67158544	18,67158544	18,67158544	18,67158544	18,67158544	18,67158544	18,67158544	18,67158544
	a _max	0	0	0	0,259437403	0	0	0	0	0	0	0
	m_Pad (mg)	18,72	18,72	18,72	18,72	18,96494897	18,72	18,72	18,72	18,72	18,72	18,72
	m_A (mg)	25,17	25,17	25,17	25,17	25,17	25,41494897	25,17	25,17	25,17	25,17	25,17
	Pur	0,99277705	0,99277705	0,99277705	0,99277705	0,99277705	0,99277705	0,993152178	0,99277705	0,99277705	0,99277705	0,99277705
	VA_PI (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1,011590226	1	1	1
	VA_Solv (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4,057812917	4	4
	VPad_PI (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,011590226	1
	VPad_Solv (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,057812917
	w_Cat	0,488821763	0,490107546	0,486431915	0,485305482	0,495217937	0,484110505	0,489006468	0,489954874	0,494473805	0,487691272	0,483234326
	(dw_Cat)/(d(xi))	0,039545144	-0,026051988	-0,013553485	0,026112274	-0,019233631	0,492378186	0,097764353	0,097764353	-0,097538254	-0,096646865	-0,096646865
	(dw_Cat)/(d(xi))*u(xi)	0,001285784	-0,002389848	-0,003516281	0,006396175	-0,004711258	0,000184705	0,001133111	0,005652042	-0,00113049	-0,005587437	-0,005587437
	u=	0,012190035										
	U(95 %)=	0,02438007										
	U' (95 %)=	4,98752%										
	Resultado:	0,489±0,024										
	Contagem percentual de componentes:	1,113%	3,844%	8,321%	27,532%	14,937%	0,023%	0,864%	21,498%	0,860%	21,009%	Soma 100%

Anexo 6.101 – Cálculos para obtenção dos valores da fração mássica de cada catinona sintética em estudo, na solução de Padrão de Calibração 3, utilizada como amostra problema, para verificar a compatibilidade metrológica.

$$W_{Cat(calculado)} = \frac{m_{Cat}}{m_{Amostra}}$$

Padrão de Calibração 3:

$$m_{Amostra} = m_{Mefedrona} + m_{Metilona} + m_{MDPV}$$

$$m_{Amostra} = 12,93 (mg) + 12,92(mg) + 12,68(mg)$$

$$m_{Amostra} = 38,53 mg$$

Mefedrona (1):

$$W_{Cat(calculado)} = \frac{12,93 (mg)}{38,53 (mg)} \Leftrightarrow W_{Cat(calculado)} = 0,336$$

Metilona (2):

$$W_{Cat(calculado)} = \frac{12,92 (mg)}{38,53 (mg)} \Leftrightarrow W_{Cat(calculado)} = 0,335$$

MDPV (3):

$$W_{Cat(calculado)} = \frac{12,68 (mg)}{38,53 (mg)} \Leftrightarrow W_{Cat(calculado)} = 0,329$$

Anexo 6.102 - Invólucro dos quatro produtos resultantes de material apreendido de uma "SmartShop", com suspeita de conterem pelo menos uma das catinonas sintéticas em estudo.



Blow Azul 1

Blow Azul 1B

Bliss Rosa 2

Blow Rosa 3

Anexo 6.103 - Compilação das 57 amostras analisadas no âmbito deste trabalho e análises efetuadas com vista à identificação das substâncias psicoativas eventualmente presentes.

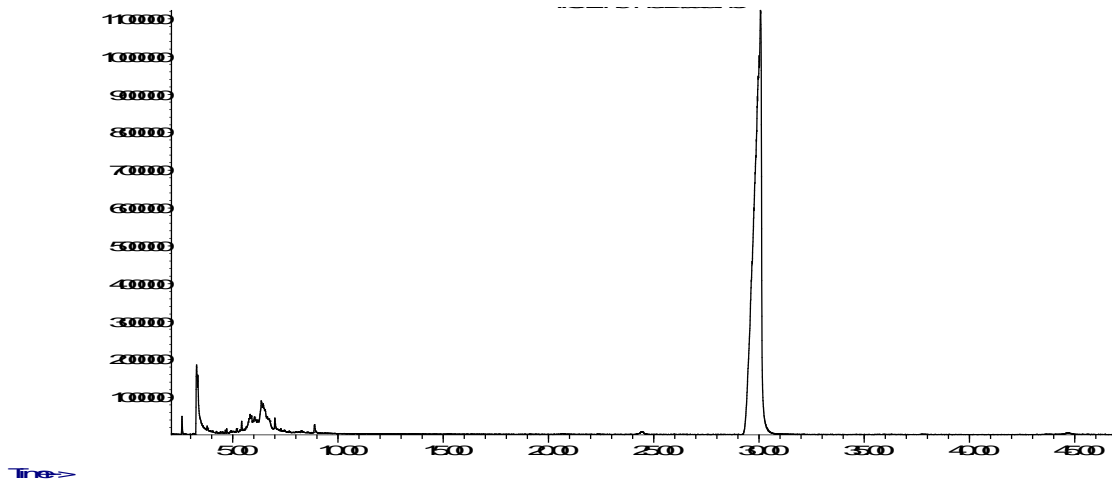
<i>Amostra</i>	<i>Tipo, Massa</i>	<i>Análise Efetuadas</i>
1	Pó, 217 mg	GC-MS ('anfet') e RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , D ₂ O e CDCl ₃)
2	Matriz herbal, 535 mg	GC-MS ('bup'), Extração MeOH e TLC
3	Matriz herbal, 1235 mg	GC-MS ('bup'), Extração MeOH, TLC, Purificação em CC, RMN ¹ H Fração20-22 (CDCl ₃), RMN ¹ H e Caracterização RMN (CDCl ₃ , MeOD e DMSO- <i>d</i> ₆) Fração40-43
4	Pó, 14 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC, HSQC-TOCSY e HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆)
5	Pó, 25 mg	GC-MS ('MS_M'), RMN ¹ H e HSQC-TOCSY (DMSO- <i>d</i> ₆)
6	Pó, 26 mg	GC-MS ('anfet') e RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
7	Solução Líquida	TLC, RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) antes e após evaporação do líquido
8	Solução Líquida	TLC, RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) antes e após evaporação do líquido
9	Solução Líquida	TLC, RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
10	Solução Líquida	TLC, RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
11	Pó	Colorimétricos Marquis e Scott, GC-MS ('anfet')
12	Pó	Colorimétricos Marquis e Scott, GC-MS ('anfet')
13	Pó, 62 mg	GC-MS ('anfet') e RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
14	Pó, 23 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, HSQC-TOCSY e COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)
15	Pó, 27 mg	GC-MS ('anfet') e RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
16	Pó, 28 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, HSQC-TOCSY e COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)
17	Autocolantes	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
18	Autocolantes	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
19	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
20	Autocolantes	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
21	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
22	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
23	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
24	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
25	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
26	Autocolantes	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
27	Autocolantes	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
28	Autocolantes	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('anfet')
29	Pó, 56,2 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, ¹³ C APT, HSQC, COSY, HSQC-TOCSY e HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆)
30	Pó, 58 mg	GC-MS('anfet'), RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
31	Pó, 47,7 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
32	Pó, 50,2 mg	GC-MS('anfet'), RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
33	Matriz herbal, 61,4 mg	GC-MS ('anfet'), Extração MeOD, RMN ¹ H, HSQC e HMBC (MeOD), TLC
34	Pó, 26 mg	GC-MS ('anfet_L'), RMN ¹ H, COSY, HSQC e HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆)
35	Pó, 70 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC e HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆)
36	Pó, 34 mg	GC-MS ('anfet_L') e RMN ¹ H
37	Pó, 45 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC e HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆), e RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC e HMBC (CDCl ₃)

Anexo 6.103 (Continuação) - Compilação das 57 amostras analisadas no âmbito deste trabalho e análises efetuadas com vista à identificação das substâncias psicoativas eventualmente presentes.

<i>Amostra</i>	<i>Tipo, Massa</i>	<i>Análise Efetuadas</i>
38	Resíduos (matriz herbal)	GC-MS ('MS_M'), Extração MeOD, HR-RMN e ESI-MS/MS
39	Pó, 25 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC, HMBC e NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆), e RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC e HMBC (MeOD)
40	Pó	Colorimétricos Marquis e Scott, GC-MS ('anfet')
41	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC, GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H (CDCl ₃), RMN ¹ H (MeOD), Extração MeOD e RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC e HMBC (MeOD), MS e ESI-MS, RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC, HMBC e NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆)
42	Vinho	Basificação (NaOH), Extração (CHCl ₃) e GC-MS ('MS_25min')
43	Alimento para animais (carne 'isco)	Lavagem com MeOH e GC-MS ('MS_L')
44	Animal	Lavagem com MeOH
45	Alimento para animais	Filtração, Extração (éter de petróleo)
46	Torrões de açúcar	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC e GC-MS ('MS_M')
47	Microselos	Extração (NaHCO ₃ e H ₂ O destilada), TLC, GC-MS ('anfet'), Extração CDCl ₃ e RMN ¹ H (CDCl ₃), Extração D ₂ O e RMN ¹ H (D ₂ O), Evaporação e Liofilização extrato D ₂ O, RMN ¹ H (MeOD), Extração MeOD e RMN ¹ H, COSY e HSQC (MeOD)
48	Comprimido	GC-MS ('anfet'), Extração MeOD, Filtração e RMN ¹ H (MeOD), Evaporação extrato e RMN ¹ H, COSY, HSQC-TOCSY e HMBC (D ₂ O)
49	Pó	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, COSY e HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆), e RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC, HMBC e NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆) com janela alargada
50	Pó, 50 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H e COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)
51	Pó, 30 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H e COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)
52	Pó, 50 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H e COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)
53	Pó, 120 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC e HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆), FTIR (pastilha KBr), MS (ESI+)
54	Pó, 199 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC, HMBC e HSQC-TOCSY (DMSO- <i>d</i> ₆), e RMN ¹ H, ¹³ C APT, COSY, HSQC e HMBC (CDCl ₃)
55	Pó, 587 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H, COSY, HSQC e HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆)
56	Pó	GC-MS ('anfet'), FTIR (pastilha KBr) e RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆)
57	Pó, 145 mg	GC-MS ('anfet'), RMN ¹ H e COSY (DMSO- <i>d</i> ₆)

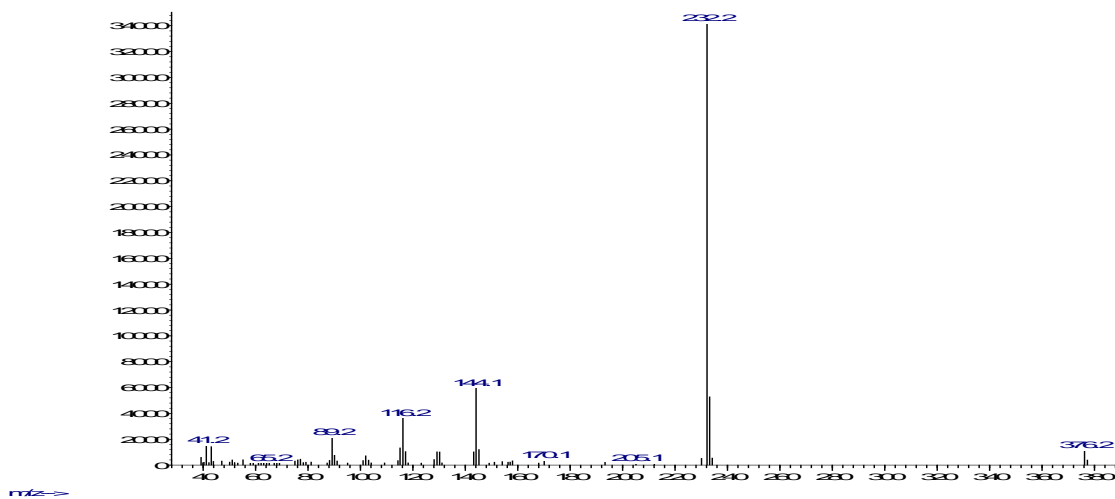
Anexo 6.104 - Cromatograma do exame correspondente à amostra que revelou conter dois canabinóides sintéticos, 5F-PB22 e 5F-AKB48, com tempos de retenção de 6.5 e 29.8 minutos, respectivamente, por GC-MS.

Abundance



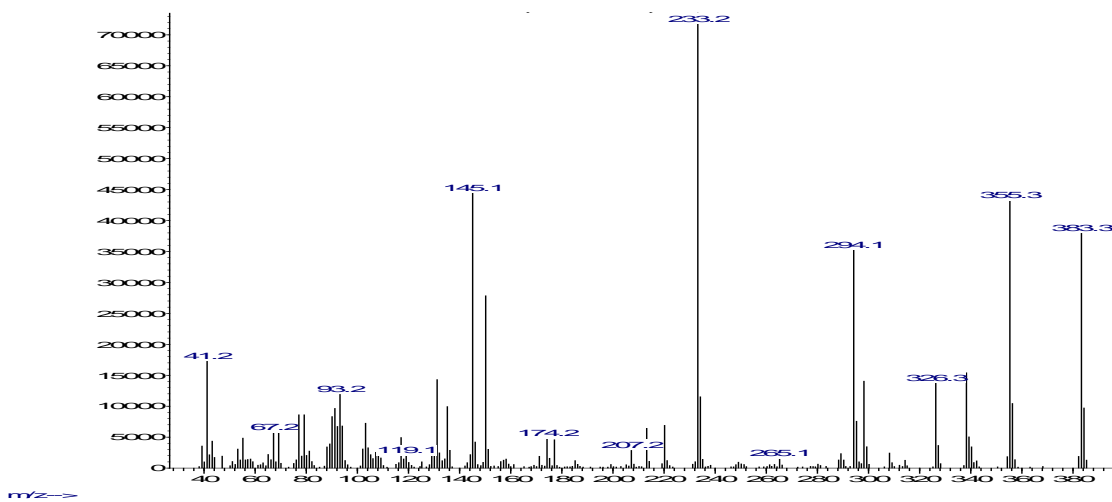
Anexo 6.105 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 6.5 minutos, resultante da análise por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 5F-PB22.

Abundance

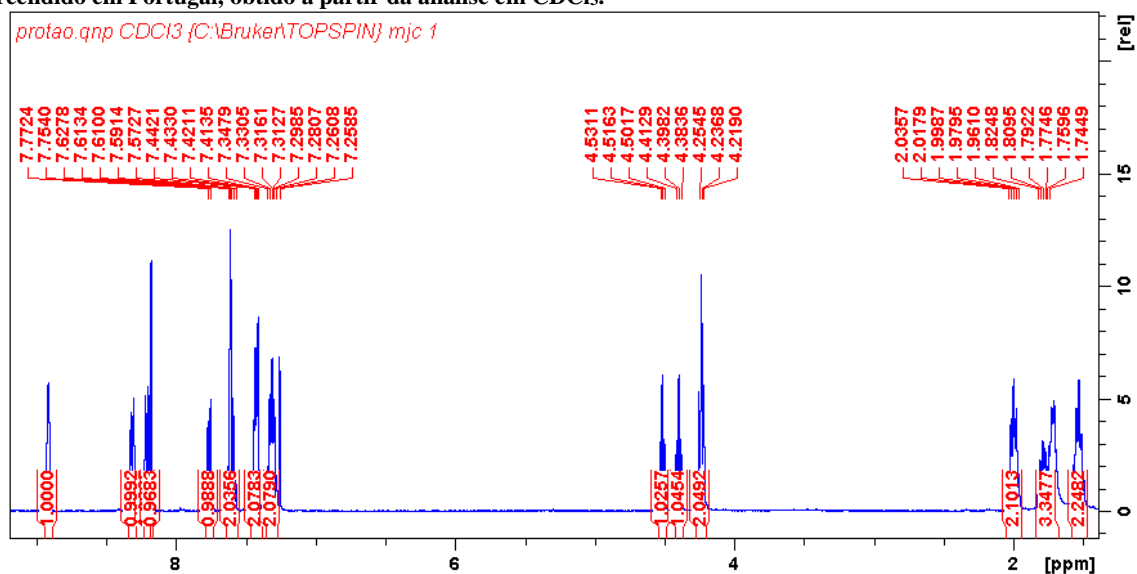


Anexo 6.106 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 29.8 minutos, resultante da análise por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 5F-AKB48.

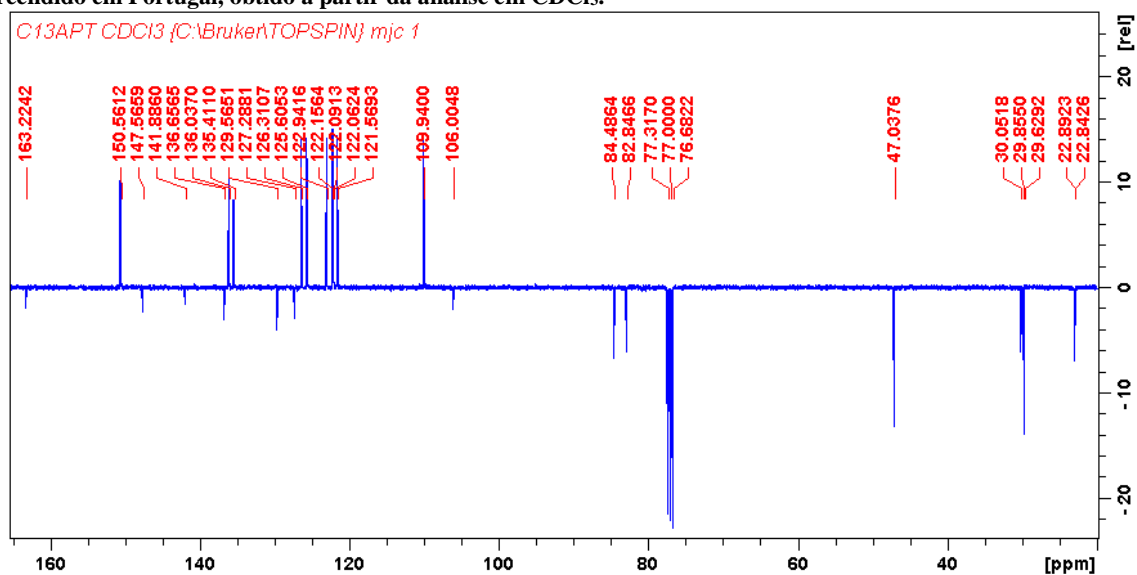
Abundance



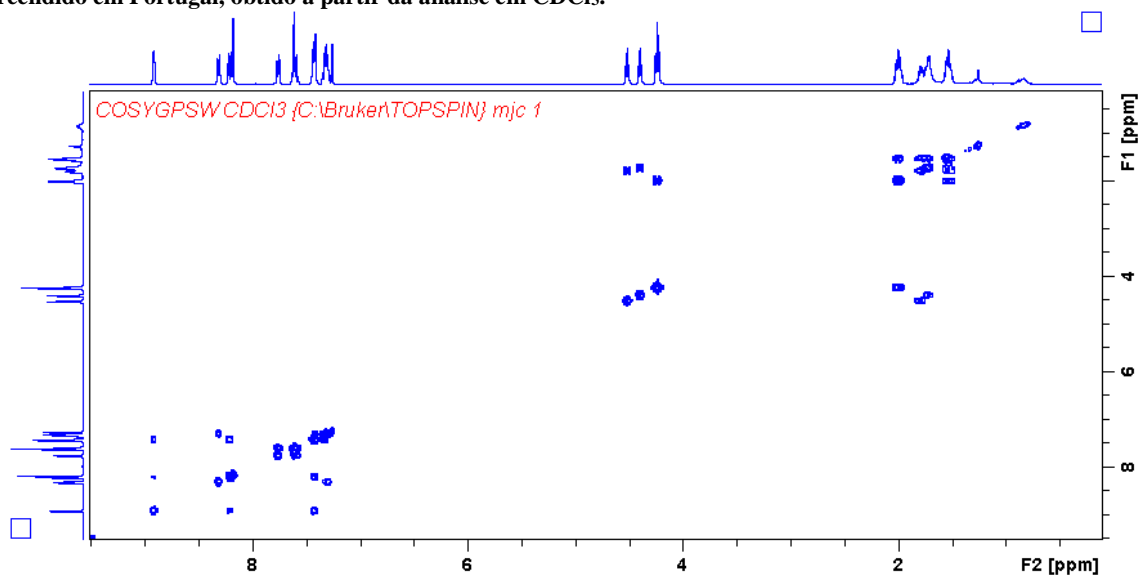
Anexo 6.107 - Espectro de RMN ^1H do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl_3 .



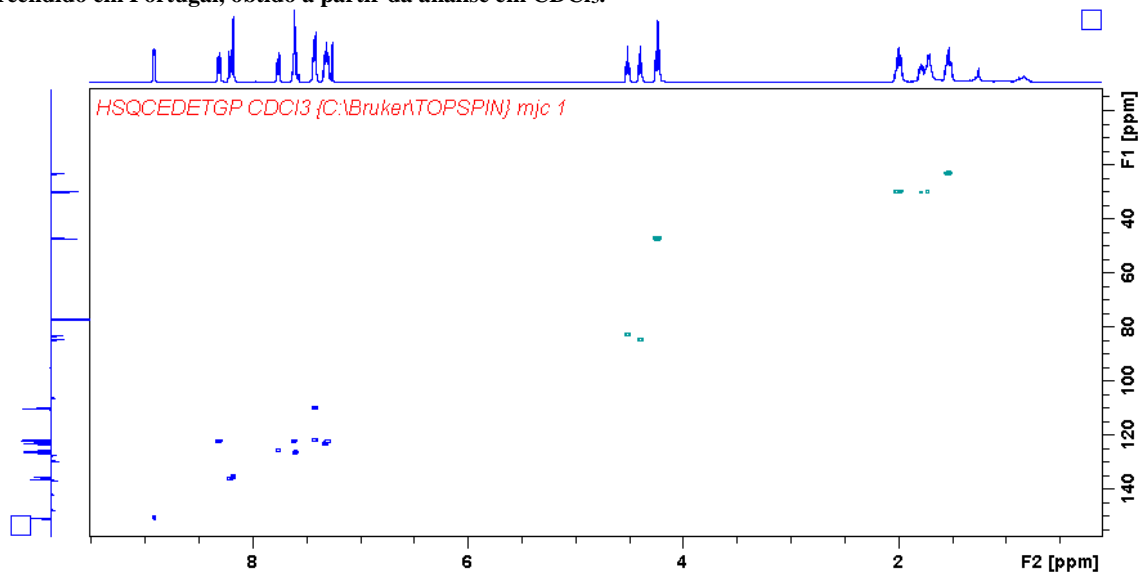
Anexo 6.108 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl_3 .



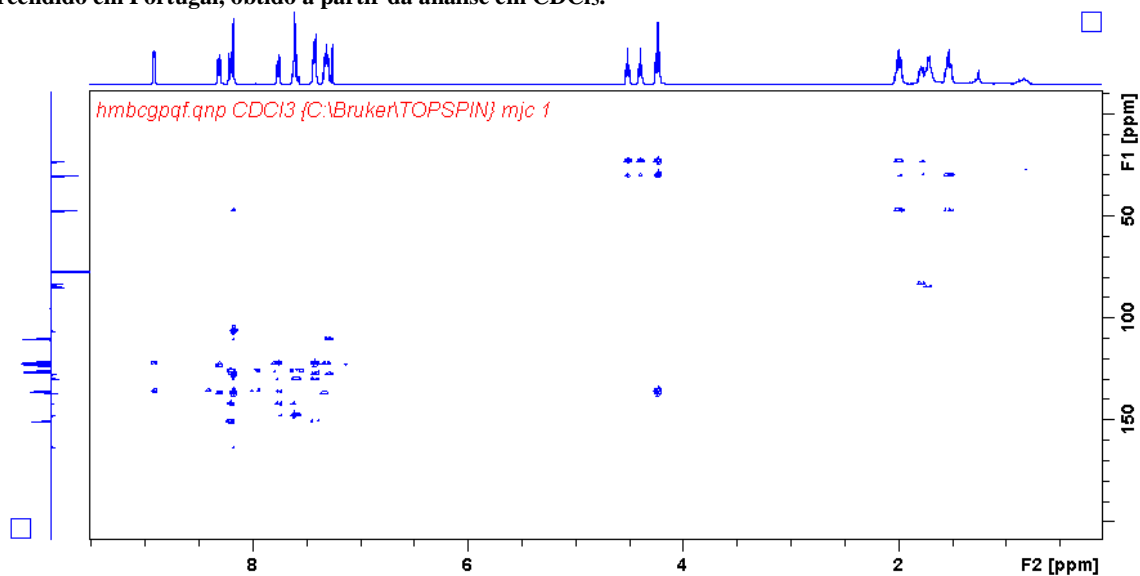
Anexo 6.109 - Espectro de COSY do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl_3 .



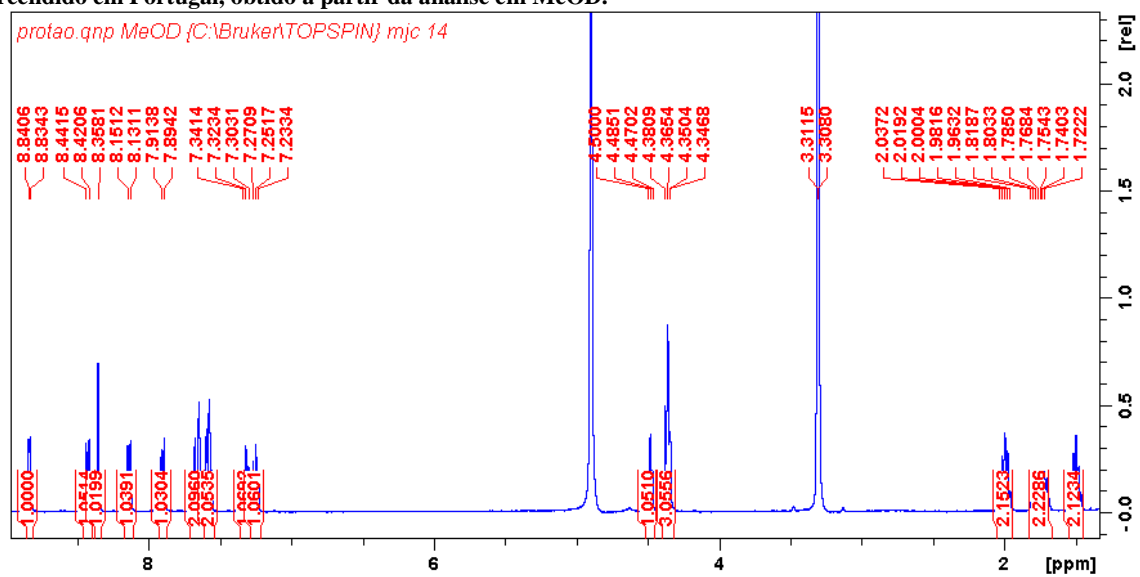
Anexo 6.110 - Espectro de HSQC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl_3 .



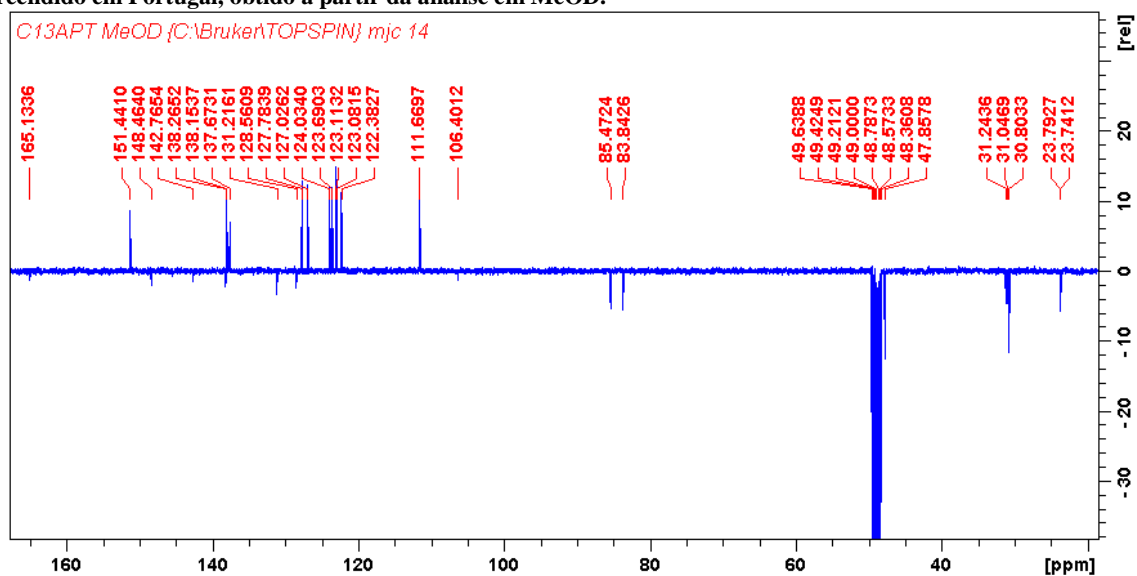
Anexo 6.111 - Espectro de HMBC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl₃.



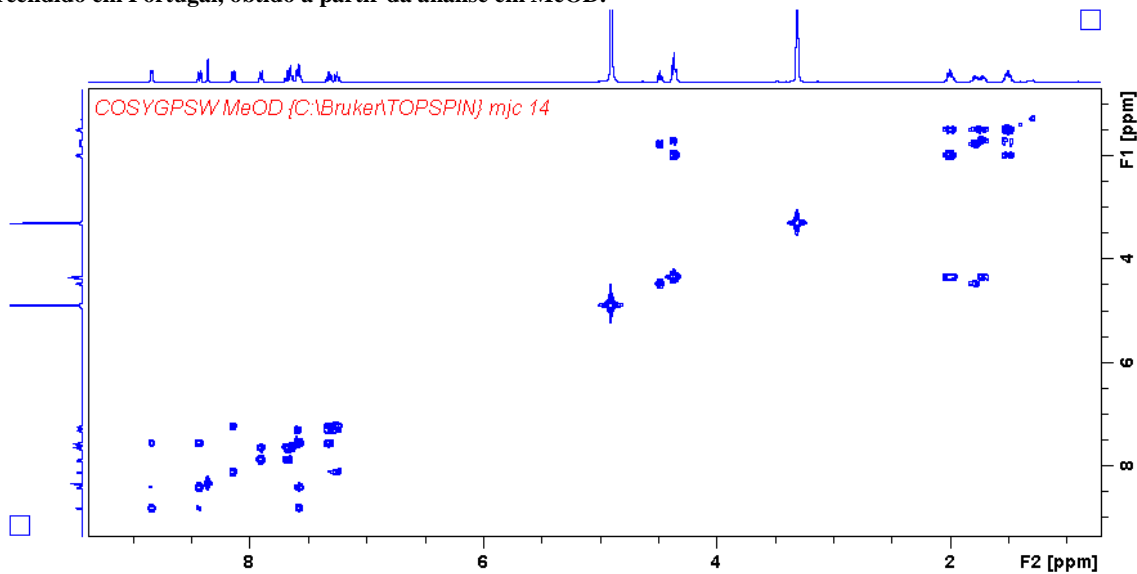
Anexo 6.112 - Espectro de RMN ¹H do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



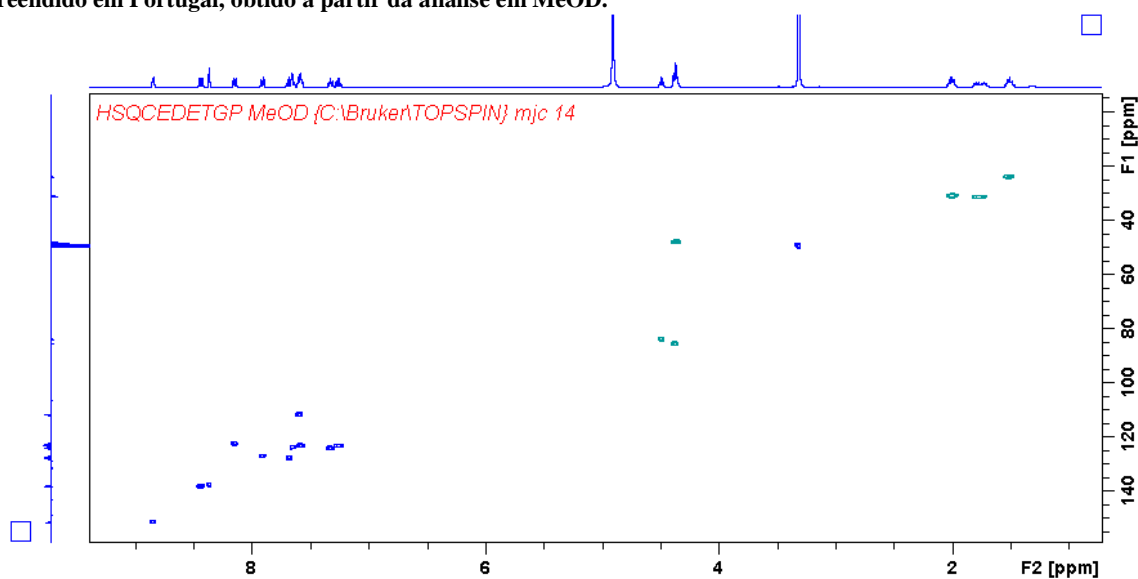
Anexo 6.113 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



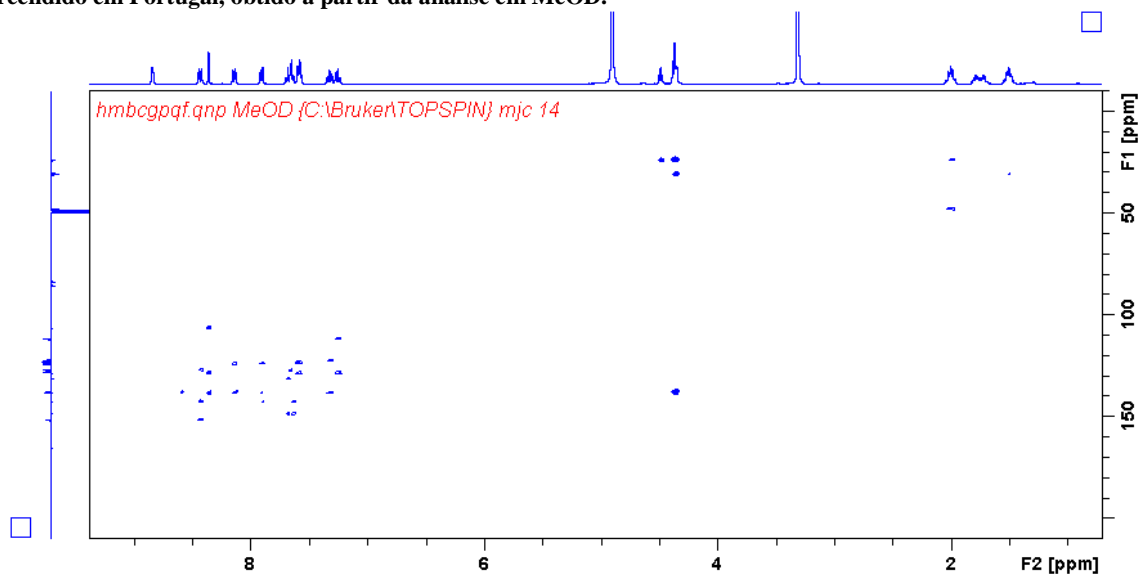
Anexo 6.114 - Espectro de COSY do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



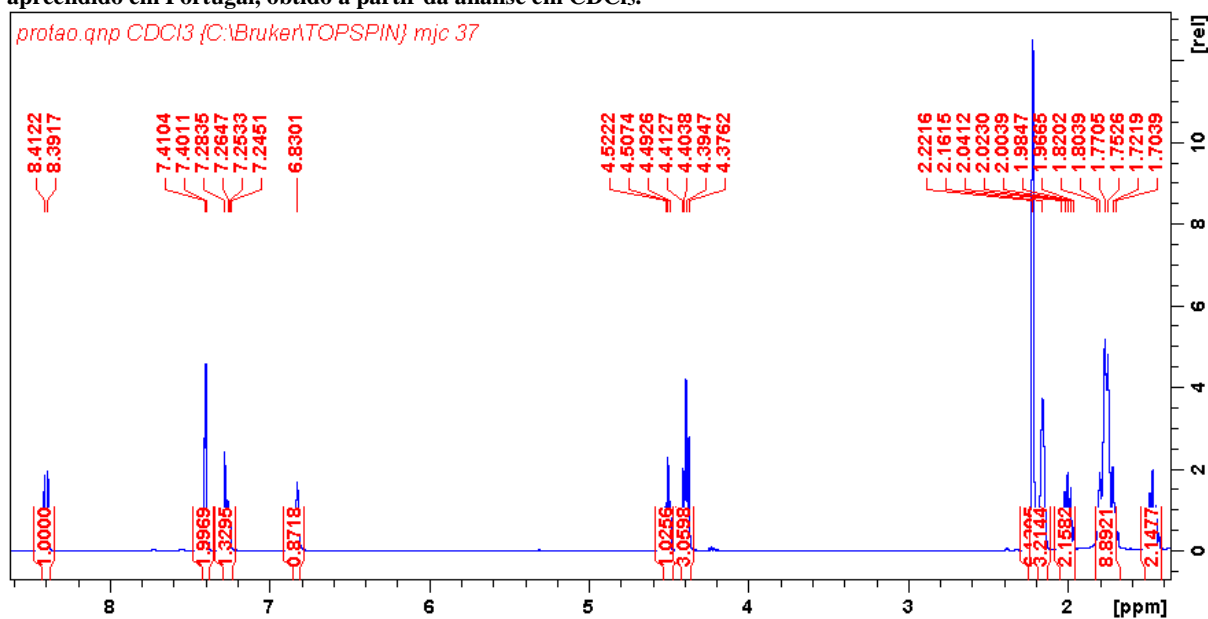
Anexo 6.115 - Espectro de HSQC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



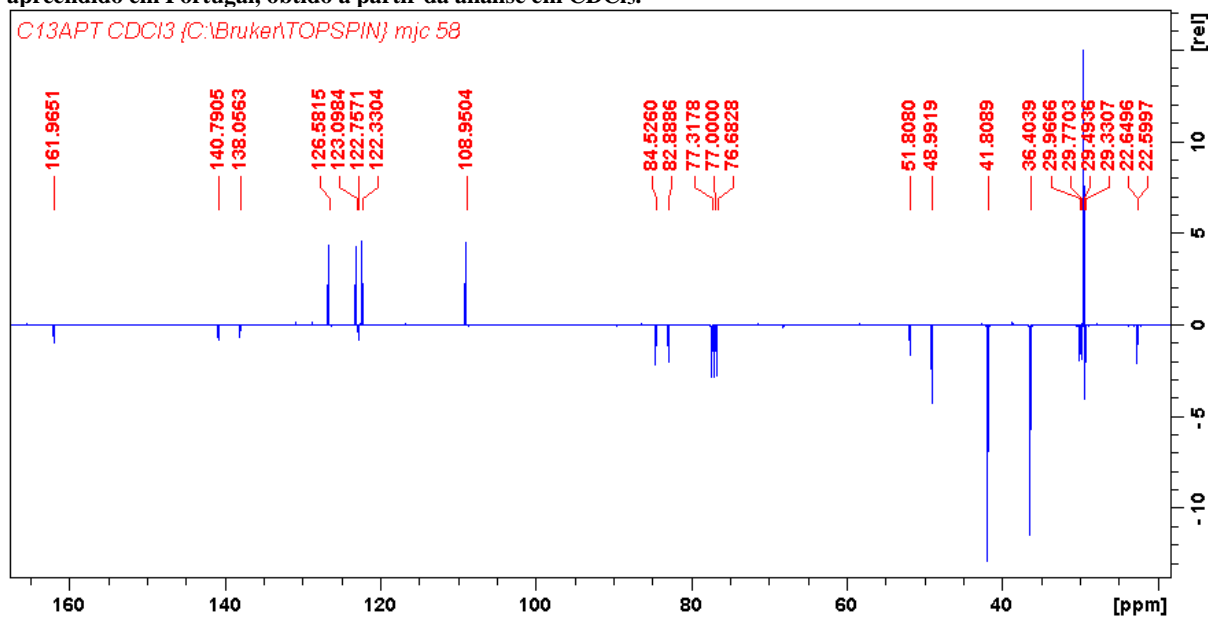
Anexo 6.116 - Espectro de HMBC do composto 5F-PB22, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



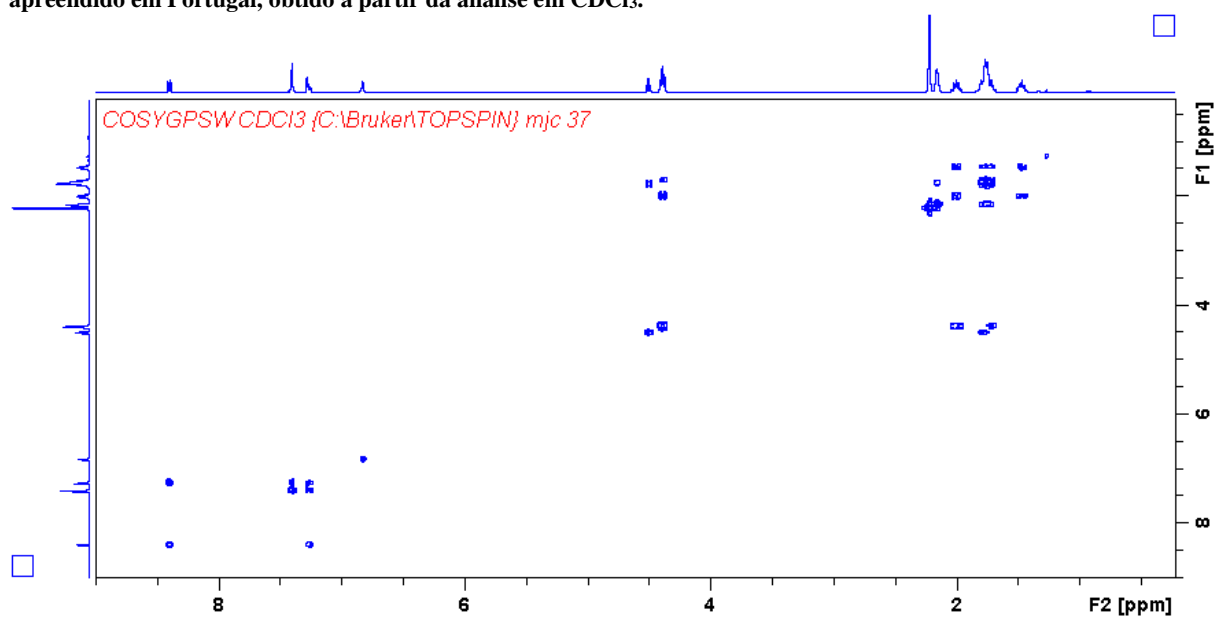
Anexo 6.117 - Espectro de RMN ^1H do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl_3 .



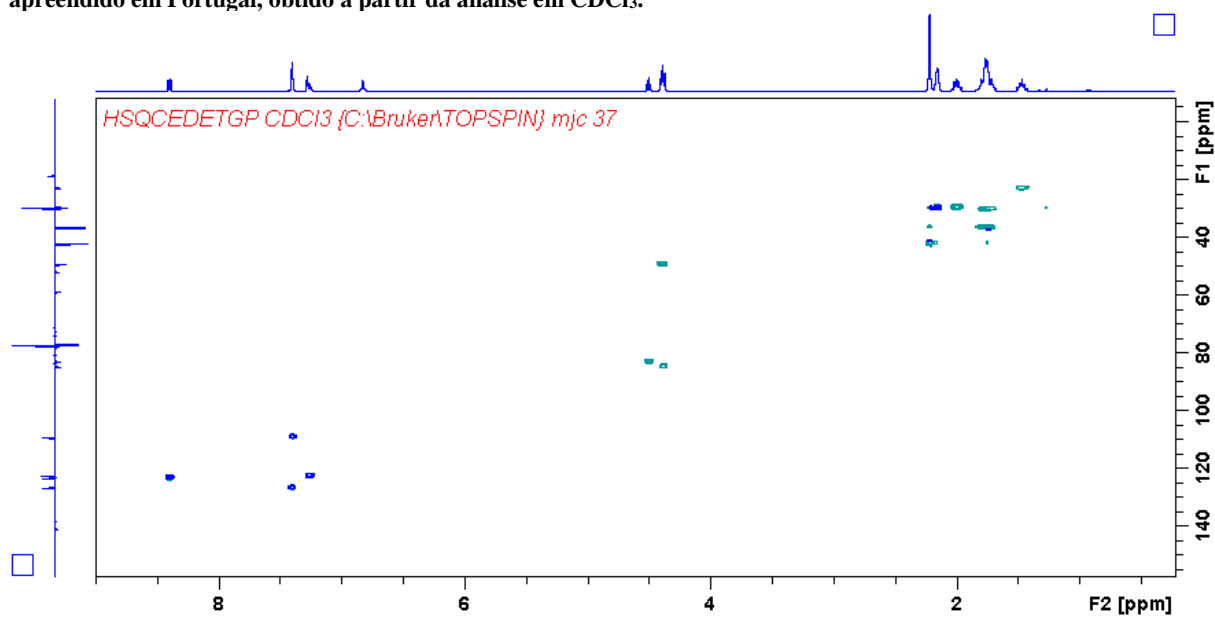
Anexo 6.118 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl_3 .



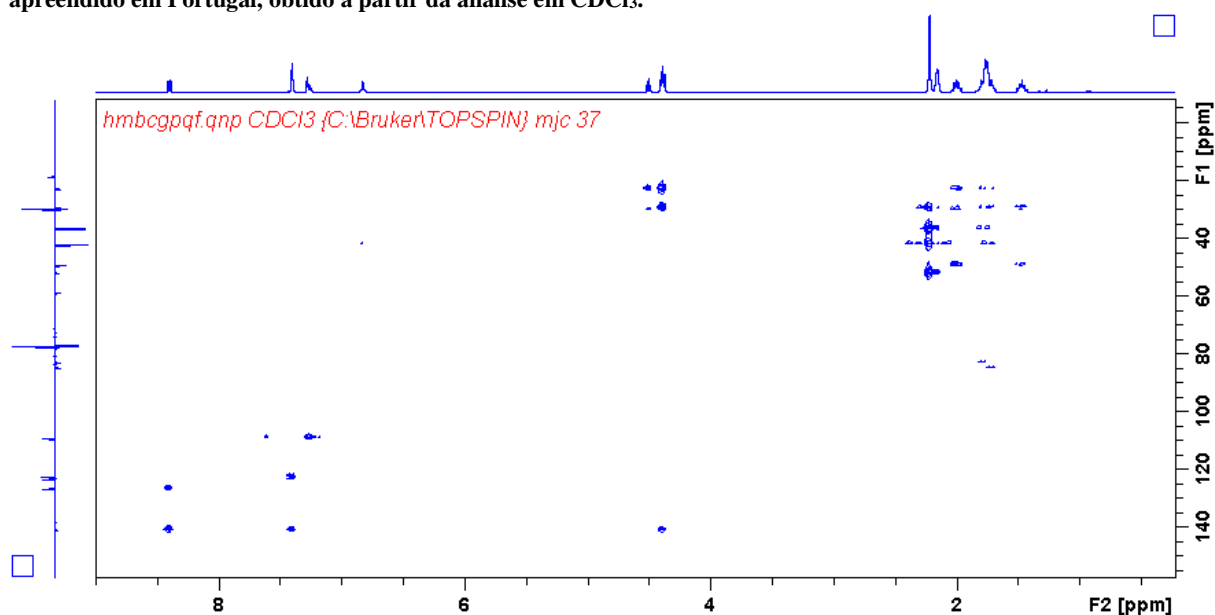
Anexo 6.119 - Espectro de COSY do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl₃.



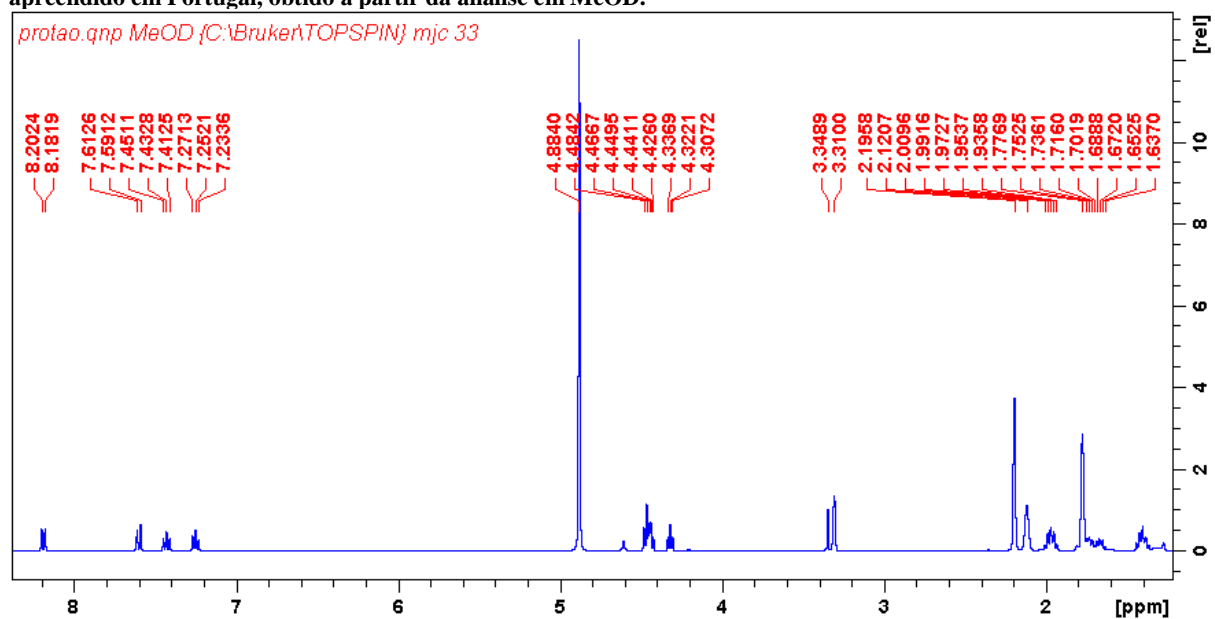
Anexo 6.120 - Espectro de HSQC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl₃.



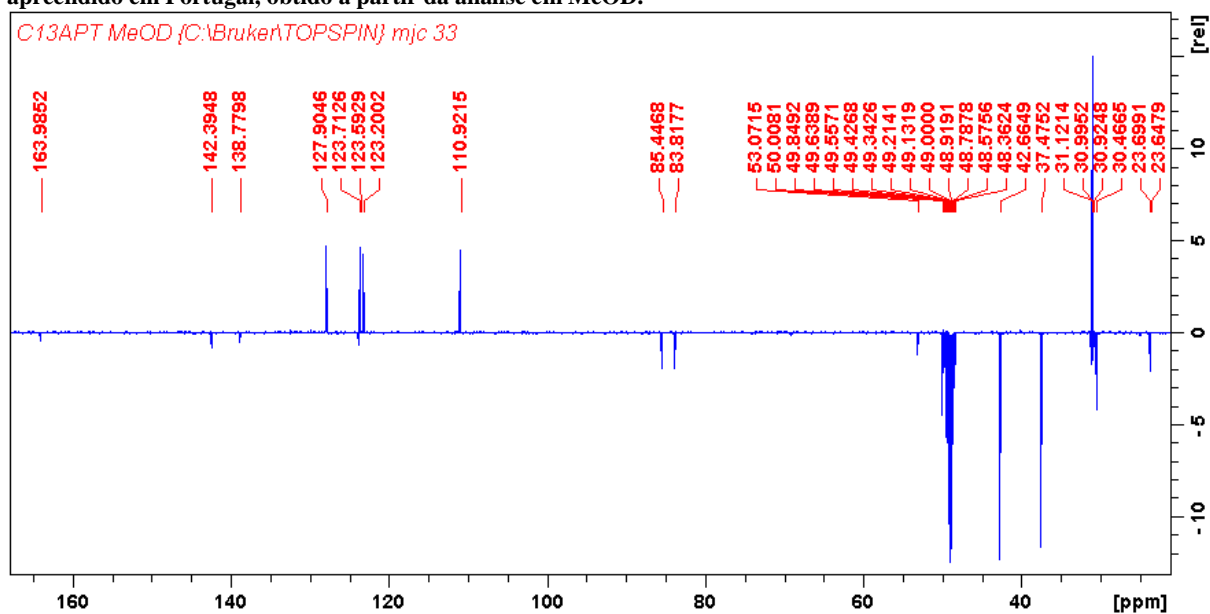
Anexo 6.121 - Espectro de HMBC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em CDCl₃.



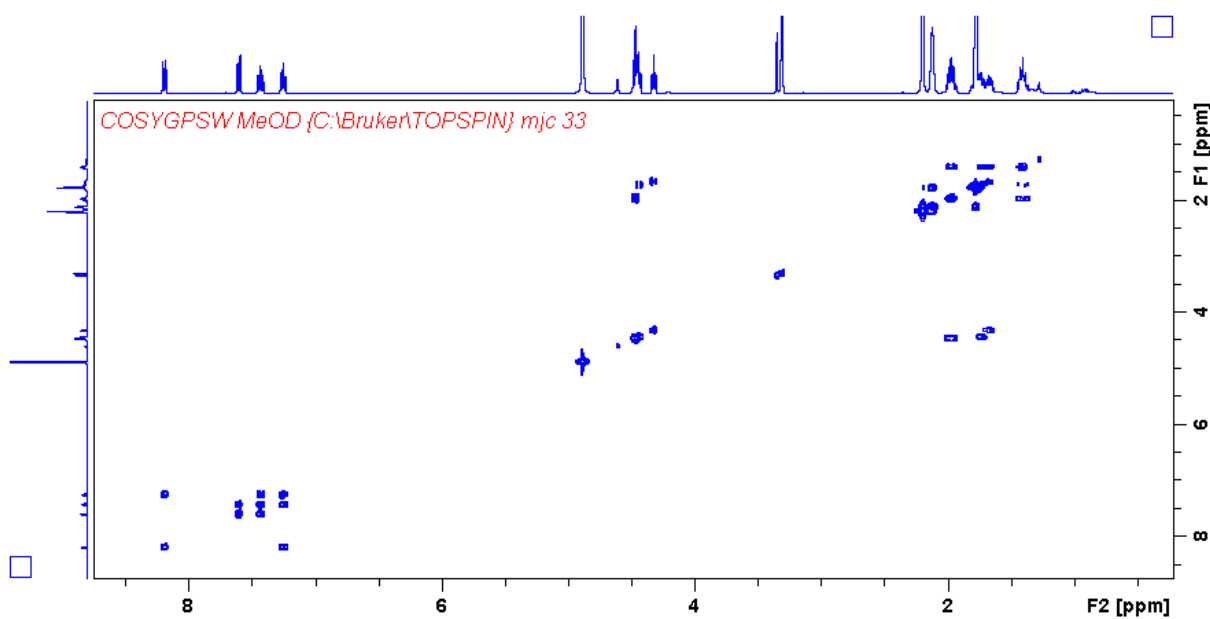
Anexo 6.122 - Espectro de RMN ¹H do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



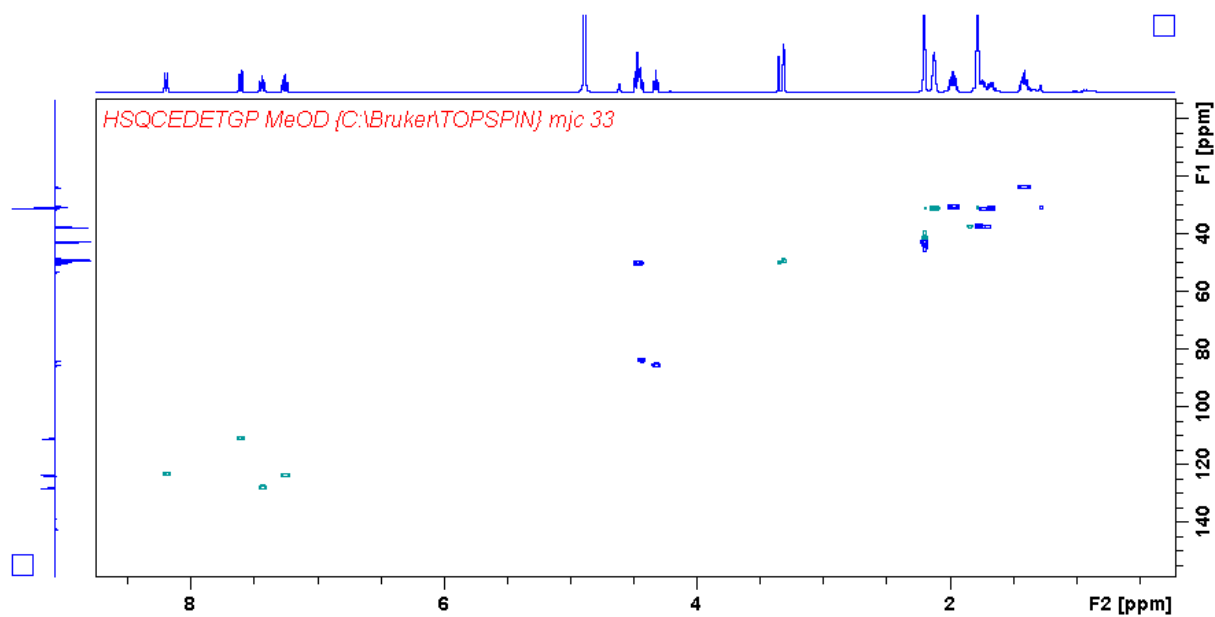
Anexo 6.123 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



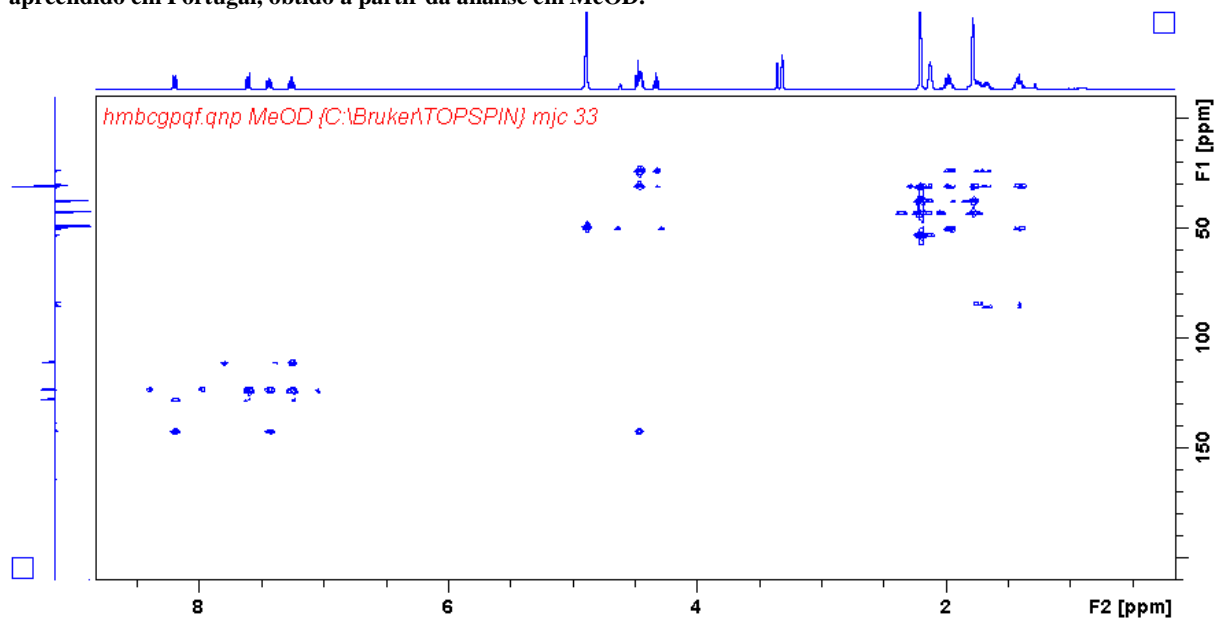
Anexo 6.124 - Espectro de COSY do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



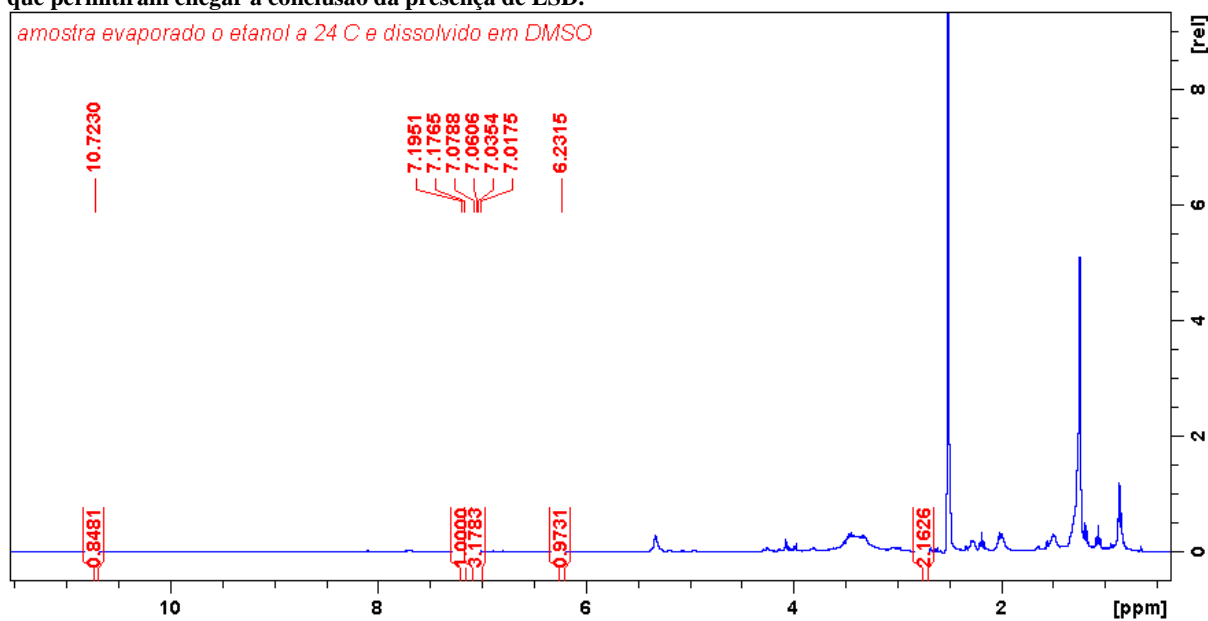
Anexo 6.125 - Espectro de HSQC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



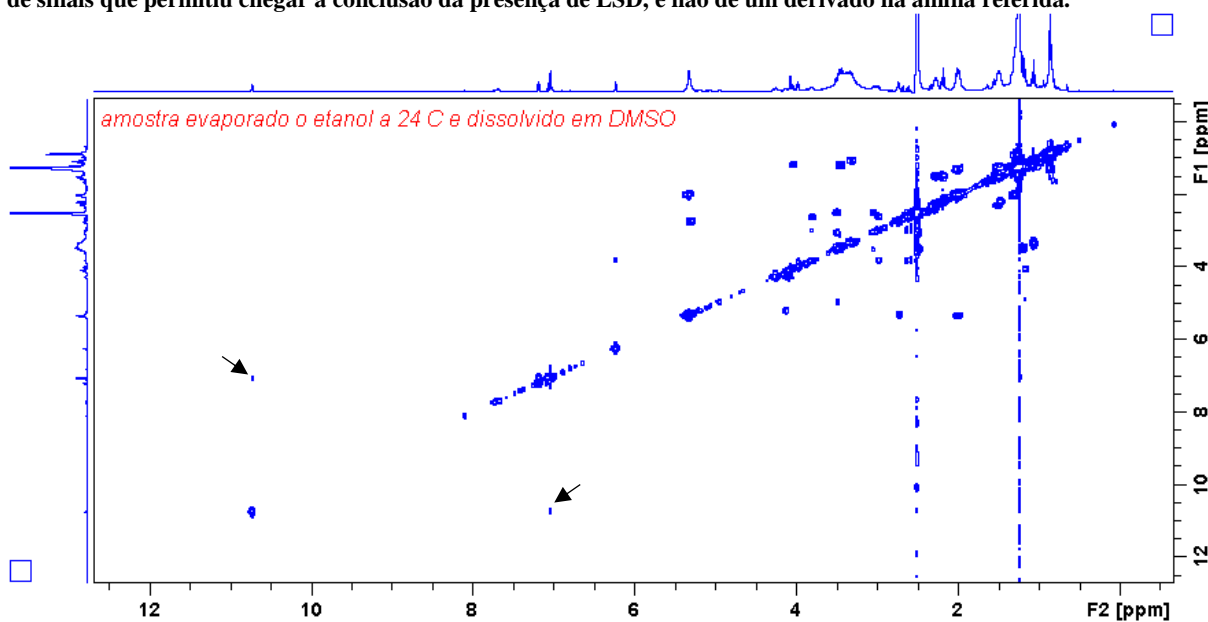
Anexo 6.126 - Espectro de HMBC do composto 5F-AKB48, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



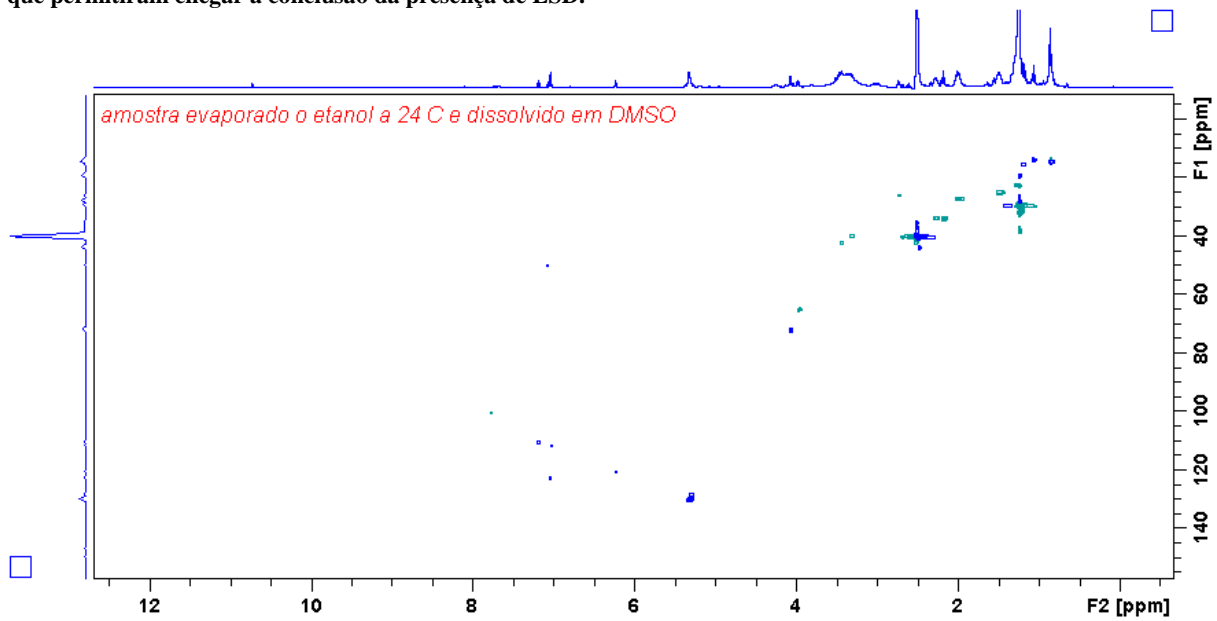
Anexo 6.127 - Espectro de RMN ^1H da amostra resultante de material apreendido em Portugal contendo LSD em mistura com outras substâncias não identificadas, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 . Encontram-se identificados os sinais que permitiram chegar à conclusão da presença de LSD.



Anexo 6.128 - Espectro de COSY da amostra resultante de material apreendido em Portugal contendo LSD em mistura com outras substâncias não identificadas, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 . Encontra-se identificada a correlação de sinais que permitiu chegar à conclusão da presença de LSD, e não de um derivado na amina referida.

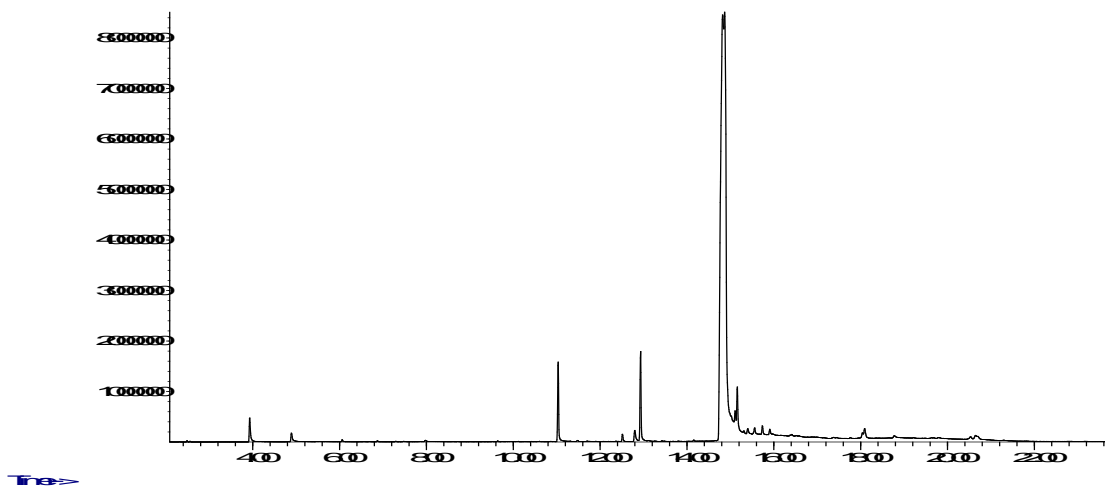


Anexo 6.129 - Espectro de HSQC da amostra resultante de material apreendido em Portugal contendo LSD em mistura com outras substâncias não identificadas, obtido a partir da análise em DMSO-d₆. Encontram-se identificados os sinais que permitiram chegar à conclusão da presença de LSD.

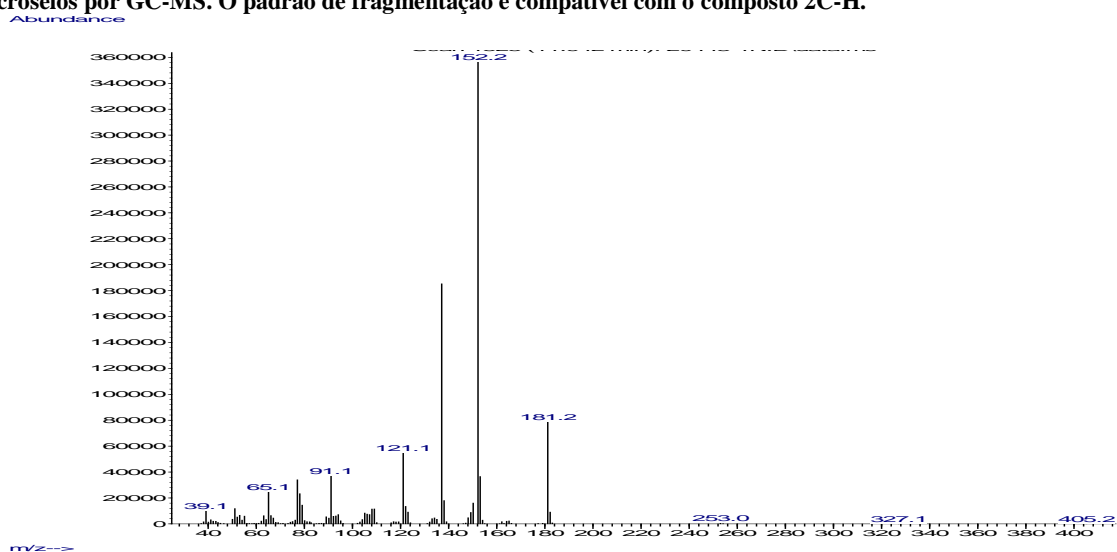


Anexo 6.130 - Cromatograma do exame de microselos, correspondente à amostra que revelou conter um composto maioritário, 25I-NBOH, por GC-MS.

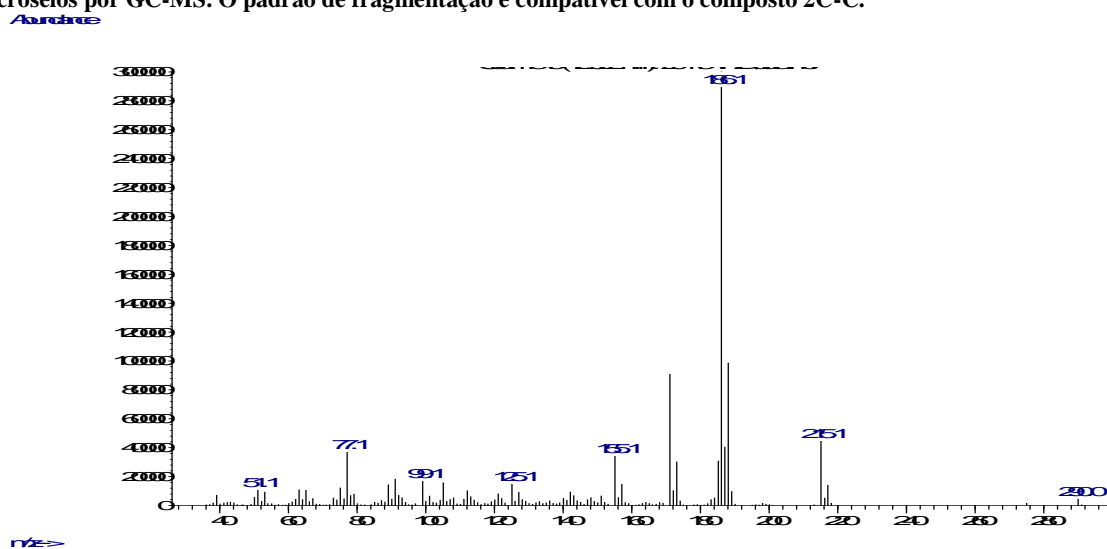
~~Anexo~~



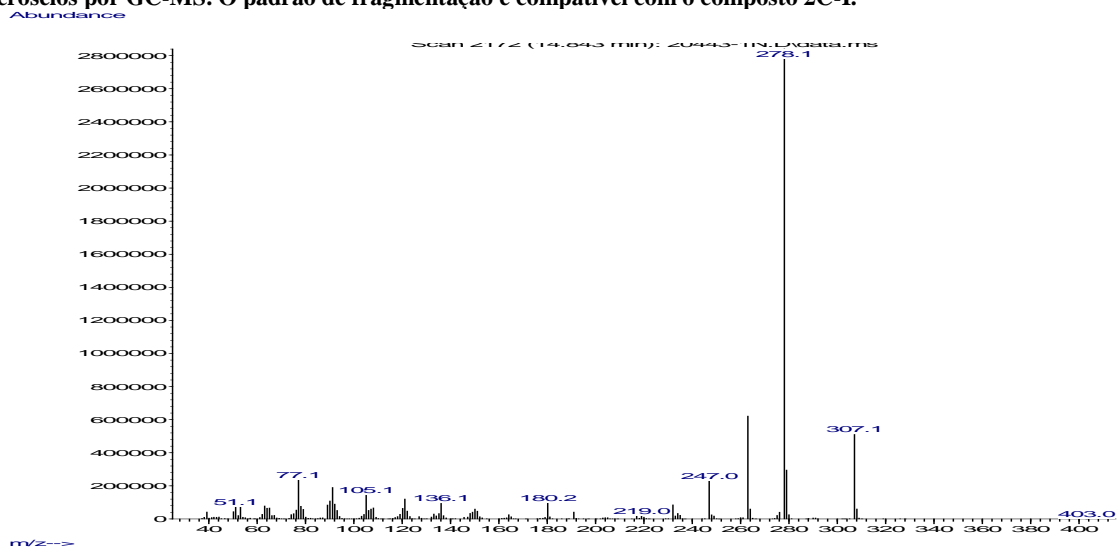
Anexo 6.131 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11.0 minutos, resultante da análise à extração de microselos por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2C-H.



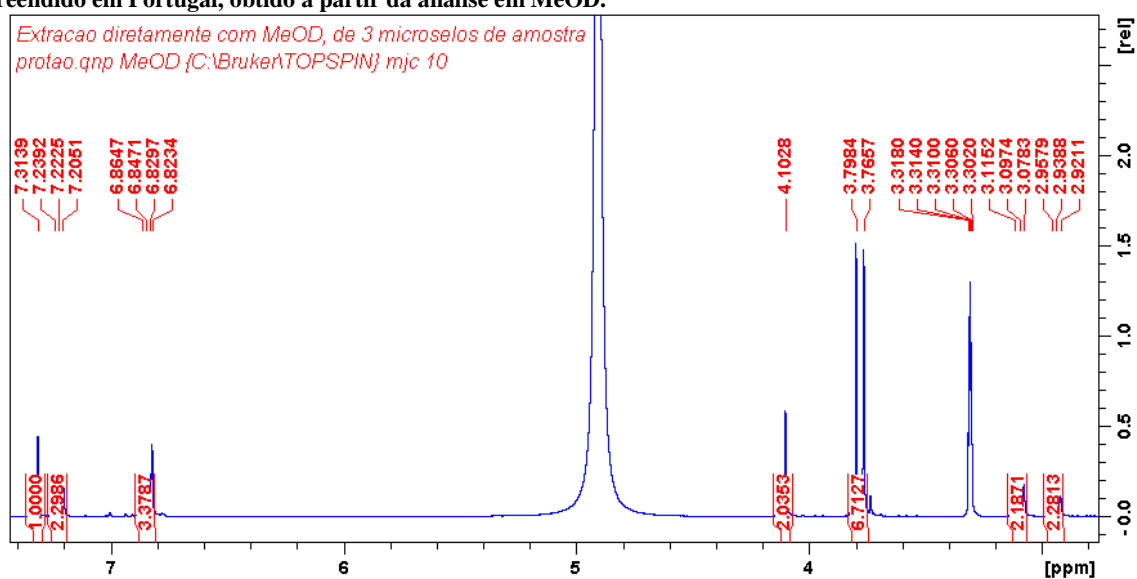
Anexo 6.132 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 12.9 minutos, resultante da análise à extração de microselos por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2C-C.



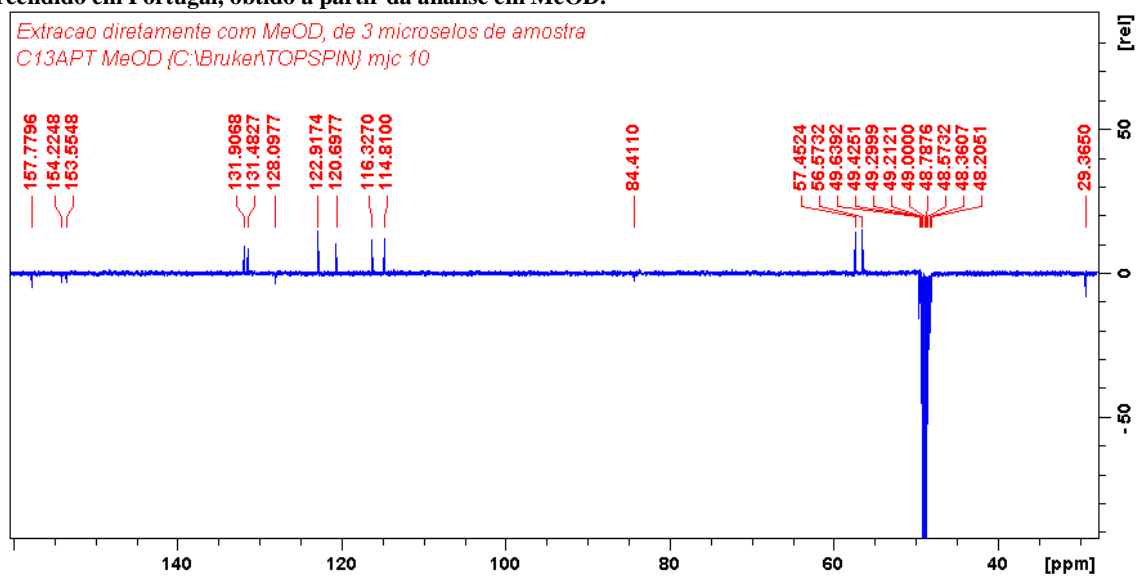
Anexo 6.133 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.8 minutos, resultante da análise à extração de microselos por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2C-I.



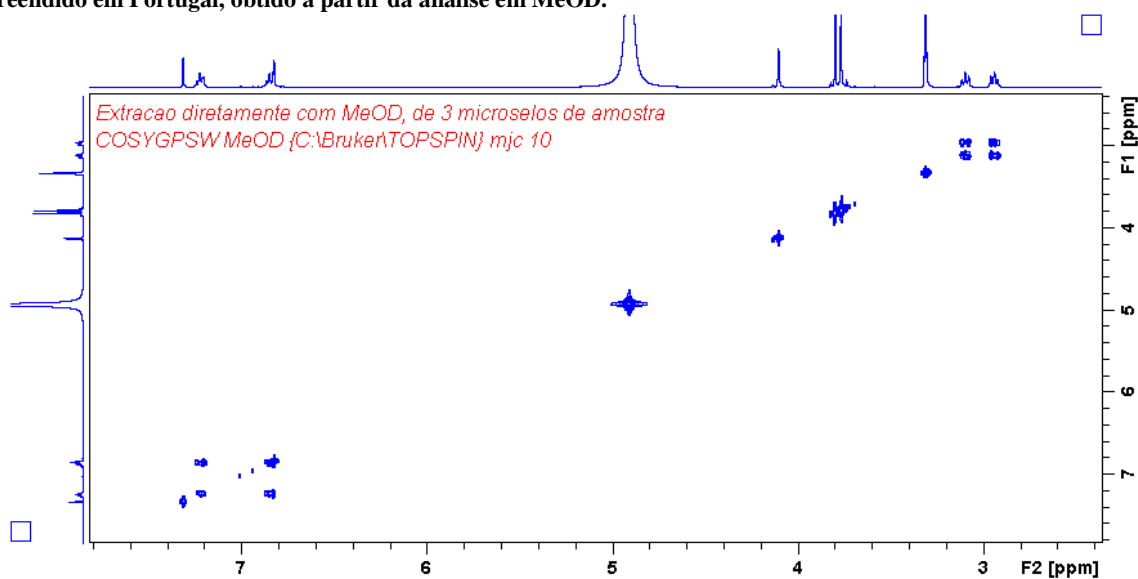
Anexo 6.134 - Espectro de RMN ^1H do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



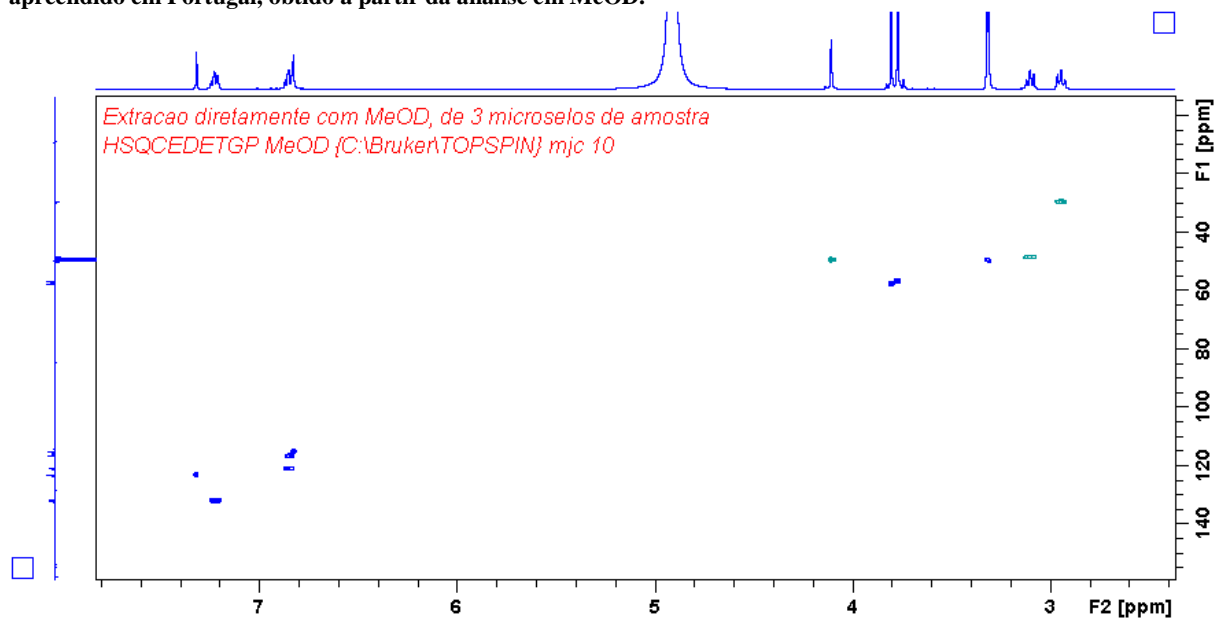
Anexo 6.135 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



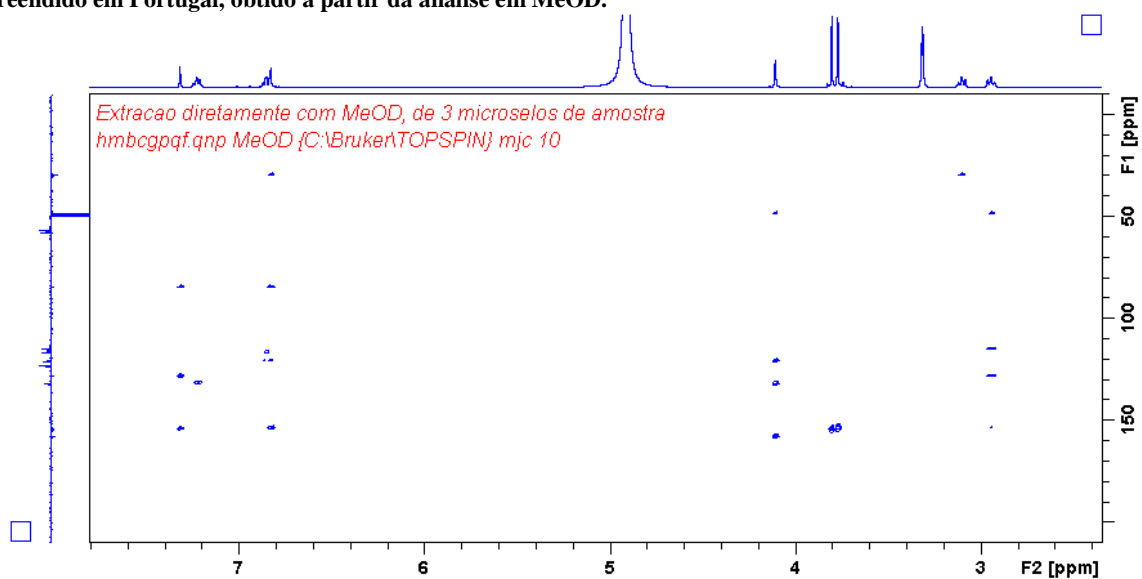
Anexo 6.136 - Espectro de COSY do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



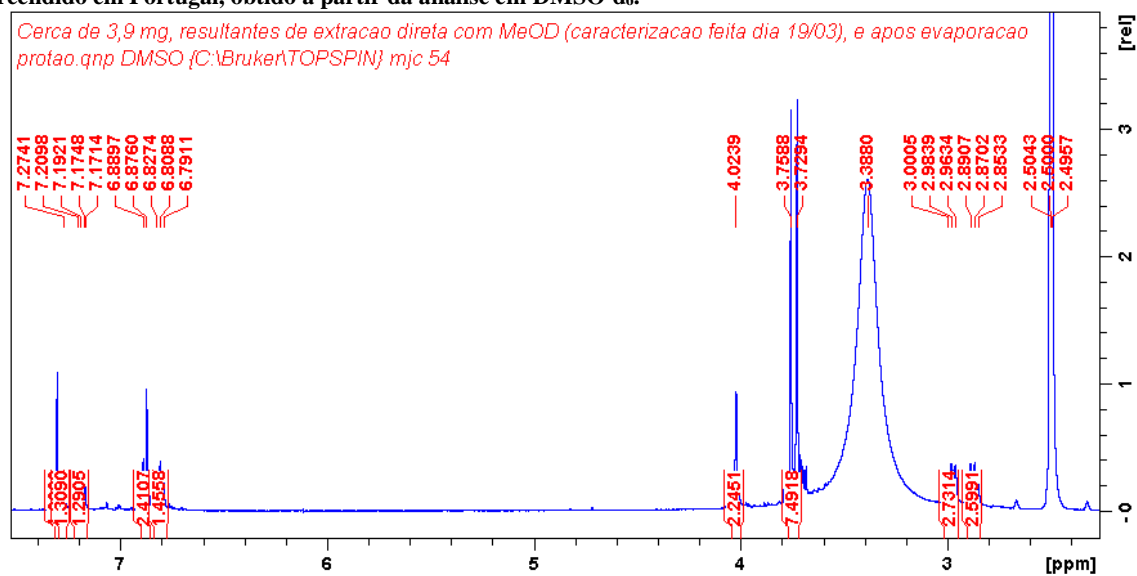
Anexo 6.137 - Espectro de HSQC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



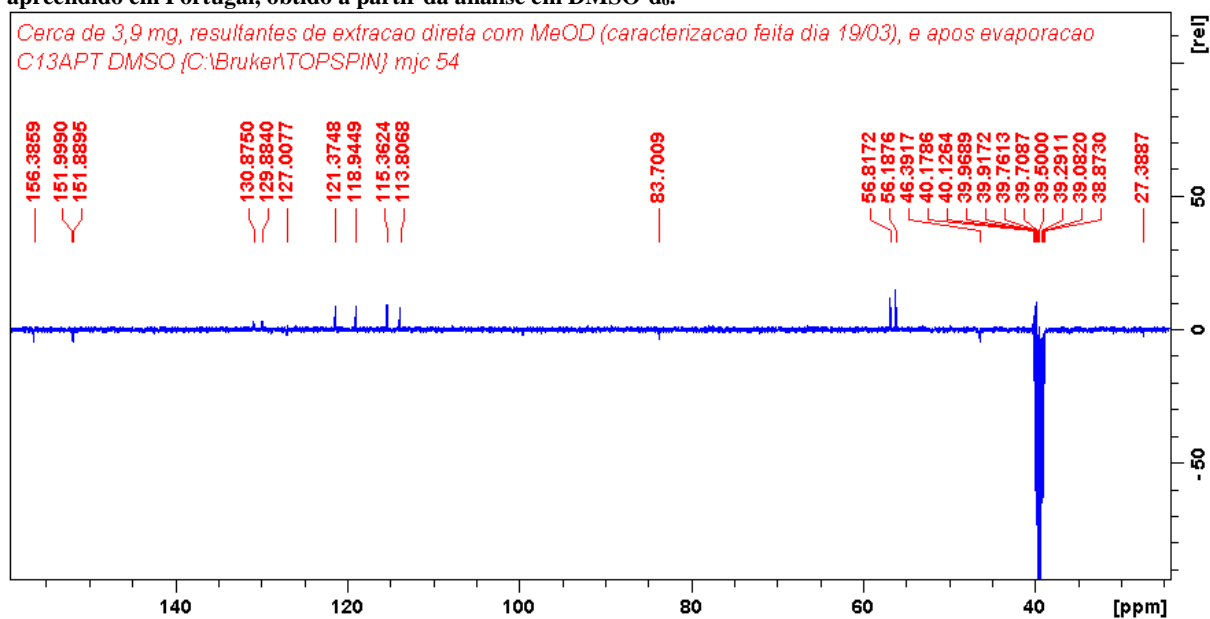
Anexo 6.138 - Espectro de HMBC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em MeOD.



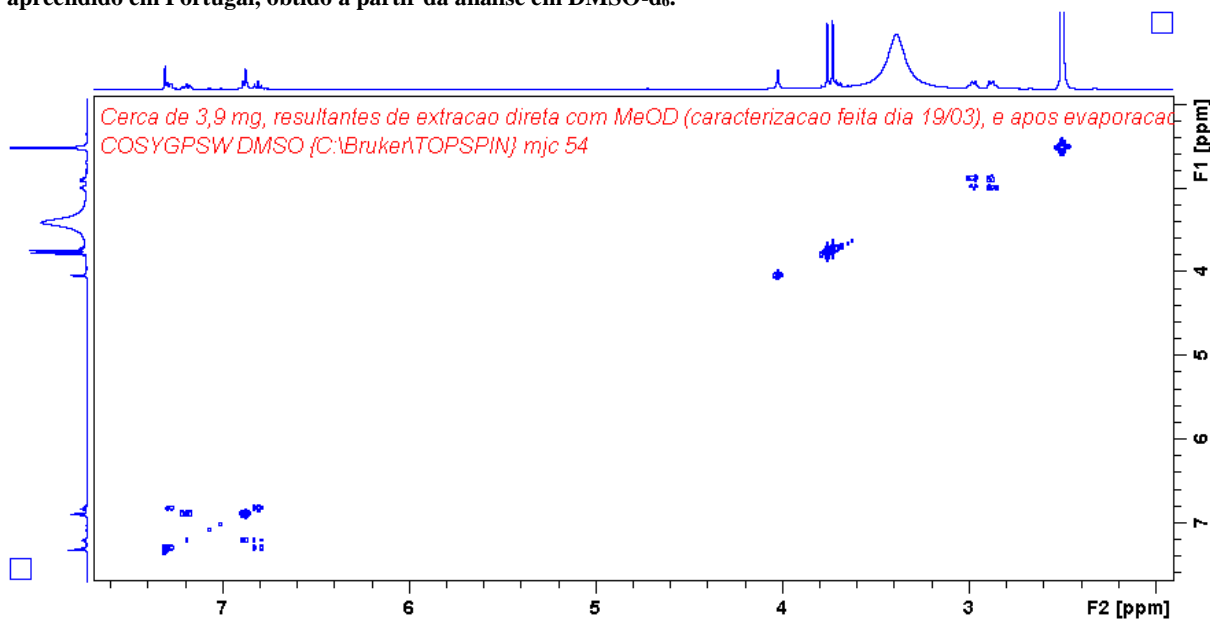
Anexo 6.139 - Espectro de RMN ^1H do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



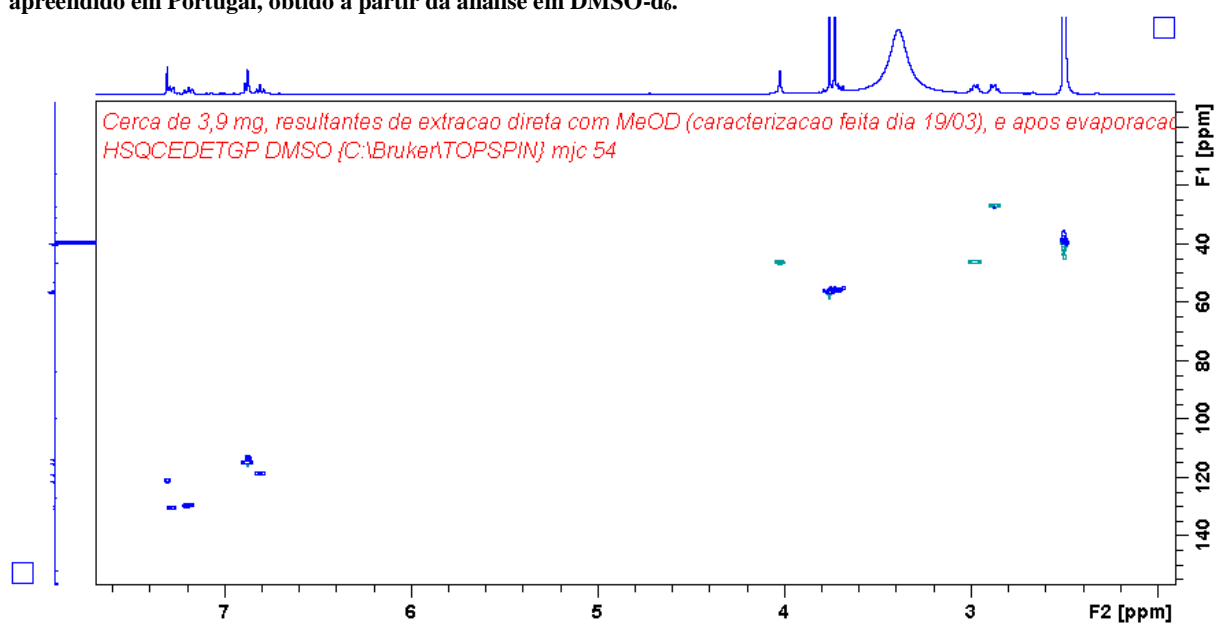
Anexo 6.140 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



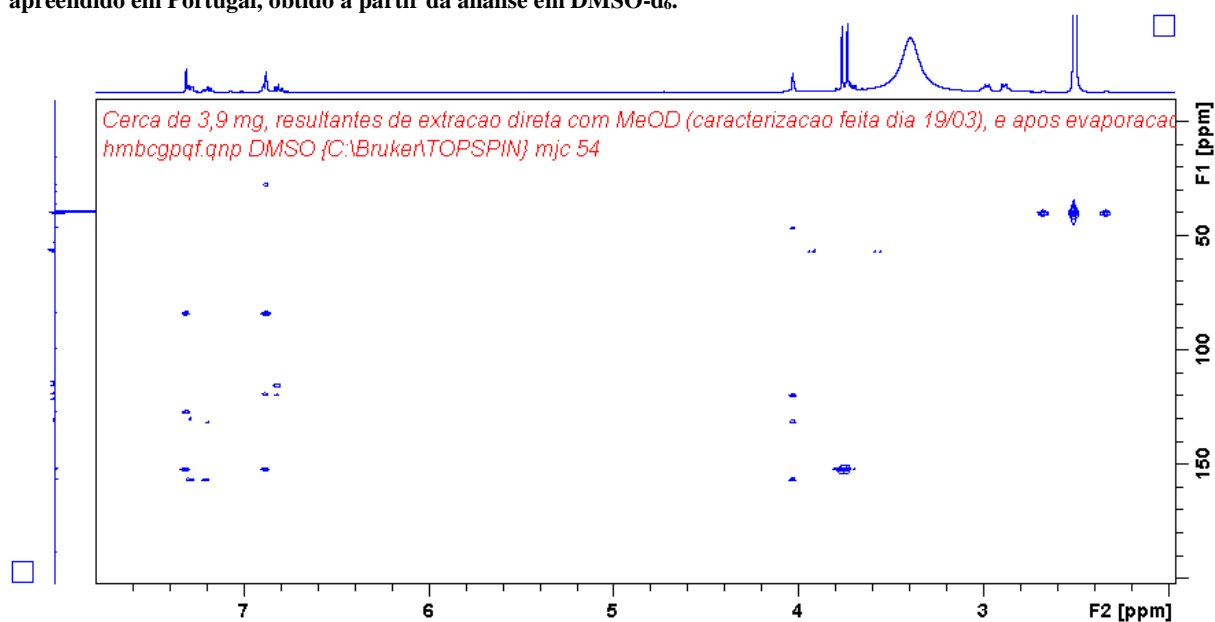
Anexo 6.141 - Espectro de COSY do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



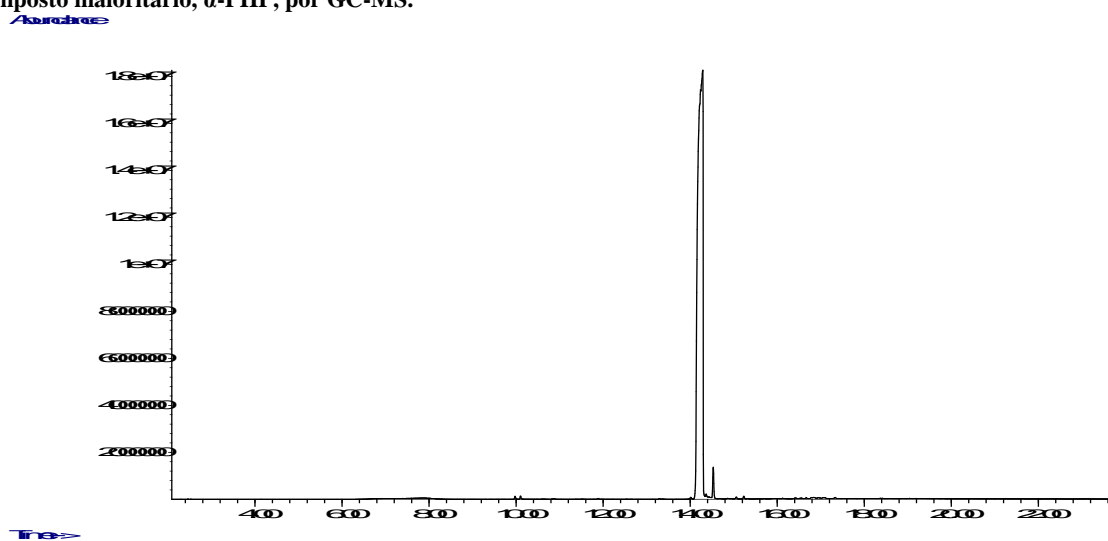
Anexo 6.142 - Espectro de HSQC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d₆.



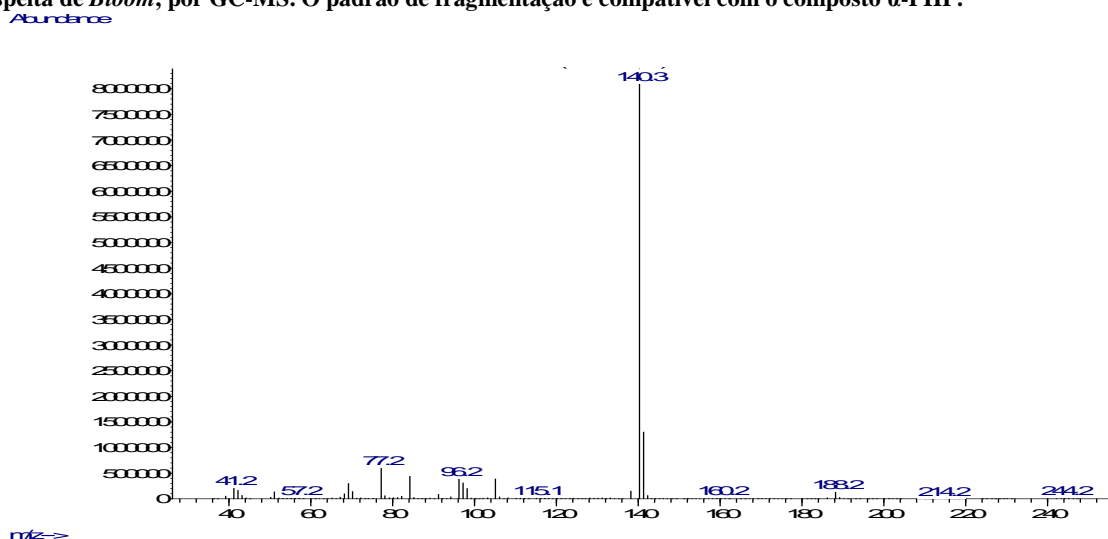
Anexo 6.143 - Espectro de HMBC do composto 25I-NBOH, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO-d₆.



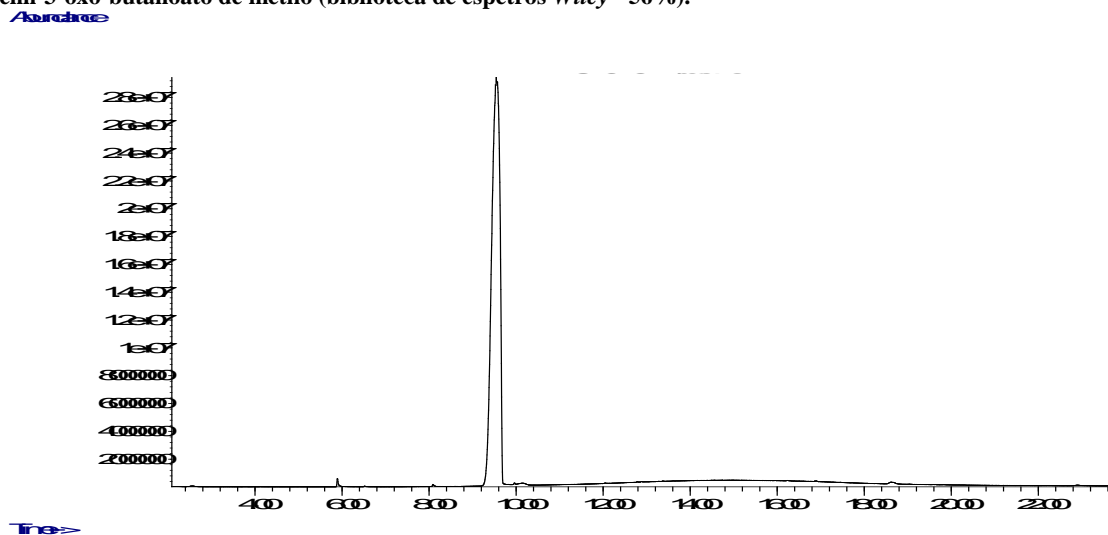
Anexo 6.144 - Cromatograma do exame com suspeita de *Bloom*, correspondente à amostra que revelou conter um composto maioritário, α -PHP, por GC-MS.



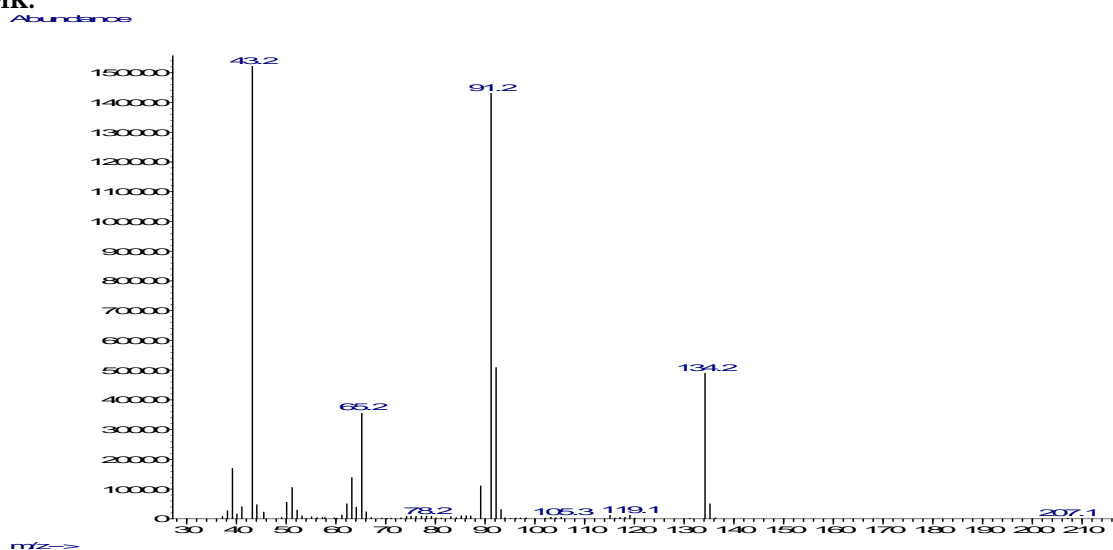
Anexo 6.145 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 14.23 minutos, resultante da análise à amostra suspeita de *Bloom*, por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto α -PHP.



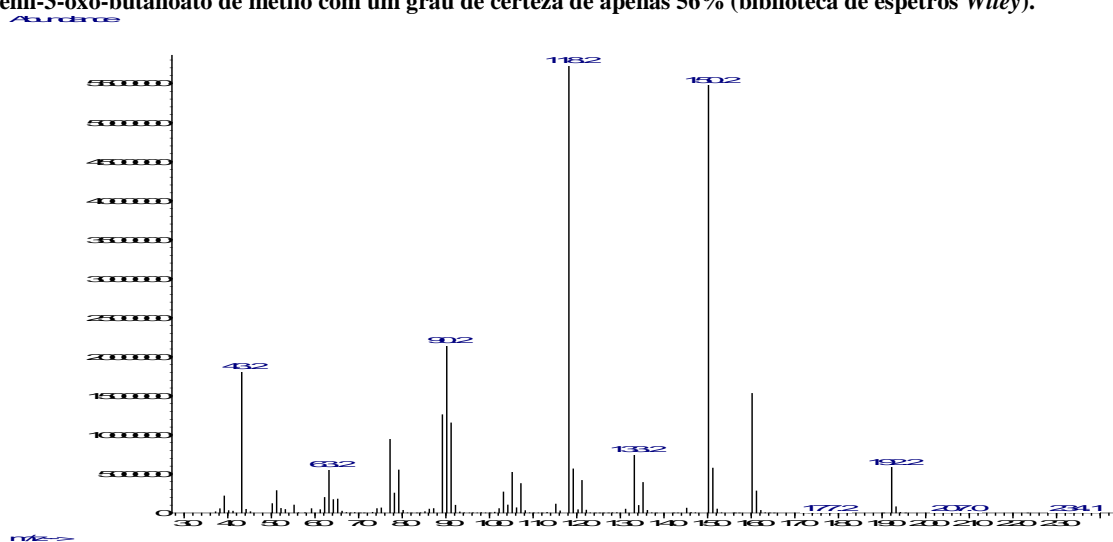
Anexo 6.146 - Cromatograma do exame que dizia conter “Sulfato de Bário”, e que após análise por GC-MS, revelou conter um composto minoritário (R_t 5.9 minutos) cujo padrão de fragmentação seria semelhante ao precursor BMK, e um composto maioritário (R_t 9.5 minutos), cujo padrão de fragmentação seria semelhante ao composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo (biblioteca de espectros Wiley - 56%).



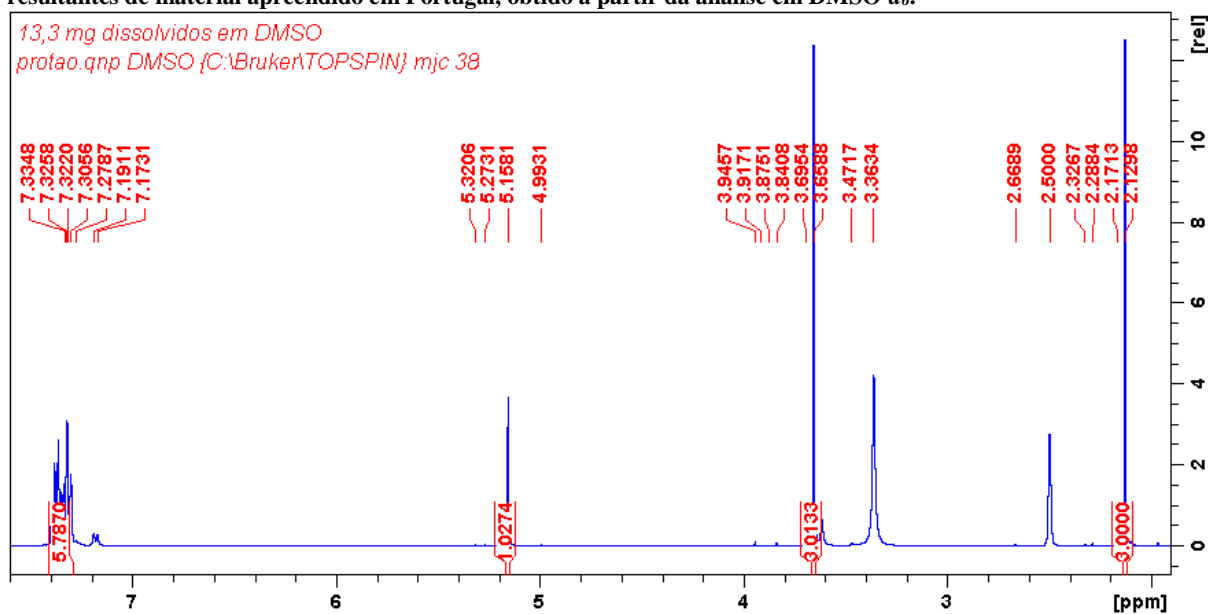
Anexo 6.147 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 5.9 minutos, resultante da análise à amostra suspeita que dizia conter "Sulfato de Bário", por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o precursor BMK.



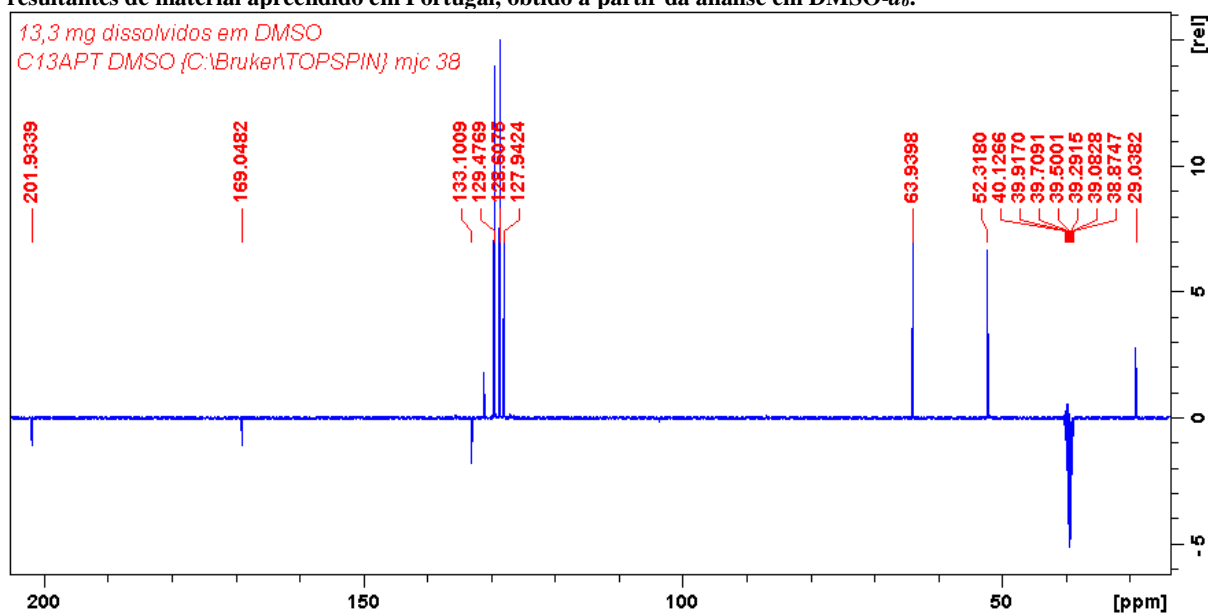
Anexo 6.148 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 9.5 minutos, resultante da análise à amostra suspeita que dizia conter "Sulfato de Bário", por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo com um grau de certeza de apenas 56% (biblioteca de espectros Wiley).



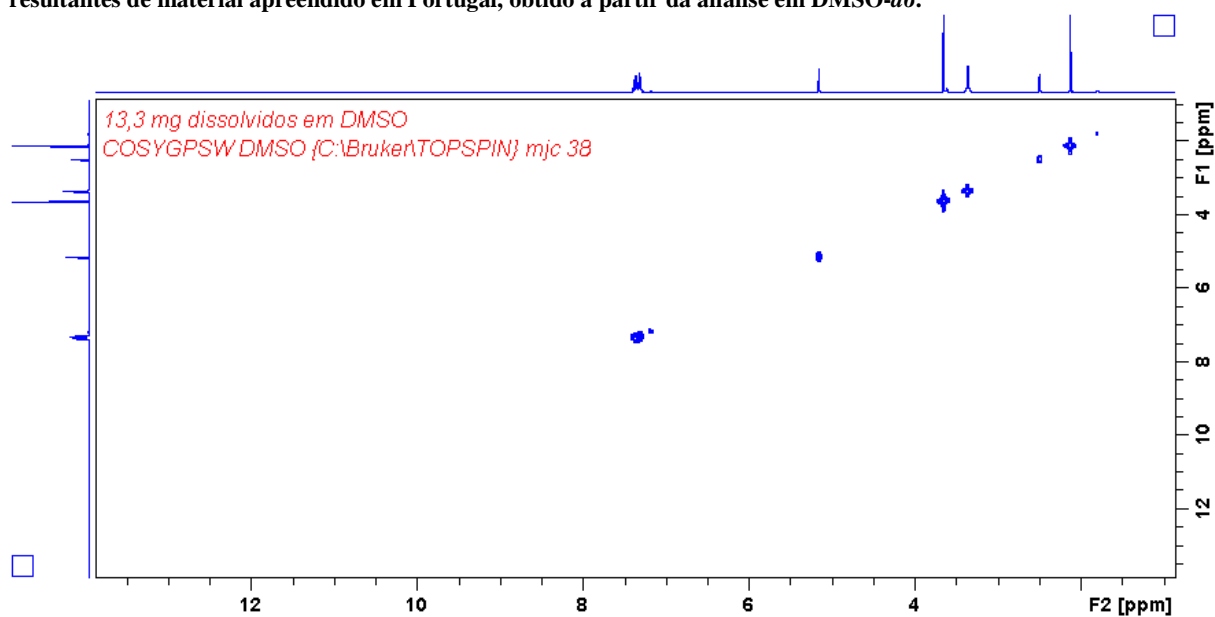
Anexo 6.149 - Espectro de RMN ^1H do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em $\text{DMSO-}d_6$.



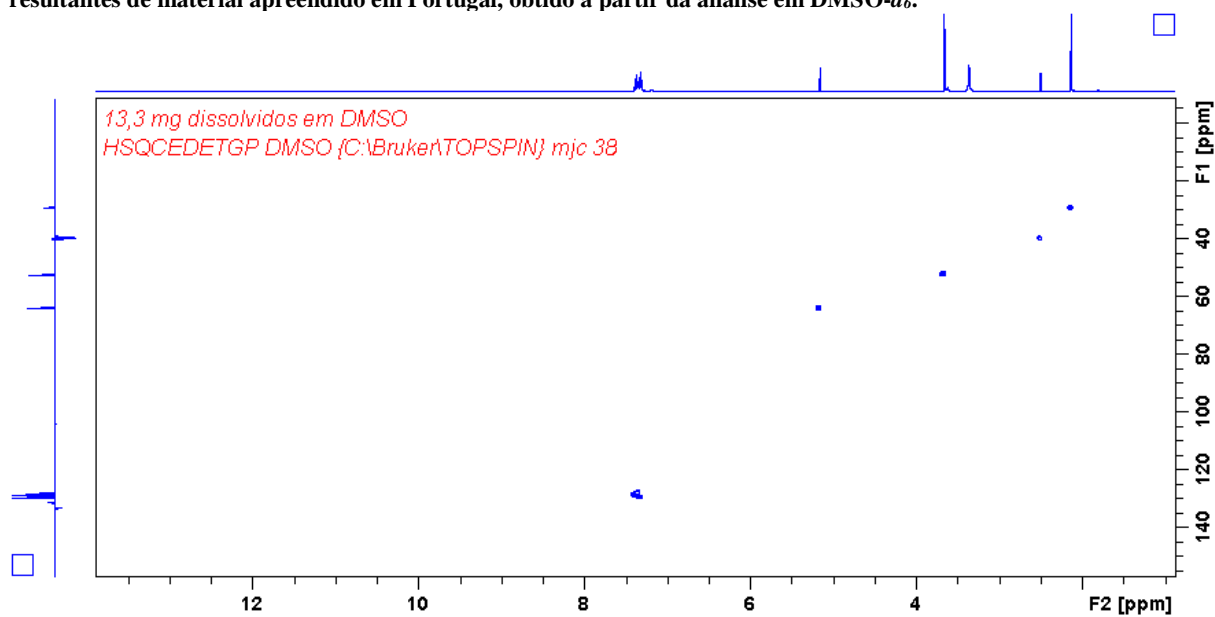
Anexo 6.150 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em $\text{DMSO-}d_6$.



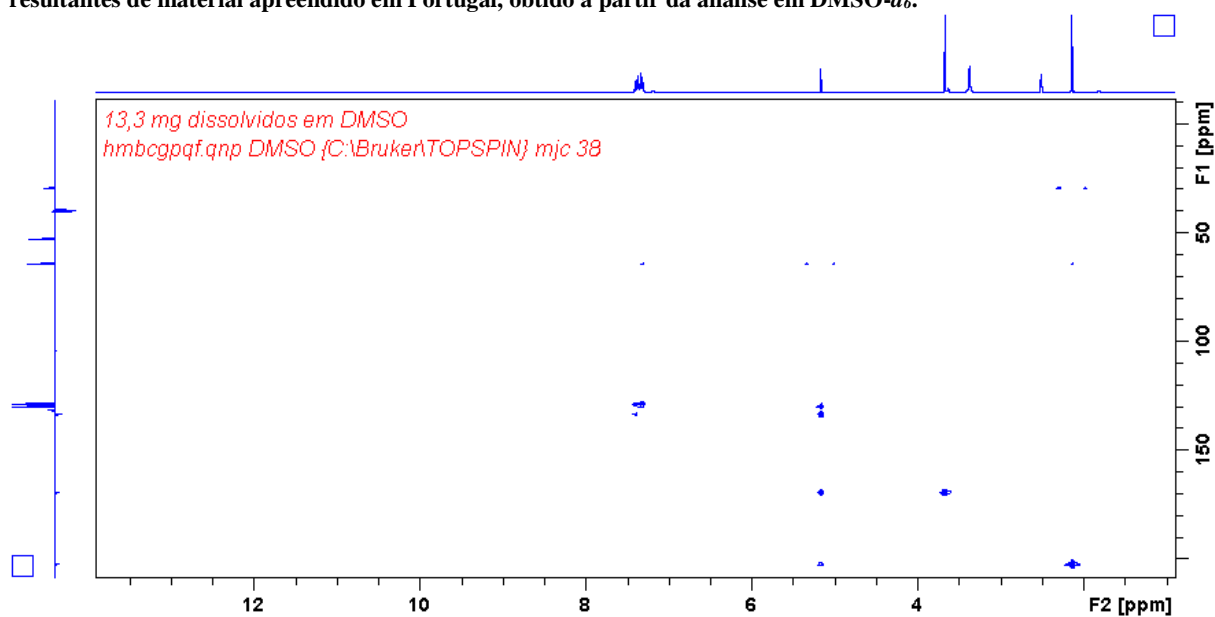
Anexo 6.151 - Espectro de COSY do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



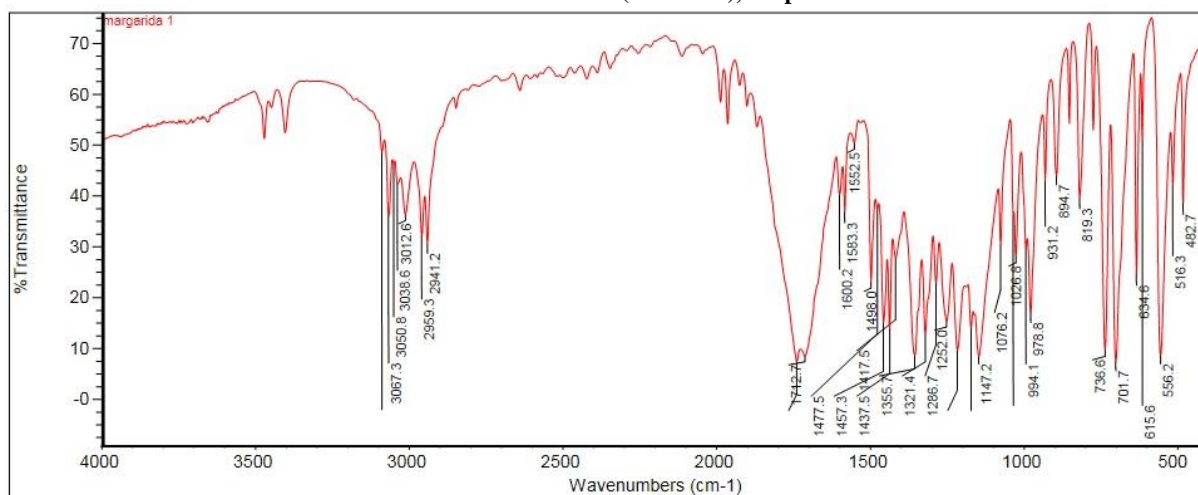
Anexo 6.152 - Espectro de HSQC do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



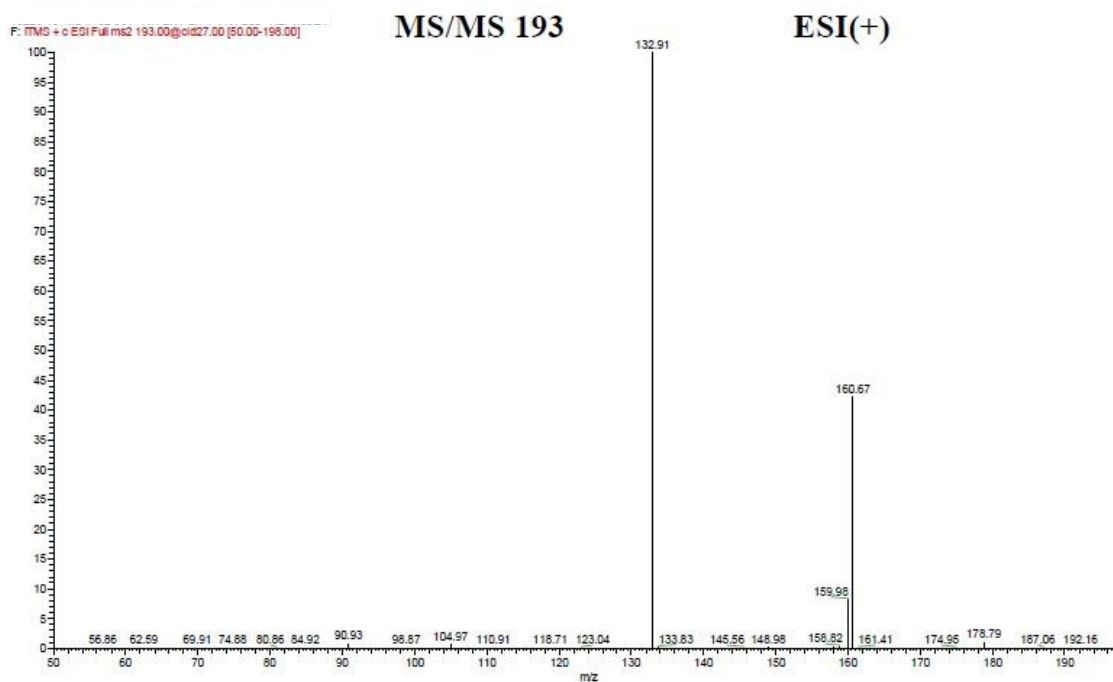
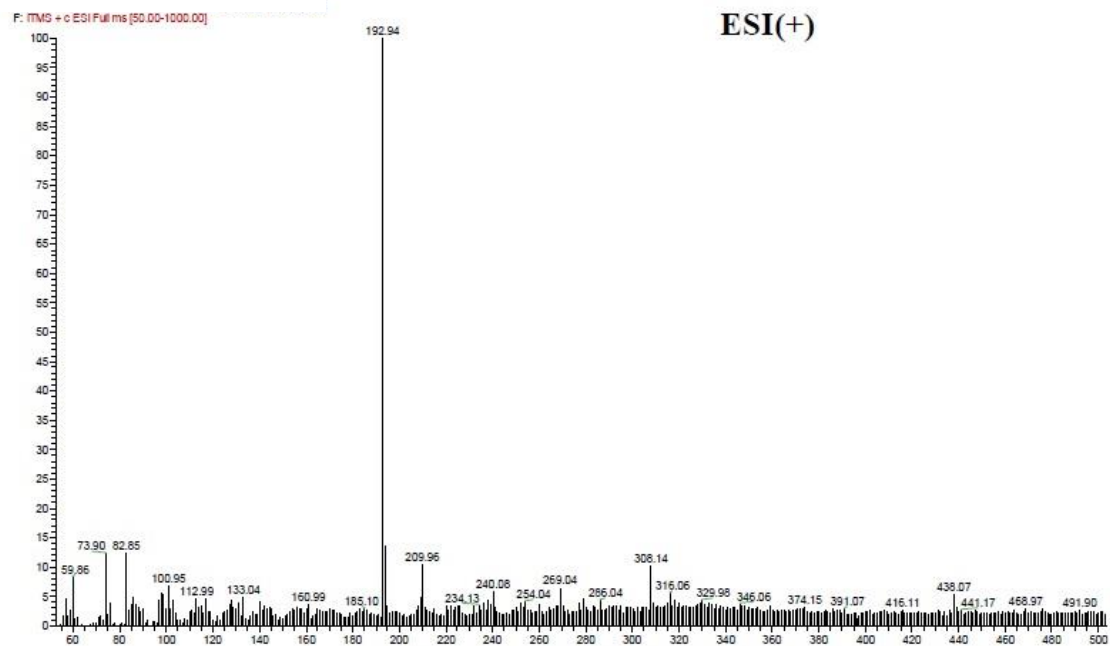
Anexo 6.153 - Espectro de HMBC do composto 2-fenil-3-oxo-butanoato de metilo, identificado numa das amostras resultantes de material apreendido em Portugal, obtido a partir da análise em DMSO- d_6 .



Anexo 6.154 - Resultados da análise de FTIR da amostra 53 (tabela 2.8), em pastilha de KBr.

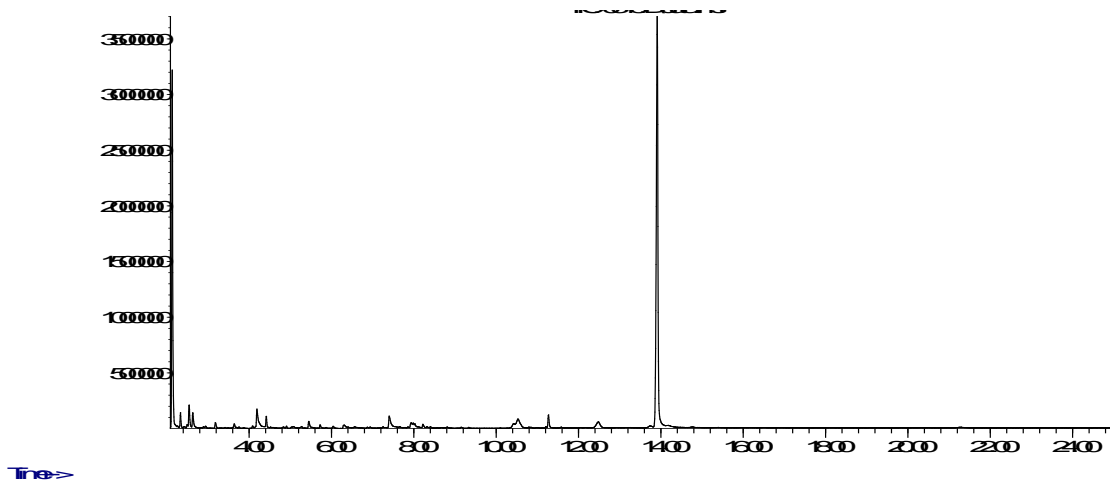


Anexo 6.155 - Resultados da análise MS (ESI+) realizada à amostra 53 (tabela 2.8).



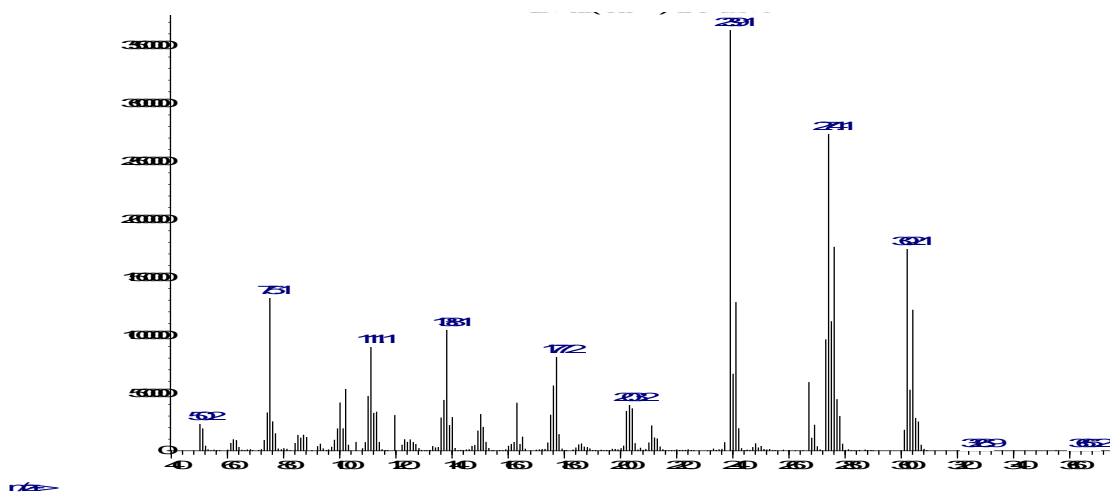
Anexo 6.156 - Cromatograma do exame com suspeita de conter uma substância depressora, que revelou conter um composto maioritário, Lorazepam, por GC-MS.

Análise



Anexo 6.157 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 13.91 minutos, resultante da análise à amostra suspeita de conter uma substância depressora, por GC-MS. O padrão de fragmentação é compatível com o composto Lorazepam.

Análise



Anexo 6.158 - Compilação das amostras analisadas ao longo do trabalho desenvolvido, com identificação da suspeita e do resultado efetivamente obtido no decorrer das análises.

<i>Amostra</i>	<i>Tipo</i>	<i>Suspeita</i>	<i>Resultados e Observações</i>
1	Pó	DOET ou outra feniletilamina	Inconclusivo
2	Matriz herbal	5F-AKB48 + 5F-PB22	5F-AKB48
3	Matriz herbal	5F-AKB48 + 5F-PB22	5F-AKB48 + 5F-PB22
4	Pó	Catinonas Sintéticas + Cafeína	3-FPM
5	Pó	Catinonas Sintéticas	4-CMC e 4Cl-PVP (2:1)
6	Pó	Catinonas Sintéticas	4-CEC
7	Solução Líquida	LSD ou derivado	LSD
8	Solução Líquida	LSD ou derivado	LSD
9	Solução Líquida	LSD ou derivado	LSD
10	Solução Líquida	LSD ou derivado	LSD
11	Pó	Bloom	α -PHP
12	Pó	Bloom	α -PHP
13	Pó	Substância inorgânica	Inconclusivo
14	Pó	Cafeína + Flefedrona + ?-MEC	3-MEC + Cafeína (5:1) + Flefedrona
15	Pó	Pentedrona + Metilona + ?-CEC	Metilona + 4-MEC + Pentedrona (2:1:1)
16	Pó	Pentedrona + Metilona + ?-CEC	Metilona + 4-MEC + Pentedrona (2:1:1)
17	Autocolantes	LSD	Nada detetado
18	Autocolantes	LSD	Nada detetado
19	Microselos	LSD	5-MeO-MiPT
20	Autocolantes	LSD	Nada detetado
21	Microselos	LSD	5-MeO-MiPT
22	Microselos	LSD	DOC
23	Microselos	LSD	DOC
24	Microselos	LSD	DOC
25	Microselos	LSD	5-MeO-MiPT
26	Autocolantes	LSD	Nada detetado
27	Autocolantes	LSD	Nada detetado
28	Autocolantes	LSD	Nada detetado
29	Pó	BMK ou Methyl-tetralona	APAA + BMK
30	Pó	BMK ou Methyl-tetralona	APAA + BMK
31	Pó	BMK ou Methyl-tetralona	APAA + BMK
32	Pó	BMK ou Methyl-tetralona	APAA + BMK
33	Matriz herbal	Canabinóides	Inconclusivo
34	Pó	Nicotina	Inconclusivo
35	Pó	BMK	APAA + BMK
36	Pó	Desconhecido	Inconclusivo
37	Pó	MDP2P	MDP2P glicinato
38	Resíduos	5F-ADB	5F-ADB
39	Pó	4-Acetoxi-DMT	4-Acetoxi-DMT
40	Pó	Bloom	α -PHP
41	Microselos	Mistura 2C-I, 2C-C e 2C-H	25I-NBOH
42	Vinho	Benzodiazepinas	Lorazepam
43	Alimento para animais (carne 'isco)	Veneno	Nada detetado
44	Animal	Veneno	Nada detetado
45	Alimento para animais	Veneno	Nada detetado

Anexo 6.158 (Continuação) - Compilação das amostras analisadas ao longo do trabalho desenvolvido, com identificação da suspeita e do resultado efetivamente obtido no decorrer das análises.

<i>Amostra</i>	<i>Tipo</i>	<i>Suspeita</i>	<i>Resultados e Observações</i>
46	Torrões de açúcar	LSD	Codeína + Morfina
47	Microselos	Lidocaína + Cafeína	Lidocaína + Cafeína
48	Comprimido	MDMA + Metilona + ?	MDMA + Metilona + Di-Metilona
49	Pó	APAA + BMK	APAA
50	Pó	4-CEC + TH-PVP	4-CEC
51	Pó	4-CEC + TH-PVP	4-CEC
52	Pó	Precursores	2,5-dimetoxibenzaldeído
53	Pó	'Sulfato de Bário' BMK?	3-oxo-2-fenilbutirato de metilo
54	Pó	BMK + 3-oxo-2-fenil-butyrate + APAA	APAA + BMK
55	Pó	BMK + 3-oxo-2-fenil-butyrate + APAA	APAA
56	Pó	Sulfato de Bário	Inconclusivo
57	Pó	Pentedrona	N-etilpentilona