

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CEILÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E**  
**TECNOLOGIAS DA SAÚDE**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO**  
**USANDO UHPLC-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE**  
**N-BENZILFENETILAMINA SUBSTITUÍDA**

**BRUNO HENRIQUE MONTEIRO LEITE**

**BRASÍLIA**

**2023**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CEILÂNDIA**

**FACULDADE DE CEILÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E**  
**TECNOLOGIAS DA SAÚDE**

**BRUNO HENRIQUE MONTEIRO LEITE**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO**  
**USANDO UHPLC-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE**  
**N-BENZILFENETILAMINA SUBSTITUÍDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade de Brasília (Faculdade de Ceilândia) como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes**

**BRASÍLIA**

**2023**

**BRUNO HENRIQUE MONTEIRO LEITE**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO  
USANDO UHPLC-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE  
N-BENZILFENETILAMINA SUBSTITUÍDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade de Brasília (Faculdade de Ceilândia) como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes – Presidente**  
Universidade de Brasília

---

**Prof. Dr. Juliano de Andrade Gomes**  
Polícia Civil do Distrito Federal

---

**Prof. Dr. Juliano Alexandre Chaker**  
Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de aproveitar este espaço para expressar minha profunda gratidão a todos aqueles que fizeram parte dessa dissertação. Primeiramente, quero agradecer à minha família, especialmente a minha esposa Ylka e aos meus pais, por todo o amor, apoio e incentivo incondicionais que sempre me forneceram.

Ao professor Dr. Anderson de Jesus Gomes e à professora Dra. Claire Nain Lunadi Gomes, pela orientação, paciência e conhecimento compartilhado. Suas orientações e encorajamentos foram fundamentais para que eu pudesse iniciar e finalizar este trabalho com sucesso.

Ao meu amigo Ettore Ferrari Júnior, pela valiosa contribuição e colaboração na realização deste projeto.

Ao Luciano Chaves Arantes, pelo incentivo e apoio para a realização deste projeto.

Aos meus colegas de trabalho e estagiários, que me proporcionaram uma experiência enriquecedora e colaborativa. O aprendizado e o trabalho em equipe foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Laboratório de Química de Física Forense da PCDF que financiou todo este projeto e onde contei com a ajuda de muitos colegas que tornaram esta experiência ainda mais enriquecedora, em especial aos gestores Bárbara Alves e Juliano de Andrade Gomes.

Ao Laboratório de Toxicologia Forense da SPTC-GO, onde tive a oportunidade de aprender e explorar a análise de HPLC-DAD.

A Agilent Technologies Brasil pelo generoso suporte técnico para essas investigações.

Por último, mas não menos importante, agradeço a Deus por me conceder saúde, sabedoria e perseverança para concluir este trabalho. Sei que sem Sua graça e proteção, não teria sido possível realizar este trabalho.

*“Buscai, em primeiro lugar, o Reino de Deus e sua justiça,  
e todas as coisas vos serão acrescentadas”*

Mt 6, 33.

## RESUMO

As N-benzilfenetilaminas substituídas, como os 25R-NBOMe e 25R-NBOH (R = Br, Cl, H, I e etil), são potentes agonistas do receptor serotoninérgico (5-HT<sub>2A</sub>) detectados em selos apreendidos em todo o mundo. Nos laboratórios forenses, essas substâncias são analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS). Nesses laboratórios é essencial desenvolver um método que seja mais rápido, simples e sensível para a identificação e quantificação de 25R-NBOH, por se tratar de um composto termicamente lábil. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um novo método em UHPLC-DAD para identificar e quantificar 25R-NBOH em selos. A análise foi realizada em modo isocrático, utilizando para a separação um cromatógrafo líquido Agilent 1290 acoplado a um detector de arranjo de diodos (UHPLC-DAD). A fase móvel consistiu de acetonitrila/tampão fosfato 0,1 M (pH 2,3), na proporção de 37:63. O método foi validado em uma faixa de concentração de 200 ng/mL a 25.000 ng/mL. Apresentou desvio padrão relativo precisão e exatidão intra e interensaio < 6%. Desenvolveu-se uma biblioteca contendo espectros de UV e tempo de retenção relativo para os compostos LSD, 25R-NBOH, 25R-NBOMe e 2C-R. Avaliou-se o método proposto analisando 158 amostras reais e a concentração média por selo foi determinada para 25C-NBOH ( $237 \pm 234$  µg, n = 49), 25B-NBOH ( $900 \pm 451$  µg, n = 33), 25E-NBOH ( $819 \pm 375$  µg, n = 37) e 25I-NBOH ( $861 \pm 383$  µg, n = 28). Ensaaios de estabilidade para as amostras de 25R-NBOH e 25R-NBOMe foram preparados com metanol e água: acetonitrila (1:1). Estas análises indicaram que, após 50 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e sem a exposição de luz, os selos apreendidos não sofreram degradação, a qual foi caracterizada pela formação do fragmento 2C-R (degradação), já em temperaturas de 50 °C foi observada a degradação do 25R-NBOH. Este estudo é o primeiro a analisar essas substâncias utilizando UHPLC-DAD, apresentando-se como um método, para análise de 25R-NBOH em selos, mais simples e rápido do que os estudos publicados anteriormente.

**Palavras-chaves:** 25R-NBOH, 25R-NBOMe, UHPLC-DAD, Degradação térmica, Alucinógenos, Novas Substâncias Psicoativas.

## ABSTRACT

The N-benzyl phenethylamine substituted, as 25R-NBOMe and 25R-NBOH compounds (R = Br, Cl, H, I, and ethyl), are potent serotonin receptor agonist (5-HT<sub>2A</sub>) detected in blotter papers worldwide. In forensic laboratories, those substances are analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). It is essential to develop a faster, simple, and sensitive method for the quantification of 25R-NBOH because this drug is a thermal labile compound. The objective of this study was to develop and validate a novel UHPLC-DAD method to determine 25R-NBOH in blotter papers. The analysis was performed in isocratic mode, using an Agilent 1290 liquid chromatography coupled to a diode array detector (UHPLC-DAD) was used for chromatographic separation. The mobile phase consisted of an acetonitrile/phosphate buffer 0.1 M (pH 2.3), in a proportion of 37:63. The method was validated over a concentration range of 200 ng/mL to 25,000 ng/mL. Both intra- and inter-assay precision and accuracy were < 6 % for all quality control samples. The development of a library containing UV spectra and relative retention time for LSD, 25R-NBOH, 25R-NBOMe and 2C-R compounds were also performed. The proposed method was evaluated in a routine analysis of 158 real samples and the mean concentration per blotter paper was determined for 25C-NBOH ( $237 \pm 234$  µg, n = 49), 25B-NBOH ( $900 \pm 451$  µg, n = 33), 25E-NBOH ( $819 \pm 375$  µg, n = 37) e 25I-NBOH ( $861 \pm 383$  µg, n = 28). Stability assays for the 25R-NBOH and 25R-NBOMe samples were prepared with methanol and water: acetonitrile (1:1) indicated that 25R-NBOH degradation occurs at 50 °C during 50 days of storage. On the other hand, the long-term stability, at room temperature and in darkness, showed no 2C-R formation in blotter papers seized. The present assay is the first study to analyze those substances using UHPLC-DAD which is a faster and simpler method for sampling than previously published analytical reports for analyzing 25R-NBOH in blotter papers.

**Key words:** 25R-NBOH, 25R-NBOMe, UHPLC-DAD, Thermal Degradation, Hallucinogens, New Psychoactive Substances.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estatísticas de apreensões, notificações e comunicações pela primeira vez de novas substâncias psicoativas notificadas e monitoradas pela EMCDDA, de 2011 - 2021.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura molecular dos 2C-R, 25R-NBOH e 25R-NBOME. R = Br: 2C-B, 25B-NBOH e 25B-NBOME; R = Cl: 2C-C, 25C-NBOH e 25C-NBOME; R = etil: 2C-E, 25E-NBOH e 25E-NBOME; R = I: 2C-I, 25I-NBOH e 25I-NBOME; R = H: 2C-H, 25H-NBOH e 25H-NBOME.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Cromatograma total de íons por GC-MS usando coluna analítica de 30m. (a): extrato metanólico de selo apreendido de 25I-NBOH, ausência do 25I-NBOH e a presença de 2C-I e seu fragmento correspondente (34). Usando coluna analítica de 4m. (b): 2C-B, 2CI, 25B-NBOH e 25I-NBOH a 400µg/mL; (c): 25R-NBOH; (d): Selo apreendido contendo 25E-NBOH sinal-ruído de 2C-E < 1:3) (43).                                                                                                                                                                                             | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Espectro de varredura completa realizado por EASI-IMS de selos apreendidos contendo o 25I-NBOH, tendo a imagem deo Avatar em um dos lados (A); Imagem do selo apreendido do Avatar (B); e visualização da distribuição espacial e temporal do íon m/z 414,05 contido no selo por EASI-IMS (C).                                                                                                                                                                                                                                                                                | 12 |
| <b>Figura 5.</b> Espectros de UV adquiridos por DAD e tempo de retenção obtidos por HPLC para isômeros de N-(metoxibenzil)-substituídos: (A) isômeros de 25I-NBOME (1a)-(1c) e (B) isômeros de 5MT-NBOME (2a)-(2C). A diferenciação dos isômeros só foi possível com a combinação da varredura completa do espectro de UV e os dados de tempo de retenção.                                                                                                                                                                                                                                     | 16 |
| <b>Figura 6.</b> Cromatograma hipotético da distribuição das faixas dos TRR.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 19 |
| <b>Figura 7.</b> Fluxo de análise do procedimento do preparo de amostra para as análises cromatográficas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 23 |
| <b>Figura 8.</b> Selos contendo 25R-NBOH ou 25R-NBOME reanalisados de 2014 a 2020, de acordo com o ano da apreensão.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Fluxo de análise do procedimento do preparo de amostra do estudo de estabilidade.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 27 |
| <b>Figura 10.</b> Espectros de ultravioleta da histamina obtidos através do detector DAD que mostram a distorção no espectro na absorção em 277 nm ao modificar o fluxo cromatográfico. (a) Espectro obtido em fluxo 0,3 mL/min sem distorção e (b) espectro obtido em fluxo 0,15 mL/min apresentando distorção.                                                                                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| <b>Figura 11.</b> Espectros de ultravioleta do benzeno obtidos através do detector DAD, mostrando as bandas de vibração entre 240 e 270 nm bem características das substâncias, que são utilizadas no controle da resolução, precisão e reprodutibilidade na medição dos espectros. (a) Espectro obtido com <i>slit</i> de 1,0 nm, <i>step</i> 0,2 nm e fluxo 0,3 mL/min; (b) espectro obtido com <i>slit</i> de 1,0 nm, <i>step</i> 1,0 nm e fluxo 0,3 mL/min; (c) espectro obtido com <i>slit</i> de 4,0 nm, <i>step</i> 1,0 nm e fluxo 0,3 mL/min.                                          | 31 |
| <b>Figura 12.</b> Corridas cromatográficas contendo 25R-NBOH (C, B, I e E) comparando as resoluções dos picos entre duas colunas diferentes, sendo que em preto encontra-se os NBOHs analisados em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP8 (1.8 µm, 100×2.1 mm, Agilent): Tempo de retenção (min.), 25C-NBOH: 1,69; 25B-NBOH: 1,85; 25I-NBOH: 2,25; 25E-NBOH: 2,61. Em azul encontra-se os NBOHs analisados em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP18 (1.8 µm, 100×2.1 mm, Agilent): Tempo de retenção (min.), 25C-NBOH: 1,95; 25B-NBOH: 2,18; 25I-NBOH: 2,77; 25E-NBOH: 3,17. | 37 |
| <b>Figura 13.</b> Cromatograma contendo todos os derivados de fenetilaminas e LSD analisados em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP18 (1.8 µm, 100×2.1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| mm, Agilent). Tempo de retenção (min.): 2C-H: 0,91; 2C-C: 0,99; 2C-B: 1,00; LSD: 1,10; 2C-I: 1,11; 2C-E: 1,23; 25H-NBOH: 1,44; 25C-NBOH: 2,10; 25H-NBOMe: 2,16; 25B-NBOH: 2,36; 25I-NBOH: 2,96; 25E-NBOH: 3,39; 25C-NBOMe: 3,44; 25B-NBOMe: 3,94; 25I-NBOMe: 5,11; 25E-NBOMe: 6,11. O <i>insert</i> mostra uma ampliação da região entre 0,6 e 1,8 min. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| <b>Figura 14.</b> Espectros de ultravioleta de 2Cs em (a); espectros de ultravioleta de 25R-NBOHs em (b); espectros de ultravioleta de 25R-NBOMes em (c); espectros de ultravioleta de 2C-B, 25B-NBOH e 25B-NBOMe em (d). Todos estão descritos na Tabela 5, e foram obtidos através do detector DAD após separação em UHPLC. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 40 |
| <b>Figura 15.</b> Representação esquemática da escolha do modelo de regressão (ER=Erro relativo; Wi=Ponderação).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 45 |
| <b>Figura 16.</b> Distribuição dos resíduos vs. concentração obtida nos ensaios de validação por UHPLC-DAD para determinação de 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I), (prev=Previsto; obs=Observado).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 46 |
| <b>Figura 17.</b> Distribuição do erro relativo percentual (%ER) em função da concentração (Conc. 0,2, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 25,0 µg/mL) de 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I) obtidas para o Modelo 1 ( $w_i=1$ ), Modelo 2 ( $w_i=1/x$ ), Modelo 3 ( $w_i=1/x^2$ ), Modelo 4 ( $w_i=1/x^{0,5}$ ), Modelo 5 ( $w_i=1/y$ ), Modelo 6 ( $w_i=1/y^2$ ) e Modelo 7 ( $w_i=1/y^{0,5}$ ). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 47 |
| <b>Figura 18.</b> Fenetilaminas (25R-NBOH e 25R-NBOMe) e LSD analisados em selos apreendidos no Distrito Federal no período entre 2015 e 2021.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 55 |
| <b>Figura 19.</b> (a) Resposta relativa dos 25R-NBOH em relação ao seu respectivo 2C-R em metanol a 50 °C. A equação linear e sua respectiva correlação para cada substância: 25B-NBOH: $y = 6,15 \times 10^{-9} x t + 0,0109$ , $R^2 = 0,9938$ ; 25C-NBOH: $y = 6,10 \times 10^{-9} x t + 0,0076$ , $R^2 = 0,9976$ ; 25E-NBOH: $y = 3,53 \times 10^{-9} x t + 0,0111$ , $R^2 = 0,9932$ ; 25I-NBOH: $y = 3,99 \times 10^{-9} x t + 0,0094$ , $R^2 = 0,9904$ . (b) Resposta relativa dos 25R-NBOH em relação ao seu respectivo 2C-R em água:ACN a 50 °C. As análises demonstraram degradação exponencial para todos os 25R-NBOH. 25B-NBOH ( $y = 0,0124 \times e(1,39 \times 10^{-6} x t)$ ) com $r^2 = 0,9998$ ; 25C-NBOH ( $y = 0,0062 \times e(1,26 \times 10^{-6} x t)$ ) com $R^2 = 0,9991$ ; 25E-NBOH ( $y = 0,0059 \times e(1,88 \times 10^{-6} x t)$ ) $r^2 = 1,0000$ ; 25I-NBOH ( $y = 0,0029 \times e(2,71 \times 10^{-6} x t)$ ) com $R^2 = 1,0000$ . .... | 66 |
| <b>Figura 20.</b> Cromatograma de uma amostra contendo 25B-NBOH, extraído com água:ACN, estocado a 50 °C, analisado em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP18 (1,8 µm, 100×2,1 mm, Agilent). Em vermelho encontra-se a corrida cromatográfica no tempo 0 e em preto a corrida cromatográfica de 50 dias de estocagem. Tempo de retenção (min.): 2C-B: 1,00; 25H-NBOH: 1,44; 25B-NBOH: 2,36; os restantes dos picos são desconhecidos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 67 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Biblioteca UVTOX organizada em faixas de TRR (70).....                                                                                                                                                                                                                    | 18 |
| <b>Tabela 2.</b> Resumo das condições cromatográficas utilizada pela biblioteca comercial (50) e as utilizadas na validação.....                                                                                                                                                           | 33 |
| <b>Tabela 3.</b> Padrões utilizados para o controle das condições cromatográficas e seletividade do DAD utilizados pela biblioteca comercial (50) e as utilizados na validação. ....                                                                                                       | 34 |
| <b>Tabela 4.</b> Tempo de retenção e tempo de retenção relativo dos compostos nas 4 colunas analíticas avaliadas .....                                                                                                                                                                     | 36 |
| <b>Tabela 5.</b> Fórmula molecular, $\lambda_{\text{max}}$ e $\lambda_{\text{min}}$ dos compostos analisados.....                                                                                                                                                                          | 39 |
| <b>Tabela 6.</b> Avaliação do efeito matriz nos níveis de concentrações 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ para o 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I). ....                                                                                                                                                | 43 |
| <b>Tabela 7.</b> Teste de homogeneidade de variâncias ( $s^2$ ): Teste F e <i>Cochran</i> .....                                                                                                                                                                                            | 46 |
| <b>Tabela 8.</b> Parâmetros de regressão da reta de calibração gerada para cada fator de ponderação ( $w_i$ ), respectiva soma dos erros relativos percentuais ( $\Sigma \%ER$ ) e o teste F a para avaliação de falta de ajuste (Faj) do modelo para os 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I). .... | 50 |
| <b>Tabela 9.</b> Faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão dos compostos validados. ....                                                                                                                                | 53 |
| <b>Tabela 10.</b> Fenetilaminas e LSD analisadas em selos apreendidos no Distrito Federal (Brasil) no período de 2015 a 2021. ....                                                                                                                                                         | 55 |
| <b>Tabela 11.</b> Concentração dos analitos encontrados em 106 amostras de selos. ....                                                                                                                                                                                                     | 56 |
| <b>Tabela 12.</b> Amostras contendo 25R-NBOH, data de apreensão, tempo de estocagem e os resultados encontrados.....                                                                                                                                                                       | 57 |
| <b>Tabela 13.</b> Perfil qualitativo encontrado em 106 amostras de selos.....                                                                                                                                                                                                              | 60 |
| <b>Tabela 14.</b> Amostras contendo 25R-NBOMe, data de apreensão, tempo de estocagem e os resultados encontrados. ....                                                                                                                                                                     | 62 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**2C-R:** 4-R-2,5-dimethoxyphenethylamine

**25R-NBOH:** 2-(((4-R-2,5-dimethoxyphenethyl)amino)methyl)phenol

**25R-NBOME:** 2-(4-R-2,5-dimethoxyphenyl)-N-(2-methoxybenzyl)ethanamine

**5-Me-O-DMT:** 2-(5-Methoxy-1H-indol-3-yl)-N,N-dimethylethanamine

**ACN:** Acetonitrila

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATR-FTIR:** *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia No Infravermelho Por Transformada De Fourier Com Reflectância Total Atenuada)

**CPP:** N- 1-(3-chlorophenyl)piperazine

**DAD:** *Diode Array Detector* (Detector de Arranjo de Diodos)

**DPR:** Desvio Padrão Relativo

**EASI:** *Easy Ambient Sonic-Spray Mass Spectrometry Imaging* (Ionização Ambiente Por Spray Sônico)

**EI:** *Electron Ionization* (Impacto Eletrônico)

**EMCDDA:** *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*

**ESI:** *Electrospray Ionization* (Ionização Por Electrospray)

**FT-ICR MS:** *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (Espectrômetro De Massas De Ressonância Ciclotrônica De Íons Por Transformada De Fourier)

**GC:** *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)

**HFBA:** Heptafluorobutírico

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

**LOD:** Limite de Detecção

**LOQ:** Limite de Quantificação

**LSD:** Lysergic acid diethylamide

**MS:** *Mass Spectrometry* (espectrometria de massas)

**MS/MS:** *Tandem Triple Quadrupole Mass Spectrometry* (Espectrômetro De Massas Em Tandem Tipo Triplo Quadrupolo)

**NIR:** *Near Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia No Infravermelho Próximo)

**NPS:** *New Psychoactive Substances* (Novas Substâncias Psicoativas)

**NRM:** *Nuclear Magnetic Resonance* (Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear)

**PSI:** *Paper Spray Ionization* (Ionização Por Paper Spray)

**PSL-DA:** *Partial Least Square-Discrimant Analysis* (Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais)

**QTOF-MS:** *Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (espectrômetro de massas de alta resolução tipo quadrupolo / tempo de Vôo)

**RDC:** Resolução da Diretoria Colegiada

**TFMPP:** N-1-(3- trifluoromethylphenyl)piperazine

**TRR:** Tempo de Retenção Relativo

**UHPLC:** *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência)

**UNODC:** United Nations Office on Drugs and Crime

**UV:** Ultra-Violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

**mg:** miligrama

**mL:** mililitro

**µg:** micrograma

**µg/mL:** micrograma por mililitro

**ng/mL:** nanograma por mililitro

**P.A.:** Para Análise

**nm:** nanômetro

**pH:** potencial hidrogeniônico

**rpm:** rotações por minuto

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de correlação da reta

**v/v:** volume por volume

**µL:** microlitro

**%:** percentual

**≥:** maior ou igual

**≤:** menor ou igual

## SUMÁRIO

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                  | 1  |
| 1.1. NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS (NSP)                                                              | 1  |
| 1.2. FENETILAMINAS SUBSTITUÍDAS                                                                       | 3  |
| 1.2.1. Fenetilaminas substituídas – estrutura e farmacologia                                          | 3  |
| 1.3. MÉTODOS APLICADOS À IDENTIFICAÇÃO DE 25R-NBOH                                                    | 5  |
| 1.3.1. Identificação de 25R-NBOH por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) | 6  |
| 1.3.2. Identificação de 25R-NBOH por cromatografia líquida de ultra alta pressão (UHPLC)              | 9  |
| 1.3.3. Identificação de 25R-NBOH por outras técnicas analíticas.                                      | 11 |
| 1.4. HPLC-DAD NA IDENTIFICAÇÃO DE FENETILAMINAS N-BENZIL-SUBSTITUÍDAS E OUTRAS NPS                    | 13 |
| 1.4.1. Biblioteca UV TOX para HPLC-DAD                                                                | 17 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                   | 20 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL                                                                                   | 20 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                            | 20 |
| 2.3. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO                                                                        | 20 |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                         | 21 |
| 3.1. MATERIAIS                                                                                        | 21 |
| 3.1.1. Reagentes                                                                                      | 21 |
| 3.1.2. Equipamentos e Instrumentos                                                                    | 21 |
| 3.1.3. Soluções                                                                                       | 22 |
| 3.2. MÉTODOS                                                                                          | 23 |
| 3.2.1. Procedimento do preparo de amostra para análise cromatográfica                                 | 23 |
| 3.2.2. Condições cromatográficas                                                                      | 23 |
| 3.2.3. Validação do método analítico para quantificação de 25R-NBOH                                   | 24 |
| 3.2.3.1. Preparação das soluções padrão                                                               | 26 |
| 3.2.5. Estudo de estabilidade                                                                         | 26 |
| 3.2.6. Análise de dados                                                                               | 28 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                      | 29 |
| 4.1. BIBLIOTECA DE TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO (TRR) E ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA (UV)                   | 29 |
| 4.1.1. Critérios para utilização da biblioteca                                                        | 34 |

|               |                                                                    |    |
|---------------|--------------------------------------------------------------------|----|
| <b>4.1.2.</b> | <b>Tempo de retenção relativo (TRR)</b> .....                      | 36 |
| <b>4.1.3.</b> | <b>Espectro de UV</b> .....                                        | 38 |
| <b>4.2.</b>   | <b>VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA</b> .....                              | 42 |
| <b>4.2.1.</b> | <b>Seletividade</b> .....                                          | 43 |
| <b>4.2.2.</b> | <b>Robustez</b> .....                                              | 44 |
| <b>4.2.3.</b> | <b>Linearidade</b> .....                                           | 44 |
| 4.2.3.1.      | Teste de homoscedasticidade .....                                  | 45 |
| 4.2.3.2.      | Escolha do modelo de regressão.....                                | 47 |
| 4.2.3.3.      | Equação de regressão linear ponderada.....                         | 52 |
| <b>4.2.4.</b> | <b>LOD e LOQ</b> .....                                             | 52 |
| <b>4.2.5.</b> | <b>Precisão e Recuperação</b> .....                                | 53 |
| <b>4.3.</b>   | <b>ESTATÍSTICAS E CASOS REAIS</b> .....                            | 54 |
| <b>4.3.1.</b> | <b>Estatísticas dos selos analisados no Distrito Federal</b> ..... | 54 |
| <b>4.3.2.</b> | <b>Casos Reais</b> .....                                           | 56 |
| <b>4.2.</b>   | <b>ESTUDO DE ESTABILIDADE</b> .....                                | 61 |
| <b>5.</b>     | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                             | 69 |
| <b>6.</b>     | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                            | 70 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS (NSP)

Novas substâncias psicoativas (NSP) são compostos químicos desenvolvidos para produzir efeitos psicoativos semelhantes aos de drogas já conhecidas. Elas são projetadas para escapar das leis de controle de drogas existentes, como a Convenção Única sobre Entorpecentes (1961) ou a Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas (1971), uma vez que elas não estão elencadas nesses acordos, o que as torna uma ameaça crescente para a saúde pública. De acordo com a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC, 2022) (1), entre 2009-2021, 134 países relataram um total de 1127 dessas substâncias no mercado global: só em 2020 surgiram 77 novas substâncias psicoativas (incluindo 7 cujos efeitos ainda são desconhecidos) (1).

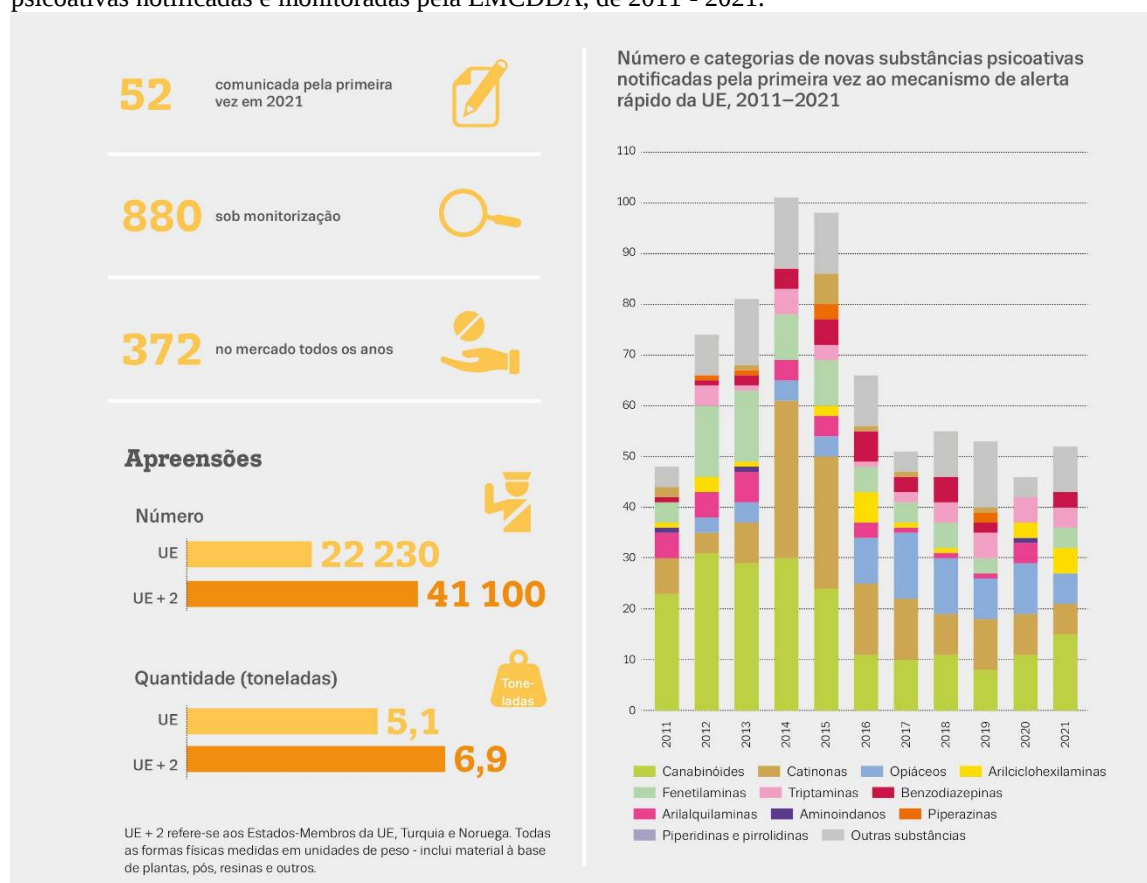
O consumo de NSP pode trazer diversos riscos tanto para a saúde individual quanto para a sociedade em geral. O uso dessas substâncias pode levar a graves consequências para a saúde, como ansiedade, alucinações, psicose, convulsões e até mesmo a morte. Além disso, as NSP podem apresentar efeitos desconhecidos e imprevisíveis, tornando ainda mais difícil a prevenção e o tratamento dos problemas decorrentes do seu uso. A pureza e a composição, também, não são conhecidas, o que acarreta um elevado risco aos usuários, evidenciado nas admissões nos hospitais de emergência e mortes relacionadas às NPS, além da alta incidências de casos com associação de substâncias (2).

Com a publicação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 79, de 23 de maio de 2016, pelo órgão responsável (Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA) da atualização da lista das substâncias entorpecentes ou psicotrópicas sujeito ao controle, o Brasil passou a adotar o sistema genérico aliado à listagem nominal de substâncias. Com a publicação da RDC nº 325/2019, o país, acertadamente, passa a adotar a classificação genérica para as fenitilaminas, resultando assim a proibição de quaisquer substâncias que se enquadrem nessa classe estrutural, assim como ocorreu para os canabinoides sintéticos, em 2016, e para as catinonas sintéticas, em 2017. A estratégia representa um avanço na visão regulatória do controle de drogas, pois abrange várias substâncias com estruturas e efeitos semelhantes que foram desenvolvidas para serem utilizadas abusivamente como substitutos de substâncias controladas (3).

De acordo com a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), o uso de NSP é um problema crescente em todo o mundo. Em 2020, cerca de 284 milhões de pessoas usaram drogas ilícitas em todo o mundo, o que representa uma em cada 18 pessoas com idade entre 15 e 64 anos, faixa de idade com a maior prevalência de uso de drogas ilícitas. Entre as NSP, os principais grupos químicos mais comuns são as catinonas sintéticas, os canabinoides sintéticos, as feniletilaminas, os opioides sintéticos e os derivados de anfetamina (4).

O mercado de NSP na Europa tem crescido exponencialmente nos últimos anos, com o surgimento de novas substâncias a cada ano, sendo que só em 2020 foram apreendidas quase 7 toneladas. Segundo o *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA, 2022), em 2021, 52 novas substâncias foram identificadas no mercado de drogas europeu, totalizando 880 substâncias monitoradas (Figura 1) (5).

**Figura 1.** Estatísticas de apreensões, notificações e comunicações pela primeira vez de novas substâncias psicoativas notificadas e monitoradas pela EMCDDA, de 2011 - 2021.



**Fonte:** European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *European Drug Report 2022* (5)

No Brasil, entre 2008 e 2017, a Polícia Civil de Minas Gerais (PCMG) analisou e identificou, em seu laboratório forense, 2744 substâncias. Um total de 93 substâncias

diferentes foram identificadas, sendo que 62 foram classificadas como NPS, tendo as fenetilaminas como o segundo maior grupo em termo de identificações, representando 33,9% das apreensões (6).

Estas substâncias apresentam-se, com maior frequência, nas seguintes formas: comprimidos, selos, pós, cristais, líquidos, etc. O histórico das apreensões na Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF) revela que a grande maioria dos selos apreendidos contém LSD ou 25R-NBOH em suas composições. Esses dados indicam que o mercado de NSP é uma realidade no país e que medidas de prevenção e combate a essa prática devem ser adotadas para garantir a saúde pública e a segurança da população.

## 1.2.FENETILAMINAS SUBSTITUÍDAS

Essas substâncias sintéticas que têm emergido no mercado de drogas nos últimos anos apresentam como um grande desafio para a saúde pública em todo o mundo. Dentre as NSP, a classe das fenetilaminas tem ganhado destaque por apresentar propriedades psicoativas e estruturas químicas diversas, incluindo os compostos conhecidos como 25R-NBOH e 25R-NBOMe (7).

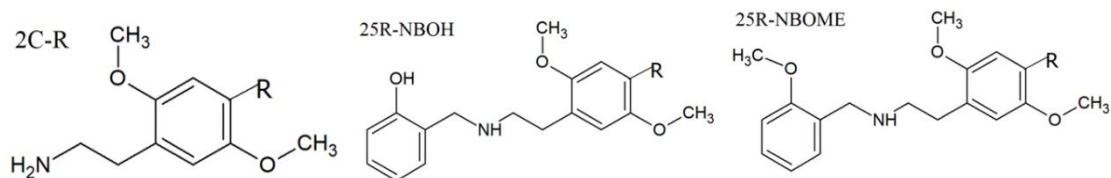
### 1.2.1. Fenetilaminas substituídas – estrutura e farmacologia

As fenetilaminas são análogas das anfetaminas com um núcleo de fenetilamina em sua estrutura (grupo amina na posição beta do anel aromático) e podem ser subdivididas em diversas subclasses, incluindo as fenetilaminas substituídas, que possuem substituintes na posição orto ou meta do anel (8). Dentre as fenetilaminas substituídas, os compostos conhecidos como 2C-R, 25R-NBOH e 25R-NBOMe têm sido alvo de preocupação devido ao seu potencial de abuso e aos seus efeitos adversos (8–11).

Os compostos 2C-R apresentam substituição no anel aromático na posição 2 e na posição 5 um átomo de halogênio, grupo alquila ou hidrogênio (10); por outro lado, os compostos 25R-NBOH e 25R-NBOMe são N-benzil substituídos derivados das famílias dos 2C-R (12–14) e apresentam este último composto com um dos seus principais metabólitos (9,15). Essas drogas têm sido relatadas em várias partes do mundo como drogas recreativas (1,2,16). Os 25R-NBOH e 25R-NBOMe apresentam psicofarmacologia semelhante as drogas psicodélicas como o LSD, DOI, psilocina e 5-Me-O-DMT (14,17), e têm sido associadas a relatos de overdose e morte em todo o

mundo (8–10,18). Na Figura 2 é possível visualizar as estruturas moleculares desses compostos.

**Figura 2.** Estrutura molecular dos 2C-R, 25R-NBOH e 25R-NBOME. R = Br: 2C-B, 25B-NBOH e 25B-NBOME; R = Cl: 2C-C, 25C-NBOH e 25C-NBOME; R = etil: 2C-E, 25E-NBOH e 25E-NBOME; R = I: 2C-I, 25I-NBOH e 25I-NBOME; R = H: 2C-H, 25H-NBOH e 25H-NBOME.



Fonte: **Autoria própria**

As características da estrutura química desses compostos, como a presença de grupos metoxi ou benzilfenetilamina, conferem-lhes propriedades farmacológicas e toxicológicas distintas, incluindo atividade agonista nos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> (11,14,17,19,20). O potencial de abuso e os riscos associados ao uso dessas substâncias são significativos, incluindo seus efeitos adversos graves como agitação prolongada, alucinações, convulsões, rabdomiólise, insuficiência renal e morte (10,11). Além disso os 25R-NBOMes são mais potentes e tóxicos que o LSD, aumentando ainda mais o risco aos usuários (21).

Os receptores de serotonina, também conhecidos como receptores 5-HT, são uma família de receptores acoplados à proteína G envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos e comportamentais, incluindo humor, ansiedade, sono, dor, apetite e comportamento sexual (22,23). Dentre os subtipos de receptores 5-HT, os receptores 5-HT<sub>2A</sub> têm sido alvo de muita atenção na pesquisa farmacológica devido aos seus efeitos alucinógenos. Esse receptor é encontrado em várias áreas do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal, e sua ativação leva a mudanças na percepção sensorial, pensamento e estados de consciência (23).

Um agonista do receptor 5-HT<sub>2A</sub> é a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), uma substância psicodélica que induz alterações na percepção sensorial, cognição e humor. O LSD se liga seletivamente e altamente aos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, levando ao aumento da atividade neuronal no córtex pré-frontal e em outras áreas do cérebro. Os efeitos farmacológicos do LSD incluem alterações na percepção visual, auditiva e tátil, bem como uma sensação de conexão com o universo e uma extensão da consciência. No entanto, o LSD também pode causar efeitos adversos, incluindo ansiedade, paranóia,

psicose, convulsões e até a morte por overdose ou reações alérgicas graves em casos raros. Devido a esses efeitos, o LSD é considerado uma substância controlada e seu uso é ilegal na maioria dos países do mundo (23,24).

### 1.3.MÉTODOS APLICADOS À IDENTIFICAÇÃO DE 25R-NBOH

O uso de métodos analíticos para a caracterização de novas substâncias psicoativas é fundamental para a identificação desses compostos, bem como dos adulterantes e dos contaminantes em amostras de drogas apreendidas, auxiliando nas investigações de crimes relacionados ao tráfico de drogas e intoxicações. Apesar da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) ser a técnica ouro na identificação de drogas em materiais apreendidos (25), a técnica de cromatografia líquida de ultra alta pressão (UHPLC) acoplada a espectrômetro de massas vem ganhando notoriedade em sua utilização para a identificação de novas substâncias psicoativas. Seu uso pode ser tanto nas amostras de drogas brutas apreendidas, como em amostras biológicas, devido à sua alta sensibilidade, a sua capacidade de separação de compostos complexos e por ser uma técnica ideal para análise de compostos que apresentam características comuns às NPS (termicamente instáveis, com baixa volatilidade ou que apresentem um perfil de fragmentação pobre para identificação no espectrômetro de massas por impacto eletrônico) (8,26–28).

Assim, a caracterização e identificação de novas substâncias psicoativas, como 25R-NBOH, representam um grande desafio para os profissionais da área de toxicologia e química forense. Existem diversas técnicas analíticas que visam à identificação dessa substância, incluindo cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS) (7,29–33), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (27,34–38), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NRM) (27,39) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) (27,39,40). No entanto, a cromatografia líquida de ultra alta pressão (UHPLC) tem se destacado por apresentar alta resolução, rapidez e sensibilidade.

### **1.3.1. Identificação de 25R-NBOH por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma técnica analítica amplamente utilizada na área de toxicologia e química forense (25). Essa técnica consiste em separar os compostos da amostra após sua volatilização por meio da cromatografia gasosa e, em seguida, ionizá-los e analisá-los em um espectrômetro de massas, que permite a identificação dos compostos com base em sua massa molecular e fragmentação. A separação dos compostos é controlada por dois fatores dos componentes da amostra, a primeira é a solubilidade na fase estacionária da coluna, onde quanto mais solúvel for um componente nesta fase, mais lentamente ele passará pela coluna. O segundo fator é a volatilidade dos compostos, no qual quanto mais volátil for a substância, maior será sua tendência a permanecer vaporizada e mais rápido ela se moverá pelo sistema (41).

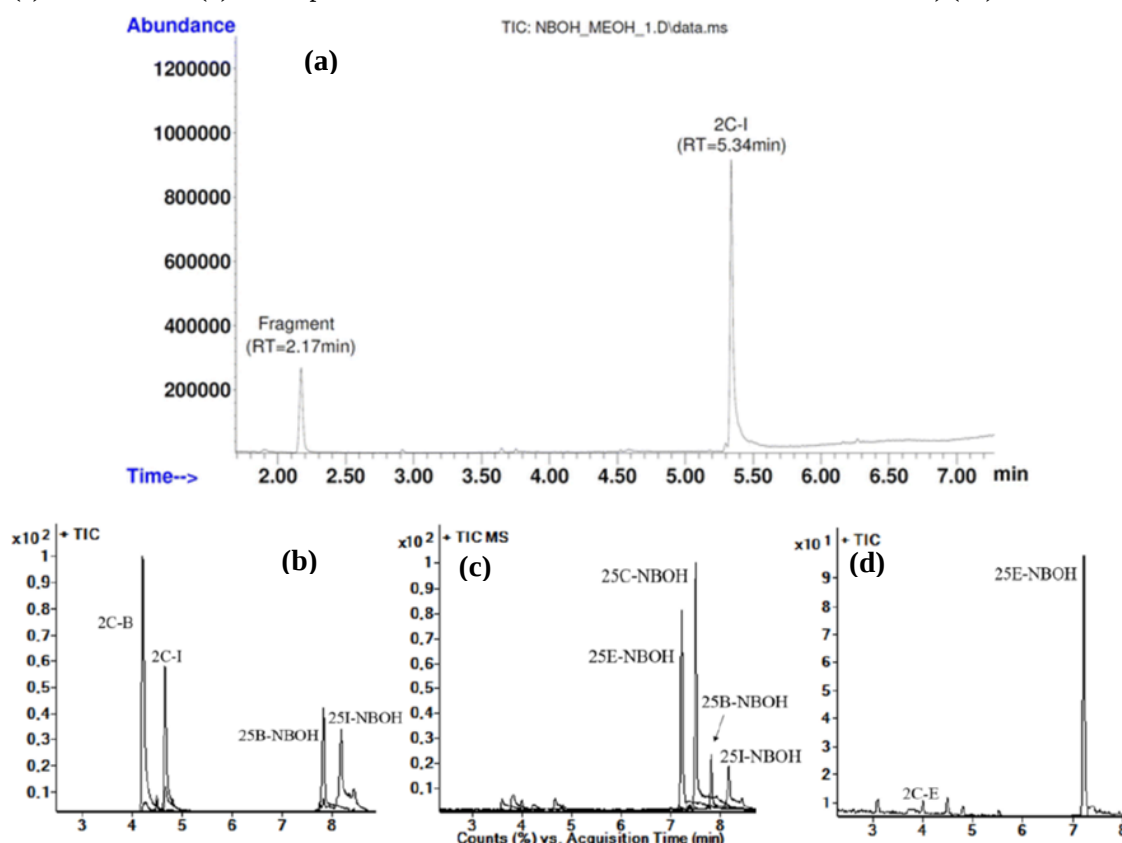
Entre as principais vantagens da técnica de GC-MS estão a alta sensibilidade, seletividade e capacidade de quantificação dos compostos presentes na amostra. Além disso, a técnica permite a identificação de compostos em amostra complexa, como drogas apreendidas, bem como a comparação dos resultados obtidos com bancos de dados de espectros de massas de compostos conhecidos (41). No entanto, a técnica de GC-MS apresenta algumas limitações, como a necessidade de derivatização prévia de compostos que apresentam baixa volatilidade (42), ou que apresentam baixa estabilidade térmica (34); além disso, alguns compostos podem apresentar fragmentação, na ionização de impacto eletrônico (EI), com espectros de massas com baixa qualidade e difícil derivatização, o que pode levar a perda de informação sobre a estrutura do composto (28).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é a técnica analítica mais utilizada para a identificação de substâncias psicoativas (25). Entretanto, as análises por GC-MS para a identificação do 25R-NBOH apresentam algumas dificuldades (27,34).

Um estudo conduzido por Coelho Neto *et al.* (2017) (34) descreveu a identificação de 25I-NBOH em amostras de selos apreendidos pelas Polícias de Minas Gerais e do Distrito Federal, utilizando a técnica de GC-MS no modo de ionização por impacto de elétrons (EI) e uma coluna capilar de sílica fundida Agilent J&W HP-1MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, espessura de filme de 0,25 µm) (34). Neste estudo, as amostras foram analisadas após serem extraídas com vários solventes (acetonitrila, acetona, acetato

de etila, etanol, isopropanol e metanol tetradeuterado). De acordo com os autores, o 25I-NBOH se degrada em 2C-I além da presença de um pico secundário, pico este não encontrado na injeção do padrão de 2C-I (Figura 3a). A análise dos fragmentos iônicos presentes nesses picos demonstrou que o 25I-NBOH foi degradado a 2C-I e 2-(metoximetil)fenol por reações de substituição nucleofílica na presença de álcool e em alta temperatura (temperatura da seringa 280 °C), onde os álcoois atuavam como grupos nucleofílicos e o 2C-I como um grupo de saída. Os autores sugeriram a necessidade de avaliar este pico secundário (2-(metoximetil)fenol) para a identificação correta de 25R-NBOH nas amostras de selos analisadas por GC-MS em coluna de 30 m (34). Andrade *et al.* (2020) (37) encontrou resultados parecidos e concluiu que o 25I-NBOH pode ser considerado como um aminoácido zwitterion solvatado pelo excesso de álcool na fase gasosa (37).

**Figura 3.** Cromatograma total de íons por GC-MS usando coluna analítica de 30m. (a): extrato metanólico de selo apreendido de 25I-NBOH, ausência do 25I-NBOH e a presença de 2C-I e seu fragmento correspondente (34). Usando coluna analítica de 4m. (b): 2C-B, 2CI, 25B-NBOH e 25I-NBOH a 400µg/mL; (c): 25R-NBOH; (d): Selo apreendido contendo 25E-NBOH sinal-ruído de 2C-E < 1:3) (43).



Fonte: Neto *et al.* 2017 (34) e Ferrari *et al.* 2020 (43).

Entretanto, muitos laboratórios têm preferido não adotar o método descrito por Neto *et al.* (2017) (34) pelo receio de incorrerem em um erro de interpretação e emitirem laudos com achados questionáveis. Esse receio deve-se ao fato de um dos fragmentos do 25R-NBOH ser idêntico aos 2C-R, tanto no tempo de retenção quanto no espectro de massas, não sendo possível garantir a ausência de 2C-R nos selos contendo 25R-NBOH quando analisados por GC-MS. Assim, a identificação dos 25R-NBOH por GC-MS tornou-se um desafio analítico, devido à sua instabilidade térmica. Para superar esses desafios, algumas estratégias têm sido propostas, como a derivatização dos compostos com agentes químicos que aumentam a sua estabilidade térmica (36–38).

Um estudo realizado por Lum *et al.* (2020) (36) descreveu a utilização de uma técnica de derivatização com anidrido heptafluorobutírico (HFBA) para a identificação de NBOHs por GC-MS. No estudo, os autores derivatizaram os selos contendo 25C-NBOH e outras substâncias análogas, e obtiveram uma melhoria significativa na sua detecção por esse cromatógrafo, devido a produção de três picos diferentes. O pico maior seria o bis-derivado onde tanto a amina quanto o fenol são derivatizados, com um pico menor do mono-derivado no qual apenas a amina é derivada. De acordo com os autores a derivatização de HFBA é eficiente e simples, funciona bem com análogos do NBOH, supera a instabilidade térmica, evita a perda do grupo de identificação (hidroxibenzílicos) e permite a identificação desses compostos nesta técnica (36). Entretanto, a utilização da derivatização para identificação de 25R-NBOH por GC-MS apresenta alguns embaraços como: maior frequência de limpeza do equipamento e adaptação do laboratório para execução das etapas necessárias para derivatização. Ferrari *et al.* (2020) (35) conseguiram contornar as dificuldades da derivatização na identificação de 25R-NBOH por GC-MS, utilizando este equipamento com coluna analítica de 4 metros. Nesse estudo foi possível detectar, pela primeira vez, 25R-NBOH intactos, sem formação de 2C-R em GC-MS, (Figura 3b,c e d) (35).

Em um recente estudo, um método rápido de GC-MS foi desenvolvido por Bloom *et al.* (2023) (44) para triagem de amostras de drogas apreendidas, incluindo o 25B-NBOH e o 25R-NBOMe. Nesse trabalho, utilizou-se uma coluna cromatográfica de 1 m de comprimento e obteve-se uma corrida cromatográfica de aproximadamente 1 minuto. A validação do método demonstrou sua utilidade para análises qualitativas precisas e exatas de drogas apreendidas em sete classes diferentes de drogas, com resolução suficiente entre os analitos. Os autores afirmam que o uso de métodos rápidos de GC-MS pode permitir resultados de testes presuntivos mais rápidos e confiáveis para a análise de

drogas apreendidas. No entanto, o método apresenta algumas limitações, incluindo a seletividade limitada entre isômeros posicionais ou outros compostos estruturalmente semelhantes e apresenta faixa de concentração reduzida para análises (44).

Em resumo, a GC-MS é uma técnica analítica importante para a identificação de 25R-NBOH em selos apreendidos pela polícia. No entanto, a sua aplicação pode apresentar desafios analíticos, devido à termoestabilidade desses compostos. A utilização de estratégias de derivatização e a utilização de coluna analítica encurtada para a sua detecção intacta pode ser útil para superar esse desafio e melhorar a precisão da identificação por GC-MS.

### **1.3.2. Identificação de 25R-NBOH por cromatografia líquida de ultra alta pressão (UHPLC)**

Tendo em vista as dificuldades encontradas nas análises por GC-MS para a identificação de 25R-NBOH, a cromatografia líquida de ultra alta pressão (UHPLC, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) tem se destacado nas análises desses compostos, por além de apresentar alta resolução, rapidez e sensibilidade, também apresenta a vantagem de ser uma técnica fria, ideal para as análises de compostos termicamente instáveis ou que apresentam fragmentação pobre para a identificação no espectrômetro de massas por impacto eletrônico. Os principais detectores acoplados a essa técnica encontrados na literatura são o espectrômetro de massas de alta resolução tipo quadrupolo / tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS) e o espectrômetro de massas em tandem tipo triplo quadrupolo (HPLC-MS/MS) (7,27,29–33,45). Entretanto, não há na literatura nenhum estudo que utilize a UHPLC acoplada ao detector de arranjo de diodo para identificação do 25R-NBOH (UHPLC-DAD).

A UHPLC-MS é uma técnica analítica que permite a separação e identificação de compostos em amostras complexas. O princípio básico dessa técnica é a separação dos compostos em uma coluna cromatográfica com uma fase estacionária, geralmente uma fase reversa, e uma fase móvel líquida. Consiste na separação de compostos presentes em uma amostra em um processo físico-químico baseado na migração diferencial desses analitos em duas fases imiscíveis. As análises de UHPLC são realizadas em equipamentos totalmente automatizados utilizando colunas recheadas com material adsorvente (fase estacionária), sendo que a fase móvel é eluída sob alta pressão. Em seguida, os compostos

são ionizados e analisados por espectrometria de massas, o que permite a identificação da massa molecular e da composição da substância (41).

Para a caracterização e identificação de 25R-NBOH em selos, Arantes *et al.* (2017) (27) utilizou além do GC-MS, o método de UHPLC-QTOF-MS. Nesse último método, a separação das substâncias foi realizada em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm, tamanho da partícula 1,8 µm, Agilent Technologies), utilizando como fase móvel A (0,1% de ácido fórmico em água) e fase móvel B (0,1% de ácido fórmico em metanol). O composto foi detectado por espectrômetro de massas de alta resolução (QTOF-MS), que permite a identificação da massa exata e a composição molecular da substância. Para a confirmação da identidade de 25R-NBOH, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NRM) e ATR-FTIR (27).

Um estudo, realizado por Moraes *et al.* (2020) (32), utilizou a técnica de HPLC-MS/MS para a identificação e quantificação de 25R-NBOH (R= Cl, Br e I) e 25R-NBOMe (R= H, Cl, Br, I, G, D, Etil, N, T2) em amostras de selos apreendidos. Realizou-se a separação das substâncias em uma coluna Raptor Biphenyl (100 x 2,1 mm, tamanho da partícula 2,7 µm, Restek), a fase móvel consistia em 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B) (75:25, eluição isocrática). Os compostos foram detectados por espectrômetro de massas triplo quadrupolo com modo de ionização positiva em *electrospray* (ESI), essa técnica é frequentemente relatada como um poderoso instrumento analítico de quantificação, muito utilizado para identificação de NPS. Os autores destacaram que esta técnica analítica demonstrou-se ser seletiva, sensível e um poderoso método de *screening* além de ser extremamente eficiente para a detecção dos novos análogos de fenetilaminas (32).

Outro estudo desenvolveu e validou a UHPLC-MS/MS para a identificação de fenetilaminas derivadas (2C-C, 25R-NBOH e 25R-NBOMe, R= H, Cl, Br e I) e LSD em selos apreendidos e comprimidos de ecstasy (7). Realizou-se a separação das substâncias em uma coluna Zorbax SB-C8 (50x4,6 mm; tamanho da partícula 1,8 µm, Agilent Technologies), a fase móvel consistia em 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (B), utilizando gradiente de solventes. Os compostos foram detectados por espectrômetro de massas triplo quadrupolo com modo de ionização positiva em *electrospray* (ESI). Os autores destacaram que esta técnica analítica apresentou alta seletividade, sensibilidade (LOQ 5 ng/mL), com uma boa precisão e que esse método é interessante para a identificação desses analitos em matrizes complexas (7).

Assim, essa técnica é capaz de identificar e quantificar impurezas e outros compostos presentes na amostra, o que é importante para avaliar a pureza da droga apreendida, a identificação dos compostos presentes ou de subprodutos de rota sintética, além de seus produtos de degradação. A detecção por espectrometria de massas é altamente seletiva e sensível, permitindo a identificação de compostos mesmo em concentrações baixas e em misturas complexas. Isso é particularmente importante para as drogas sintéticas, que podem apresentar muitos compostos em sua composição (7).

Por outro lado, a HPLC-MS apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de amostras cuidadosamente preparadas e purificadas, pois alguns componentes presentes na matriz podem interferir nos resultados da análise, além de que partículas em suspensão podem prejudicar o funcionamento do equipamento. Além disso, a técnica é cara e requer treinamento especializado para sua operação e interpretação dos dados.

### **1.3.3. Identificação de 25R-NBOH por outras técnicas analíticas.**

Além das técnicas de cromatografia, existem outras abordagens analíticas para a identificação dos 25R-NBOHs, como as espectrometrias de massas (MS): a análise por ionização ambiente por spray sônico (*EASI-IMS*, do inglês *Easy Ambient Sonic-Spray Mass Spectrometry Imaging*) (46) ) e espectrômetro de massas de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de fourier (FT-ICR MS, do inglês *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*) (47). A espectrometria de massa é uma técnica poderosa para a identificação de moléculas desconhecidas, que envolve a ionização das moléculas e a análise da massa dos íons resultantes. Esta técnica pode ser utilizada em conjunto com a cromatografia, permitindo a identificação precisa de substâncias mesmo em misturas complexas (41).

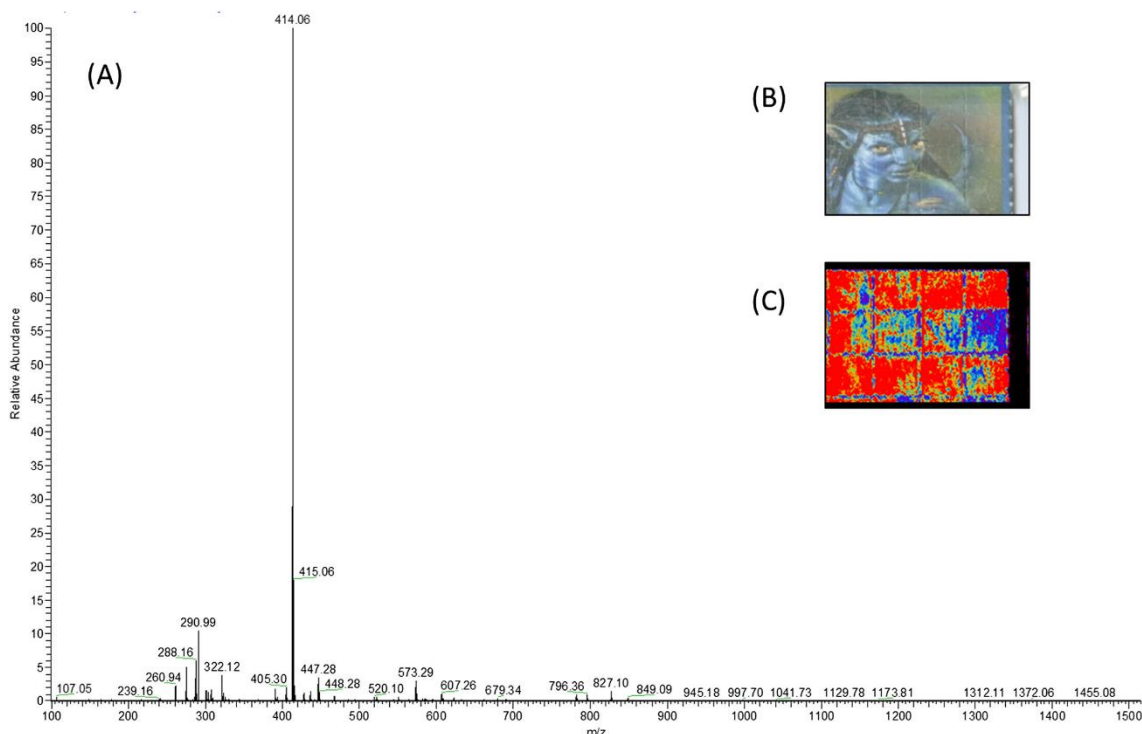
O estudo realizado por de Moraes *et al.* (2017) (46) aplicou o EASI-IMS com ionização em modo positivo para triagem de 7 drogas (entre elas o 25I-NBOH, Dois métodos são relatados na literatura para a identificação de 25R-NBOH e 25R-NBOMe em selos apreendidos. O primeiro método é o ATR-FTIR associado com a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Square-Discriminant Analysis*) (40); o segundo é a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) associado com análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) (48).

Por fim, Belchior *et al.* (2019) (49) estudaram o comportamento voltamétrico do 25I-NBOH, 25I-NBOMe e 2C-I, e determinaram as características eletroanalíticas desses compostos (49). Segundo os autores, esse método eletroanalítico demonstrou ser rápido, sensível para identificação de 25I-NBOH, de baixo custo, desenvolvido em plataforma portátil, e também conseguiu diferenciar as referidas substâncias. Entretanto esse tipo de abordagem só pode ser considerada como uma técnica analítica de triagem para discriminar com segurança ambas as substâncias encontradas nos selos (49).

) contidos em selos de apreensão. De acordo com o autor, a técnica fornece uma ferramenta muito simples, sensível, confiável e livre de voltagem para uma triagem. Essas propriedades são ideais para investigações forenses. Para a análise de selos de apreensão, nenhuma derivatização ou extração foi necessária, sendo uma análise não destrutiva realizada diretamente na superfície da matriz com poucas interferências, de modo que a amostra seja preservada para estudos posteriores (46).

O trabalho realizado por Santo *et al.* (2020) (47) explorou e revelou o perfil químico de 100 comprimidos e 79 selos apreendidos contendo drogas ilícitas e NPS, inclusive os 25R-NBOH e 25R-NBOMe, utilizando o FT-ICR MS com duas diferentes fontes de ionização em modo positivo por *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e ionização em modo positivo por *paper spray* (PSI, do inglês *Paper Spray Ionization*), sendo a ESI mais eficiente. Os autores demonstraram ser possível a análise direta de NPS com FT-ICR MS sem a necessidade de separação do analito da amostra por métodos de preparação ou cromatográficos (47).

**Figura 4.** Espectro de varredura completa realizado por EASI-IMS de selos apreendidos contendo o 25I-NBOH, tendo a imagem deo Avatar em um dos lados (A); Imagem do selo apreendido do Avatar (B); e visualização da distribuição espacial e temporal do íon  $m/z$  414,05 contido no selo por EASI-IMS (C).



**Fonte:** de Moraes *et al.* 2017 (46)

Outra técnica comumente usada na identificação de novas substâncias psicoativas, por apresentar alto grau de especificidade e sensibilidade, além de fornecer informações sobre a estrutura química da molécula, é a espectroscopia de infravermelho. Ela é baseada na interação da radiação eletromagnética, no infravermelho, com as ligações químicas do analito, ocasionando vibrações moleculares nos grupos funcionais. Essas vibrações geram um espectro de absorção característico que pode ser usado para identificar a presença de certas ligações químicas e grupos funcionais. As principais limitações da técnica de FTIR são a reduzida capacidade de analisar misturas complexas - exigindo a aplicação de métodos de purificação ou métodos de identificação secundária - e a dificuldade de aplicá-la em soluções aquosas, pois absorvem a maior parte da radiação (41).

Dois métodos são relatados na literatura para a identificação de 25R-NBOH e 25R-NBOMe em selos apreendidos. O primeiro método é o ATR-FTIR associado com a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Square-Discriminant Analysis*) (40); o segundo é a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared Spectroscopy*) associado com análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) (48).

Por fim, Belchior *et al.* (2019) (49) estudaram o comportamento voltamétrico do 25I-NBOH, 25I-NBOMe e 2C-I, e determinaram as características eletroanalíticas desses compostos (49). Segundo os autores, esse método eletroanalítico demonstrou ser rápido, sensível para identificação de 25I-NBOH, de baixo custo, desenvolvido em plataforma portátil, e também conseguiu diferenciar as referidas substâncias. Entretanto esse tipo de abordagem só pode ser considerada como uma técnica analítica de triagem para discriminar com segurança ambas as substâncias encontradas nos selos (49).

No entanto, é importante ressaltar que nenhuma dessas técnicas analíticas podem ser consideradas como única ou suficiente para a caracterização de uma NPS. Seria necessário o uso de múltiplas técnicas analíticas, além das citadas, para uma caracterização adequada e confiável dos 25R-NBOHs. Ademais, alguns desses métodos utilizam-se de métodos quimiométricos complexos, como PLS-DA (o que dificulta sua utilização na rotina de um laboratório forense) (40,48), não são técnicas comumente encontradas nesses laboratórios (46,47,49) ou são extremamente caras (46,47).

#### 1.4.HPLC-DAD NA IDENTIFICAÇÃO DE FENETILAMINAS N-BENZIL-SUBSTITUÍDAS E OUTRAS NPS

O Detector de Arranjo de Diodos (DAD) é um tipo de detector utilizado em cromatografia líquida (HPLC) que permite a detecção de múltiplos comprimentos de onda simultaneamente. Diferentemente dos detectores convencionais, que operam em apenas um comprimento de onda fixo, o DAD é capaz de detectar toda a faixa do espectro de absorção dos compostos em análise, que vai do comprimento de onda do ultra violeta ao visível, fornecendo uma informação adicional que pode ser utilizada para confirmação da identidade dos materiais investigados (41).

O princípio de funcionamento do DAD baseia-se na passagem de um feixe de luz de espectro contínuo, por meio de fontes intercambiáveis com lâmpadas de tungstênio e deutério, focalizadas através de uma lente sobre a amostra em fluxo, em que os compostos absorvem a luz em diferentes comprimentos de onda, gerando um sinal que é detectado por uma série de diodos. Cada diodo detecta um comprimento de onda diferente, de forma que é possível construir um espectro de absorção para cada composto, que é utilizado para confirmar sua identidade (41)

As vantagens do uso do DAD incluem a capacidade de detectar e quantificar múltiplos compostos individualmente, a alta sensibilidade e especificidade para

compostos cromóforos. Porém, assim como qualquer técnica analítica, o uso do DAD também apresenta desafios, como a interferência de compostos co-eluentes que podem mascarar a absorção de compostos de interesse, além disso a seleção adequada da coluna cromatográfica e da fase móvel é crítica para a eficácia da análise (41,50).

No entanto, o DAD apresenta como ferramenta para avaliação da pureza a sobreposição dos espectros do início, topo e fim de um pico cromatográfico (*upslope*, *top* e *downslope*) e ir simultaneamente armazenando os dados. Utilizando este recurso, picos de interferência podem ser identificados de forma eficiente em análises cromatográficas, sendo também conveniente para identificação de espécies e seleção de melhores condições cromatográficas na determinação quantitativa de fármacos (51).

A HPLC-DAD ou UHPLC-DAD têm sido utilizadas nas análises de identificação das fenetilaminas N-benzil-substituídas, incluindo compostos como o 2C-R e o 25R-NBOME (52–56). ). Na área forense, o HPLC-DAD vem sendo utilizado como uma alternativa para a caracterização e a identificação desses compostos, fornecendo informações valiosas sobre sua composição química e a presença em amostras apreendidas. Os motivos para isso são que essa técnica pode ser aplicada para as análises de substâncias termolábeis, além da sua robustez, fácil manipulação, apresenta espectros de UV com alta especificidade e baixa sensibilidade a interferente presente na matriz (efeito matriz) (50,57–60). O HPLC-DAD vindo sendo aplicado como técnica complementar de identificação ao GC-MS (61,62) e além de análise complementar, também vem auxiliando a diferenciar isômeros de posição nas análises por HPLC-MS/MS (55).

Um exemplo de estudo que utilizou o UHPLC-DAD para a identificação de fenetilaminas substituídas é o trabalho de Edmunds *et al.* (2017) (52). Os compostos investigados foram: 25R-NBOMe [R = H, Br, I, Cl, T (metiltio), D (metil), E (Etil), G (3,4-dimetil)], 25I-NBMD e 25I-NBF. Os autores utilizaram uma coluna cromatográfica C18 de 100×2,1 mm com partícula de 1,7 µm e uma corrida em modo isocrático contendo fase móvel composta por 70% de metanol e 30% de água com 0,2% de pirrolidina e 0,1% ácido acético glacial. Eles conseguiram separar eficientemente os compostos de interesse e tratá-los com base em seus tempos de retenção e espectros de absorção no DAD. Após o desenvolvimento, 119 selos apreendidos na Austrália foram analisados entre 2014 e 2016. O estudo encontrou uma concentração média de 69 3µg/selo, variando entre 553 a 1100 µg/selo, para o 25C-NBOMe; 740 µg/selo, variando entre 123 a 1480 µg/selo para o 25B-NBOMe; 642 µg/selo, variando entre 114 a 1193 µg/selo para o 25I-NBOMe. Os autores concluíram que o método foi eficiente e rápido para quantificação de NBOMe em

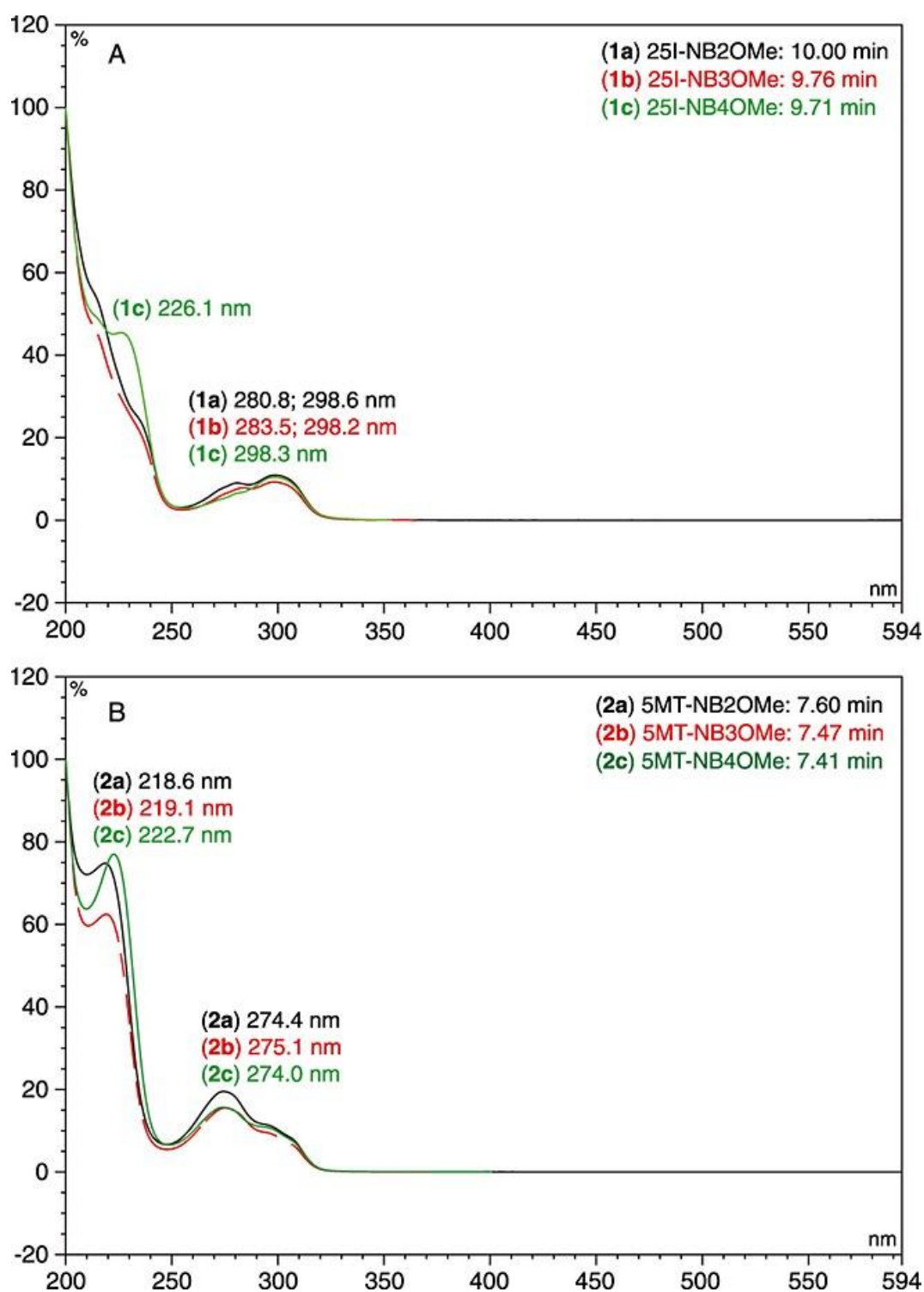
selos, que houve diferença significativa nas quantidades detectadas e que essa diferença pode levar a um aumento nas chances de efeitos adversos devido às inconsistências nas dosagens(52).

O HPLC-DAD também é usado como uma técnica complementar ao HPLC-MS/MS para distinguir os isômeros de posição das amostras contendo NPS, como as fenetilaminas N-benzil-substituídas (NBOMes) (55) (Figura 5), triptaminas sintéticas (55,63), derivados de piperazinas (TFMPP e CPP) (64), os isômeros estruturais dos análogos de fentanil (ciclopropilfentanil e crotonilfentanil) (65), bem como técnica complementar ao GC-MS para diferenciação dos isômeros das catinonas sintéticas (61,62,66) e para separação quiral de 24 catinonas derivadas (67). Rowe 2017 (62) relatou que "o uso de um detector UV na análise de catinonas sintéticas ajudou na identificação de isômeros de posição que eram indistinguíveis por GC-MS convencional" (62). Em outro estudo, o HPLC-DAD permitiu a diferenciação de regioisômeros resultantes de diferentes padrões de substituição no anel aromático de catinonas (61). Partes separadas da molécula e substituintes isolados que não são inerentemente ativos ao grupamento, que não absorve na região do UV, não contribuem diretamente para a absorção, mas podem alterar o espectro por hiperconjugação ou efeitos estéricos (50).

Além disso o HPLC-DAD pode ser utilizado como método de identificação (68) ou de triagem e posterior confirmação com UHPLC-MS/MS ou GC-MS para identificação de NPS em amostras biológicas, (8,66,69). Tudo isso corrobora os resultados aqui encontrados, demonstrando que o detector de DAD consegue avaliar pequenas mudanças nos grupamentos estruturais das moléculas, tornando-se assim um poderoso instrumento para detecção e caracterização das NPS.

**Figura 5.** Espectros de UV adquiridos por DAD e tempo de retenção obtidos por HPLC para isômeros de N-(metoxibenzil)-substituídos: (A) isômeros de 25I-NBOMe (1a)-(1c) e (B) isômeros de 5MT-NBOME

(2a)-(2C). A diferenciação dos isômeros só foi possível com a combinação da varredura completa do espectro de UV e os dados de tempo de retenção.



Fonte: Brandt *et al.* (2014) (55)

#### 1.4.1. Biblioteca UV TOX para HPLC-DAD

O HPLC-DAD vem sendo utilizado como ferramenta de triagem de amostras desconhecidas, através de bibliotecas que abrangem o maior número possível de drogas, medicamentos e toxinas (50,58,60,69). Lehmann *et al.* (2020) (69) desenvolveram um método automatizado de extração em fase sólida-cromatografia em conjunto a um UHPLC-MS/MS para a determinação de 97 estimulantes na urina, incluindo estimulantes convencionais (anfetamina e MDMA) e NPS (25R-NBOME), dos quais 68 analitos foram totalmente validados para quantificação. Nesse estudo, os autores utilizaram o HPLC-DAD em conjunto com a biblioteca UV TOX para triagem desses compostos (69).

A biblioteca UV TOX foi desenvolvida por Pragst *et al.* (2001) (70) e é composta por 2682 espectros de UV de substâncias com relevância toxicológica e os tempos de retenção relativo (TRR). Apesar dos desafios enfrentados para a reprodução das condições cromatográficas em diferentes laboratórios, o TRR pode ser utilizado como um critério inicial de identificação. Além disso, a biblioteca permite a comparação dos máximos, mínimos e ombros dos espectros de UV, o que possibilita a identificação das substâncias nas análises de rotina (50). A UV TOX tem sido amplamente utilizada em análises toxicológicas, contribuindo para uma identificação mais precisa e confiável de substâncias em amostras brutas e biológicas (50,51,69). No entanto, é importante ressaltar que a biblioteca apresenta algumas limitações, como a ausência de espectros de UV para todas as substâncias relevantes (como as NPS) e a necessidade de verificação com outros métodos analíticos para confirmação da identificação.

De acordo com Pragst *et al.* (2004) (50), entre as 2682 substâncias, foi estabelecido o sistema de absorção para 2560 delas. Desses, 1650 diferentes sistemas de absorção foram encontrados, o que sugere alta especificidade dos espectros. O valor de similaridade (SI) foi calculado para todos os possíveis pares de substâncias, mostrando que 60,4% apresentaram um espectro único. A inclusão do tempo de retenção relativo melhorou a seletividade, identificando 84,2% das substâncias de forma inequívoca. De acordo com os autores, comparado com os métodos de GC-MS, a seletividade da HPLC-DAD não fica muito atrás (50).

Os espectros UV armazenados na biblioteca foram obtidos na faixa de 200 a 380 nm com uma resolução de 1 nm. Para identificar o espectro de UV de um composto desconhecido, é realizada uma comparação com a biblioteca de espectros UVTOX. Isso é feito adquirindo-se o espectro de UV do composto por meio de HPLC-DAD e comparando-o com os espectros da biblioteca usando similaridade espectral. A similaridade espectral é calculada comparando-se a forma e a intensidade das curvas de

absorção na faixa de comprimentos de onda de 200-380 nm. Para essa comparação, os espectros são tratados como vetores de  $n$ -dimensões no espaço, onde os valores de  $n$  representam os pares de dados (Abs $\times$ lambda). A forma do espectro determina a direção do vetor no espaço, enquanto o comprimento é proporcional à concentração. Define-se o índice de similaridade como o cosseno do ângulo beta entre os vetores obtidos (50).

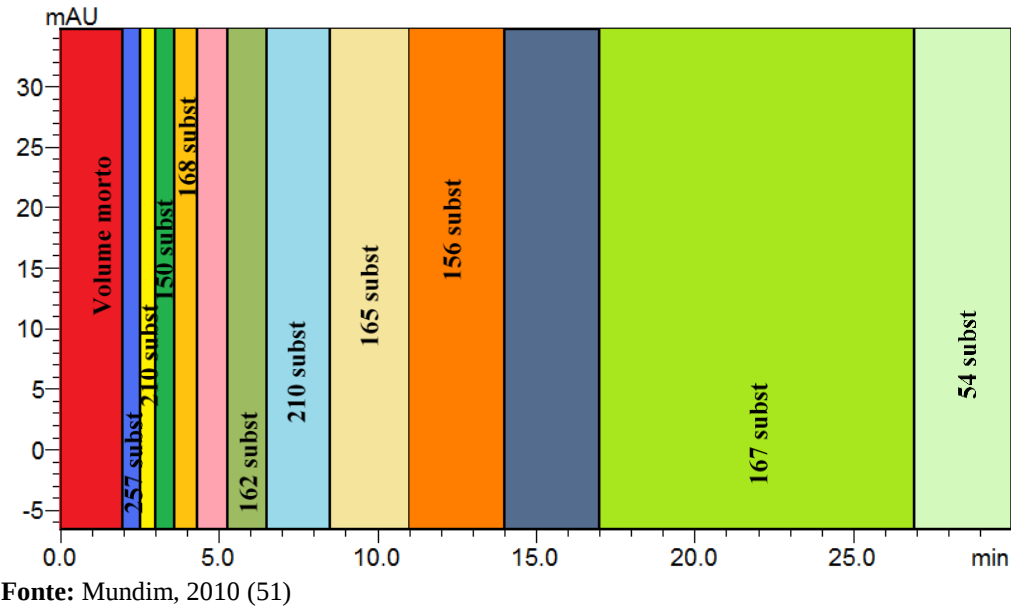
De acordo com Mundim (2010) (51), a referida biblioteca de dados, UVTOX (70), foi criada a partir dos valores de TRR de todas as substâncias e foi dividida em sub-bibliotecas de acordo com a região do TRR. Dessa forma, o TRR é utilizado como o primeiro filtro de possíveis candidatos na identificação de substâncias desconhecidas, submetendo compostos eluídos em uma janela de tempo específica para busca em uma biblioteca espectral (51). a Tabela 1 e a Figura 6 foram disponibilizadas por Mundim 2010 para melhor compreensão da biblioteca (51).

**Tabela 1.** Biblioteca UVTOX organizada em faixas de TRR (70).

| Sub-Biblioteca | Região TRR    | Número de espectros |
|----------------|---------------|---------------------|
| TRRA01         | $\leq 0,050$  | 257                 |
| TRRA02         | 0,051 – 0,100 | 210                 |
| TRRA03         | 0,101 – 0,150 | 150                 |
| TRRA04         | 0,151 – 0,220 | 168                 |
| TRRA05         | 0,221 – 0,320 | 172                 |
| TRRA06         | 0,321 – 0,450 | 162                 |
| TRRA07         | 0,451 – 0,650 | 210                 |
| TRRA08         | 0,651 – 0,900 | 165                 |
| TRRA09         | 0,901 – 1,200 | 156                 |
| TRRA10         | 1,201 – 1,500 | 122                 |
| TRRA11         | 1,501 – 2,500 | 167                 |
| TRRA12         | $> 2,500$     | 54                  |
| TRRB01         | $\leq 0,700$  | 324                 |
| TRRB02         | 0,701 – 1,200 | 148                 |
| TRRB03         | $\geq 1,200$  | 217                 |

**Fonte:** Mundim, (2010) (51)

**Figura 6.** Cromatograma hipotético da distribuição das faixas dos TRR.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1.OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa desenvolver, validar e implementar uma rotina analítica por cromatografia líquida de ultra alta pressão acoplada a detector de arranjo de diodos (UHPLC-DAD) para analisar o perfil químico dos principais compostos encontrados em selos apreendidos pela PC-DF.

### 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a metodologia desenvolvida em UHPLC-DAD comprovando a sua aplicabilidade para a execução de análises de quantificação dos 25R-NBOHs;
- Desenvolver uma biblioteca de espectros de absorção no UV-Vis, para os seguintes compostos, 25H-NBOH, 25C-NBOH, 25B-NBOH, 25E-NBOH, 25I-NBOH, 25H-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25E-NBOMe, 25I-NBOMe e LSD através da técnica de UHPLC-DAD
- Avaliar amostras reais em uma rotina analítica e a estabilidade dos 25R-NBOH e 25R-NBOMe presente nos selos.

### 2.3. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O desenvolvimento deste trabalho irá contribuir para identificação inequívoca dos 25R-NBOHs, evitando assim que análises incorretas acarretem julgamentos equivocados. Além disso, avaliar a estabilidade desses compostos traz segurança jurídica aos laboratórios forenses, pois com esse estudo é possível saber como e por quanto tempo esses analitos podem ser armazenados e, se necessário, serem reanalisados. Além do mais, a maioria dos laboratórios de química forense estaduais brasileiros, os quais são responsáveis pela análise de drogas brutas, possuem um GC-MS. Alguns possuem também um HPLC-DAD. Os laboratórios forenses que têm HPLC-MS/MS, utilizam tal equipamento para análises toxicológicas. Portanto, uma técnica de identificação de 25R-NBOH que incluía análise por GC-MS e UHPLC-DAD seria de grande valia para a comunidade forense.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. Reagentes

- Padrões de referências de 2C-C, 2C-E, 25H-NBOMe, 25C-NBOH, 25B-NBOH, 25E-NBOH, 25I-NBOH, 25E-NBOMe, com grau de pureza  $\geq 99,9\%$ , marca Cayman Chemical (EUA)<sup>®</sup>;
- Padrões de referências de 2C-B, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe e 25-NBOMe, com grau de pureza  $\geq 99,9\%$ , fornecido pela *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC);
- Padrão de referência de 2C-I, com grau de pureza  $\geq 99,9\%$ , fornecido pela *United States Drug Enforcement Administration* (DEA);
- 25H-NBOH e LSD foram preparados a partir de drogas de apreensões previamente analisadas por GC-MS e FTIR.
- Histamina, Benzeno, 5-(4-Metilfenil)-5-fenil-hidantoina (MPPH) e cafeína com, grau de pureza  $\geq 99,9\%$ , marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.
- Acetonitrila P.A., com grau de pureza  $\geq 99,9\%$ , marca Scharlau<sup>®</sup>;
- Metanol para LC-MS, CH<sub>3</sub>OH, com grau analítico de pureza  $\geq 99,9\%$ , e fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), com grau analítico de pureza  $\geq 98\%$ , marca Merck KGaA<sup>®</sup>;
- Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 85%, com grau analítico de pureza  $\geq 85\%$ , marca Alphatec<sup>®</sup>;
- Água ultrapurificada, H<sub>2</sub>O obtida através de ultrapurificador Milli Q<sup>®</sup>, marca Merck Millipore<sup>®</sup>.
- Utilizaram-se selos em branco “livre de drogas” para os procedimentos de otimização e validação como controle.

##### 3.1.2. Equipamentos e Instrumentos

- Ultrassom;
- Balança analítica da marca Shimadzu<sup>®</sup>, modelo AX200;
- Centrífuga de bancada para microtubos da marca SOLAB<sup>®</sup>, modelo SL-702;

- Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência da marca Agilent<sup>®</sup>, modelo *Agilent 1290 Infinity II LC System*, com auto injetor G4226A, bomba binária L-G4220A, detector de arranjo de fotodiodos (DAD) G4212A, sistema operador software *OpenLab EZChrom Edition*;
- pHmetro da marca Lucema<sup>®</sup>, modelo LUCA-210;
- Micropipeta volume variável monocanal de 20-200 µL da marca Pipetman<sup>®</sup> e micropipeta variável monocanal basic de 100-1.000 µL da marca Pipetman<sup>®</sup>.

### 3.1.3. Soluções

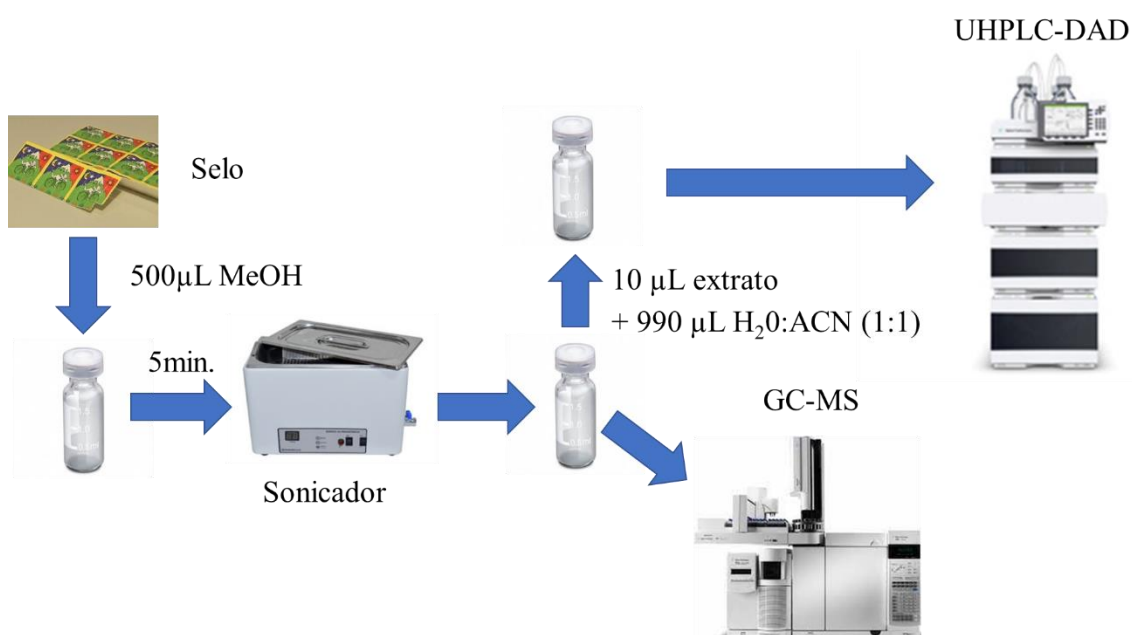
- Solução estoque dos padrões foi preparada em metanol, a 1000 µg/mL.
- Soluções de trabalho dos padrões foi preparada:
  - 25R-NBOH, 25R-NBOMe, 2C-R e LSD: foram preparados por diluição seriada da solução estoque com acetonitrila grau LC-MS e água (1:1); concentração final de 20 µg/mL. Armazenaram-se as soluções em frascos a - 20 °C.
  - Histamina, 5-(4-Metilfenil)-5-fenil-hidantoina (MPPH) e cafeína: foram preparados por diluição seriada da solução estoque com acetonitrila grau LC-MS e água (1:1); concentração final de 50 µg/mL. Armazenou-se as soluções em frascos a - 20 °C.
  - Benzeno: foi preparado por diluição seriada do padrão analítico com acetonitrila grau LC-MS e água (1:1); concentração final de 500 µg/mL. Armazenou-se a solução em frasco a - 20 °C.
- Fase Móvel – ACN:Tampão fosfato 0,1M (pH 2,3), proporção de 37:63 (50)
- Tampão Fosfato 0,1M (pH 2,3) 2,0%: O foi preparado pela adição de 6,6g de fosfato de potássio monobásico em um béquer de vidro com a adição de 1000mL de água destilada. Essa solução foi agitada e posteriormente foi ajustado o pH para 2,3 com ácido fosfórico.
- Para preparação da fase móvel os reagentes foram medidos em provetas graduadas separadas, nas respectivas proporções e, em seguida foram misturados em um béquer de vidro. A fase móvel foi filtrada e armazenada em frasco de vidro tipo *Schott*.

## 3.2.MÉTODOS

### 3.2.1. Procedimento do preparo de amostra para análise cromatográfica

Selos de apreensões pela Polícia Civil do Distrito Federal, estocados a temperatura ambiente e sem exposição de luz, foram adicionados em frasco contendo 0,5 mL de metanol. Posteriormente, foi sonicado por 5 min. e analisou-se o extrato por GC-MS, de acordo com o método descrito por Ferrai *et. al.* (2020) (35) (Figura 7).

**Figura 7.** Fluxo de análise do procedimento do preparo de amostra para as análises cromatográficas



**Fonte:** Autoria própria (PowePoint 2016).

Para injeção em UHPLC-DAD, adicionou-se, em outro frasco, 10 µL do extrato e 990 µL de ACN e água (1:1). Após sonicação de 5 min. o extrato foi analisado. Preparações contendo apenas ACN também foram testadas; entretanto, resultou-se em alargamento de pico e consequentemente, na diminuição da resolução.

### 3.2.2. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido, Agilent 1290, com auto injetor G4226A, bomba binária G4220A, e detector de arranjo de fotodiodos (DAD) G4212A. A separação cromatográfica se deu de através uma coluna analítica Zorbax, Eclipse Plus RP18 (2,1×100 mm×1.8µm) da marca Agilent<sup>®</sup>, mantida a 25°C, utilizando

um método de separação isocrático, cuja fase móvel era composta por ACN: tampão fosfato 0.1M (pH 2.3), (63:37; v/v), com fluxo de 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 5.0 µL. Os parâmetros do DAD para a abertura da fenda (slit) e aquisição espectro (step) foram de 1.0 nm e 0.2 nm, respectivamente, com tempo de corrida de 10 minutos. O software utilizado para coletar, integrar e analisar os dados cromatográficos foi o *Agilent OpenLab EZChrom*.

Para o estabelecimento dos parâmetros de qualidade do equipamento e aquisição do tempo de retenção relativo (TRR), injetaram-se 2,0 µL de uma solução contendo padrões de histamina, cafeína, MPPH a 50 µg/mL e benzeno a 500 µg/mL. Avaliou-se o tempo morto pela histamina, a cafeína foi utilizada para a avaliação da reprodutibilidade do injetor e o MPPH para o cálculo do TRR. Avaliou-se a resolução, acurácia e reprodutibilidade da aquisição do espectro de ultravioleta (UV) por intermédio do espectro do benzeno. Fixou-se a faixa de absorção para aquisição e avaliação dos espectros de UV entre 195 a 380nm. O comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 225nm foi usado na validação para a aquisição das áreas. De acordo com a literatura, este comprimento de onda ( $\lambda$ ) é o suficiente para identificar 2682 compostos, usado no método proposto por Pragst *et al.* (2004) (50).

### **3.2.3. Validação do método analítico para quantificação de 25R-NBOH**

Validou-se o método para linearidade, carreamento de amostra (do inglês, *carryover*), seletividade, repetibilidade, precisão intermediária, acurácia (bias), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), robustez e estabilidade térmica, para 25R-NBOH (R = Br, Cl, I e etil).

Estimou-se a linearidade da curva por padrão em matriz utilizando oito concentrações diferentes (0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 25,0 µg/mL ); entretanto, foi injetado no equipamento a quantidade de 5,0 µL de cada solução. Utilizou-se para o cálculo da curva, em cada ponto, a média das áreas normalizadas (área do analito/ IS área) e o *post-hoc test* (*Grubbs test*) para a detecção de outliers. O teste F foi aplicado para avaliação da linearidade ( $p \leq 0.05$ ) (71).

O carreamento de amostra foi examinado por meio das análises dos selos, sem padrão adicionado, após as injeções dos pontos da curva analítica com as concentrações mais elevadas, 25,0 µg/mL (branco, n = 3). A avaliação do carreamento de amostra se deu pela ausência de picos nos cromatogramas correspondentes às soluções dos brancos.

A avaliação da seletividade foi realizada pela análise, em branco (selos), sem padrão interno, da presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos, levando-se em conta os espectros de UV das fenetilaminas presentes na biblioteca deste trabalho e dos espectros da biblioteca UVTOX (70).

Mensurou-se o efeito de matriz pela comparação entre a área média normalizada dos padrões de interesse adicionados em amostras de selo em branco, com a área média normalizada dos respectivos padrões diluído em solvente e expresso em porcentagem. Avaliaram-se dois níveis de concentrações 1,0 e 5,0 µg/mL. O teste *t* de Student foi utilizado para comparação de duas variâncias (amostra fortificada e amostra em solvente), seguido de um teste F para avaliar se o efeito da matriz foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Para o teste F, se o F calculado fosse maior que o F tabulado, as variâncias não poderiam ser consideradas iguais; ou seja, a matriz tem um efeito importante na precisão do método, na faixa de concentração em estudo. Para o teste *t* de Student, se o valor *t* calculado for menor que o *t* tabelado, pode-se concluir que a matriz não afeta o teste (71).

A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas após a adição de uma mistura dos padrões em selo em branco com três diferentes concentrações: 0,25, 5,0 e 25,0 µg/mL. Para validação de precisão intermediária, dois analistas diferentes repetiram todo o procedimento em dias diferentes (71). A recuperação foi determinada por meio da porcentagem da concentração dos selos enriquecidos com os padrões em duas concentrações (1,0 e 5,0 µg/mL) analisados no decorrer de dois dias consecutivos ( $n = 6$ ). Os critérios de aceitação foram recuperação dentro de  $\pm 20\%$  (72) e repetibilidade e precisão intermediária menor que 7,3 % de desvio padrão relativo (DPR) (71).

Definiu-se o LOD do método, para cada analito em matriz, como  $\mu + 3,3s$ , quando “ $\mu$ ” é a média do sinal-ruído e “ $s$ ” é o desvio padrão das 10 diferentes amostras em branco. O LOQ do método foi definido, para cada analito em matriz, como o nível mais baixo no qual o método foi validado dentro dos critérios de aceitação para exatidão, repetibilidade e precisão intermediária (71).

Para aceitação dos critérios de robustez, o tempo de retenção de cada substância ( $n = 17$ ), analisado no tempo “zero”, 1 dia e 7 dias, deveria apresentar um desvio padrão relativo  $< 2,0\%$  (72). Todas as amostras foram armazenadas no amostrador do LC (10 °C) durante o teste de robustez e análise da estabilidade térmica. Para a avaliação da estabilidade térmica os frascos foram analisados e reanalisados após 48 h. A variação da relação 2C-R/25R-NBOH após o período de estocagem não deveria ultrapassar 8,0% para que o analito fosse considerado estável em condições de laboratório ( $n = 3$ ).

### **3.2.3.1. Preparação das soluções padrão**

A solução estoque dos padrões (histamina, cafeína, MPPH) foram preparados pela dissolução de 1 mg dos analitos em 1 mL de metanol (concentração de 1,0 mg/mL), sendo que os demais analitos já se encontravam preparados nas mesmas condições. A curva de calibração foi montada a partir de diluições da solução estoque para obtenção da faixa de concentração de 0,05 – 25,0 µg/mL (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 25,0 µg/mL).

### **3.2.4. Condições cromatográficas para desenvolvimento de biblioteca de UV e TRR.**

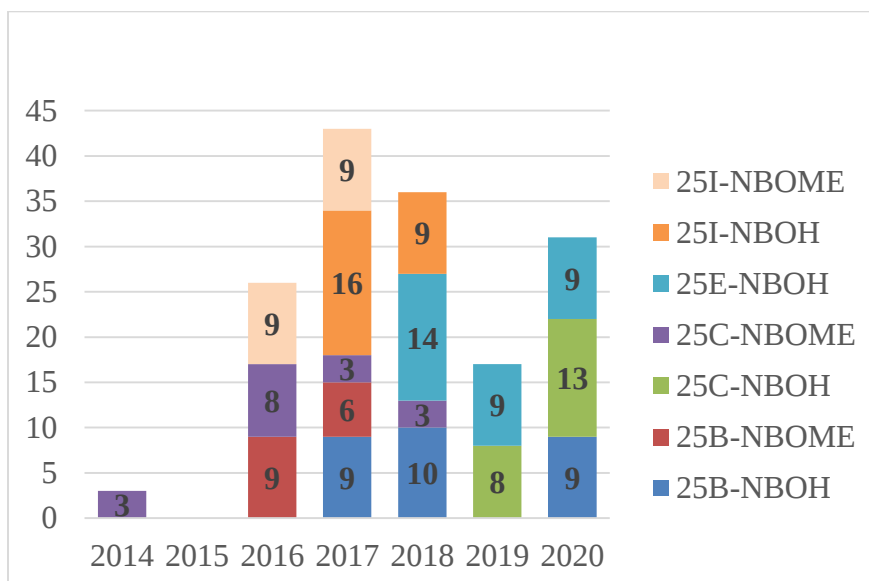
A biblioteca contendo os espectros de UV e o tempo de retenção relativo (TRR) foi configurada para quatro colunas diferentes: UHPLC Zorbax, Eclipse Plus RP18 (2,1×100 mm×1,8µm), Agilent; UHPLC Zorbax, Eclipse Plus RP8 (2,1×100 mm×1,8µm), Agilent; UHPLC Poroshell 120 RP8ec (3,0×100 mm×1,9µm), Agilent e HPLC LiChrosphere RP8ec (4,0×250 mm×5,0µm), Merck/Darmstadt. Para as colunas UHPLC, o fluxo da fase móvel foi ajustado para 0,3 mL/min e para o HPLC LiChrosphere RP8ec, 1,0 mL/min.

### **3.2.5. Estudo de estabilidade**

Cento e cinquenta e seis (156) amostras (selos) apreendidas entre 2014 e 2020, pela Polícia Civil do Distrito Federal, foram reanalisadas para avaliar uma eventual degradação de 25R-NBOH (Cl, Br, I e Etil) e 25R-NBOMe (Cl, Br, I e Etil) após armazenamento prolongado em temperatura ambiente e sem exposição à luz. A frequência de cada substância por ano é mostrada na Figura 8.

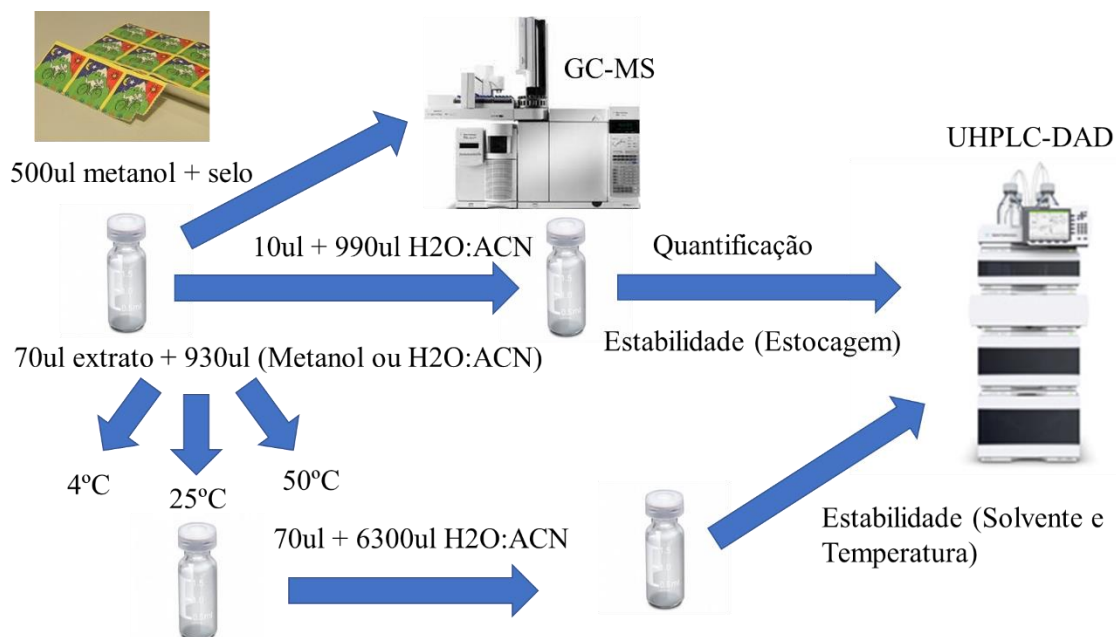
Transferiram-se 70 µL do extrato metanólico preparado para análise no GC-MS para seis frascos diferentes, três deles contendo 930 µL de água/acetonitrila (1:1), e os demais, 930 µL de metanol, para simular armazenamento em solvente. Armazenaram-se os frascos, para cada solução, a 4,0, 25 e 50 °C, por 0, 2, 5, 7, 12, 28 e 50 dias (Figura 9).

**Figura 8.** Selos contendo 25R-NBOH ou 25R-NBOMe reanalisados de 2014 a 2020, de acordo com o ano da apreensão.



**Fonte:** Autoria própria (Excel 2016).

**Figura 9.** Fluxo de análise do procedimento do preparo de amostra do estudo de estabilidade.



**Fonte:** Autoria própria (PowePoint 2016).

Para análise no UHPLC-DAD, 70 µL de cada amostra armazenada em diferentes temperaturas foram alíquotadas para outro frasco, além de 630 µL de água/ACN (50:50%). Posteriormente, foram agitados em vórtex (30 s) e então analisados (Figura 9). Utilizaram-se quatro amostras, para cada analito, 25R-NBOH e 25R-NBOMe (total de 28 amostras), para proceder ao estudo de estabilidade. Na primeira análise (tempo “zero”), a presença do 2C-R e a razão 2C-R/25R-NBOH ou 2C-R/25R-NBOMe foram utilizados

como parâmetro para avaliação da estabilidade da amostra. Considerou-se, como 2C-R não detectado, quando a relação se encontrava abaixo de 1,0%.

A respectiva apreensão e os dados de reanálise de cada amostra e das substâncias detectadas encontram-se descritos nas Tabela 12 e Além disso, outros fatores podem influenciar a clivagem do 25R-NBOH na análise por GC-MS, como o comprimento da coluna (35). Por isso, a reanálise dos selos por UHPLC-DAD, uma técnica fria ideal para substâncias termolábeis, após longo armazenamento e avaliação de possível degradação em solvente ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas, pode ajudar a entender o mecanismo de degradação do 25R-NBOH em 2C-R.

Avaliou-se que na análise “tempo zero”, 2C-R foi detectado em 4 amostras contendo 25R-NBOMe e 36 com 25R-NBOH, na proporção de 1,0 - 2,5% (Tabela 12 e **Erro! Autoreferência de indicador não válida.**). Não se pode concluir que os 2C-R detectados sejam precursores da síntese de 25R-NBOH (32,81) e/ou subproduto de degradação do 25R-NBOH (27,35), como já foi discutido por Edmund *et al.* (2018) (52). No entanto, considerando o grande tempo de armazenamento das amostras reais analisadas nesse estudo, é plausível concluir que NBOH e NBOMe são estáveis a longo prazo quando armazenados em temperatura ambiente e sem exposição à luz.

**Tabela 14** das seções 4.4.2 e 4.5, respectivamente..

### 3.2.6. Análise de dados

Os testes quantitativos desenvolvidos neste estudo foram realizados em triplicata e os dados numéricos apresentados como média aritmética das três medidas  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram efetuadas através dos programas Microsoft Excel 2016.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. BIBLIOTECA DE TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO (TRR) E ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA (UV)

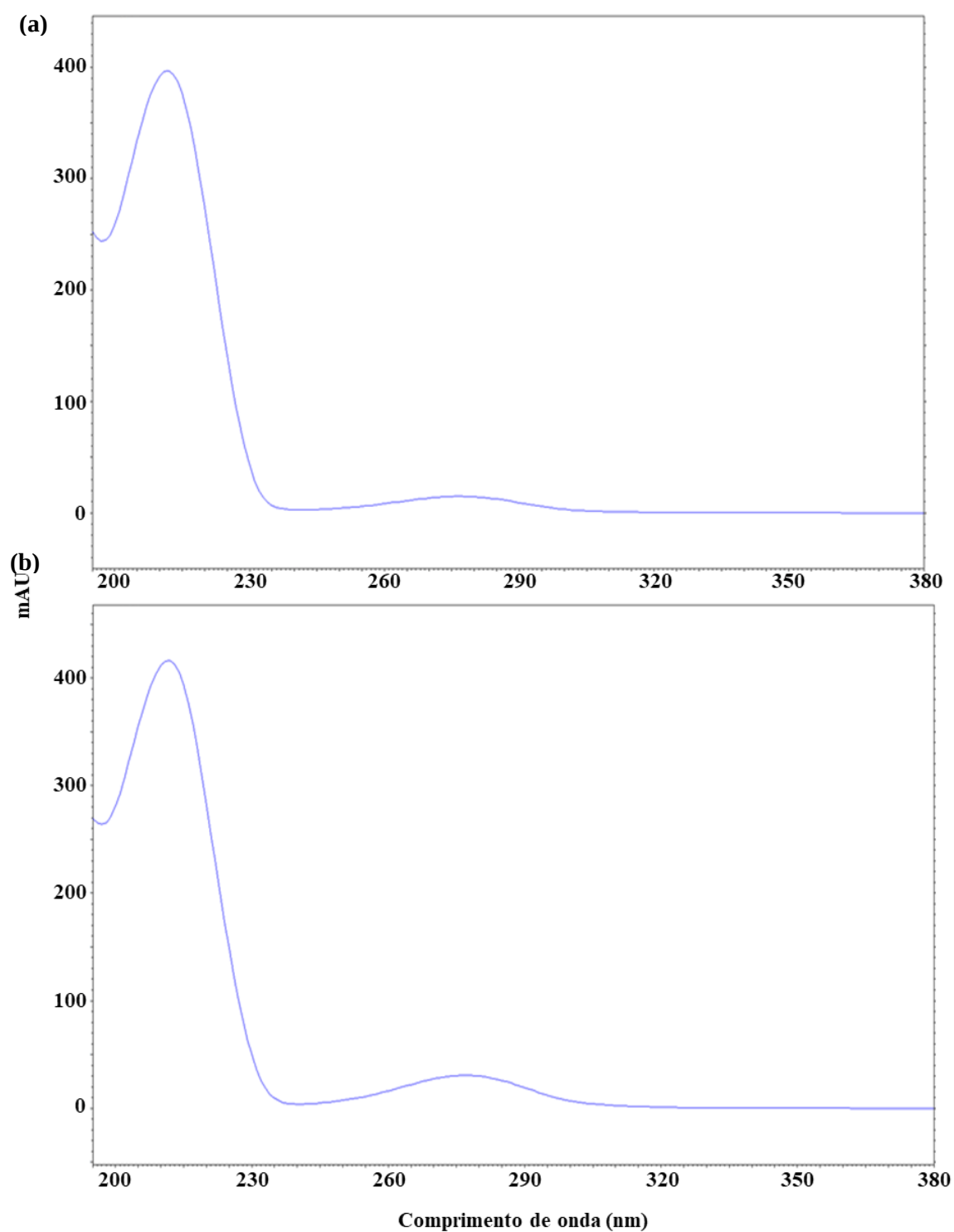
Neste trabalho foi desenvolvido uma biblioteca contendo TRR (Equação 1) e espectros de UV dos analitos estudados: 25R-NBOH, 25R-NBOMe, 2C-R e LSD. Esta biblioteca foi produzida com o intuito de ser intercambiável com a biblioteca comercial UV TOX - Pragst (70), utilizando-se, desta última, a mesma faixa de comprimento de onda (200 a 380 nm) e as mesmas condições cromatográficas, : fase móvel (ACN:Tampão fosfato 0,1 M, pH 2,3, proporção de 37:63), fluxo (1,0 mL/min) e a mesma coluna de HPLC. Além do mais, também foi adquirido UV e TRR usando colunas UHPLC.

$$TRR_i = \frac{(TR_i - t_0)}{(TR_{MPPH} - t_0)} \quad \text{Equação 1}$$

TRR é o tempo de retenção relativo da amostra *i*; TR é o tempo de retenção da amostra *i*; *t*<sub>0</sub> é o tempo morto; e TRMPPH é o tempo de retenção do padrão interno do método. Para isso, diferentes fluxos foram testados (0,15, 0,3 e 0,4 mL/min) e os melhores resultados foram alcançados com 0,3 mL/min, pois o fluxo de 0,15 mL/min acarretou alteração dos espectros de UV obtido da histamina em 277 nm (Figura 10); isso se deu provavelmente pelo aumento das interações moleculares com o solvente, acarretado pelo baixo fluxo cromatográfico. Por outro lado, o fluxo de 0,4 mL/min apresentou pouca resolução na corrida cromatográfica.

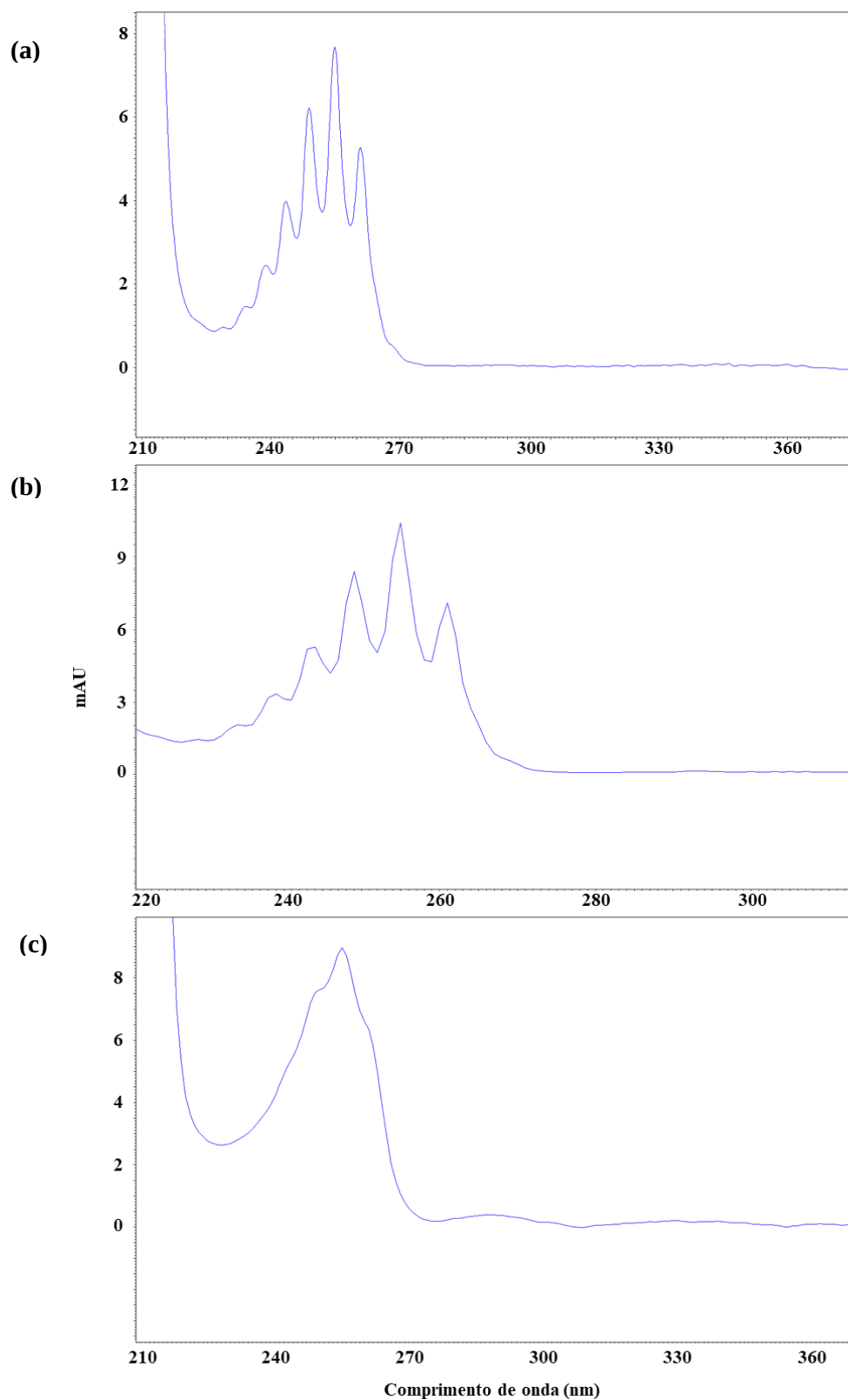
Parâmetros do DAD foram otimizados a fim de adquirir melhor resolução dos espectros de UV. Duas medias foram avaliadas: a abertura da fenda (*slit*) e a aquisição e dos dados (*step*). Para a abertura da fenda comparou-se *slit* em 1,0 nm (Figura 11b) e 4,0 nm (Figura 11c), no qual se demonstrou a perda da resolução do espectro com o aumento da fenda. No que se diz respeito ao *step*, avaliaram-se duas medidas: 1,0 nm (Figura 11b), o mesmo utilizado pela biblioteca comercial, e 0,2 nm (Figura 11a). Notou-se que a diminuição do *step* acarretava uma melhora na resolução dos espectros, resultado esse que é essencial quando se pretende desenvolver uma biblioteca para identificação de compostos. Entretanto, também se observou a compatibilidade dos espectros obtidos em 0,2 nm com os espectros disponibilizados pela biblioteca.

**Figura 10.** Espectros de ultravioleta da histamina obtidos através do detector DAD que mostram a distorção no espectro na absorção em 277 nm ao modificar o fluxo cromatográfico. (a) Espectro obtido em fluxo 0,3 mL/min sem distorção e (b) espectro obtido em fluxo 0,15 mL/min apresentando distorção.



Fonte: Autoria própria (EzChrom Elite).

**Figura 11.** Espectros de ultravioleta do benzeno obtidos através do detector DAD, mostrando as bandas de vibração entre 240 e 270 nm bem características das substâncias, que são utilizadas no controle da resolução, precisão e reprodutibilidade na medição dos espectros. (a) Espectro obtido com *slit* de 1,0 nm, *step* 0,2 nm e fluxo 0,3 mL/min; (b) espectro obtido com *slit* de 1,0 nm, *step* 1,0 nm e fluxo 0,3 mL/min; (c) espectro obtido com *slit* de 4,0 nm, *step* 1,0 nm e fluxo 0,3 mL/min.



**Fonte:** Autoria própria (EzChrom Elite).

Pragst *et al.* (2004) (50) propuseram uma biblioteca com 2.682 compostos, com moléculas identificadas por meio da comparação do tempo de retenção relativo (TRR) e do espectro de absorção de UV (50,70). A proposta do TRR é gerar um índice mais reprodutível do que o tempo de retenção, sendo menos suscetível às condições cromatográficas instrumentais: é atípico que uma substância apresente um tempo de retenção que permaneça constante, com a mesma coluna, durante um período de tempo de uso (por causa da perda gradual da fase estacionária) ou entre diferentes lotes de colunas que são nominalmente idênticos (60).

Para que uma biblioteca de espectros DAD seja reprodutível, faz-se necessário que as mesmas condições cromatográficas, da sua criação, sejam utilizadas (o mesmo tipo de tampão aquoso e o mesmo pH utilizado para construção da biblioteca). Deste modo é imprescindível, para a identificação de uma substância pela pesquisa de uma biblioteca espectral de UV, que os espectros das amostras não sofram alterações devido às condições experimentais. Tais alterações são ocasionadas por efeitos químicos da interação do ambiente com a molécula ou diferenças nas condições instrumentais. Por exemplo, os espectros de UV de compostos ácidos ou básicos podem ser completamente diferentes em seus respectivos estados protonados ou não protonados se o grupo ácido ou básico fizer parte do cromóforo. Nesses casos, um pequeno desvio do pH pode alterar essencialmente o espectro se o pKa da substância estiver próximo do pH do tampão. Devido à sua alta transmissão óptica até 195 nm, as misturas de tampão fosfato/acetonitrila são frequentemente preferidas (50).

Ademais, trabalhar com uma eluição isocrática tem uma vantagem sobre a eluição gradiente, devido à possibilidade de tempos de retenção mais reprodutíveis, *background* espectroscópico constante durante a execução, bem como vantagens na quantificação e possibilidade de recirculação da fase móvel (50,59,73).

Em relação à fase móvel, o método proposto por Pragst *et al.* (2004) (50) indica a utilização de três fases móveis: Fase Móvel A (ACN:Tampão fosfato 0.1M, pH 2.3, proporção de 37:63); Fase Móvel B (ACN:Tampão fosfato 0,1 M, pH 2,3, proporção de 63:37) e Fase Móvel C (ACN:Tampão fosfato 0,1 M, pH 2,3, proporção de 20:80). Tal sugestão se justifica uma vez que a mesma amostra poderia ser analisada em três condições e a triagem abrangeria a maior parte dos analitos pesquisados, incluindo compostos muito lipofílicos (50).

Entretanto, foi avaliado neste trabalho que não se faz necessário a utilização das 3 fases móveis para a identificação das principais substâncias presente nos selos de

apreensão. Verificou-se que uma única corrida cromatográfica, contendo a fase móvel A, é suficiente para a triagem e identificação desses compostos (25R-NBOH, 25R-NBOMe, 2C-R e LSD). A explicação para isso é que a fase móvel C apresenta uma solução com maior polaridade que as demais fases, ideal para melhorar a separação dos analitos polares, que ficam menos retidos na coluna e, portanto, menos resolvidos na fase móvel A. A fase móvel B, por outro lado, é uma mistura de solventes ideal para identificar espécies menos polares e tende a ser mais retida na coluna cromatográfica, fazendo com que esses compostos não apareçam nas corridas da fase móvel A.

A Tabela 2 abaixo traz um resumo das condições cromatográficas utilizadas pela biblioteca comercial (Pragst *et al.* 2004)(50), bem como as utilizadas neste trabalho para a validação.

**Tabela 2.** Resumo das condições cromatográficas utilizada pela biblioteca comercial (50) e as utilizadas na validação.

|                                       | PRAGST                                                                | VALIDAÇÃO                                                             |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>Coluna cromatográfica</b>          | Lichrospher RP8ec, (4,0×250 mm×5,0µm), Merck®                         | Zorbax, Eclipse Plus RP18 (2,1×100 mm×1,8µm), Agilent®                |
| <b>Temperatura da coluna</b>          | Ambiente                                                              | 25°C                                                                  |
| <b>Fase móvel</b>                     | Mistura de acetonitrila: tampão fosfato de potássio monobásico pH 2,3 | Mistura de acetonitrila: tampão fosfato de potássio monobásico pH 2,3 |
| <b>Eluição</b>                        | Isocrática                                                            | Isocrática                                                            |
| <b>Fluxo</b>                          | 1,0 mL/min                                                            | 0,3 mL/min                                                            |
| <b>Injetor</b>                        | 10 uL (Padrão) e 50 uL (amostra)                                      | 2 uL (Padrão) e 5 uL (amostra)                                        |
| <b>Faixa de varredura do detector</b> | De 195 a 380 nm                                                       | De 195 a 380 nm                                                       |
| <b>Step</b>                           | 1,0 nm                                                                | 0,2 nm                                                                |
|                                       | 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (MPPH)                             | 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (MPPH)                             |
|                                       | 4-fenilbenzofenona (PBP)                                              | -                                                                     |
| <b>Padrões de calibração</b>          | Salicilamida                                                          | -                                                                     |
|                                       | Histamina                                                             | Histamina                                                             |
|                                       | Cafeína                                                               | Cafeína                                                               |
|                                       | Benzeno                                                               | Benzeno                                                               |

Antes de cada corrida cromatográfica, um padrão controle é injetado para verificar sua calibração e para determinação dos parâmetros cromatográficos que irão auxiliar no

cálculo do TRR e como um controle da seletividade do DAD. Utilizou-se os padrões reportados na Tabela 3 para reprodução da biblioteca:

**Tabela 3.** Padrões utilizados para o controle das condições cromatográficas e seletividade do DAD utilizados pela biblioteca comercial (50) e as utilizados na validação.

| PADRÃO                                                                                                                                                    | [ ] Validação | [ ] PRAGST | FUNÇÃO                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Cafeína</b>                                                                                                                                            | 50 µg/mL      | 100 µg/mL  | Controle da precisão do injetor, uma vez que a área obtida é reprodutível e o padrão possui alta estabilidade;                                                                                                                              |
| <b>Histamina HCl</b>                                                                                                                                      | 50 µg/mL      | 100 µg/mL  | Determinação e controle do tempo morto ( $t_0$ ) da coluna;                                                                                                                                                                                 |
| <b>MPPH (5-(4-Metilfenil)-5-fenilhidantoína)</b>                                                                                                          | 50 µg/mL      | 100 µg/mL  | Cálculo do TRR na fase móvel A                                                                                                                                                                                                              |
| <b>4-fenilbenzofenona (PBP)</b>                                                                                                                           | -             | 100 µg/mL  | Cálculo do TRR na fase móvel B                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Salicilamida</b>                                                                                                                                       | -             | 100 µg/mL  | Cálculo do TRR na fase móvel C                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Benzeno</b>                                                                                                                                            | 500 µg/mL     | 1000 µg/mL | Controle da resolução, precisão e reprodutibilidade na medição dos espectros, pois este analito possui bandas de vibração entre 240 e 270 nm bem características, verificando assim, a precisão do detector na obtenção dos espectros de UV |
| [ ] Validação: Concentrações dos padrões utilizados para controle das condições cromatográficas na validação.                                             |               |            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| [ ] Pragst: Concentrações dos padrões utilizados para controle das condições cromatográficas no método preconizado pelo Pragst <i>et al.</i> (2004) (50). |               |            |                                                                                                                                                                                                                                             |

Um total de 174 análises foram realizadas empregando para identificação os espectros de UV e TRR das substâncias estudadas: 25R-NBOH, 25R-NBOMe, 2C-R e LSD. Todos os resultados estavam de acordo com os resultados das análises prévias de GC-MS, com uma coluna DB1-ms de 4 metros (35).

#### 4.1.1. Critérios para utilização da biblioteca

Mundim (2010) (51) delimitou alguns passos e critérios, que foram seguidos nesse estudo, visando a identificação da(s) substância(s) existente(s) nas amostras, por meio de uma biblioteca de HPLC-DAD:

a) O pico cromatográfico ser integrado para que o software possa realizar o cálculo de pureza do pico (*Total Peak Purity*), permitindo assim verificar se o pico

pertence a uma ou mais substância, bem como escolher o melhor tempo de retenção (TR) para a aquisição do espectro UV visando a comparação com a biblioteca;

- PURO – *Total Peak Purity* de 1,00;
- ALTA PROBABILIDADE DE SER PURO - *Total Peak Purity* maior que 0,99 e menor que 1,00;
- POSSÍVEL COELUIÇÃO - *Total Peak Purity* maior que 0,90 e menor que 0,99: Para a avaliação da biblioteca levou-se em consideração outros parâmetros para a aprovação da possibilidade da tomada do espectro UV ou não, como análise de sobreposição de cromatogramas (*Multi chromatogram* e *Ratio Plot*) e avaliação dos espectros no total de todo o pico (*Mix View*).
- IMPURO - *Total Peak Purity* (TPP) abaixo de 0,90. Não se considerou esse pico em suas análises.

b) Foi calculado o TRR do analito, para a seleção da biblioteca na qual seria realizada a comparação do espectro UV este TRR serviu como um primeiro filtro na identificação da substância. Caso a identificação não fosse possível, utilizou-se uma biblioteca pertencente a um TRR menor e/ou maior para ser realizada uma segunda busca; variação aceita para o TRR foi de 5%.

c) A comparação dos espectros foi realizada pelo software do equipamento na faixa de 200 a 380nm, mas não necessariamente toda a faixa foi utilizada. Para os analitos cujo espectro tenha uma faixa grande sem apresentar a absorção de luz, esta faixa foi retirada da comparação;

d) A substância foi identificada quando o índice de similaridade obtido foi maior que 0,99 para a faixa de comprimento de onda selecionado, e que tenha sido aprovada pelo analista quando da comparação dos espectros UV demonstrado pelo software.

- a. IDENTIFICADA – IDÊNTICO - *Similarity Index* (SI) de 1,00;
- b. IDENTIFICADA - ALTA SIMILARIDADE - *Similarity Index* maior que 0,99 e menor que 1,00;
- c. NÃO IDENTIFICADA – BAIXA SIMILARIDADE - *Similarity Index* menor que 0,99, sendo necessário a aprovação do analista quando da comparação dos espectros UV demonstrado pelo software.

#### 4.1.2. Tempo de retenção relativo (TRR)

A Tabela 4 mostra o tempo de retenção e o tempo de retenção relativo dos compostos. Os TRRs variaram de 0,03% a 0,81% (intradia) e 0,11% a 3,93% (interdia, 2 dias), encontrando-se dentro da variação de TRR recomendada (até 2,0%, intradia e interdia) (72) no intradia e interdia, com exceção dos 2C-R.

Os 2Cs foram os analitos que apresentaram intervalos maiores que 2,0%. Estes analitos apresentaram os picos cromatográficos no início da corrida, isso explica a maior variação, pois analitos que são eluídos no início da corrida cromatográfica estão mais suscetíveis a uma maior variação no TRR. A fase móvel consistia de um tampão acetonitrila/fosfato 0,1 M (pH 2,3), no entanto quando esta proporção não é suficiente para se ter uma resolução dos picos cromatográficos na primeira parte do cromatograma se aplica a proporção de 20:80, proporção esta ideal para esses picos cromatográficos que são constituídos de substâncias com alta polaridade (50).

**Tabela 4.** Tempo de retenção e tempo de retenção relativo dos compostos nas 4 colunas analíticas avaliadas

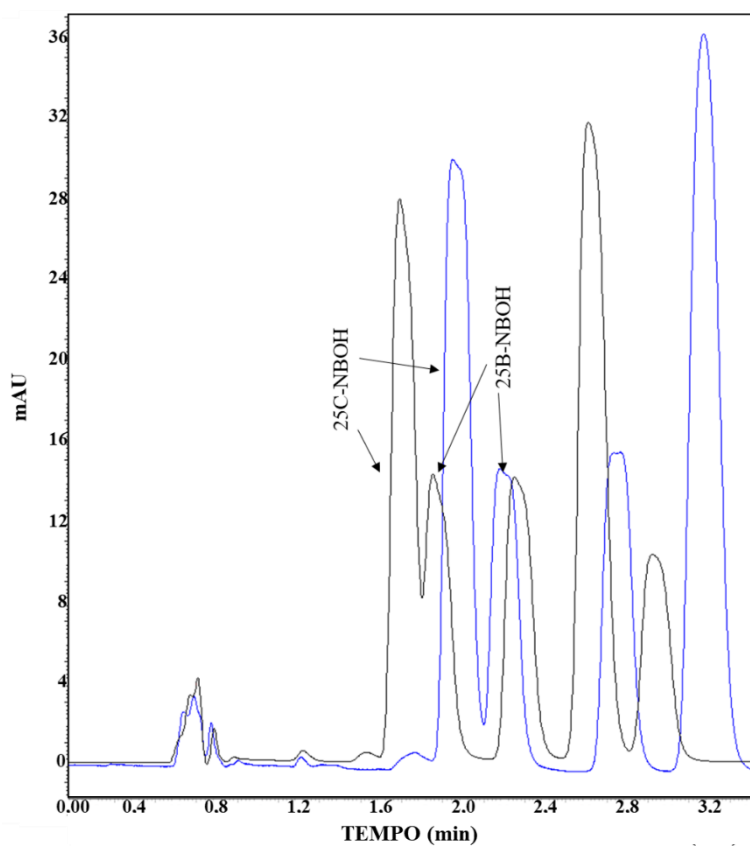
| Compostos | Eclipse Plus<br>RP18 |       | Eclipse Plus<br>RP8 |       | Poroshell<br>RP8ec |       | LiChrosphere<br>RP8ec |       |
|-----------|----------------------|-------|---------------------|-------|--------------------|-------|-----------------------|-------|
|           | TR<br>(min.)         | TRR   | TR<br>(min.)        | TRR   | TR<br>(min.)       | TRR   | TR<br>(min.)          | TRR   |
| 2C-H      | 0,87                 | 0,055 | 0,85                | 0,060 | 1,60               | 0,062 | 2,75                  | 0,081 |
| 2C-C      | 0,98                 | 0,079 | 0,96                | 0,084 | 1,85               | 0,098 | 3,45                  | 0,136 |
| 2C-B      | 1,05                 | 0,095 | 1,02                | 0,100 | 1,97               | 0,116 | 3,72                  | 0,157 |
| 2C-I      | 1,17                 | 0,120 | 1,13                | 0,125 | 2,20               | 0,149 | 4,27                  | 0,199 |
| 2C-E      | 1,22                 | 0,132 | 1,20                | 0,141 | 2,34               | 0,167 | 4,49                  | 0,217 |
| 25H-NBOH  | 1,46                 | 0,183 | 1,37                | 0,183 | 2,62               | 0,208 | 5,58                  | 0,335 |
| 25C-NBOH  | 2,13                 | 0,327 | 1,92                | 0,315 | 3,73               | 0,366 | 8,68                  | 0,544 |
| 25H-NBOME | 2,15                 | 0,332 | 1,93                | 0,317 | 3,69               | 0,360 | 8,98                  | 0,570 |
| 25B-NBOH  | 2,40                 | 0,387 | 2,14                | 0,369 | 4,15               | 0,426 | 9,66                  | 0,621 |
| 25I-NBOH  | 3,04                 | 0,525 | 2,64                | 0,488 | 5,11               | 0,563 | 11,95                 | 0,800 |
| 25C-NBOME | 3,40                 | 0,603 | 2,94                | 0,571 | 5,59               | 0,648 | 13,84                 | 0,950 |
| 25E-NBOH  | 3,46                 | 0,623 | 3,07                | 0,592 | 5,97               | 0,686 | 13,60                 | 0,929 |
| 25B-NBOME | 3,92                 | 0,715 | 3,33                | 0,667 | 6,31               | 0,755 | 15,60                 | 1,088 |
| 25I-NBOME | 5,24                 | 1,000 | 4,31                | 0,908 | 8,08               | 1,014 | 19,91                 | 1,426 |
| 25E-NBOME | 6,16                 | 1,201 | 5,14                | 1,110 | 9,72               | 1,254 | 23,25                 | 1,688 |
| LSD       | 1,15                 | 0,117 | 1,12                | 0,122 | 2,14               | 0,140 | 4,57                  | 0,224 |

TR: Tempo de retenção; TRR: Tempo de retenção relativo.

A coluna Poroshel RP8ec apresentou a melhor resolução cromatográfica entre as demais colunas testadas e a Eclipse Plus RP18 apresentou melhor resolução que a RP8 (Figura 12). As resoluções entre 25C-NBOH e 25B-NBOH foram: 2,934 para Eplipse

C18; 1,869 para Eclipse C8; 3,115 para Poroshell e para Lichrosphere foi 2,934. Apesar das coeluições apresentadas entre 2C-C e 2C-B, entre 25C-NBOH e 25H-NBOMe, e entre 25C-NBOMe e 25E-NBOH, todas essas substâncias foram corretamente identificadas pela análise do espectro UV. Em todas as 4 colunas avaliadas, o tempo de retenção relativo foram diferentes. Por conseguinte, para que os resultados cromatográficos sejam reprodutíveis, deve-se utilizar a mesma coluna analítica. A corrida cromatográfica com a mistura de 15 analitos é mostrada na Figura 13.

**Figura 12.** Corridas cromatográficas contendo 25R-NBOH (C, B, I e E) comparando as resoluções dos picos entre duas colunas diferentes, sendo que em preto encontra-se os NBOHs analisados em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP8 (1.8  $\mu$ m, 100 $\times$ 2.1 mm, Agilent): Tempo de retenção (min.), 25C-NBOH: 1,69; 25B-NBOH: 1,85; 25I-NBOH: 2,25; 25E-NBOH: 2,61. Em azul encontra-se os NBOHs analisados em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP18 (1.8  $\mu$ m, 100 $\times$ 2.1 mm, Agilent): Tempo de retenção (min.), 25C-NBOH: 1,95; 25B-NBOH: 2,18; 25I-NBOH: 2,77; 25E-NBOH: 3,17.

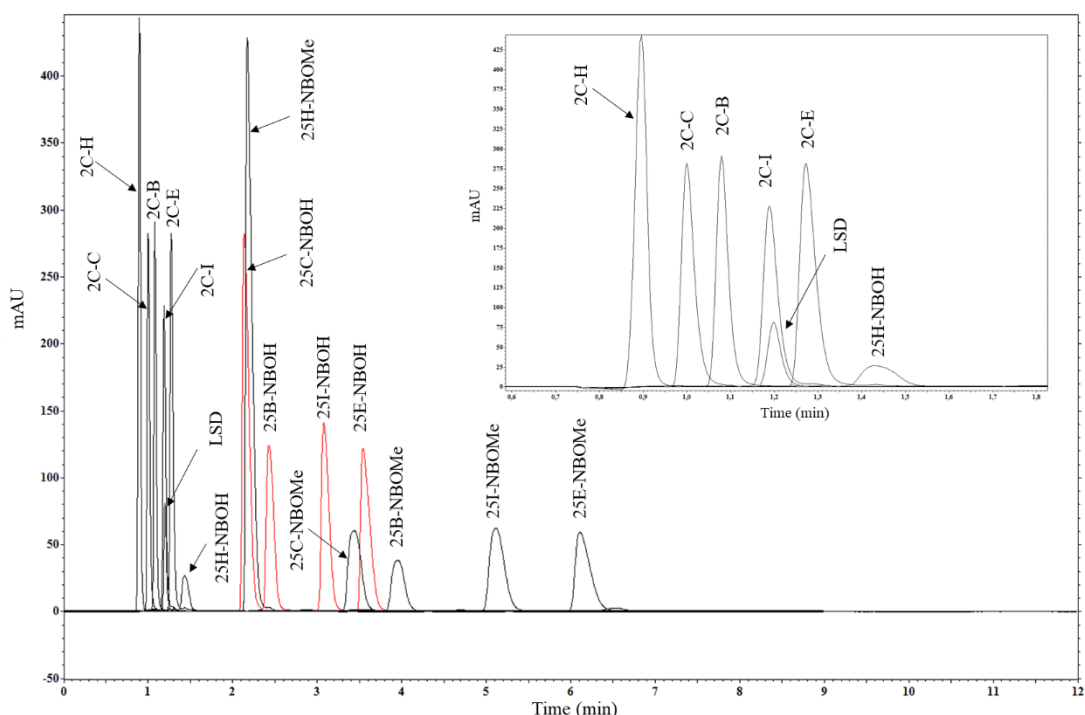


**Fonte:** Autoria própria (EzChrom Elite)

As nossas análises demonstraram, que as colunas de UHPLC reduziram o tempo de análise (de 30 min para 10 min) e o fluxo da fase móvel (1,0 para 0,3 mL/min), quando comparadas com a coluna de HPLC, o que acarreta uma economia no uso de solventes, diminuindo de 30 mL para 3 mL o gasto de fase móvel por corrida cromatográfica, e o aumento do número de amostras analisadas em 24 horas, o que é essencial para um

laboratório que pretende utilizar a referida metodologia em uma rotina analítica de identificação dessas drogas em selos. Além disso, foi possível atingir resolução de pico, com menor volume de injeção (de 10 a 2,0  $\mu$ L), o que acarretou picos cromatográficos mais finos e com melhores separações.

**Figura 13.** Cromatograma contendo todos os derivados de fenetilaminas e LSD analisados em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP18 (1.8  $\mu$ m, 100 $\times$ 2.1 mm, Agilent). Tempo de retenção (min.): 2C-H: 0,91; 2C-C: 0,99; 2C-B: 1,00; LSD: 1,10; 2C-I: 1,11; 2C-E: 1,23; 25H-NBOH: 1,44; 25C-NBOH: 2,10; 25H-NBOMe: 2,16; 25B-NBOH: 2,36; 25I-NBOH: 2,96; 25E-NBOH: 3,39; 25C-NBOMe: 3,44; 25B-NBOMe: 3,94; 25I-NBOMe: 5,11; 25E-NBOMe: 6,11. O insert mostra uma ampliação da região entre 0,6 e 1,8 min.



**Fonte:** Autoria própria (EzChrom Elite) e PowerPoint.

#### 4.1.3. Espectro de UV

Encontra-se descritos a fórmula molecular, o  $\lambda_{\text{max}}$  e o  $\lambda_{\text{min}}$  para cada fenetilamina na Tabela 5. Os compostos 2C-R têm um grupo cromóforo a menos que os 25R-NBOHs e 25R-NBOMes e foram facilmente diferenciados (Figura 14d). Segundo Pragst *et al.* (2004)(50) algumas moléculas possuem mais de um cromóforo isolado entre si por átomos de carbono saturados. Nestes casos, o espectro UV da substância é aproximadamente a soma dos espectros dos cromóforos individuais (50).

O poder de discriminação da espectroscopia de UV para distinguir a substituição no anel de benzeno na posição R4 é mostrado na Tabela 5 e Figura 14a-c. Como exemplo,

é possível visualizar um maior efeito batocrômico (absorção em maior comprimento de onda) nos compostos que apresentam substituição de I na posição R4 do benzeno (2C-I, 25I-NBOH e 25I-NBOMe) e um maior efeito hipsocrômico (absorção em menor comprimento de onda) nos compostos que contêm a substituição de H nessa posição (2C-H, 25H-NBOH e 25H-NBOMe).

**Tabela 5.** Fórmula molecular,  $\lambda_{\text{max}}$  e  $\lambda_{\text{min}}$  dos compostos analisados.

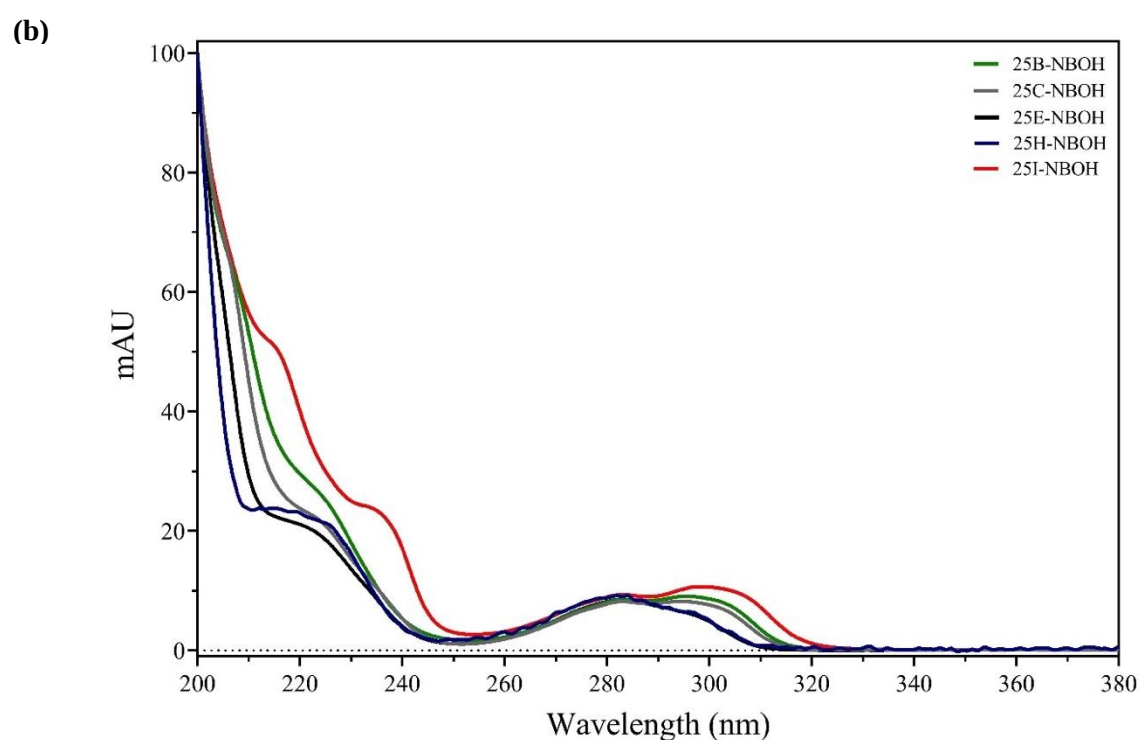
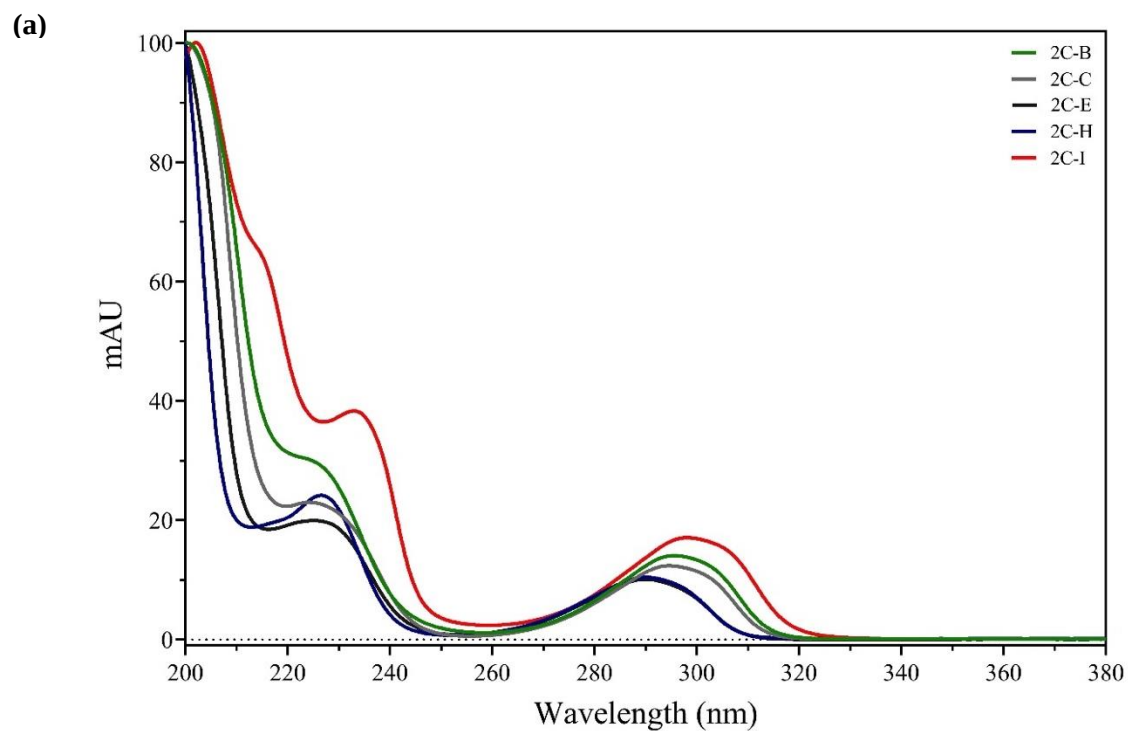
| Compostos | Fórmula Molecular                                 | $\lambda_{\text{max}}$ 1 | $\lambda_{\text{max}}$ 2 | $\lambda_{\text{max}}$ 3 | $\lambda_{\text{min}}$ 1 | $\lambda_{\text{min}}$ 2 |
|-----------|---------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2C-H      | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>   | 226,8                    | 290,2                    |                          | 213,0                    | 252,2                    |
| 2C-C      | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>2</sub> | 200,4                    | 224,4                    | 294,6                    | 219,8                    | 255,2                    |
| 2C-B      | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> BrNO <sub>2</sub> | 200,2                    | 295,6                    |                          | 258,0                    |                          |
| 2C-I      | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> INO <sub>2</sub>  | 202,2                    | 233,2                    | 298,4                    | 226,8                    | 261,2                    |
| 2C-E      | C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>   | 225,0                    | 290,0                    |                          | 216,4                    | 254,0                    |
| 25H- NBOH | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>   | 214,6                    | 281,8                    |                          | 212,8                    | 248,2                    |
| 25C-NBOH  | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>3</sub> | 283,2                    | 294,2                    |                          | 251,4                    | 288,0                    |
| 25H-NBOMe | C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>   | 221,8                    | 280,6                    |                          | 210,0                    | 245,0                    |
| 25B-NBOH  | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> BrNO <sub>3</sub> | 283,2                    | 294,8                    |                          | 253,3                    | 287,4                    |
| 25I-NBOH  | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> INO <sub>3</sub>  | 283,0                    | 299,2                    |                          | 253,4                    | 289,2                    |
| 25C-NBOMe | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>3</sub> | 281,4                    | 295,2                    |                          | 251,4                    | 286,8                    |
| 25E-NBOH  | C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>   | 282,6                    |                          |                          | 250,4                    |                          |
| 25B-NBOMe | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> BrNO <sub>3</sub> | 281,4                    | 296,0                    |                          | 252,8                    | 286,4                    |
| 25I-NBOMe | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> INO <sub>3</sub>  | 281,2                    | 299,6                    |                          | 253,8                    | 286,8                    |
| 25E-NBOMe | C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>   | 220,8                    | 281,0                    |                          | 216,0                    | 250,4                    |
| LSD       | C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O  | 226,8                    | 313,2                    |                          | 216,0                    | 268,6                    |

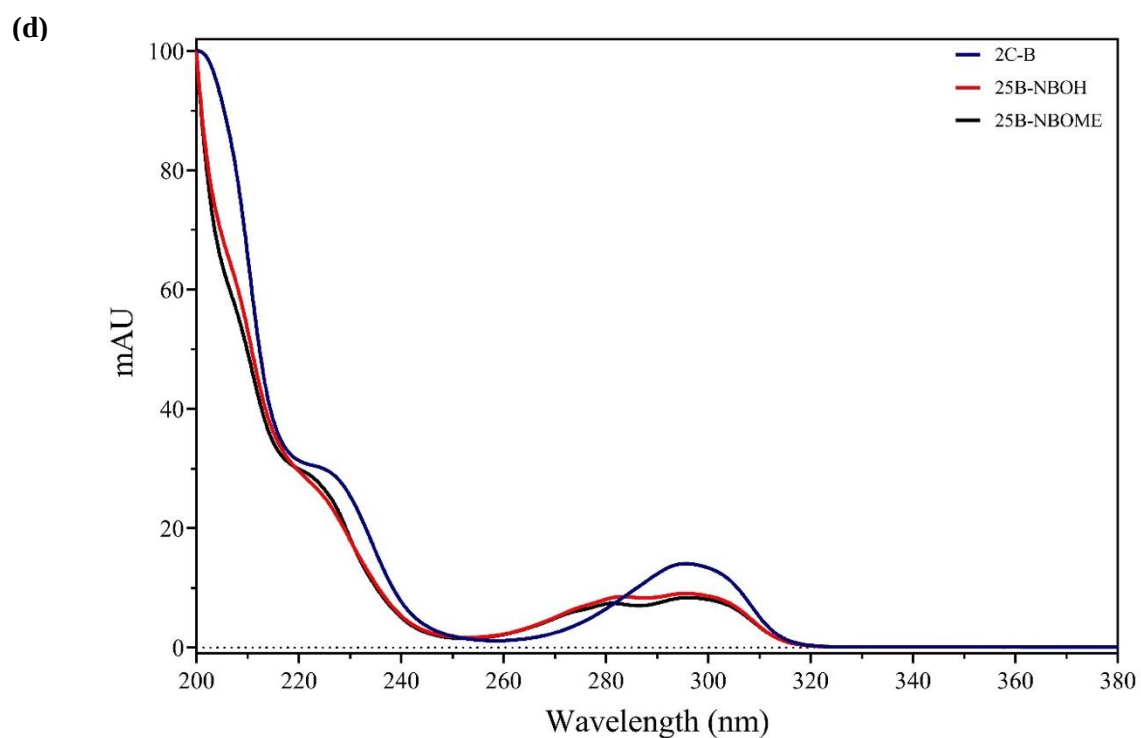
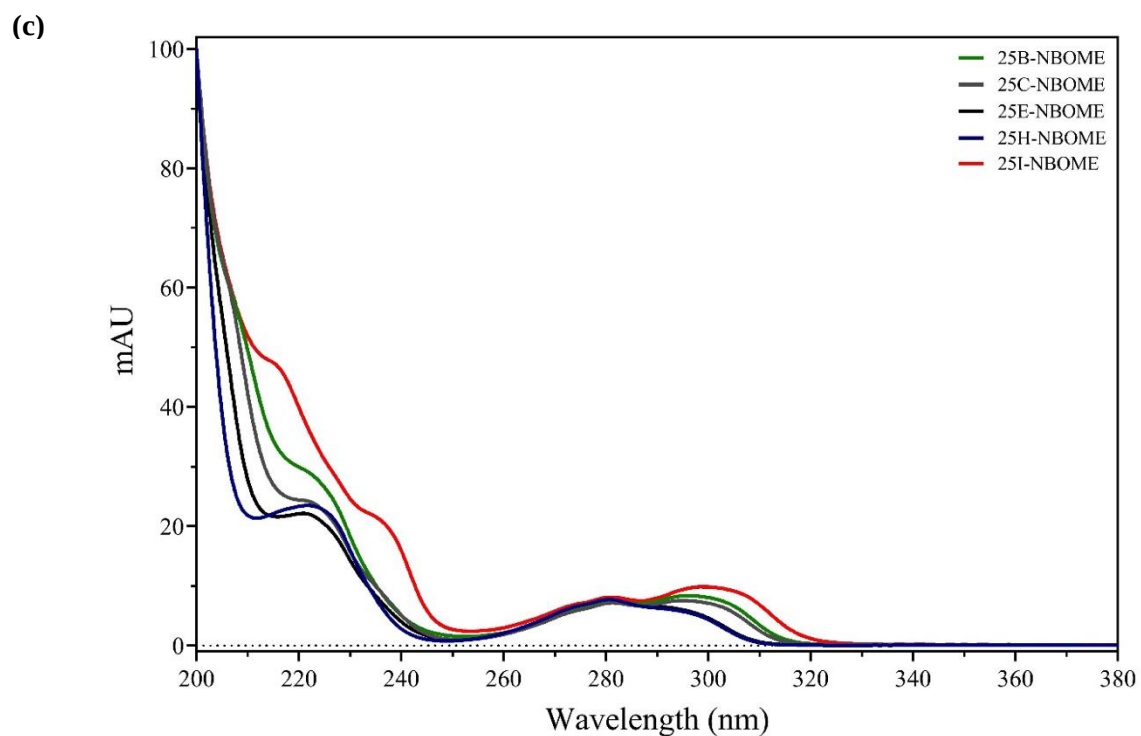
$\lambda$ : Comprimento de onda

Comparando os compostos 25R-NBOH e 25R-NBOMe, a adição no radical cresol de um grupo metil na hidroxila ocasionou uma pequena distorção no espectro de absorção (efeito batocrômico devido a adição de um grupo metil, na faixa de 215-230 nm) possibilitando a diferenciação de 25R-NBOH e 25R-NBOMe dos que apresentaram a mesma substituição no anel aromático (Figura 4d).

De acordo com Pragst *et al.* (2004)(50) “A importância da espectroscopia UV para identificação de substâncias é frequentemente questionada devido a forma simplificada de comparação com apenas um ou dois máximos e mínimos. Esse tipo de análise leva a resultados menos seletivos do que comparações de banco de dados. ”

**Figura 14.** Espectros de ultravioleta de 2Cs em (a); espectros de ultravioleta de 25R-NBOHs em (b); espectros de ultravioleta de 25R-NBOMes em (c); espectros de ultravioleta de 2C-B, 25B-NBOH e 25B-NBOMe em (d). Todos estão descritos na Tabela 5, e foram obtidos através do detector DAD após separação em UHPLC.





**Fonte:** Autoria própria (GraphPad Prism).

Herzler *et al.*(200) (57) investigaram a seletividade do detector DAD e concluíram que é uma importante ferramenta para a identificação de compostos desconhecidos. Esses detectores diferenciam compostos que compartilham grupos cromóforos semelhantes, isso ocorre devido ao fato dos espectros de UV serem altamente reproduzíveis e

específicos, de modo que pequenas diferenças próximas ao grupamento cromóforo são suficientes para distinguir dois analitos diferentes (57). No entanto, os espectros podem ser alterados por ruído, efeito de matriz e flutuações nas condições cromatográficas. Para que isso não aconteça é necessário que as condições experimentais não sejam alteradas, que o método apresente boa resolução cromatográfica, evitando assim a sobreposição de picos, e que as concentrações não estejam em um valor limite para a identidade do espectro, pois valores baixos podem levar a deterioração deste espectro pelo ruído (50).

O HPLC-DAD tem sido usado como uma ferramenta de triagem para amostras desconhecidas, por meio de bibliotecas que abrangem o maior número possível de drogas e toxinas (50,58,60,69). Além disso, o HPLC-DAD vem sendo aplicado na análise de NPS (67,68,74,75) para diferenciação de isômeros indistinguíveis por GC-MS (61–63) e por HPLC-MS/MS (55,64,69,76). Partes separadas da molécula e substituintes isolados que não são inatamente ativos para absorção de UV e que não contribuem diretamente para o grupo cromóforo, podem alterar o espectro por hiperconjugação ou efeitos estéricos (50). Assim esses trabalhos demonstram o poder de discriminação de um DAD para identificação de substâncias na área forense.

O presente trabalho visou a criação de uma biblioteca complementar, uma vez que a biblioteca Pragst atualmente não possui espectros de UV ou TRR para as fenetilaminas estudadas (25R-NBOH e 25R-NBOMe), aumentando o número de compostos em uma análise de triagem DAD e sendo uma nova possibilidade de técnica analítica para identificação desses compostos.

#### 4.2.VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

##### *Considerações sobre o método de análise*

No presente trabalho foi avaliada a adequabilidade de um método de UHPLC para a execução de análises de quantificação dos 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I), utilizando-se como referência o método desenvolvido em HPLC por Pragst *et al.*(2004) (50) para aplicação em análises toxicológicas sistemática. Escolheu-se o estudo desenvolvido por Pragst e colaboradores por tratar-se de uma metodologia simples, rápida, realizada na forma isocrática, “fria” (que é ideal para compostos termicamente instáveis e que não são analisados por GC-MS) e por ser utilizada para intercambiar a biblioteca UVTOX (70).

#### 4.2.1. Seletividade

Seletividade é uma medida da capacidade do método de identificar/quantificar os analitos na presença de outras substâncias, endógenas ou exógenas, em uma matriz ou de outro material potencialmente interferente. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (71,72). A verificação da seletividade foi realizada a partir de injeções de uma extração de selos em branco, sem a adição de padrão, para a avaliação de interferentes nos tempos de retenção dos analitos, levando-se em conta os espectros de UV das fenetilaminas presentes na biblioteca deste trabalho e dos espectros da biblioteca UVTOX (70). Não foram observados picos interferentes nos cromatogramas, além de não apresentar espectros interferentes na biblioteca UVTOX, indicando que o método é seletivo.

Em relação a matriz da amostra o Inmetro cita que esta pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Logo, no estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz (71). A Tabela 6, abaixo, apresenta o resultado da análise.

**Tabela 6.** Avaliação do efeito matriz nos níveis de concentrações 1,0 e 5,0 µg/mL para o 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I).

| NBOH | Conc.<br>µg/mL | Média      |            | DPR  | Teste F |        | Teste T |        |
|------|----------------|------------|------------|------|---------|--------|---------|--------|
|      |                | Solvente   | Matriz     |      | F calc. | F tab. | T calc. | T tab. |
| 25B  | 1              | 3155230,3  | 3045438,7  | 7,55 | 0,0017  | 0,053  | 0,351   | 2,92   |
|      | 5              | 18175229   | 16687679,7 | 3,50 | 0,031   | 0,053  | 0,045   | 2,92   |
| 25C  | 1              | 6611614,7  | 7426324,3  | 6,85 | 0,0010  | 0,053  | 0,130   | 2,92   |
|      | 5              | 38033217   | 32687039,3 | 3,43 | 0,033   | 0,053  | 0,015   | 2,92   |
| 25E  | 1              | 3744859,7  | 3567874,7  | 8,02 | 0,0026  | 0,053  | 0,314   | 2,92   |
|      | 5              | 22109770,7 | 20087023,3 | 3,53 | 0,035   | 0,053  | 0,036   | 2,92   |
| 25I  | 1              | 3603587    | 4885237,7  | 7,03 | 0,0009  | 0,053  | 0,030   | 2,92   |
|      | 5              | 21253853,7 | 22930384,3 | 3,62 | 0,026   | 0,053  | 0,064   | 2,92   |

Conc: Concentração; DPR: Desvio Padrão Relativo; Cal.: Calculado; Tab.: Tabelado.

Mensurou-se o efeito de matriz pela comparação entre a área média normalizada dos padrões de interesse adicionados em amostras de selo em branco, com a área média normalizada dos respectivos padrões diluído em solvente e expresso em porcentagem. Os analitos apresentaram uma variação, para a concentração de 1,0 µg/mL, de 6,85 a 8,02%. Já em relação ao nível de 5, 0 µg/mL, a variação presente foi entre 3,43 a 3,62 %. O teste F não mostrou significância estatística entre a variação das áreas normalizadas do padrão (papéis selo em branco) e das amostras de padrões adicionadas em solvente, nas 2

concentrações (1,0 e 5,0 µg/mL) investigadas. Dessa forma, a matriz não apresenta um efeito importante na precisão do método, na faixa de concentração em estudo. Já em relação ao teste *t* de *Student*, todos os analitos apresentaram o valor *t* calculado menor que o *t* tabelado, podendo-se assim concluir que a matriz não afeta o teste.

#### 4.2.2. Robustez

Normalmente, a robustez é um procedimento opcional na etapa de otimização, avaliado anteriormente à validação do método(71). Para avaliação da robustez, avaliou-se a variação dos tempos de retenção, no mesmo dia, por meio das injeções de padrões. Observou-se que estas análises apresentaram uma variação entre 0,03% a 0,72% e, após 24 horas com o mesmo solvente, uma variação de 0,17% a 0,52% nos tempos de retenção. As amostras armazenadas no amostrador a 10 °C e reanalisadas após 7 dias não apresentaram uma variação estatística significativa. Portanto, o método demonstrou-se ser robusto.

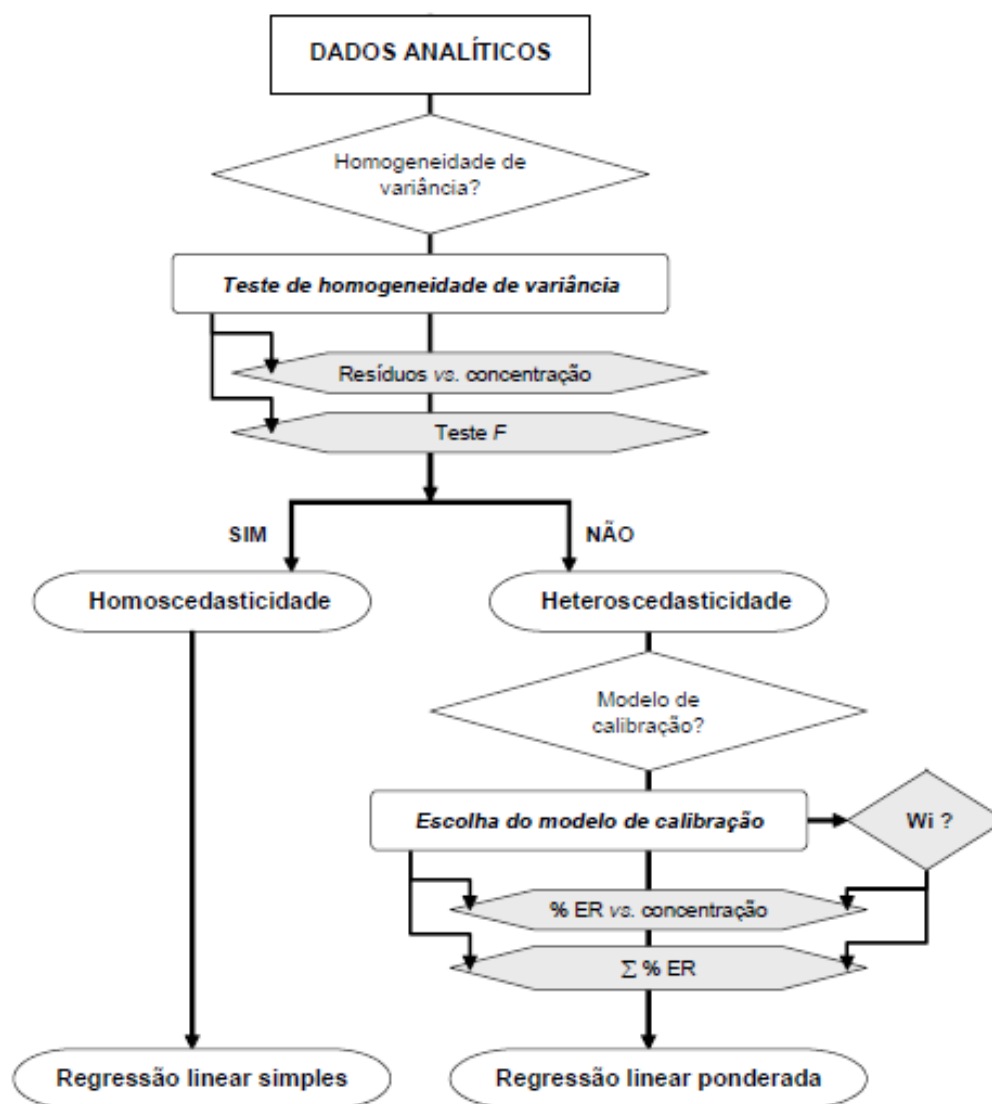
#### 4.2.3. Linearidade

De acordo com o Inmetro (2016) (71), a linearidade de um procedimento analítico refere-se à sua capacidade (em uma determinada faixa) de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A linearidade do método não pode ser avaliada apenas plotando a resposta em função da concentração do analito. A validação de cada nível de concentração para *outliers* deve ser feita usando o teste de Grubbs ou com base em resíduos padronizados de Jackknife; além disso, deve-se analisar a homoscedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados, por meio do teste de Cochran, de Levene ou de Brown-Forsythe, entretanto deve ser investigado antes de realizar a regressão linear (71).

Todo o processo de análise de dados para a avaliação do melhor modelo para regressão linear obtido pela validação, desde a avaliação da homoscedasticidade, passando pela observação dos resíduos vs. concentração, até ao cálculo da equação que melhor exprime a natureza dos dados pode ser esquematicamente traduzido pela

Figura 15.

**Figura 15.** Representação esquemática da escolha do modelo de regressão (ER=Erro relativo;  $W_i$ =Ponderação).

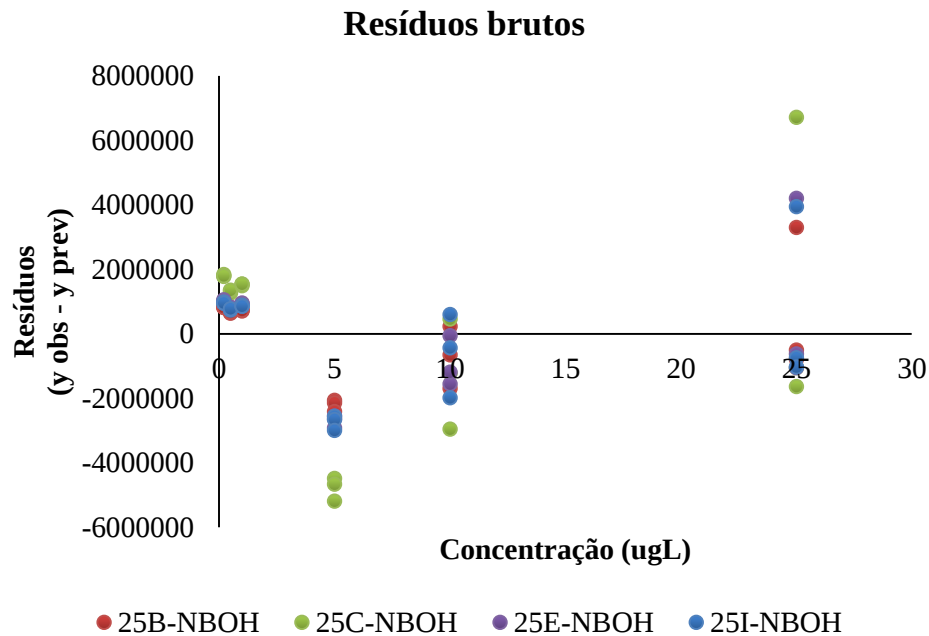


**Fonte:** Francisco 2008 (77).

#### 4.2.3.1. Teste de homoscedasticidade

Pode-se observar na Figura 16 a distribuição dos resíduos obtidos para o conjunto de dados do ensaio intra-dia da validação para os NBOHs em função da concentração. Por meio da avaliação desta figura não é possível observar uma banda horizontal de erro aleatoriamente distribuído em redor do eixo das abcissas, o que seria um indicativo de homoscedasticidade.

**Figura 16.** Distribuição dos resíduos vs. concentração obtida nos ensaios de validação por UHPLC-DAD para determinação de 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I), (prev=Previsto; obs=Observado).



**Fonte:** Autoria própria (Excel).

O teste F (Tabela 7) relevou uma diferença significativa de variâncias entre os dois extremos da reta de calibração quando o valor experimental, (25C-NBOH ( $F_{exp} = 19857,71$ ); 25B-NBOH ( $F_{exp} = 19716,49$ ), 25I-NBOH ( $F_{exp} = 15493,72$ ); 25E-NBOH ( $F_{exp} = 10742,24$ )), foi comparado com o valor tabelado ( $F_{tab} = 19$ ), para todos os NBOHs investigados. Além disso, foi utilizado com complemento da avaliação de homoscedasticidade o teste de *Cochran* o qual também demonstrou heterogeneidade em todas as curvas analíticas ( $C_{cal} 0,8172$  a  $0,9284 > C_{tab} 0,6131$ ). Os resultados indicam que a assunção de homoscedasticidade não foi cumprida; os dados são heteroscedásticos.

**Tabela 7.** Teste de homogeneidade de variâncias ( $s^2$ ): Teste F e *Cochran*.

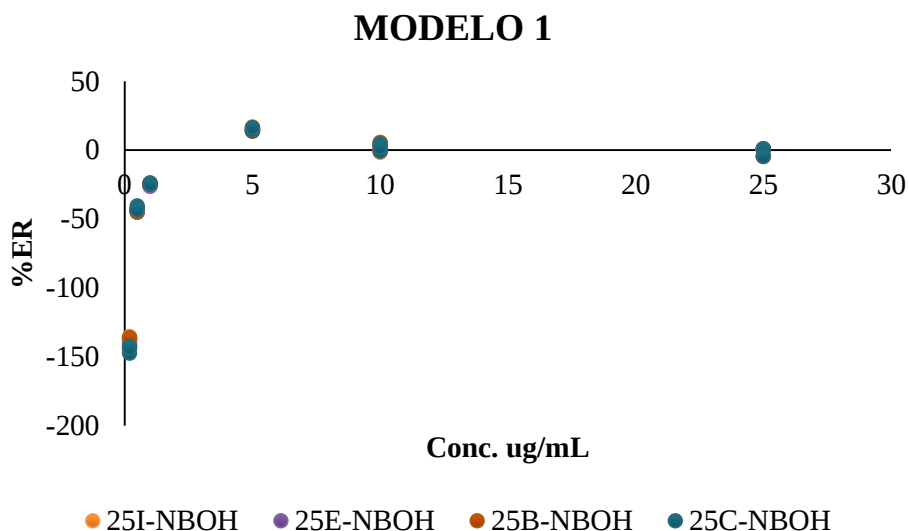
| NBOH | Conc.<br>µg/mL | A        | s2       | Fexp     | Fcal | Cochran | Crítico |
|------|----------------|----------|----------|----------|------|---------|---------|
| 25C  | 0,2            | 1,31E+06 | 1,1E+09  | 1,99E+04 | 19   | 0,8770  | 0,6131  |
|      | 25             | 1,57E+08 | 2,18E+13 |          |      |         |         |
| 25B  | 0,2            | 6,39E+05 | 2,66E+08 | 1,97+04  |      |         |         |
|      | 25             | 7,57E+07 | 5,24E+12 |          |      |         |         |
| 25I  | 0,2            | 6,97E+05 | 5,04E+08 | 1,55E+04 |      | 0,8172  |         |
|      | 25             | 8,80E+07 | 7,81E+12 |          |      |         |         |
| 25E  | 0,2            | 7,13E+05 | 7,91E+08 | 1,07E+04 |      | 0,9284  |         |

|    |          |         |
|----|----------|---------|
| 25 | 9,21E+07 | 8,5E+12 |
|----|----------|---------|

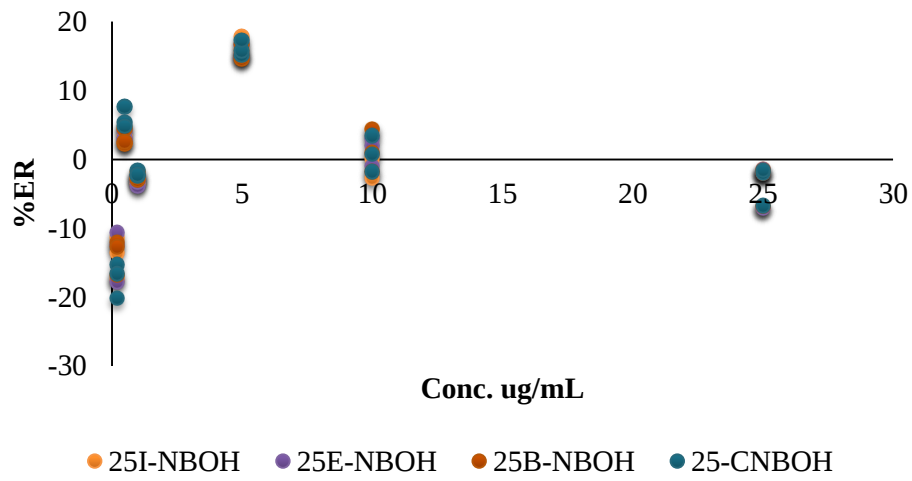
#### 4.2.3.2. Escolha do modelo de regressão

Avaliou-se o melhor modelo para regressão ponderada por meio da comparação da distribuição do erro relativo percentual (%ER) em função da concentração (0,2, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 25,0 µg/mL). Os resultados se encontram na Figura 17 tanto para o modelo de regressão linear simples (Modelo 1), quanto para os modelos de regressão ponderada (Modelos 2-7). É possível verificar que os Modelos 1, 2, 4 e 7 originaram uma subestimação das concentrações, próximas do extremo inferior da curva de calibração, principalmente no limite de quantificação (LOQ). Além disso, é possível avaliar que a concentração de 5µg/mL apresenta uma superestimação em todos os modelos. Por fim, os Modelos 3 e 6 apresentaram os melhores resultados nesses pontos.

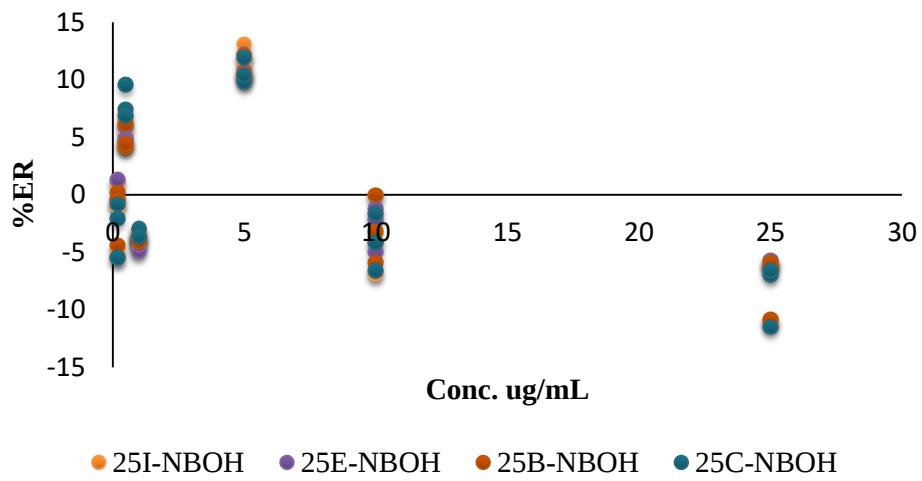
**Figura 17.** Distribuição do erro relativo percentual (%ER) em função da concentração (Conc. 0,2, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 25,0 µg/mL) de 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I) obtidas para o Modelo 1 ( $w_i=1$ ), Modelo 2 ( $w_i=1/x$ ), Modelo 3 ( $w_i=1/x^2$ ), Modelo 4 ( $w_i=1/x^{0.5}$ ), Modelo 5 ( $w_i=1/y$ ), Modelo 6 ( $w_i=1/y^2$ ) e Modelo 7 ( $w_i=1/y^{0.5}$ ).



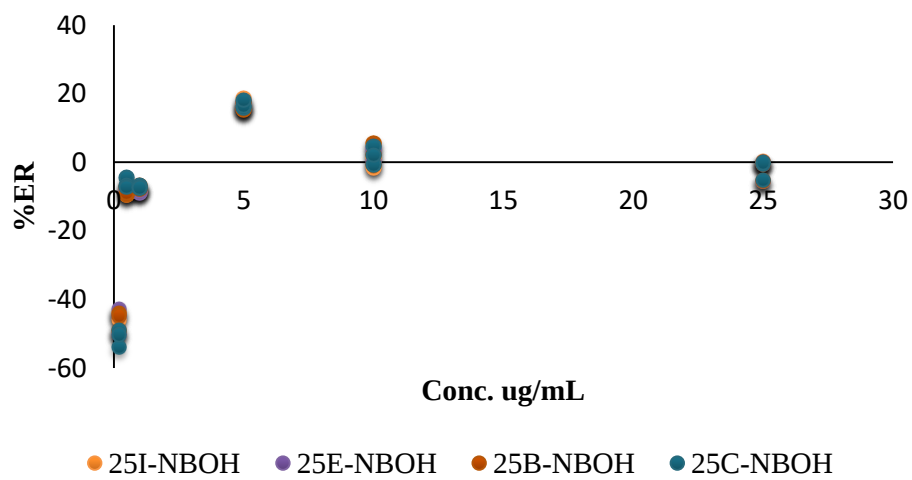
### MODELO 2



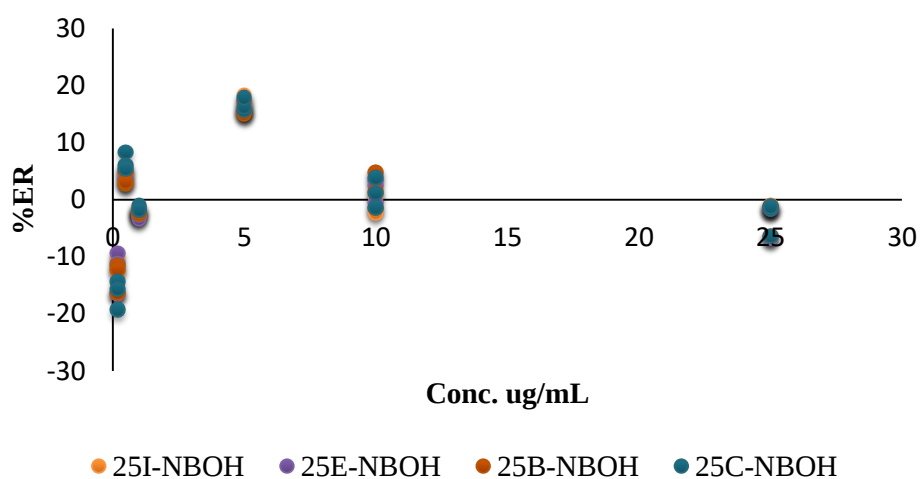
### MODELO 3



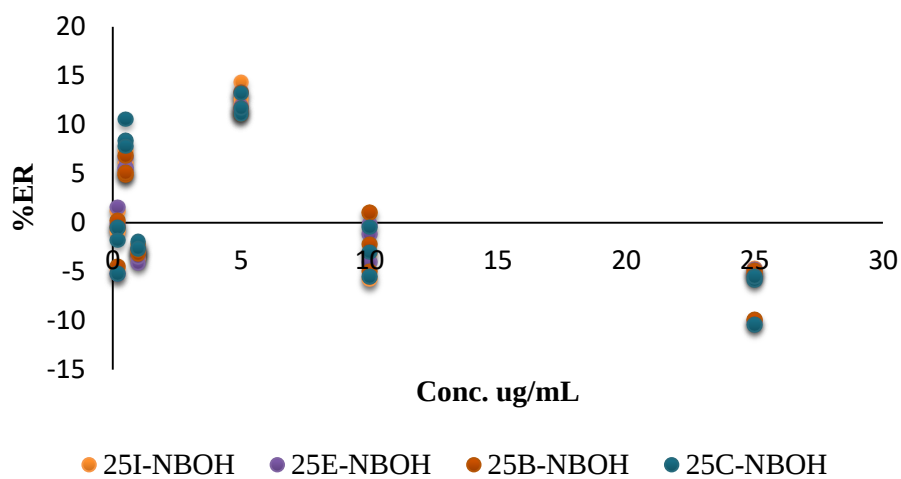
### MODELO 4



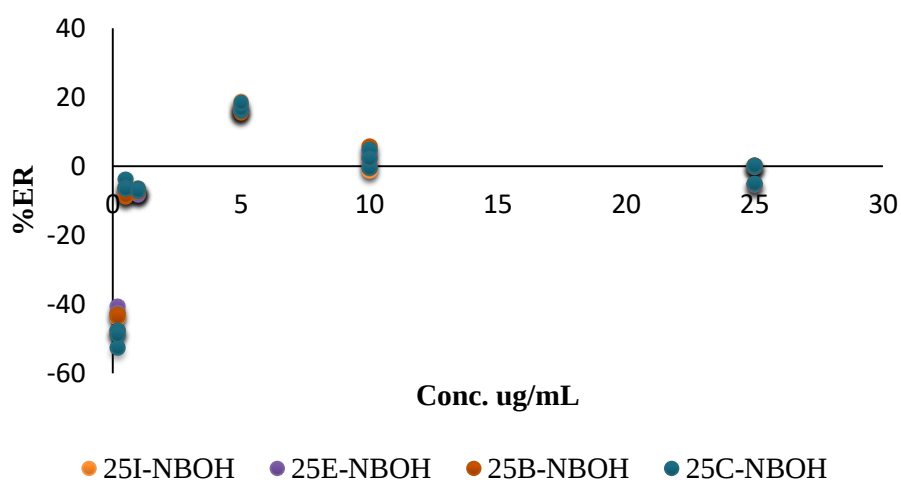
### MODELO 5



### MODELO 6



### MODELO 7



Fonte: Autoria própria (Excel).

Francisco (2008) (77) demonstrou em seu estudo que uma larga percentagem de erros no extremo inferior da reta de calibração pode coexistir com valores de coeficiente de correlação (R) aceitáveis. De acordo com o autor este aspecto é particularmente importante, se pensarmos que alguns analistas continuam a utilizar o coeficiente de correlação (de 0,999 a 1,000) como único critério de aceitação na avaliação do Método dos Mínimos Quadrados. De fato, o valor de  $R^2$  é apenas um indicador de associação ou correlação entre duas variáveis, e não um indicador de linearidade (77) .

Os parâmetros de regressão gerados a partir de cada fator de ponderação, o respectivo somatório dos erros relativos percentuais e o valor do teste F para falta de ajuste encontram-se resumidos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Parâmetros de regressão da reta de calibração gerada para cada fator de ponderação ( $w_i$ ), respectiva soma dos erros relativos percentuais ( $\Sigma \%ER$ ) e o teste F para avaliação de falta de ajuste (Faj) do modelo para os 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I).

| NBOH | Par.          | MODELO ( $w_i$ ) |           |                  |                    |           |                  |                    |
|------|---------------|------------------|-----------|------------------|--------------------|-----------|------------------|--------------------|
|      |               | 1                | 2         | 3                | 4                  | 5         | 6                | 7                  |
|      |               | 1                | 1/x       | 1/x <sup>2</sup> | 1/x <sup>0,5</sup> | 1/y       | 1/y <sup>2</sup> | 1/y <sup>0,5</sup> |
| 25C  | $R^2$         | 0,9986           | 0,9975    | 0,9960           | 0,9983             | 0,9977    | 0,9962           | 0,9983             |
|      | Faj           | 6,08             | 10,70     | 0,08             | 0,01               | 0,02      | 0,06             | 0,01               |
|      | $\Sigma \%ER$ | 691,32           | 140,57    | 112,05           | 257,03             | 138,97    | 108,19           | 250,26             |
|      | $B_0$         | 1,86E+06         | 2,31E+05  | -2,87E+04        | 6,83E+05           | 2,24E+05  | -1,68E+04        | 6,65E+05           |
|      | $B_1$         | 6,28E+06         | 6,51E+06  | 6,88E+06         | 6,39E+06           | 6,49E+06  | 6,79E+06         | 6,39E+06           |
| 25B  | $R^2$         | 0,9986           | 0,9977    | 0,9967           | 0,9983             | 0,9978    | 0,9969           | 0,9984             |
|      | Faj           | 5,41             | 9,50      | 0,07             | 0,01               | 0,02      | 0,05             | 0,01               |
|      | $\Sigma \%ER$ | 676,94           | 121,66    | 95,13            | 248,33             | 121,02    | 94,30            | 242,91             |
|      | $B_0$         | 8,67E+05         | 9,89E+04  | -7,01E+03        | 3,06E+05           | 9,80E+04  | -1,36E+02        | 3,00E+05           |
|      | $B_1$         | 3,02E+06         | 3,13E+06  | 3,28E+06         | 3,08E+06           | 3,12E+06  | 3,24E+06         | 3,07E+06           |
| 25I  | $R^2$         | 0,9985           | 0,9974    | 0,9962           | 0,9982             | 0,9977    | 0,9965           | 0,9982             |
|      | Faj           | 5,02             | 8,61      | 0,07             | 0,01               | 0,02      | 0,05             | 0,01               |
|      | $\Sigma \%ER$ | 681,43           | 128,17    | 104,33           | 254,09             | 126,15    | 103,39           | 244,17             |
|      | $B_0$         | 9,65E+05         | 7,21E+04  | -5,31E+04        | 3,15E+05           | 6,66E+04  | -4,56E+04        | 3,00E+05           |
|      | $B_1$         | 3,51E+06         | 3,64E+06  | 3,81E+06         | 3,57E+06           | 3,62E+06  | 3,77E+06         | 3,57E+06           |
| 25E  | $R^2$         | 0,9986           | 0,9976    | 0,9966           | 0,9983             | 0,9978    | 0,9967           | 0,9984             |
|      | Faj           | 5,64             | 9,87      | 0,07             | 0,01               | 0,02      | 0,05             | 0,01               |
|      | $\Sigma \%ER$ | 686,40           | 123,41    | 100,00           | 249,78             | 121,07    | 97,17            | 239,71             |
|      | $B_0$         | 5,34E+04         | -7,31E+04 | 3,07E+05         | 4,66E+04           | -6,72E+04 | 2,91E+05         | 1,00E+06           |
|      | $B_1$         | 3,81E+06         | 3,99E+06  | 3,74E+06         | 3,80E+06           | 3,95E+06  | 3,74E+06         | 3,68E+06           |

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação; Faj: Teste F da Falta de Ajuste;  $\Sigma \%ER$ : Erro relativo percentual;  $B_0$  e  $B_1$ : Parâmetros dos modelo.

Os parâmetros  $B_0$  e  $B_1$  para a regressão linear ponderada foram obtidos com base nas Equação 2 e Equação 3, onde ( $x_i$ ,  $y_i$ ) representam o par de dados  $i$  do  $n$  total de pares

de dados e  $w_i$  representa o fator de ponderação. O grau de dependência estabelecido entre as duas variáveis, expresso pelo coeficiente de correlação ( $r$ ), foi obtido pela Equação 4. Os somatórios dos erros relativos percentuais foram obtidos com base na Equação 5, o qual compara a concentração obtida através da equação resultante da regressão ( $C_{exp}$ ), com a concentração teórica ou nominal ( $C_{nom}$ ) (77).

$$B_1 = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad \text{Equação 2}$$

$$B_0 = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i x_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad \text{Equação 3}$$

$$R = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad \text{Equação 4}$$

$$\%ER = \frac{C_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Para a avaliação de ajuste do modelo, os Modelos 1 e 2 apresentaram uma falta de ajuste,  $F_{aj} (5,02 \text{ a } 10,70) > F_{tab} (3,259)$ ; no entanto, os demais modelos se encontravam bem ajustados,  $F_{aj} (0,01 \text{ a } 0,07) < F_{tab} (3,259)$ . Outrossim, o Modelo 6 aparece associado ao somatório dos erros relativos percentuais mais baixo em relação a todos os 25R-NBOH (Cl, Br, Etil e I), pelo qual a aproximação de variância  $1/y^2$  apresenta-se como a mais válida de todas as estudadas. De acordo com Francisco (2008) (77), o melhor fator de ponderação é aquele que apresenta a menor soma de erros. Estes resultados estão de acordo com a distribuição gráfica assumida pelos erros (Figura 17). Por conseguinte, o Modelo 6 foi escolhido como o modelo de regressão mais adequado ao conjunto de dados estudados.

#### 4.2.3.3. Equação de regressão linear ponderada

A linearidade da curva padrão da matriz foi calculada pelo método dos mínimos quadrados ponderados, que utiliza o fator de ponderação  $1/y^2$ , Modelo 6, e mostrou-se satisfatória para a maioria dos compostos ( $R^2 > 0,996$ ): 25C-NBOH ( $y = 6,79E+06x - 1,68E+04$ , com  $R^2 = 0,9962$ ); 25B-NBOH ( $y = 3,24E+06x - 1,36E+02$ , com  $R^2 = 0,9969$ ); 25I-NBOH ( $y = 3,77E+06x - 4,56E+04$ , com  $R^2 = 0,9965$ ); 25E-NBOH ( $y = 3,95E+06x - 6,72E+04$ , com  $R^2 = 0,9967$ ). O teste  $t$  de Student mostrou que a linearidade foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Francisco (2008) (77) demonstrou em seu estudo que houve um aumento da exatidão para o modelo de regressão baseado no fator de ponderação  $1/x^2$  em relação ao modelo de regressão linear simples. Este aumento esteve particularmente evidente no extremo inferior da reta, sem que por isso fosse alterada a exatidão existente nas porções média e superior da reta de calibração (77).

Não foram observados valores extremos (teste de Grubbs). Em relação aos resultados de carregamento de amostra, após analisar os brancos injetados após os pontos mais concentrados, verificou-se que não havia presença de nenhum composto. O carregamento de amostra foi examinado por meio das análises dos selos, sem padrão adicionado, após as injeções dos pontos da curva analítica com as concentrações mais elevadas, 25,0  $\mu\text{g/mL}$  (branco,  $n = 3$ ). A avaliação deste parâmetro se deu pela ausência de picos nos cromatogramas correspondentes às soluções dos brancos.

#### 4.2.4. LOD e LOQ

Entende-se por LOD a menor concentração de um determinado analito que pode ser detectada e identificada com um grau de certeza. Também se define o LOD como a menor concentração que pode ser distinguida do ruído de fundo com um certo grau de confiança (6). Já em relação ao LOQ, este apresenta-se como o fator limite para quantificação sendo o limite inferior da faixa de concentração. Já em relação ao limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (71). Os valores de LOD para o método foi ajustado para 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , exceto para 25C-NBOH (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ), valor avaliado pela menor concentração de padrão injetado que apresentava sensibilidade para uma boa seletividade do espectro de ultravioleta, e LOQ de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 9).

**Tabela 9.** Faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão dos compostos validados.

| Substâncias | Faixa de linearidade<br>µg/mL | LOD<br>µg/mL | LOQ<br>µg/mL | Repetibilidade<br>(RSD %; n = 3) |     |      | Reprodutibilidade<br>(RSD %; n = 6) |     |      | Recuperação<br>(RSD%; n = 3) |       |
|-------------|-------------------------------|--------------|--------------|----------------------------------|-----|------|-------------------------------------|-----|------|------------------------------|-------|
|             |                               |              |              | 0,25                             | 5,0 | 25,0 | 0,25                                | 5,0 | 25,0 | 1,0                          | 5,0   |
| 25B-NBOH    | 0,2-25                        | 0,05         | 0,2          | 0,3                              | 0,9 | 2,5  | 4,6                                 | 0,5 | 2,2  | 92,9                         | 109,5 |
| 25C-NBOH    | 0,2-25                        | 0,1          | 0,2          | 0,6                              | 0,9 | 2,4  | 4,2                                 | 0,5 | 2,1  | 113,5                        | 106,9 |
| 25E-NBOH    | 0,2-25                        | 0,05         | 0,2          | 0,1                              | 0,8 | 2,6  | 5,0                                 | 2,0 | 5,7  | 82,8                         | 99,6  |
| 25I-NBOH    | 0,2-25                        | 0,05         | 0,2          | 0,2                              | 1,0 | 2,5  | 6,0                                 | 0,7 | 2,5  | 105,1                        | 113,5 |

LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação; RSD: Desvio padrão relativo; 0,25 µg/mL; 1,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 25,0 µg/mL.

#### 4.2.5. Precisão e Recuperação

De acordo com a UNODC (2009) (72), a precisão é uma medida da proximidade dos resultados analíticos, nas condições do método, obtidos a partir de uma série de medições repetidas. Ela reflete os erros aleatórios que ocorrem em um método. Dois conjuntos de condições comumente aceitos sob os quais a precisão é medida são a repetibilidade e reprodutibilidade (72).

De acordo com a UNODC 2009 (72), a repetibilidade é observada quando o mesmo analista investiga amostras no mesmo dia com o mesmo instrumento e no mesmo laboratório. Já em relação a reprodutibilidade ou precisão intermediária esta seria qualquer variação dessas condições (por exemplo, diferentes analistas, diferentes dias, diferentes instrumentos, diferentes laboratórios). A precisão é geralmente medida como o coeficiente de variação ou desvio padrão relativo de resultados analíticos obtidos de padrões de controle de qualidade preparados independentemente. A precisão depende da concentração e deve ser medida em diferentes concentrações dentro da faixa de trabalho, normalmente nas partes inferior, intermediária e superior. A precisão aceitável nas concentrações mais baixas é de 20%. Em concentrações mais altas, seria de esperar uma precisão melhor (72).

Avaliou-se a repetibilidade e a reprodutibilidade dentro da faixa de trabalho, nas partes inferior, intermediária e superior: 0,25, 5,0 e 25,0 µg/mL. Dois analistas diferentes repetiram todo o procedimento, em dias diferentes, para validação de reprodutibilidade. De acordo com os dados mostrados na Tabela 9, para a avaliação de repetibilidade os 25R-NBOH variaram entre 0,1 a 0,6 % na faixa inferior, de 0,8 a 1,0% na intermediária e 2,4 a 2,6 % no superior. No que tange a reprodutibilidade, verificou-se que a variação na faixa baixa ficou entre 4,2 e 6,0 %, na média a variação foi de 0,5 a 2,0% e na superior encontrou-se uma variação de 2,1 a 5,7%.

A recuperação de uma substância em um ensaio é a resposta do detector obtida a partir de uma quantidade do analito adicionada e extraída da matriz (amostras fortificadas), em comparação com a resposta do detector para a verdadeira concentração do padrão autêntico puro (71,72). A recuperação do analisador não precisa ser de 100%, mas a extensão da recuperação deve ser consistente (para todas as concentrações testadas) e precisa ser reprodutível (melhor que 20%) (72). Assim, no que se refere a recuperação (Tabela 9) para os pontos de 1.0 e 5.0 µg/mL, apresentou-se uma taxa de recuperação para o 25B-NBOH (92,9% e 109,5%) respectivamente; 25C-NBOH (113,5% e 106,9%); 25E-NBOH (82,8% e 99,6%) e 25I-NBOH (105,1% e 113,5%). Os resultados de repetibilidade/reprodutibilidade e recuperação ficaram dentro da faixa aceitável proposta, para todos os compostos,  $\pm 20\%$  (72), e menor que 7,3 % RSD (71), respectivamente.

#### 4.3. ESTATÍSTICAS E CASOS REAIS

##### 4.3.1. Estatísticas dos selos analisados no Distrito Federal

Entre 2015 e 2021, um total de 81919 selos foram apreendidos pela Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF) e 791 casos foram analisados no Laboratório de Química e Física Forense (LQFF) do Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Distrito Federal, por GC-MS e/ou Q-TOF-HPLC/MS. Detectou-se, nesse período, as seguintes fenetilaminas (25R-NBOH e 25R-NBOMe) em 64,9% e 17,2%, respectivamente, e LSD, em 18% dos casos analisados.

No último ano, o LSD apresentou aumento nas apreensões, chegando a 40% do total de análises. Já os NBOMes foram detectados em 17,2% das ocorrências analisadas. Em 2015, essas fenetilaminas atingiram 97% no total das apreensões. Porém, com o passar dos anos, esse grupo de NPS entrou em declínio e não houve apreensões no ano de 2021. Essa tendência também foi relatada pela UNODC, onde 25B-NBOMe, 25C-NBOMe e 25I-NBOMe tiveram um declínio significativo nas notificações depois que foram regulamentados em 2015 (78).

Os 25R-NBOHs (25I-NBOH, 25C-NBOH, 25B-NBOH e 25E-NBOH) foram detectados pela primeira vez em 2016, presente em 58% do total dos casos analisados naquele ano. Esta classe apresentou um total de 64,9% de todas as análises realizadas em selos entre 2015 a 2021 no DF. Chegando a 80% dos casos analisados em 2019 (Tabela

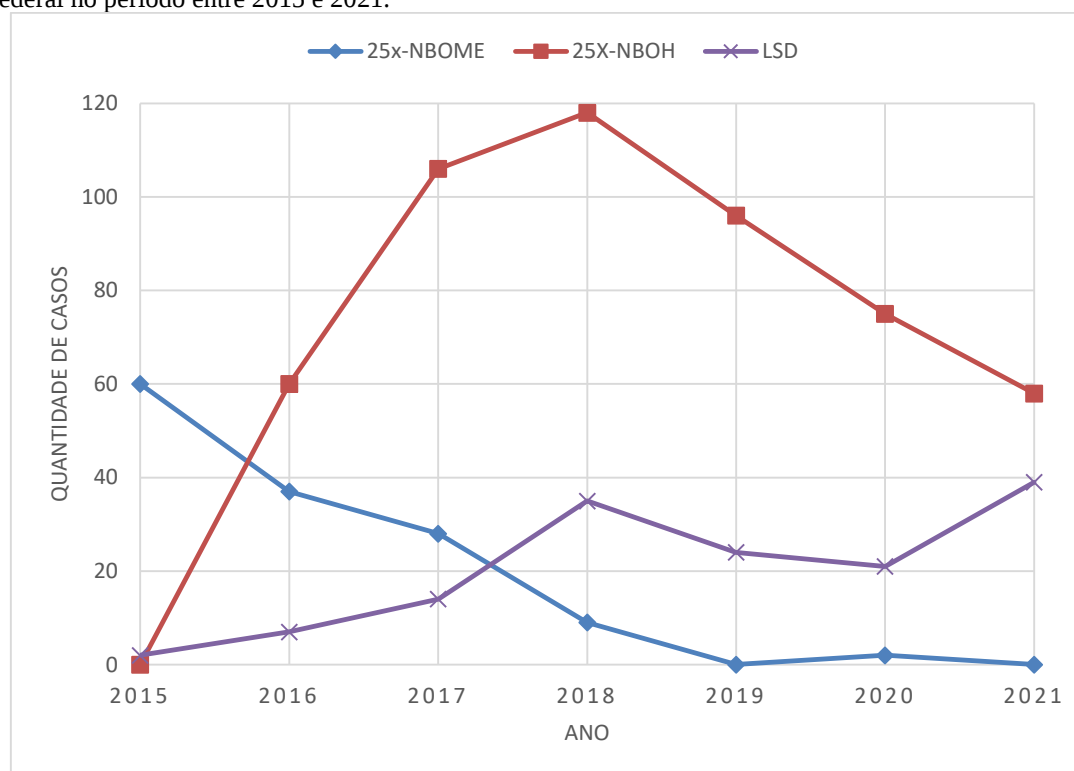
10). O 25I-NBOH é a substância que teve maior frequência em 2016 e 2017, e o 25E-NBOH nos anos posteriores (

Figura 18).

**Tabela 10.** Fenetilaminas e LSD analisadas em selos apreendidos no Distrito Federal (Brasil) no período de 2015 a 2021.

|       | Fenetilaminas e LSD |           |          |           |          |          |           | LSD | Total |
|-------|---------------------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----|-------|
|       | 25B-NBOH            | 25B-NBOME | 25C-NBOH | 25C-NBOME | 25E-NBOH | 25I-NBOH | 25I-NBOME |     |       |
| 2015  | 0                   | 19        | 0        | 8         | 0        | 0        | 33        | 2   | 62    |
| 2016  | 0                   | 8         | 0        | 14        | 0        | 60       | 15        | 7   | 104   |
| 2017  | 29                  | 1         | 0        | 0         | 0        | 77       | 27        | 14  | 148   |
| 2018  | 24                  | 2         | 13       | 1         | 56       | 25       | 6         | 35  | 162   |
| 2019  | 1                   | 0         | 22       | 0         | 71       | 2        | 0         | 24  | 120   |
| 2020  | 12                  | 1         | 21       | 1         | 40       | 2        | 0         | 21  | 98    |
| 2021  | 10                  | 0         | 2        | 0         | 46       | 0        | 0         | 39  | 97    |
| Total | 76                  | 31        | 58       | 24        | 213      | 166      | 81        | 142 | 791   |

**Figura 18.** Fenetilaminas (25R-NBOH e 25R-NBOME) e LSD analisados em selos apreendidos no Distrito Federal no período entre 2015 e 2021.



**Fonte:** Autoria própria (Excel).

No Estado de Santa Catarina, Brasil, há uma prevalência de NPS sobre LSD em selos apreendidos. 25R-NBOME, 25R-NBOH, fentanil, derivados de mescalina, triptaminas, catinonas e canabinoides sintéticos foram detectados nos selos apreendidos entre 2011 e 2017 (79). Entre 2008 e 2017, em Minas Gerais, 62 NPS foram identificadas

em materiais como tablets, selos e cristais (6). Análise de selos apreendidos entre 2006 e 2019, no Rio de Janeiro, detectaram 15 substâncias prevalentes, sendo 13 fenetilaminas. Verificou-se que os compostos 25R-NBOH apresentaram maior frequência nesta matriz, representando 54% dos selos estudados. No mesmo estudo, constatou-se que em 2016 o número de 25R-NBOH superou os números de 25R-NBOMe em selos apreendidos no Rio de Janeiro (80). Os compostos de 25R-NBOH aparecem como alternativas para o LSD no mercado de *designer drug* e como metabólitos dos 25R-NBOMe (9,14,15,21,27).

#### 4.3.2. Casos Reais

Para este trabalho, 106 amostras de selos apreendidos de casos reais foram quantificadas e os resultados estão resumidos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Concentração dos analitos encontrados em 106 amostras de selos.

| Analito  | Casos Positivos | Média<br>µg/selo | Faixa de<br>Concentração | 2C-R* |
|----------|-----------------|------------------|--------------------------|-------|
| 25C-NBOH | 49 (46,2%)      | 237,0            | 12,2 – 705,7             | 5     |
| 25B-NBOH | 33 (31,1%)      | 899,6            | 14,2 - >1250             | 13    |
| 25E-NBOH | 37 (34,9%)      | 818,9            | 35,3 - >1250             | 9     |
| 25I-NBOH | 28 (26,4%)      | 861,3            | 20,5 - >1250             | 9     |

Concentração em µg/mL por selo de 25B-NBOH; 25C-NBOH; 25E-NBOH; 25I-NBOH.  
\*2C-R detectado correspondente ao selo analisado.

A faixa de contração de cada 25R-NBOH para os selos analisados foram: (12,2 – 705,7 µg, n = 49), 25B-NBOH (14,2 - >1250 µg, n = 33), 25E-NBOH (35,3 - >1250 µg, n = 37) e 25I-NBOH (20,5 - >1250 µg, n = 28) (Tabela 11). Quatro amostras apresentaram o 25E-NBOH em alta concentração (25C-NBOH, com 205,5 a 557,4 µg; 25E-NBOH, com 274,9 a 607,5 µg) (Tabela 12).

Destaca-se, em relação a questões toxicológicas, as elevadas concentrações encontradas nas amostras apreendidas. Altas concentrações, como as encontradas nesse trabalho, elevam o risco de overdose entre usuários de drogas. Em um estudo com 119 selos, apreendidos entre 2014 e 2016, na Austrália, observou-se diferença significativa entre a maior e a menor concentração por selo para os NBOMes, apresentando DPR de 25,4% para o 25C-NBOME, 49,1% para o 25B-NBOME e 46,4% para o 25I-NBOME (52). Em nossos resultados, o DPR para cada NBOH avaliado, com alta concentração, foi para o 25C-NBOH (29,2%), 25B-NBOH (25,3%), 25E-NBOH (34,8%) e 25I-NBOH (27,7%).

**Tabela 12.** Amostras contendo 25R-NBOH, data de apreensão, tempo de estocagem e os resultados encontrados.

| Amostra/<br>item | Data de<br>apreensão | Tempo de<br>estocagem<br>(meses)* | Analito                              | 2C<br>(1,0 - 2,5%) |
|------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| A01/1            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOH (>1250); 25I-NBOH (57,18)   | -                  |
| A01/2            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOH (419,11); 25I-NBOH (<LOQ)   | -                  |
| A01/3            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOH (598,71); 25I-NBOH (16,78)  |                    |
| A02/1            | out/17               | 47                                | 25B-NBOH (1080,02)                   | -                  |
| A02/2            | out/17               | 47                                | 25B-NBOH (583,70)                    | -                  |
| A02/3            | out/17               | 47                                | 25B-NBOH (852,04)                    | -                  |
| A03/1            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOH (960,80)                    | -                  |
| A03/2            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOH (>1250)                     | -                  |
| A03/3            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOH (888,30)                    | -                  |
| A04/1            | fev/18               | 43                                | 25B-NBOH (>1250)                     | 2C-B               |
| A04/2            | fev/18               | 43                                | 25B-NBOH (>1250)                     | 2C-B               |
| A04/3            | fev/18               | 43                                | 25B-NBOH (>1250)                     | 2C-B               |
| A05/1            | abr/18               | 41                                | 25B-NBOH (570,69); 25E-NBOH (31,08)  | 2C-B               |
| A05/2            | abr/18               | 41                                | 25B-NBOH (1125,57); 25E-NBOH (75,24) | -                  |
| A05/3            | abr/18               | 41                                | 25B-NBOH (1184,88); 25E-NBOH (23,30) | -                  |
| A06/1            | abr/18               | 41                                | 25B-NBOH (1207,96)                   | 2C-B               |
| A06/2            | abr/18               | 41                                | 25B-NBOH (1129,95)                   | 2C-B               |
| A06/3            | abr/18               | 41                                | 25B-NBOH (871,79)                    | 2C-B               |
| A07/1            | set/20               | 12                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | 2C-B               |
| A07/2            | set/20               | 12                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | 2C-B               |
| A07/3            | set/20               | 12                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | 2C-B               |
| A08/1            | set/20               | 12                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | 2C-B               |
| A08/2            | set/20               | 12                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | 2C-B               |
| A08/3            | set/20               | 12                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | 2C-B               |
| A09/1            | out/20               | 11                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | -                  |
| A09/2            | nov/20               | 10                                | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | -                  |
| A09/3            | dez/20               | 9                                 | 25B-NBOH (>1250); 25H-NBOH           | -                  |
| A15/1            | jan/19               | 32                                | 25C-NBOH (397,41)                    | -                  |
| A15/2            | jan/19               | 32                                | 25C-NBOH (385,38)                    | -                  |
| A15/3            | jan/19               | 32                                | 25C-NBOH (443,30)                    | -                  |
| A16/1            | set/19               | 24                                | 25C-NBOH (572,82)                    | 2C-C               |
| A16/2            | set/19               | 24                                | 25C-NBOH (643,52)                    | 2C-C               |
| A16/3            | set/19               | 24                                | 25C-NBOH (598,61)                    | -                  |
| A17/1            | jan/20               | 20                                | 25C-NBOH (492,05)                    | 2C-C               |
| A17/2            | jan/20               | 20                                | 25C-NBOH (340,06)                    | 2C-C               |
| A17/3            | jan/20               | 20                                | 25C-NBOH (394,27)                    | 2C-C               |
| A18/1            | mai/20               | 16                                | 25C-NBOH (207,36); 25E-NBOH (280,63) | -                  |
| A18/2            | mai/20               | 16                                | 25C-NBOH (243,87); 25E-NBOH (314,26) | -                  |
| A18/3            | mai/20               | 16                                | 25C-NBOH (247,33); 25E-NBOH (336,03) | -                  |

|       |        |    |                                                                       |      |
|-------|--------|----|-----------------------------------------------------------------------|------|
| A19/1 | mai/20 | 16 | 25C-NBOH (504,69)                                                     | -    |
| A19/2 | mai/20 | 16 | 25C-NBOH (448,99)                                                     | -    |
| A19/3 | mai/20 | 16 | 25C-NBOH (521,76)                                                     | -    |
| A20/1 | mai/20 | 16 | 25C-NBOH (595,6)                                                      | -    |
| A20/2 | mai/20 | 16 | 25C-NBOH (544,47)                                                     | -    |
| A20/3 | mai/20 | 16 | 25C-NBOH (568,42)                                                     | -    |
| A28/1 | abr/18 | 41 | 25E-NBOH (848,12)                                                     | -    |
| A28/2 | abr/18 | 41 | 25E-NBOH (733,60)                                                     | -    |
| A28/3 | abr/18 | 41 | 25E-NBOH (738,23)                                                     | -    |
| A29/1 | nov/18 | 34 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | -    |
| A29/2 | nov/18 | 34 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | -    |
| A29/3 | nov/18 | 34 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | -    |
| A30/1 | dez/18 | 33 | 25E-NBOH 723,91)                                                      | -    |
| A30/2 | dez/18 | 33 | 25E-NBOH (810,58)                                                     | -    |
| A30/3 | dez/18 | 33 | 25E-NBOH (648,59)                                                     | -    |
| A31/1 | out/19 | 23 | 25E-NBOH (757,41)                                                     | -    |
| A31/2 | out/19 | 23 | 25E-NBOH (646,06)                                                     | -    |
| A31/3 | out/19 | 23 | 25E-NBOH (590,44)                                                     | -    |
| A32/1 | jul/19 | 26 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | 2C-E |
| A32/2 | jul/19 | 26 | 25E-NBOH (1194,34)                                                    | 2C-E |
| A32/3 | jul/19 | 26 | 25E-NBOH (1168,62)                                                    | 2C-E |
| A33/1 | jul/19 | 26 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | 2C-E |
| A33/2 | jul/19 | 26 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | 2C-E |
| A33/3 | jul/19 | 26 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | 2C-E |
| A34/1 | out/20 | 11 | 25E-NBOH (772,87)                                                     | 2C-E |
| A34/2 | out/20 | 11 | 25E-NBOH (646,06)                                                     | 2C-E |
| A34/3 | out/20 | 11 | 25E-NBOH (590,44)                                                     | 2C-E |
| A35/1 | mai/20 | 16 | 25E-NBOH (1191,40)                                                    | -    |
| A35/2 | mai/20 | 16 | 25E-NBOH (940,26)                                                     | -    |
| A35/3 | mai/20 | 16 | 25E-NBOH (>1250)                                                      | -    |
| A36/1 | mai/20 | 16 | 25E-NBOH (1046,98)                                                    | -    |
| A36/2 | mai/20 | 16 | 25E-NBOH (1205,05)                                                    | -    |
| A36/3 | mai/20 | 16 | 25E-NBOH (1173,11)                                                    | -    |
| A37/1 | jan/17 | 56 | 25I-NBOH (687,95); 25C-NBOH (11,33);<br>25H-NBOH                      | -    |
| A37/2 | jan/17 | 56 | 25I-NBOH (759,70); 25C-NBOH (<LOQ);<br>25H-NBOH                       | -    |
| A37/3 | jan/17 | 56 | 25I-NBOH (643,19); 25C-NBOH (<LOQ);<br>25H-NBOH                       | -    |
| A38/1 | jul/17 | 50 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (13,54);<br>25H-NBOH                       | -    |
| A38/2 | jul/17 | 50 | 25I-NBOH (1215,54); 25C-NBOH<br>(<LOQ); 25H-NBOH                      | -    |
| A38/3 | jul/17 | 50 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (<LOQ);<br>25H-NBOH                        | -    |
| A39/1 | mar/17 | 54 | 25I-NBOH (1199,04); 25C-NBOH<br>(<LOQ); 25B-NBOH (<LOQ); 25H-<br>NBOH | -    |

|        |        |    |                                                                |      |
|--------|--------|----|----------------------------------------------------------------|------|
| A39/2  | mar/17 | 54 | 25I-NBOH (1220,93); 25C-NBOH (<LOQ); 25B-NBOH (<LOQ); 25H-NBOH | -    |
| A39/3  | mar/17 | 54 | 25I-NBOH (610,24); 25H-NBOH                                    | 2C-I |
| A40/1  | jan/18 | 44 | 25I-NBOH (910,41); 25C-NBOH (39,80); 25H-NBOH                  | -    |
| A40/2  | jan/18 | 44 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (63,71); 25B-NBOH (<LOQ); 25H-NBOH  | -    |
| A40/3  | jan/18 | 44 | 25I-NBOH (796,42); 25C-NBOH (36,60); 25H-NBOH                  | -    |
| A41/1  | abr/18 | 41 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (30,97); 25H-NBOH                   | 2C-I |
| A41/2  | abr/18 | 41 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (37,46); 25H-NBOH                   | 2C-I |
| A41/3  | abr/18 | 41 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (31,98); 25H-NBOH                   | 2C-I |
| A42/1  | jan/18 | 44 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (92,36); 25H-NBOH                   | -    |
| A42/2  | jan/18 | 44 | 25I-NBOH (1027,85); 25C-NBOH (70,54); 25H-NBOH                 | -    |
| A42/3  | jan/18 | 44 | 25I-NBOH (1161,59); 25C-NBOH (81,65); 25H-NBOH                 | -    |
| A49/1  | jul/17 | 50 | 25I-NBOH (>1250); 25C-NBOH (12,16); 25H-NBOH                   | 2C-I |
| A50/1  | jan/17 | 56 | 25I-NBOH (674,82); 25H-NBOH                                    | 2C-I |
| A51/1  | jan/17 | 56 | 25I-NBOH (602,17) 25H-NBOH                                     | 2C-I |
| A52/1  | jan/17 | 56 | 25I-NBOH (581,16); 25H-NBOH                                    | -    |
| A53/1  | abr/17 | 53 | 25I-NBOH (937,23); 25C-NBOH (13,21); 25H-NBOH                  | 2C-I |
| A54/1  | abr/17 | 53 | 25I-NBOH (818,74); 25C-NBOH (<LOQ); 25H-NBOH                   | -    |
| A55/1  | abr/17 | 53 | 25I-NBOH (973,32); 25C-NBOH (14,38); 25H-NBOH                  | 2C-I |
| A 16/4 | set/19 | 24 | 25C-NBOH (748,47)                                              | -    |
| A 15/4 | jan/19 | 32 | 25C-NBOH (385,38)                                              | -    |
| A56/1  | abr/18 | 41 | 25B-NBOH (>1250)                                               | -    |
| A57/1  | out/18 | 35 | 25E-NBOH (637,81); 25C-NBOH (587,98)                           | -    |
| A58/1  | jul/18 | 38 | 25E-NBOH (921,98)                                              | -    |
| A59/1  | out/18 | 35 | 25E-NBOH (1111,18)                                             | -    |
| A60/1  | out/18 | 35 | 25E-NBOH (>1250); 25C-NBOH (44,62)                             | -    |
| A61/1  | out/18 | 35 | 25C-NBOH (573,93)                                              | -    |
| A62/1  | ago/20 | 13 | 25C-NBOH (730,04)                                              | -    |

\* Tempo de estocagem entre a data de apreensão e a reanálise

Verificou-se que em 32 amostras foi encontrado um padrão, no qual além da detecção do composto principal ou majoritário no selo (>100 µg), também se detectou a presença de um segundo composto de NBOH, analito secundário, em baixa concentração (< 100 µg) (Tabela 12 e Tabela 13). Para o 25B-NBOH, foi possível identificar que 21%

dos selos analisados apresentavam metabólitos secundários, 25I-NBOH (perfil 1,3; n=3) e 25E-NBOH (perfil 1,4; n=3). Para o 25E-NBOH, somente em um caso detectou-se um composto em baixa concentração, 25C-NBOH (perfil 2,2; n=1) e não se detectou, para o 25C-NBOH, nenhum selo com compostos secundários em baixa concentração.

**Tabela 13.** Perfil qualitativo encontrado em 106 amostras de selos.

| Perfil    | 25C-NBOH | 25B-NBOH | 25E-NBOH | 25I-NBOH | 25H-NBOH | Total | %     |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| 1,1       |          | x        |          |          |          | 13    | 12,26 |
| 1,2       |          | x        |          |          | x        | 9     | 8,49  |
| 1,3       |          | x        |          | o        |          | 3     | 2,83  |
| 1,4       |          | x        | o        |          |          | 3     | 2,83  |
| 2,1       |          |          | x        |          |          | 29    | 27,36 |
| 2,2       | o        |          | x        |          |          | 1     | 0,94  |
| 2,3       | x        |          | x        |          |          | 4     | 3,77  |
| 3,1       | x        |          |          |          |          | 19    | 17,92 |
| 4,1       | o        |          |          | x        | x        | 20    | 18,87 |
| 4,2       | o        | o        |          | x        | x        | 5     | 4,72  |
| Total (n) | 49       | 33       | 37       | 28       | 34       | 106   | 100   |
| %         | 46,23    | 31,13    | 34,91    | 26,42    | 32,08    | 100   |       |

x: analito com concentração > 100 µg (analito majoritário)  
o: analito com concentração < 100 µg (analito secundário)

Chama atenção os selos que apresentavam 25I-NBOH como analito majoritário, pois avaliou-se que em 100% dos casos detectou-se a presença de 25C-NBOH (perfil 4,1 e 4,2; n = 25). Rodrigues de Moraes *et al.* (2020) (32) reportaram concentrações em selos para o 25C-NBOH entre 0,04 a 340 µg e para os selos que continham 25I-NBOH 0,07 a 1929 µg. Em todos os selos analisado que continham 25I-NBOH como composto principal (n=11), detectou-se 25C-NBOH como composto secundário. Chia *et al.* 2019 (7) em seu estudo utilizaram amostras de selos apreendidos para teste de seu método (UHPLC-MS/MS), e as amostras analisadas apresentaram o mesmo perfil químico dos selos relatados por este estudo que apresentavam 25I-NBOH com maior concentração nos selos, (25I-NBOH, 25H-NBOH, 25C-NBOH e 2C-I).

Wu *et al.* (2017) (12) desenvolveram rotas sintéticas para síntese de potenciais metabólitos para 25C-NBOMe e 25I-NBOMe. Nove destes produtos poderiam ser usados como metabólitos de biomarcadores na detecção urinária em laboratórios forenses. Nesse trabalho, para a síntese do 25I-NBOMe, foi possível identificar a utilização de reagentes como N-clorosuccinimida e diclorometano que apresentam cloro em sua estrutura

molecular (12). Barro *et al.* (2021) (13) relataram um método para a síntese de três NBOHs (25H-, 25I- e 25B-NBOH; 9-38% de rendimento total) e três NBOMes (25H-, 25I- e 25B-NBOMe; 7-33% de rendimento total). Da mesma forma que o estudo anterior, a produção de 25I-NBOH e 25I-NBOMe apresentou em sua rota de síntese a utilização de reagente clorado, no caso o HCl (ácido clorídrico). Estas rotas sintéticas e a presença de 25C-NBOH em todos os selos que continham 25I-NBOH como composto majoritário demonstram que a presença de 25C-NBOH, nesses casos, pode ser um indicativo que esta substância seja um subproduto de síntese para os 25I-NBOH.

Também foi avaliado que todas as amostras que continham 25I-NBOH como composto majoritário (perfil 4,1 e 4,2; n = 25) se identificou 25H-NBOH. Esta última substância também foi detectada conjuntamente com 25B-NBOH (perfil 1,2; n = 9). Ressalta-se que seja improvável a adição intencional de NBOHs nos selos quando essas substâncias apresentam valores abaixo de 100 µg (52). A presença de 25H-NBOH também pode ser um indicativo de que esta substância seja um outro produto de síntese para os 25I e 25B-NBOH. Zawilska *et al.* (2020) (21) afirmaram que se pode assumir que “a etapa de halogenação realizada durante a síntese de uma droga em um laboratório clandestino seja incompleta e que o material não convertido não seja adequadamente removido por purificação, assim parece provável que 25H-NBOMe possa estar presente no produto final da droga de abuso” (21,52). Foi possível avaliar uma heterogeneidade nas quantidades de 25H-NBOH presente nas amostras analisadas.

#### 4.2. ESTUDO DE ESTABILIDADE

Sabe-se que as substâncias da família NBOH fragmentam-se no respectivo 2C quando analisadas por GC-MS, utilizando colunas analíticas convencionais (27,34). Além disso, outros fatores podem influenciar a clivagem do 25R-NBOH na análise por GC-MS, como o comprimento da coluna (35). Por isso, a reanálise dos selos por UHPLC-DAD, uma técnica fria ideal para substâncias termolábeis, após longo armazenamento e avaliação de possível degradação em solvente ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas, pode ajudar a entender o mecanismo de degradação do 25R-NBOH em 2C-R.

Avaliou-se que na análise “tempo zero”, 2C-R foi detectado em 4 amostras contendo 25R-NBOMe e 36 com 25R-NBOH, na proporção de 1,0 - 2,5% (Tabela 12 e **Erro! Autoreferência de indicador não válida.**). Não se pode concluir que os 2C-R

detectados sejam precursores da síntese de 25R-NBOH (32,81) e/ou subproduto de degradação do 25R-NBOH (27,35), como já foi discutido por Edmund *et al.* (2018) (52). No entanto, considerando o grande tempo de armazenamento das amostras reais analisadas nesse estudo, é plausível concluir que NBOH e NBOMe são estáveis a longo prazo quando armazenados em temperatura ambiente e sem exposição à luz.

**Tabela 14.** Amostras contendo 25R-NBOMe, data de apreensão, tempo de estocagem e os resultados encontrados.

| Amostra/<br>item | Data de<br>apreensão | Tempo de<br>estocagem<br>(meses)* | Analito                         | 2C<br>(1,0 - 2.5%) |
|------------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| A10/1            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A10/2            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A10/3            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A11/1            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A11/2            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A11/3            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A12/1            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A12/2            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A12/3            | jan/16               | 68                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A13/1            | abr/17               | 53                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A13/2            | abr/17               | 53                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A13/3            | abr/17               | 53                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A14/1            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOMe; 25H-NBOMe            | -                  |
| A14/2            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOMe; 25H-NBOMe            | -                  |
| A14/3            | dez/17               | 45                                | 25B-NBOMe; 25H-NBOMe            | -                  |
| A21/1            | abr/14               | 89                                | 25C-NBOMe                       | 2C-C               |
| A21/2            | abr/14               | 89                                | 25C-NBOMe                       | 2C-C               |
| A21/3            | abr/14               | 89                                | 25C-NBOMe                       | 2C-C               |
| A22/1            | mai/16               | 64                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A22/2            | mai/16               | 64                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A22/3            | mai/16               | 64                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A23/1            | jun/16               | 63                                | 25C-NBOMe; 25I-NBOMe            | -                  |
| A23/2            | jun/16               | 63                                | 25C-NBOMe; 25I-NBOMe            | -                  |
| A23/3            | jun/16               | 63                                | 25C-NBOMe; 25I-NBOMe            | -                  |
| A24/1            | jun/16               | 63                                | 25C-NBOMe                       | 2C-C               |
| A25/2            | jun/16               | 63                                | 25B-NBOMe                       | -                  |
| A26/1            | abr/17               | 53                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A26/2            | abr/17               | 53                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A26/3            | abr/17               | 53                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A27/1            | mai/18               | 40                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A27/2            | mai/18               | 40                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A27/3            | mai/18               | 40                                | 25C-NBOMe                       | -                  |
| A43/1            | mai/16               | 64                                | 25I-NBOMe; 25C-NBOMe; 25H-NBOMe | -                  |
| A43/2            | mai/16               | 64                                | 25I-NBOMe; 25C-NBOMe; 25H-NBOMe | -                  |

|       |        |    |                                 |   |
|-------|--------|----|---------------------------------|---|
| A43/3 | mai/16 | 64 | 25I-NBOMe; 25C-NBOMe; 25H-NBOMe | - |
| A44/1 | abr/16 | 65 | 25I-NBOMe;25H-NBOMe             | - |
| A44/2 | abr/16 | 65 | 25I-NBOMe;25H-NBOMe             | - |
| A44/3 | abr/16 | 65 | 25I-NBOMe;25H-NBOMe             | - |
| A45/1 | abr/16 | 65 | 25I-NBOMe;25H-NBOMe             | - |
| A45/2 | abr/16 | 65 | 25I-NBOMe;25H-NBOMe             | - |
| A45/3 | abr/16 | 65 | 25I-NBOMe;25H-NBOMe             | - |
| A46/1 | dez/17 | 45 | 25I-NBOMe; 25C-NBOMe; 25H-NBOMe | - |
| A46/2 | dez/17 | 45 | 25I-NBOMe; 25C-NBOMe; 25H-NBOMe | - |
| A46/3 | dez/17 | 45 | 25I-NBOMe; 25C-NBOMe; 25H-NBOMe | - |
| A47/1 | jul/17 | 50 | 25I-NBOMe                       | - |
| A47/2 | jul/17 | 50 | 25I-NBOMe                       | - |
| A47/3 | jul/17 | 50 | 25I-NBOMe                       | - |
| A48/1 | ago/17 | 49 | 25I-NBOMe                       | - |
| A48/2 | ago/17 | 49 | 25I-NBOMe                       | - |
| A48/3 | ago/17 | 49 | 25I-NBOMe                       | - |

\* Tempo de estocagem entre a data de apreensão e a reanálise

No que tange aos resultados de estabilidade das amostras, os selos que continham 25R-NBOMe não apresentaram perda significativa de área do analito, tanto em relação ao solvente (água/ACN 1:1 e metanol) quanto à temperatura (4,0, 25 e 50 °C). 25R-NBOH apresentou estabilidade em metanol e em meio aquoso, a 4°C, após 50 dias e a 25 °C, em metanol.

Para as demais condições que os NBOHs foram submetidos, no estudo de estabilidade, as amostras armazenadas em metanol a 50 °C apresentaram aumento significativo da área de 2C-R e diminuição do respectivo 25R-NBOH. Obteve-se uma razão da área 2C-R/25R-NBOH em 53% para 25E-NBOH, 81% para 25C-NBOH, considerando todos os selos avaliados do NBOH respectivo. Também se revelou relevante a degradação nas amostras extraídas com água/ACN (1:1), a 25 e 50 °C. A 25°C, a razão entre as áreas de 2C-R/25R-NBOH variou de 23% (25E-NBOH) a 44% (25C-NBOH).

No que diz respeito às amostras de 25R-NBOH estocados a 50 °C e solvente água/ACN, a análise demonstrou uma degradação exponencial para todos os 25R-NBOH testados. A partir do dia 2, já se observou uma diminuição da área de todos os 25R-NBOHs. Avaliou-se que a perda de área da relação 25R-NBOH/2C-R, no dia 28, foi de 91% (25C-NBOH) a 99% (25I-NBOH). Em relação à média das áreas absolutas dos 25R-NBOHs, apresentou-se, no dia 50, uma degradação de 93% para o 25C-NBOH e completa para os restantes.

Alguns autores também avaliaram o efeito da temperatura no armazenamento de 25R-NBOH/NBOMe; entretanto, os artigos não indicaram, para os parâmetros de temperatura e tempo de armazenamento, um efeito significativo de degradação. Chia *et al.*(2019) (7) estudaram a estabilidade dos analitos, 25B-NBOH, 25C-NBOH, 25I-NBOH e 25H-NBOH, em água e metanol, por 6 meses; contudo, as condições de temperatura não foram informadas. A alteração da temperatura do forno no LC (35 e 40 °C) e da linha de dessolvatação (250 e 300 °C) também foram investigadas e não se observou nenhuma degradação significativa para o 25R-NBOH em 2C-R (DPR < 6%) (7). Franck *et al.*(2019) (33) avaliaram a estabilidade de 51 novas substâncias psicoativas, a 4,0 °C, em metanol, incluindo 25B-NBOH, 25C-NBOH, 25E-NBOH e 25I-NBOH, no período de 16 a 20 meses. Os autores concluíram que não houve degradação ao longo do tempo (33). 25R-NBOH (R= Br, Cl, I e H), adicionados em amostras de extração de urina, foram estáveis, por pelo menos 4 dias, quando mantidos a 4,0 °C (30). A estabilidade em plasma humano dos derivados de NBOMes (25H-NBOMe, 25B-NBOMe, 25E-NBOMe, 25N-NBOMe, 25C-NBOH, 25I-NBOH, 25B-NBF, 25C-NBF e 25I-NBF) foi avaliada por Seo *et al.*(2019) (29). Os autores avaliaram a estabilidade de curto prazo em ciclos repetidos de congelamento-descongelamento, bancada (1 dia em temperatura ambiente) e estabilidade pós-preparativa (1 dia a 4,0 °C). Eles também analisaram a estabilidade de longo prazo, em que as amostras foram armazenadas em -80 °C, por 30 dias. Segundo os autores, todas as substâncias, em ambos os testes, apresentaram boa estabilidade (DPR < 7,2%) (29).

A estabilidade das amostras, sangue e urina que continham 79 substâncias, incluindo 25R-NBOH e 25R-NBOMe (R = Br, Cl, I e etil), extraídas em acetonitrila, foi avaliada em condições laboratoriais, após 24 h de armazenamento, a 10 e 30°C. Os autores concluíram que não houve alteração na concentração após o período de armazenamento (DPR < 20%) (82).

A detecção de 2C-R, em baixas concentrações, em selos que contenham o respectivo 25R-NBOH, pode apresentar variadas explicações: podendo ser subproduto de degradação (27,34) ou remanescente de rota sintética (13).

Quando analisado por GC-MS, a degradação de 25R-NBOH para 2C-R já foi descrita, nas condições térmicas do respectivo equipamento (6,27). A degradação do 25I-NBOH no injetor do GC-MS também foi avaliada por Andrade *et al.*(2020) (37). Estes autores propuseram que o 25I-NBOH, quando extraído com um álcool (por exemplo: metanol), sob condições de alta temperatura (280 °C) e pressão relativamente alta no *liner*,

o álcool poderia atuar como um grupo nucleofílico e o 2C-I como um grupo de saída. Deste modo, pode-se considerar o 25I-NBOH como um zwitterion solvatado pelo excesso de álcool na fase gasosa (37).

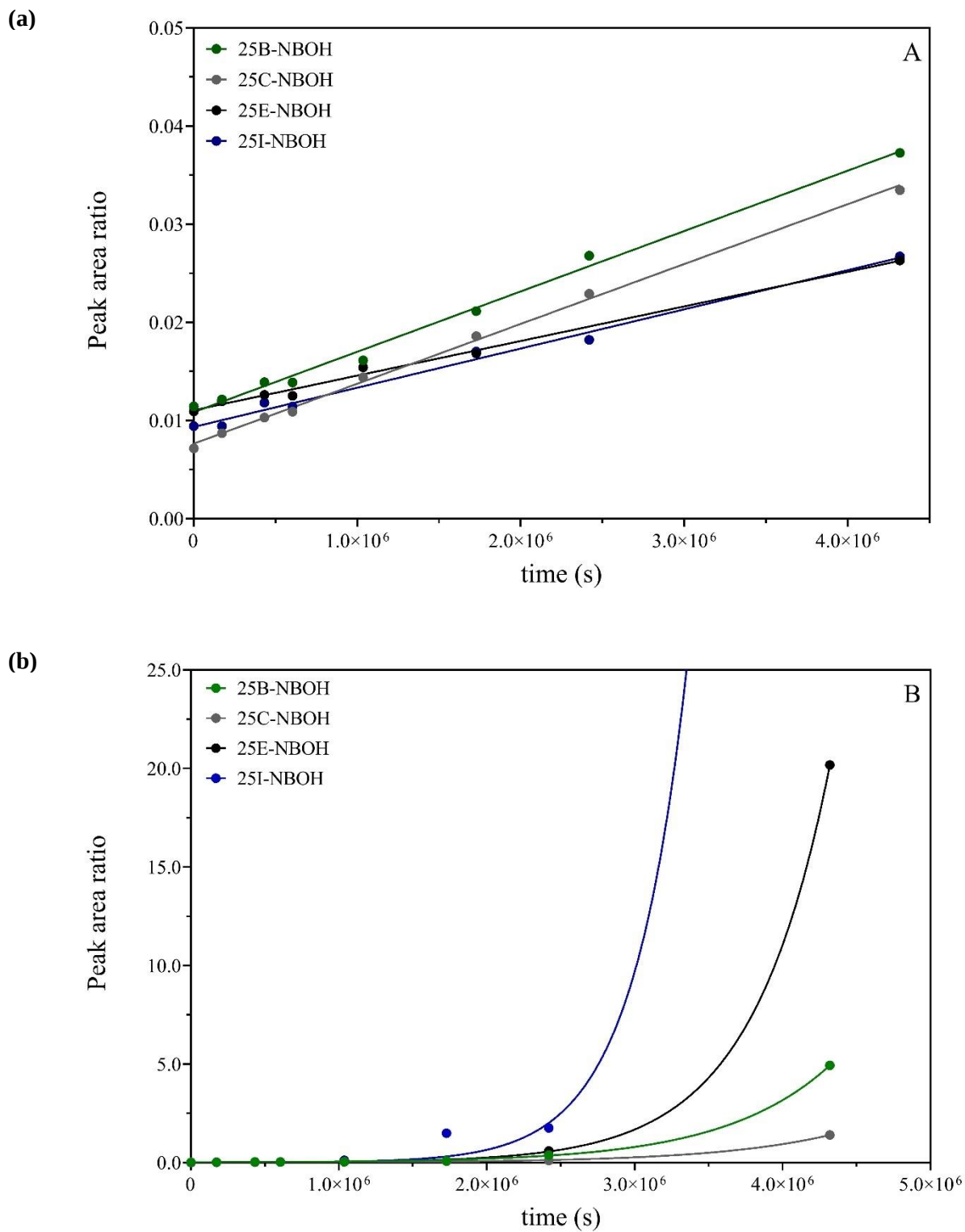
Outrossim, a formação de 2C-I a partir de 25I-NBOH também foi relatada empregando uma técnica “fria de cromatografia” (Q-TOF-LC-MS) (27). Os autores evidenciaram a possibilidade da produção de 2C-I, utilizando diferentes intensidades de *fragmentor voltage*, revelando assim que tal degradação pode ocorrer por outros meios, além da degradação térmica (27).

Ferrari *et al.*(2020) (35) detectaram, pela primeira vez, 25R-NBOH intactos, sem formação de 2C-R, por meio da análise em GC-MS com coluna analítica de quatro metros. Neste trabalho foram avaliados diferentes comprimentos de coluna (4, 10 e 30 metros) e temperaturas do injetor (250 e 280 °C). Os autores concluíram que o uso de uma coluna curta diminui o tempo de permanência dos analitos no interior da coluna e sua degradação, além disso as temperaturas testadas do injetor não afetaram a área do 25R-NBOH no cromatograma (35).

Em relação as análises realizadas nesse trabalho, os resultados sugerem que a degradação do 25R-NBOH ao longo do tempo está relacionada à temperatura. Considerando ambos os solventes, a 50 °C, observa-se uma elevada degradação em porcentagem. Com metanol, a relação 2C-R/25R-NBOH, para todos os compostos, apresentou uma tendência linear ( $R^2 > 0,99$ ). A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados e o teste *t* de *Student*, e mostrou-se estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 19a). Amostras preparadas em água:ACN apresentaram degradação exponencial ( $R^2 > 0,97$ ) (Figura 19b).

No entanto, ao se comparar o perfil de degradação de ambos os lotes de amostras (metanol e água:ACN), é possível identificar diferenças. Em metanol, houve formação constante de 2C-R (a partir do respectivo 25R-NBOH) durante todo o período de armazenamento. Conforme discutido anteriormente em outros trabalhos, o solvente (metanol) e a temperatura podem ser as variáveis que afetam a degradação do 25R-NBOH; entretanto, os resultados obtidos nesse estudo foram em temperatura mais baixa do que normalmente é aplicado no *liner* do GC-MS (ex.: 280 °C) e em pressão atmosférica.

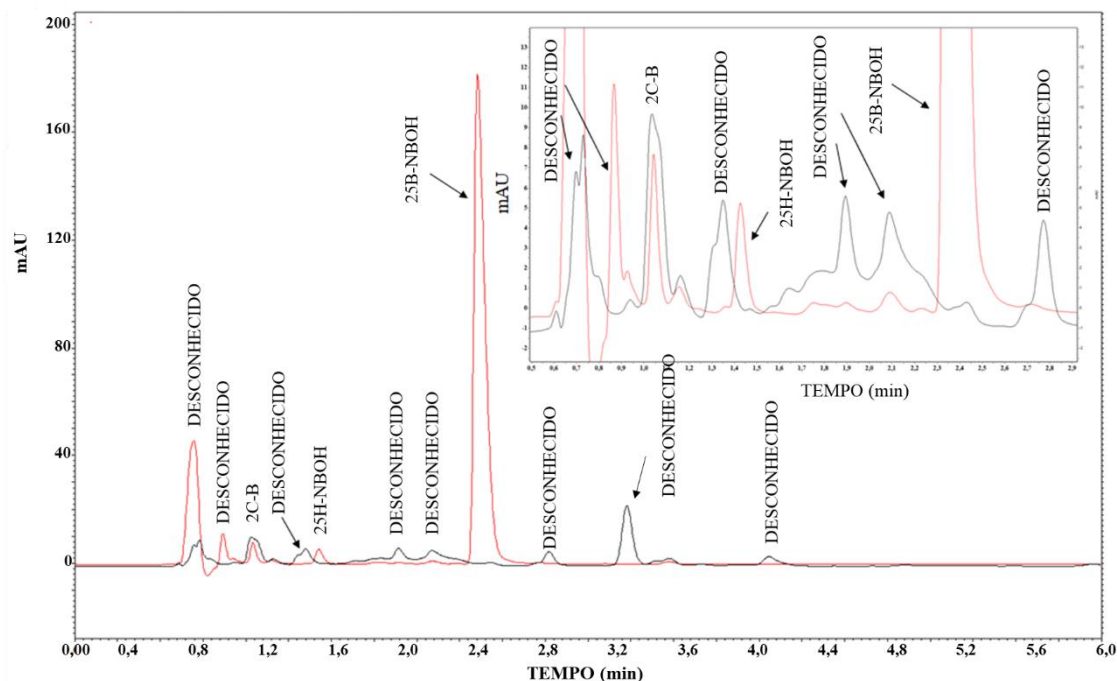
**Figura 19.** (a) Resposta relativa dos 25R-NBOH em relação ao seu respectivo 2C-R em metanol a 50 °C. A equação linear e sua respectiva correlação para cada substância: 25B-NBOH:  $y = 6,15 \times 10^{-9} x t + 0,0109$ ,  $R^2 = 0,9938$ ; 25C-NBOH:  $y = 6,10 \times 10^{-9} x t + 0,0076$ ,  $R^2 = 0,9976$ ; 25E-NBOH:  $y = 3,53 \times 10^{-9} x t + 0,0111$ ,  $R^2 = 0,9932$ ; 25I-NBOH:  $y = 3,99 \times 10^{-9} x t + 0,0094$ ,  $R^2 = 0,9904$ . (b) Resposta relativa dos 25R-NBOH em relação ao seu respectivo 2C-R em água:ACN a 50 °C. As análises demonstraram degradação exponencial para todos os 25R-NBOH. 25B-NBOH ( $y = 0,0124 x e(1,39 \times 10^{-6} x t)$ ) com  $r^2 = 0,9998$ ; 25C-NBOH ( $y = 0,0062 x e(1,26 \times 10^{-6} x t)$ ) com  $R^2 = 0,9991$ ; 25E-NBOH ( $y = 0,0059 x e(1,88 \times 10^{-6} x t)$ )  $r^2 = 1,0000$ ; 25I-NBOH ( $y = 0,0029 x e(2,71 \times 10^{-6} x t)$ ) com  $R^2 = 1,0000$ .



**Fonte:** Autoria própria (GraphPad Prism).

Nos extratos aquosos, água:ACN, a 50 °C, a degradação do 25R-NBOH foi completa aos 50 dias de estocagem; todavia, também foi possível detectar uma perda considerável de área dos analitos em estocagem a 25 °C, no mesmo tipo de solvente. Nos cromatogramas, encontraram-se picos desconhecidos que não são encontrados nos extratos metanólicos; além disso, a formação de 2C-R foi menos pronunciada do que no extrato metanólico, o que sugere uma via de degradação diversa da metanólica. Na Figura 20 é possível visualizar os picos desconhecidos (*unknown*) formados, após 50 dias de estocagem, a 50 °C, em uma amostra de selo que continha 25B-NBOH extraído em solvente aquoso: a cor vermelha representa a corrida cromatográfica no tempo 0 e a cor preta em 50 dias de estocagem.

**Figura 20.** Cromatograma de uma amostra contendo 25B-NBOH, extraído com água:ACN, estocado a 50 °C, analisado em UHPLC mediante coluna Zorbax, Eclipse Plus RP18 (1.8 µm, 100×2.1 mm, Agilent). Em vermelho encontra-se a corrida cromatográfica no tempo 0 e em preto a corrida cromatográfica de 50 dias de estocagem. Tempo de retenção (min.): 2C-B: 1,00; 25H-NBOH: 1,44; 25B-NBOH: 2,36; os restantes dos picos são desconhecidos.



**Fonte:** Autoria própria (EzChrom Elite e PowerPoint).

É importante ressaltar que a degradação do NBOH parece ser complexa e está envolvida com vários fatores, como solvente, temperatura, interação com a coluna em GC-MS e o tempo de permanência (solvente e coluna), e possíveis interações entre os diferentes fatores.

Com base na Figura 19a pode-se observar a degradação dos compostos NBOH (25B, 25C, 25E e 25I), na presença de metanol aos 50 dias de estocagem, onde a reação iniciou em ritmo mais lento e foi se acentuando ao longo do tempo, perfil típico de degradação cinética de ordem zero com constantes de velocidade  $k(25B-NBOH) = 6,15 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(25C-NBOH) = 6,10 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(25E-NBOH) = 3,53 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(25I-NBOH) = 3,99 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ . Em meio aquoso (Figura 20b) os compostos em análise apresentam cinética de degradação de primeira ordem, com constantes de velocidade em torno de  $k(25B-NBOH) = 1,35 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(25C-NBOH) = 1,11 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ;  $k(25E-NBOH) = 1,72 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ; e  $k(25I-NBOH) = 2,46 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .

Em geral, os compostos NBOH são bastante estáveis por longos períodos de tempo (7,33); entretanto, como foi demonstrado pelo ensaio de degradação realizado a 4, 25 e 50 °C, a estabilidade dessas substâncias é dependente da temperatura. Vale ressaltar que os ensaios também demonstraram que a taxa de degradação aumenta em pelo menos 1000 vezes em presença de água quando comparado com meio metanólico, pois a reação de hidrólise é um processo químico de degradação comum, que ocorrem nos grupos funcionais ionizáveis presentes na molécula. A hidrólise é um fenômeno comum para compostos que contêm grupos funcionais éster e amida, especialmente na presença de uma fase aquosa (83,84).

Também é possível que a degradação ocorra por oxidação. A decomposição oxidativa é responsável pela instabilidade de um número considerável de compostos. Essas reações são mediadas por radicais livres ou por oxigênio molecular. Os principais grupos funcionais suscetíveis de sofrer degradação oxidativa são o grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático, dienos conjugados, nitritos e nitrosos derivados, anéis aromáticos heterocíclicos e aldeídos (85).

Assim, entender o processo de degradação dos analitos estudados se faz de extrema importância, pois esta informação se torna uma ferramenta útil na tentativa de tomar medidas de prevenção da degradação dos analitos presentes nas amostras tanto em estudos posteriores, como em uma cadeia de análise em um laboratório químico: desde o tempo que essa amostra ficará em estocagem nas etapas pré-analíticas até as suas etapas posteriores, como o tempo em solução, tipos de soluções da extração utilizada e a forma ideal de estocagem para o decorrer do processo (análises e reanálises). Além do controle de qualidade, hoje, o entendimento do processo de estocagem tomou proporções jurídicas, na atual legislação, Art. 158 do Código do Processo Penal (Brasil, 1941), requer-se o

armazenamento (contraprovas) dos vestígios após as análises periciais, em caso de necessidade de exames complementares (86).

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, desenvolveu-se e validou-se, com sucesso, um novo método em UHPLC-DAD, simples, rápido e sensível para análise de 25R-NBOH. O desenvolvimento de uma nova biblioteca contendo espectro UV e tempo de retenção relativo para quatro colunas diferentes para análise qualitativa de LSD, 25R-NBOH, 25R-NBOMe, 2C-R também foi alcançado.

A avaliação do método proposto foi realizada através da análise de 156 amostras reais. A concentração média de cada 25R-NBOH por selo foi: 25C-NBOH (237 µg, n = 49), 25B-NBOH (900 µg, n = 33), 25E-NBOH (819 µg, n = 37) e 25I -NBOH (861 µg, n = 28).

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a analisar essas substâncias usando UHPLC-DAD. Foi possível adquirir o TRR para 4 colunas analíticas diferentes, espectros UV de 25R-NBOH, 25R-NBOMe, 2C-R e LSD, sendo assim uma análise alternativa para identificação e quantificação de selos apreendidos. A análise por UHPLC-DAD utilizando para identificação o tempo de retenção relativo (TRR) e o espectro de absorção UV torna esta técnica seletiva, sensível e confiável.

O estudo de estabilidade mostrou que os selos com 25R-NBOH/25R-NBOMe são estáveis a longo prazo, quando armazenados em temperatura ambiente e sem exposição à luz. O 25R-NBOH sofreu degradação a 50 °C, quando extraído em metanol, e analisado ao longo do tempo (até 50 dias de armazenamento), e a 25 °C e 50 °C, quando extraído com água:ACN (1:1), provavelmente devido à hidrólise. Após 50 dias (50 °C), houve degradação de 93% para o 25C-NBOH e completa para os restantes dos 25R-NBOHs. Demonstra-se assim, com esses resultados, que o 25R-NBOH apresenta um complexo mecanismo de degradação e não pode ser resumido apenas como um fenômeno de degradação térmica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UNODC. Drug Market Trends Amphetamine- Type Stimulants New Psychoactive: World Drug Report 2022. 2022. 110 p.
2. UNODC. Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 25]. Available from: <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS>
3. ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 325 [Internet]. Brasil; 2019. Available from: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0325\\_03\\_12\\_2019.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0325_03_12_2019.pdf)
4. UNODC. Global Overview Drug Demand: World Drug Report 2022. 2022. 83 p.
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report 2022: Trends and Developments [Internet]. 2022. Available from: [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14644/20222419\\_TDAT22001PTN\\_PDF.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14644/20222419_TDAT22001PTN_PDF.pdf)
6. Machado Y, Coelho Neto J, Lordeiro RA, Silva MF, Piccin E. Profile of new psychoactive substances (NPS) and other synthetic drugs in seized materials analysed in a Brazilian forensic laboratory [Internet]. Vol. 37, Forensic Toxicology. Springer Japan; 2019. p. 265–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11419-018-0456-3>
7. Chia XWS, Ong MC, Yeo YYC, Ho YJ, Binte Ahmad Nasir EI, Tan L-LJLJLJ, et al. Simultaneous analysis of 2Cs, 25-NBOHs, 25-NBOMes and LSD in seized exhibits using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A targeted approach. Forensic Sci Int [Internet]. 2019 Aug;301:394–401. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.036>
8. Ferrari Júnior E, Leite BHM, Gomes EB, Vieira TM, Sepulveda P, Caldas ED. Fatal cases involving new psychoactive substances and trends in analytical techniques. Front Toxicol [Internet]. 2022 Oct 25;4(October):1–18. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ftox.2022.1033733/full>
9. Caspar AT, Helfer AG, Michely JA, Auwärter V, Brandt SD, Meyer MR, et al. Studies on the metabolism and toxicological detection of the new psychoactive designer drug 2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine (25I-NBOMe) in human and rat urine using GC-MS, LC-MSn, and LC-HR-MS/MS. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2015 Sep 25;407(22):6697–719. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-015-8828-6>
10. Kamińska K, Świt P, Malek K. 2-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)- N -[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine (25I-NBOME): A Harmful Hallucinogen Review. J Anal Toxicol [Internet]. 2021 Jan 21;44(9):947–56. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article/44/9/947/5775597>
11. Eshleman AJ, Wolfrum KM, Reed JF, Kim SO, Johnson RA, Janowsky A. Neurochemical pharmacology of psychoactive substituted N-benzylphenethylamines: High potency agonists at 5-HT<sub>2A</sub> receptors. Biochem Pharmacol [Internet]. 2018 Dec;158:27–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.09.024>
12. Wu X, Eriksson C, Wohlfarth A, Wallgren J, Kronstrand R, Josefsson M, et al. Synthesis and identification of metabolite biomarkers of 25C-NBOME and 25I-NBOME. Tetrahedron [Internet]. 2017 Nov;73(45):6393–400. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402017309468>
13. Alves de Barros W, Queiroz MP, da Silva Neto L, Borges GM, Martins FT, de Fátima Â. Synthesis of 25X-BOMes and 25X-NBOHs (X = H, I, Br) for pharmacological studies and as reference standards for forensic purposes. Tetrahedron Lett [Internet]. 2021 Mar;66:152804. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152804>
14. Braden MR, Parrish JC, Naylor JC, Nichols DE. Molecular Interaction of Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Residues Phe339 (6.51) and Phe340 (6.52) with Superpotent N -Benzyl Phenethylamine Agonists. Mol Pharmacol [Internet]. 2006 Dec;70(6):1956–64. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.106.028720>
15. Nielsen LM, Holm NB, Leth-Petersen S, Kristensen JL, Olsen L, Linnet K. Characterization of the hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of

- 25I-NBOMe and 25I-NBOH. *Drug Test Anal* [Internet]. 2017 May;9(5):671–9. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84978907397&doi=10.1002%2Fda.2031&partnerID=40&md5=ce05c3d146620cb45c6045efe893d85e>
16. Report EDM. EU Drug Markets Report 2019 [Internet]. 2019. 2019. 260 p. Available from: [www.emcdda.europa.eu](http://www.emcdda.europa.eu)
  17. Nichols DE. Structure-activity relationships of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> agonists [Internet]. Vol. 1, Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling. 2012. p. 559–79. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/wmts.42>
  18. Kueppers VB, Cooke CT. 25I-NBOMe related death in Australia: A case report. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2015;249:e15–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073815000730>
  19. Hansen M, Phonekeo K, Paine JS, Leth-Petersen S, Begtrup M, Bräuner-Osborne H, et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships of N -Benzyl Phenethylamines as 5-HT<sub>2A/2C</sub> Agonists. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2014 Mar 19;5(3):243–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cn400216u>
  20. Nichols DE, Sassano MF, Halberstadt AL, Klein LM, Brandt SD, Elliott SP, et al. N -Benzyl-5-methoxytryptamines as Potent Serotonin 5-HT<sub>2</sub> Receptor Family Agonists and Comparison with a Series of Phenethylamine Analogues. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2015 Jul 15;6(7):1165–75. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cn500292d>
  21. Zawilska JB, Kacela M, Adamowicz P. NBOMes—Highly Potent and Toxic Alternatives of LSD [Internet]. Vol. 14, *Frontiers in Neuroscience*. 2020. p. 1–15. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2020.00078/full>
  22. Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* [Internet]. 2008 Dec;195(1):198–213. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808001526>
  23. Nichols DE. Psychedelics. Barker EL, editor. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2016 Apr;68(2):264–355. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.115.011478>
  24. Passie T, Halpern JH, Stichtenoth DO, Emrich HM, Hintzen A. The Pharmacology of Lysergic Acid Diethylamide: A Review. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 2008 Dec;14(4):295–314. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-5949.2008.00059.x>
  25. (UNODC) UNO on D and C. International Collaborative Exercises (ICE) — summary report 2022/1 [Internet]. 2022. Available from: [https://www.unodc.org/documents/scientific/Summary\\_report\\_2022-1\\_SM.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Summary_report_2022-1_SM.pdf)
  26. Couto RAS, Gonçalves LM, Carvalho F, Rodrigues JA, Rodrigues CMP, Quinaz MB. The Analytical Challenge in the Determination of Cathinones, Key-Players in the Worldwide Phenomenon of Novel Psychoactive Substances. *Crit Rev Anal Chem* [Internet]. 2018 Sep 3;48(5):372–90. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2018.1439724>
  27. Arantes LC, Júnior EF, de Souza LF, Cardoso AC, Alcântara TLF, Lião LM, et al. 25I-NBOH: a new potent serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist identified in blotter paper seizures in Brazil. *Forensic Toxicol* [Internet]. 2017 Jul 16;35(2):408–14. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85013131006&doi=10.1007%2Ffs11419-017-0357-x&partnerID=40&md5=269f99717eb44e42d7ef6439f381b08d>
  28. Namera A, Kawamura M, Nakamoto A, Saito T, Nagao M. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicol*. 2015;33(2):175–94.
  29. Seo H, Yoo HH, Kim YY-HYY-H, Hong J, Sheen YY. Simultaneous quantitative determination of nine hallucinogenic nbome derivatives in human plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom Lett* [Internet]. 2019;10(1):18–26. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

- 85066852715&doi=10.5478%2FMSL.2019.10.1.18&partnerID=40&md5=cbed7c64819338c978943e3e356400c8
30. Ng XQ, Hamzah A, Goh MLE, Moy HY, Yao YJ, Lui CP. Qualitative analysis of synthetic opioids, synthetic hallucinogens and LSD in urine using LC-MS/MS. *Aust J Forensic Sci* [Internet]. 2019 Jul 29;51(sup1):S229–33. Available from: <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1568565>
  31. da Cunha KF, Oliveira KD, Huestis MA, Costa JL. Screening of 104 New Psychoactive Substances (NPS) and Other Drugs of Abuse in Oral Fluid by LC–MS-MS. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2020 Oct 12;44(7):697–707. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article/44/7/697/5873249>
  32. Rodrigues de Moraes D, Francisco da Cunha K, Betoni Rodrigues T, Lanaro R, de Melo Barbosa L, Jardim Zacca J, et al. Triple quadrupole–mass spectrometry protocols for the analysis of NBOMes and NBOHs in blotter papers. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2020 Apr;309:110184. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073820300463>
  33. Franck MC, Monteiro MG, Limberger RP. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for simultaneous whole blood analysis of 51 new psychoactive substances. *Drug Anal Res* [Internet]. 2019 Dec 23;3(2):36–45. Available from: <https://seer.ufrgs.br/dar/article/view/97423>
  34. Coelho Neto J, Andrade AFB, Lordeiro RA, Machado Y, Elie M, Ferrari Júnior E, et al. Preventing misidentification of 25I-NBOH as 2C-I on routine GC–MS analyses. *Forensic Toxicol* [Internet]. 2017 Jul 24;35(2):415–20. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85016063133&doi=10.1007%2Fs11419-017-0362-0&partnerID=40&md5=b552bd72239d6232480430d9797e8d2d>
  35. Ferrari E, Arantes LC, Salum LB, Caldas ED. Analysis of non-derivatized 2-(4-R-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-hydroxyphenyl)methyl]ethanamine using short column gas chromatography – mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. 2020 Dec 20;1634:461657. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967320309316>
  36. Lum BJ, Brettell TA, Brophy JJ, Brynn Hibbert D. Identification of a new class of thermolabile psychoactive compounds, 4-substituted 2-(4-X-2, 5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-hydroxyphenyl)methyl]ethanamine (25X-NBOH, X = Cl, Br, or I) by gas chromatography-mass spectrometry using chemical derivatization by he. *Forensic Chem* [Internet]. 2020 Aug;20(February):100266. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85088375571&doi=10.1016%2Fj.forc.2020.100266&partnerID=40&md5=70115d91aea34013ecc250e52337882>
  37. Belchior de Andrade AF, Elie M, Weck C, Jardim Zacca J, de Souza MP, Caldas LNB, et al. Challenges in the identification of new thermolabile psychoactive substances: The 25I-NBOH case. *Forensic Sci Int*. 2020 Jul;312:110306.
  38. Fogarty MF, Logan BK, Diamond FX, Mickolas L, Shuda SA, Krotulski AJ. Letter to Editor—NBOH Derivatization for the Analysis of Seized Drug Casework by GC-MS [Internet]. Vol. 64, *Journal of Forensic Sciences*. 2019. p. 958–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1556-4029.14064>
  39. Machado Y, Coelho Neto J, Lordeiro RA, Alves RB, Piccin E. Identification of new NBOH drugs in seized blotter papers: 25B-NBOH, 25C-NBOH, and 25E-NBOH. *Forensic Toxicol* [Internet]. 2020 Jan 2;38(1):203–15. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85075932340&doi=10.1007%2Fs11419-019-00509-7&partnerID=40&md5=aa0b885e6722441d0a62f102b002d5db>
  40. Custódio MF, Magalhães LO, Arantes LC, Braga JWB. Identification of Synthetic Drugs on Seized Blotter Papers Using ATR-FTIR and PLS-DA: Routine Application in a Forensic Laboratory. *J Braz Chem Soc* [Internet]. 2021;32(3):513–22. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

- 85100553027&doi=10.21577%2F0103-5053.20200205&partnerID=40&md5=91c10ba5b97e4bb1909be1a02b6aa00a
41. Skoog DA, West D, Holler FJ, Crouch S. Fundamentos de química analítica. 2ª edição. Cengage Learning; editor. 2014. 1088 p.
  42. Catrinck TCPG, Aguiar MCS, Dias A, Silvério FO, Fidêncio PH, de Pinho GP. Study of the Reaction Derivatization Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) with &lt;i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. Am J Anal Chem [Internet]. 2013;04(11):647–52. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2013.411077>
  43. Ferrari E, Arantes LC, Salum LB, Caldas ED, Ettore FJ, Arantes LC, et al. Analysis of non-derivatized 2-(4-R-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-hydroxyphenyl)methyl]ethanamine using short column gas chromatography – mass spectrometry. J Chromatogr A [Internet]. 2020 Dec; 1634:461657. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967320309316>
  44. Bloom MB, Sisco E, Lurie IS. Development and validation of a rapid GC–MS method for seized drug screening. Forensic Chem [Internet]. 2023 May;33(February):100479. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100479>
  45. Cabal LFR, Neto AJ dos S. Microtécnicas de extração líquido-líquido : Automatização e seu acoplamento com cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas [Internet]. [São Carlos]: Universidade de São Paulo; 2019. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-28052020-154453/>
  46. de Moraes DR, Barbosa IL, Cunha KF, Tripodi GL, Angolini CFF, Franco MF, et al. EASI-IMS an expedite and secure technique to screen for 25I-NBOH in blotter papers. J Mass Spectrom [Internet]. 2017 Oct;52(10):701–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.3977>
  47. dos Santos NA, Macrino CJ, Allochio Filho JF, Gonçalves FF, Almeida CM, Agostini F, et al. Exploring the chemical profile of designer drugs by ESI(+) and PSI(+) mass spectrometry—An approach on the fragmentation mechanisms and chemometric analysis. J Mass Spectrom [Internet]. 2020 Oct;55(10):e4596. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.4596>
  48. Magalhães LDO, Arantes LC, Braga JWB. Identification of NBOMe and NBOH in blotter papers using a handheld NIR spectrometer and chemometric methods. Microchem J [Internet]. 2019 Jan;144:151–8. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85053017816&doi=10.1016%2Fj.microc.2018.08.051&partnerID=40&md5=91afbe195a66a405511c019e142fde6b>
  49. Belchior de Andrade AF, Gonzalez-Rodriguez J. Electroanalytical identification of 25I-NBOH and 2C-I via differential pulse voltammetry: a rapid and sensitive screening method to avoid misidentification. Analyst [Internet]. 2019 May;144(9):2965–72. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85065114401&doi=10.1039%2F9an00062c&partnerID=40&md5=2ecd1043b0cbeba6bed91c844cbaf020>
  50. Pragst F, Herzler M, Erxleben B-T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Clin Chem Lab Med [Internet]. 2004 Jan 1;42(11):1325–40. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2004.251/html>
  51. MUNDIM IM. Análise Toxicológica Sistemática utilizando HPLC-DAD: Validação da técnica analítica para triagem de intoxicações agudas por medicamentos. Goiânia; 2010.
  52. Edmunds R, Donovan R, Reynolds D. The analysis of illicit 25X-NBOMe seizures in Western Australia. Drug Test Anal [Internet]. 2018 Apr;10(4):786–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2260>
  53. Elbardisy HM, Foster CW, Marron J, Mewis RE, Sutcliffe OB, Belal TS, et al. Quick Test for Determination of N-Bombs (Phenethylamine Derivatives, NBOMe) Using High-Performance Liquid Chromatography: A Comparison between Photodiode Array and Amperometric Detection. ACS Omega [Internet]. 2019 Sep 10;4(11):14439–50. Available

- from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b01366>
54. Soh YNA, Elliott S. An investigation of the stability of emerging new psychoactive substances. *Drug Test Anal* [Internet]. 2014 Jul;6(7–8):696–704. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.1576>
  55. Brandt SD, Elliott SP, Kavanagh P V., Dempster NM, Meyer MR, Maurer HH, et al. Analytical characterization of bioactive N -benzyl-substituted phenethylamines and 5-methoxytryptamines. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 2015 Apr 15;29(7):573–84. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.7134>
  56. Giroud C, Augsburg M, Rivier L, Mangin P, Sadeghipour F, Varesio E, et al. 2C-B: A New Psychoactive Phenylethylamine Recently Discovered in Ecstasy Tablets Sold on the Swiss Black Market. *J Anal Toxicol* [Internet]. 1998 Sep 1;22(5):345–54. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article-lookup/doi/10.1093/jat/22.5.345>
  57. Herzler M, Pragst F, Herre S, Rothe M. Selectivity of photodiode array UV spectra for substance identification in systematic toxicological analysis. *Z Zagadnien Nauk Sadowych* [Internet]. 2000;42:122–9. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/SELECTIVITY-OF-PHOTODIODE-ARRAY-UV-SPECTRA-FOR-IN-Herzler-Pragst/de923ee1ca95afb568e44aa04db0bdcc2c8df713>
  58. Maier RD, Bogusz M. Identification Power of a Standardized HPLC-DAD System for Systematic Toxicological Analysis. *J Anal Toxicol* [Internet]. 1995 Mar 1;19(2):79–83. Available from: <http://academic.oup.com/jat/article/19/2/79/709483/Identification-Power-of-a-Standardized-HPLCDAD>
  59. Herzler M, Herre S, Pragst F. Selectivity of Substance Identification by HPLC-DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of 2682 Compounds. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2003 May 1;27(4):233–42. Available from: <http://academic.oup.com/jat/article/27/4/233/721374/Selectivity-of-Substance-Identification-by-HPLCDAD>
  60. Elliott SP, Hale KA. Applications of an HPLC-DAD Drug-Screening System Based on Retention Indices and UV Spectra. *J Anal Toxicol* [Internet]. 1998 Jul 1;22(4):279–89. Available from: <http://academic.oup.com/jat/article/22/4/279/715125/Applications-of-an-HPLCDAD-DrugScreening-System>
  61. KOHYAMA E, CHIKUMOTO T, TADA H, KITAICHI K, HORIUCHI T, ITO T. Differentiation of the Isomers of N-Alkylated Cathinones by GC-EI-MS-MS and LC-PDA. *Anal Sci* [Internet]. 2016;32(8):831–7. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/32/8/32\\_831/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/32/8/32_831/_article)
  62. Rowe WF, Marginean I, Carnes S, Lurie IS. The role of diode array ultraviolet detection for the identification of synthetic cathinones. *Drug Test Anal* [Internet]. 2017 Oct;9(10):1512–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dta.2163>
  63. Taschwer M, Ebner E, Schmid M. Test purchase of new synthetic tryptamines via the Internet: Identity check by GC-MS and separation by HPLC. *J Appl Pharm Sci* [Internet]. 2016;6(1):028–34. Available from: [http://www.japsonline.com/abstract.php?article\\_id=1744](http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=1744)
  64. Elliott S, Smith C. Investigation of the first deaths in the United Kingdom involving the detection and quantitation of the piperazines BZP and 3-TFMPP. *J Anal Toxicol*. 2008;32(2):172–7.
  65. Maher S, Elliott SP, George S. The analytical challenges of cyclopropylfentanyl and crotonylfentanyl: An approach for toxicological analysis. *Drug Test Anal*. 2018;10(9):1483–7.
  66. Bottinelli C, Cartiser N, Gaillard Y, Boyer B, Bévalot F. A fatal case of 3-methylmethcathinone (3-MMC) poisoning. *Toxicol Anal Clin* [Internet]. 2017 Feb;29(1):123–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352007816302359>
  67. Mohr S, Taschwer M, Schmid MG. Chiral Separation of Cathinone and Amphetamine Derivatives by HPLC/UV Using Sulfated  $\beta$ -Cyclodextrin as Chiral Mobile Phase Additive. *Chirality* [Internet]. 2014 Aug;26(8):411–8. Available from:

- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chir.22341>
68. Maskell PD, De Paoli G, Seneviratne C, Pounder DJ. Mephedrone (4-Methylmethcathinone)-Related Deaths. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2011 Apr 1;35(3):188–91. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article-lookup/doi/10.1093/anatox/35.3.188>
  69. Lehmann S, Kieliba T, Thevis M, Rothschild MA, Mercer-Chalmers-Bender K. Fatalities associated with NPS stimulants in the Greater Cologne area. *Int J Legal Med* [Internet]. 2020 Jan 18;134(1):229–41. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00414-019-02193-z>
  70. Pragst F, Herzler M, Herre S, Erxleben B-T, Rothe M. *UV Spectra of Toxic Compounds*. 2001.
  71. INMETRO. Guidance in validation of analytical methods. *Inst Nac Metrol Qual e Tecnol* [Internet]. 2016;31. Available from: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)
  72. United Nations Office on Drugs and Crime. *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. Unodc. New York; 2009. 2–76 p.
  73. Koves EM. Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology. *J Chromatogr A* [Internet]. 1995 Feb;692(1–2):103–19. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967394008406>
  74. Mashayekhi HA, Khalilian F. Development of Solid-Phase Extraction Coupled with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Simultaneous Determination of Three Benzodiazepines in Human Urine and Plasma. *J Chromatogr Sci* [Internet]. 2016 Jul;54(6):1068–73. Available from: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bmw031>
  75. Merola G, Aturki Z, D’Orazio G, Gottardo R, Macchia T, Tagliaro F, et al. Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2012 Dec;71:45–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.008>
  76. Maher S, Elliott SP, George S. The analytical challenges of cyclopropylfentanyl and crotonylfentanyl: An approach for toxicological analysis. *Drug Test Anal* [Internet]. 2018 Sep;10(9):1483–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dta.2417>
  77. Francisco AM de A. *Estudo da lamotrigina em doentes epilépticos submetidos a monitorização vídeo-electroencefalográfica* [Internet]. Universidade de Coimbra; 2008. Available from: <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/5519?mode=full>
  78. UNODC. UNODC. *Global SMART Update Volume 25. Regional diversity and the impact of scheduling on NPS trends*. [Internet]. Vol. 2. 2021. Available from: [www.unodc.org/tox](http://www.unodc.org/tox)
  79. de Souza Boff B, Silveira Filho J, Nonemacher K, Driessen Schroeder S, Dutra Arbo M, Rezin KZ. New psychoactive substances (NPS) prevalence over LSD in blotter seized in State of Santa Catarina, Brazil: A six-year retrospective study. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2020 Jan;306:110002. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110002>
  80. Meira VL, de Oliveira AS, Cohen LSAA, de A. Bhering C, de Oliveira KM, de Siqueira DS, et al. Chemical and statistical analyses of blotter paper matrix drugs seized in the State of Rio de Janeiro. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2021 Jan;318(October):110588. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073820304503>
  81. Kamińska K, Świt P, Malek K. 25C-NBOMe short characterisation. *Forensic Toxicol* [Internet]. 2020 Jul 30;38(2):490–5. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00530-1>
  82. Ferrari Júnior E, Caldas ED. Determination of new psychoactive substances and other drugs in postmortem blood and urine by UHPLC–MS/MS: method validation and analysis of forensic samples. *Forensic Toxicol* [Internet]. 2022 Jan 5;40(1):88–101. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00600-y>
  83. Kahne D, Still WC. Hydrolysis of a peptide bond in neutral water. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1988 Oct 1;110(22):7529–34. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00230a041>

84. Gunaydin H, Houk KN. Molecular Dynamics Prediction of the Mechanism of Ester Hydrolysis in Water. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2008 Nov 19;130(46):15232–3. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja8050525>
85. Roy J. Pharmaceutical impurities—A mini-review. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2002 Jun;3(2):1–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/pt030206>
86. Brasil. Decreto-lei nº 3.689. Código de Processo Penal. 1941.