



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DE AMOSTRAS DE
CRACK APREENDIDAS NO ESTADO DA PARAÍBA POR
RMNq-¹H E CLAE-DAD**

RONY ANDERSON REZENDE COSTA

**João Pessoa - PB
2012**

ronyarcosta@yahoo.com.br

**DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DE AMOSTRAS DE CRACK
APREENDIDAS NO ESTADO DA PARAÍBA POR RMN_q-¹H E CLAE-
DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOQUÍMICA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

**João Pessoa - PB
2012**

C837d Costa, Rony Anderson Rezende.

Determinação do grau de pureza de amostra de crack apreendidas no Estado da Paraíba por RMNq-¹H e

CLAE-DAD / Rony Anderson Rezende Costa.-- João Pessoa, 2012.

120f. : il.

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira

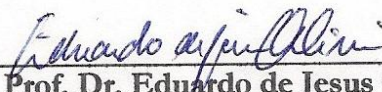
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Drogas. 2. Cocaína. 3. Crack. 4. RMNq. 5. CLAE-DAD.

6. Pureza. 7. Teor.

Aprovado em 10/07/2012

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira
Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)



Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara
Universidade Federal Rural de Pernambuco
(Examinador Externo)



Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza
Universidade Federal da Paraíba
(Examinadora Interna)

*À minha esposa Mirella e
ao meu filho Luan,
essências da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e Senhor Jesus Cristo pelo sacrifício na cruz para me salvar.

A todos os que fizeram a ciência antes deste trabalho.

À minha esposa Mirella pelo amor, carinho e auxílio durante a caminhada profissional e pessoal.

Ao meu filho Luan pelas horas furtadas de brincadeiras e alegrias devido aos experimentos, as preocupações e a redação deste trabalho.

Ao Prof. Dr Eduardo de Jesus Oliveira pelo empenho e exemplo, pelos aconselhamentos científicos, pela orientação e amizade, sem o qual este trabalho não seria possível. Parabéns pelo caráter e retidão.

À minha mãe Vera Lúcia pelo amor incondicional e pelo carinho.

À minha irmã Vivian e ao meu irmão Julle pela amizade e cumplicidade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr Ricardo Oliveira pelo empenho para as aquisições dos espectros de RMNq-¹H de 47 amostras de crack e pela disponibilidade constante, tornando este trabalho possível.

Ao Dr. Patrick Hays pela ajuda na integração dos sinais de cocaína via macro e pelos importantes esclarecimentos quanto a técnica de RMNq-¹H.

Ao Perito Criminal Federal Dr. Adriano Maldaner pela disponibilidade em quantificar, via Projeto PeQui, o padrão de referência secundário.

Ao Perito Oficial Dr. Ticiano Pereira por ter cedido o padrão de referência secundário e pela amizade e debates quanto a pontos deste trabalho.

À Perita Oficial MSc. Ana Paloma por ter cedido parte de suas amostras de crack para realização das análises e pela amizade.

Aos Peritos Oficiais Antônio Toscano, ex-diretor-geral do Instituto de Polícia Científica da Paraíba, Maria do Carmo e Lúcia Vasconcelos pelo estímulo para realização deste trabalho.

Ao Perito Oficial Humberto Jorge, Diretor-Geral do Instituto de Polícia Científica da Paraíba, em nome de quem agradeço a instituição por fornecer a estrutura e equipamentos para realização de parte dos experimentos deste trabalho.

Ao Perito Oficial Dr. Vanduir Filho pelo intercâmbio com o Prof. Dr. Ricardo Oliveira para a realização dos experimentos de RMNq-¹H.

Aos técnicos Dr. Alexsandro Marinho e MSc. Vicente Carlos pelo auxílio nas aquisições de espectros de RMNq-¹H durante o desenvolvimento do método.

Aos professores de pós-graduação pela participação em minha formação acadêmica em especial ao Prof. Josean Fechine pelos conselhos quanto a identificação de sinais de RMN-¹H.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análises Farmacêuticas e Moleculares, Antonilêni, Fábila, Ingrid, Sandro, Micheline, Lídia, Eugênia e Ayala pelo companheirismo, auxílio e descontração.

À aluna de graduação Lídia Lúcia pela importante ajuda em diversas etapas deste trabalho.

To pharmacy student Kyle Wojciech for help in some experiments and stimulate my interest in English.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do trabalho através do Edital Universal 2010.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no primeiro ano do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos.

A todos aqueles que de uma forma ou outra ajudaram na realização deste projeto.

Muito Obrigado!!!

Rony Anderson Rezende Costa

*“Lâmpada para os meus pés é a tua palavra,
e luz para os meus caminhos”
Salmos 119:105.*

RESUMO

O senso comum da população tem o crack como um “subproduto” impuro da cocaína. No Brasil, a análise do teor de cocaína em amostras de crack ou a pesquisa de adulterantes adicionados não constitui rotina nos laboratórios oficiais das perícias forenses. O estado da Paraíba apresentou um crescente número de análises em amostras de crack apreendidas pelas forças policiais entre os anos de 2007 e 2010, passando de 250 para 575 exames. Por outro lado, não existem na literatura dados sobre o teor de cocaína nestas amostras. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia baseada no uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio (RMNq- ^1H) para avaliar o grau de pureza de amostras de crack apreendidas no estado da Paraíba. A RMNq- ^1H é um método analítico primário e pode tornar-se exata e precisa quando satisfeitos parâmetros de aquisição e processamento dos dados. O método de RMNq- ^1H foi comparado à metodologia desenvolvida e validada baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os resultados das duas metodologias permitiram determinar que o teor médio de cocaína nas amostras foi superior a 70%. O teor médio de cocaína determinado pelo método de RMNq- ^1H foi de 71,9%, com amostras variando entre 5,2 a 89,1%. Os resultados do método de CLAE-DAD foram ligeiramente superiores, onde o teor médio de todas as amostras foi de 74,4%, com amostras variando entre 4,9 e 93,8% de cocaína. A melhor correlação obtida entre os resultados de CLAE-DAD e RMNq- ^1H foi aquela que utilizou a região 7 (singleto em 3,6 ppm correspondente a metila da função éster), com coeficiente de correlação de Pearson de 0,83. A precisão e exatidão da RMNq- ^1H mostrou-se sujeita a diversos parâmetros de aquisição que precisam ser otimizados. Por sua vez a metodologia por CLAE-DAD mostrou-se rápida, exata e precisa para quantificação de cocaína em 47 amostras de crack analisadas. Além disso, as amostras foram submetidas a análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), mostrando que o principal adulterante nas amostras foi a fenacetina, dado confirmado por RMN- ^1H .

Palavras-chave: Cocaína, Crack, RMNq, CLAE-DAD, pureza, teor.

ABSTRACT

Population's commonsense regards crack cocaine as an impure byproduct of cocaine. In Brazil, the cocaine levels in crack samples or the profiling of its adulterants is not a mandatory analysis of official forensic laboratories. The state of Paraíba has shown a marked increase in the number of analyses done on crack cocaine samples seized by the police forces between 2007 and 2010, rising from 250 to 575 analyses. On the other hand, there is no literature data on the concentration of cocaine on these samples. The present study aimed at developing and validating a method based on quantitative hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H -qNMR) to determine cocaine in crack cocaine samples seized within the state of Paraíba. ^1H -qNMR is a primary analytical method and can become accurate and precise when certain acquisition and processing parameters are properly set. The ^1H -qNMR method was compared to a high performance liquid chromatography method with photodiode array detection (HPLC-PDA). The results from both methods allowed us to determine that the average concentration of cocaine in the samples was higher than 70%. The average concentration determined by the ^1H -qNMR method was 71.9%, with samples ranging from 5.2 to 89.1%. The results from the HPLC-PDA method were slightly higher, with an average figure of 74.4% and samples ranging from 4.9 to 93.8%. The best correlation between HPLC-PDA and ^1H -qNMR data was obtained when integration from region 7 of the spectrum was used (singlet signal at 3.6 ppm from the methyl protons of the ester function) yielding a Pearson's correlation coefficient of 0.83. Precision and accuracy of the ^1H -qNMR method was sensitive to several acquisition and processing parameters that need to be optimized. The HPLC-PDA method developed proved to be fast, accurate and precise for the quantification of cocaine in 47 samples of seized crack cocaine. In addition, the analysis of crack cocaine samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) revealed that the main adulterant present in the samples was phenacetin, a result that was confirmed by the ^1H -NMR data.

Keywords: Cocaine, Crack, ^1H -qNMR, HPLC-PDA, purity, assay.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ANEL TROPANO (8-AZABICICLO[3.2.1]OCTANO).....	6
FIGURA 2 - ALCALÓIDES DERIVADOS DA ECGONINA PRESENTES NAS FOLHAS DE COCA SEGUNDO ALMEIDA (2003).	7
FIGURA 3 - ALCALÓIDES DERIVADOS DA TROPINA PRESENTES NAS FOLHAS DE COCA SEGUNDO ALMEIDA (2003).	7
FIGURA 4 - ALCALÓIDES DERIVADOS DA HIGRINA PRESENTES NAS FOLHAS DE COCA SEGUNDO ALMEIDA (2003).	8
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA COCAÍNA.	8
FIGURA 6 - OBTENÇÃO DA PASTA BASE DE COCAÍNA SEGUNDO ALMEIDA (ALMEIDA, 2003).	11
FIGURA 7 – OBTENÇÃO DO CLORIDRATO DE COCAÍNA A PARTIR DA PASTA BASE SEGUNDO ALMEIDA (ALMEIDA, 2003).	12
FIGURA 8 – OBTENÇÃO DO CRACK A PARTIR DA PASTA BASE OU DO CLORIDRATO DE COCAÍNA SEGUNDO ALMEIDA (ALMEIDA, 2003).	12
FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS ADULTERANTES.	13
FIGURA 10 – ESPECTRO DE UV/VIS DA COCAÍNA ADAPTADO DE MOFFAT <i>ET AL.</i> (MOFFAT, 2003).	17
FIGURA 11 – ESTRUTURA DA COCAÍNA (BASE LIVRE E CLORIDRATO) COM NUMERAÇÃO.	17
FIGURA 12 – ESQUEMA DO SISTEMA DE CLAE ADAPTADO DE SANTOS (SANTOS, 2008).	19
FIGURA 13 – PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DE UM ESPECTRÔMETRO DE RMN. (A) UM PULSO É APLICADO COM UMA BOBINA TRANSMISSORA NA DIREÇÃO DO EIXO-X E APÓS A EXCITAÇÃO, (B) O VETOR DE MAGNETIZAÇÃO INICIAR UMA ROTAÇÃO AO REDOR DO EIXO-Z (NO PLANO X-Y) E INDUZ UMA VOLTAGEM NA BOBINA RECEPTORA LOCALIZADA NO EIXO-Y E (C) O SINAL DETECTADO É AMOSTRADO NA ESCALA DO TEMPO (ADAP. DE SOININEN) (SOININEN, 2008)... ..	21
FIGURA 14 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H (500MHZ) DE PADRÃO DE REFERÊNCIA DE COCAÍNA TENDO O ÁCIDO MALÉICO COMO SR INTERNA EM D ₂ O (ADAP. DE HAYS) (HAYS, 2005).	31
FIGURA 15 – (A) COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DA INTEGRAÇÃO DE TRÊS PICOS E ELETROFORESE CAPILAR DE 291 AMOSTRAS DE CLORIDRATO DE HEROÍNA E (B) COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DA MEDIÇÃO DA ALTURA ASSOCIADAS COM AS INTEGRAÇÕES DE CINCO PICOS E ELETROFORESE CAPILAR (ADAP. DE HAYS & THOMPSON) (HAYS, 2009).	32
FIGURA 16 – PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO E TIPOS DE APLICAÇÃO DE RMNQ- ¹ H SEGUNDO PAULI <i>ET AL.</i> (PAULI, 2005).	35
FIGURA 17 – AMOSTRAS DE CRACK UTILIZADAS NO ESTUDO.	38
FIGURA 18 – FLUXOGRAMA PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COCAÍNA PELOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS.	48
FIGURA 19 – FLUXOGRAMA PARA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO PELO MÉTODO DE CLAE-DAD.....	49
FIGURA 20 – FLUXOGRAMA PARA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO PELO MÉTODO DE RMNQ- ¹ H.	55
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA INICIAL DE AMOSTRA DE PADRÃO SECUNDÁRIO DE COCAÍNA (50 µG/mL), OBTIDO COM AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DESCRITAS NA METODOLOGIA DE OLIVEIRA (OLIVEIRA <i>ET AL.</i> , 2009).	59
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO SECUNDÁRIO DA COCAÍNA (50 µG/mL) ELUÍDO COM FASE MÓVEL CONSTITUÍDA DE ÁGUA:ACETONITRILA (50:50, v/v).....	59
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO SECUNDÁRIO DE COCAÍNA (50 µG/mL), OBTIDO APÓS A ADIÇÃO DE TRIETILAMINA A FASE MÓVEL (SOLUÇÃO AQUOSA DE TRIETILAMINA 0,05%: ACETONITRILA 50:50, v/v).	60
FIGURA 24 – PERFIL CROMATOGRÁFICO FINAL APÓS DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO AMOSTRA DE PADRÃO SECUNDÁRIO DE COCAÍNA A 80 µG/mL, COM FASE MÓVEL CONSISTINDO DE 0,01% DE TRIETILAMINA EM ÁGUA:ACETONITRILA (45:55, v/v).	61
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE COCAÍNA SECUNDÁRIO (57,1 µG/mL) COM DADOS DA PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO DA COCAÍNA (TEMPO DE RETENÇÃO DE 5,9 MINUTOS).	62
FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DE POOL DE CINCO AMOSTRAS DE CRACK (400 MG/ML) COM ADULTERANTES CAFEÍNA (40 MG/ML) E PROCAÍNA (40 MG/ML) EM UV 224 NM.	62
FIGURA 27 – COMPARAÇÃO DE ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA OBTIDO APÓS ANÁLISE CROMATOGRÁFICA COM O MÉTODO DESENVOLVIDO DE UM POOL DE AMOSTRAS DE COCAÍNA	

(CRACK) A 80 $\mu\text{G/mL}$ COM O ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DE REFERÊNCIA DA BIBLIOTECA UVTox®.....	63
FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA ÍNTEGRA DE CRACK RK1 A 80 $\mu\text{G/mL}$ (A); SOB DEGRADAÇÃO BRANDA (B) E SOB DEGRADAÇÃO FORTE (C).....	64
FIGURA 29 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA ÍNTEGRA DE CRACK PF1 A 80 $\mu\text{G/mL}$ (A); SOB DEGRADAÇÃO BRANDA (B) E SOB DEGRADAÇÃO FORTE (C).....	65
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA, ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA COM DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIÓDOS E COMPARAÇÃO COM A BIBLIOTECA UVTox® DE UMA AMOSTRA DE CAFEÍNA (40 $\mu\text{G/mL}$) ANALISADA NAS MESMAS CONDIÇÕES DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	66
FIGURA 31 – CROMATOGRAMA, ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA COM DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIÓDOS E COMPARAÇÃO COM A BIBLIOTECA UVTox® DE UMA AMOSTRA DE PROCAÍNA (40 $\mu\text{G/mL}$) ANALISADA NAS MESMAS CONDIÇÕES DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	67
FIGURA 32 – EXEMPLO - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO 2º DIA.....	68
FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA RA3 (200 MHz) EM CDCl ₃	71
FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DO PADRÃO DE REFERÊNCIA SECUNDÁRIO (200 MHz) EM CD ₃ OD CONTENDO ÁCIDO MALÉICO. DESTAQUE PARA SINAIS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.	74
FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DO PADRÃO DE REFERÊNCIA SECUNDÁRIO (200 MHz) EM CD ₃ OD CONTENDO ÁCIDO MALÉICO, DESTACADOS OS SINAIS DAS METILAS DA COCAÍNA COM SOBREPOSIÇÃO DE SINAIS. ESCALA VERTICAL AJUSTADA PARA VISUALIZAÇÃO DOS SINAIS MENORES E DEFINIÇÃO DOS SINAIS NA LINHA DE BASE.	75
FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DO PADRÃO DE REFERÊNCIA SECUNDÁRIO (500 MHz) EM CD ₃ OD CONTENDO ÁCIDO MALÉICO, DESTACADOS OS SINAIS DAS METILAS DA COCAÍNA COM SOBREPOSIÇÃO DE SINAIS. ESCALA VERTICAL AJUSTADA PARA VISUALIZAÇÃO DOS SINAIS MENORES E DEFINIÇÃO DOS SINAIS NA LINHA DE BASE.	76
FIGURA 37 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA PR1 (200 MHz) EM D ₂ O ACIDIFICADO COM DCL CONTENDO TSP. DESTAQUE PARA SINAIS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.	77
FIGURA 38 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA RA3 (200 MHz) EM D ₂ O CONTENDO TSP COMO SR INTERNA, DESTACADOS OS SINAIS DAS METILAS DA COCAÍNA COM SOBREPOSIÇÃO DE SINAIS. ESCALA VERTICAL AJUSTADA PARA VISUALIZAÇÃO DOS SINAIS MENORES E DEFINIÇÃO DOS SINAIS NA LINHA DE BASE.....	78
FIGURA 39 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA RA3 (500 MHz) EM D ₂ O CONTENDO TSP COMO SR INTERNA, DESTACADOS OS SINAIS DAS METILAS DA COCAÍNA COM MENOR SOBREPOSIÇÃO DE SINAIS. ESCALA VERTICAL AJUSTADA PARA VISUALIZAÇÃO DOS SINAIS MENORES E DEFINIÇÃO DOS SINAIS NA LINHA DE BASE.	78
FIGURA 40 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA RV1 (300 MHz) EM D ₂ O ACIDIFICADO CONTENDO TSP COMO SR INTERNA E OS ADULTERANTES CAFEÍNA E FENACETINA.....	84
FIGURA 41 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA RM1 (300 MHz) EM D ₂ O ACIDIFICADO CONTENDO TSP COMO SR INTERNA E O ADULTERANTE FENACETINA.....	85
FIGURA 42 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-EM DA AMOSTRA DE RM1.....	85
FIGURA 43 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-EM DA AMOSTRA DE PC1.....	86
FIGURA 44 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA PT1 (300 MHz) EM D ₂ O ACIDIFICADO CONTENDO TSP COMO SR INTERNA E O ADULTERANTE BENZOCAÍNA. AMPLIAÇÃO DA ESCALA VERTICAL PARA VISUALIZAÇÃO DE SINAIS COM BAIXA RESOLUÇÃO S/N.....	86
FIGURA 45 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA RN1 (300 MHz) EM D ₂ O ACIDIFICADO CONTENDO TSP COMO SR INTERNA E O ADULTERANTE BENZOCAÍNA. AMPLIAÇÃO DA ESCALA VIRTUAL PARA VISUALIZAÇÃO DE SINAIS COM BAIXA RESOLUÇÃO S/N.	87
FIGURA 46 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG-EM DA AMOSTRA DE RN1.	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONTEÚDO DE COCAÍNA EM FUNÇÃO DA ESPÉCIE DE ERYTHROXYLUM.....	6
TABELA 2 - ASSINALAMENTOS DE RMN- ¹ H DA COCAÍNA (CARROLL, 1982).	17
TABELA 3 – QUANTIDADES AMOSTRADAS DAS APREENSÕES.....	39
TABELA 4 – PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS DO PADRÃO DE REFERÊNCIA SECUNDÁRIO DE COCAÍNA PARA ENSAIO DA LINEARIDADE.	47
TABELA 5 - QUANTIDADE PESADA DAS AMOSTRAS, CONCENTRAÇÕES ESTIMADAS DE COCAÍNA APÓS DILUIÇÕES.....	50
TABELA 6 – QUANTIDADE PESADA DAS AMOSTRAS, CONCENTRAÇÃO ESTIMADA DE COCAÍNA APÓS DILUIÇÃO E MASSAS DE COCAÍNA E TSP APÓS TRANSFERÊNCIA EM TUBOS DE RMN.	56
TABELA 7 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE LINEARIDADE (N=3).....	68
TABELA 8 - VALORES DE EXATIDÃO E PRECISÃO PARA O TESTE DE REPETIBILIDADE DO 1º DIA, PARA TRÊS CONCENTRAÇÕES DE COCAÍNA (N = 3).....	69
TABELA 9 - VALORES DE EXATIDÃO E PRECISÃO PARA O TESTE DE REPETIBILIDADE DO 2º DIA, PARA TRÊS CONCENTRAÇÕES DE COCAÍNA (N = 3).....	69
TABELA 10 - VALORES DE EXATIDÃO E PRECISÃO PARA O TESTE DE REPETIBILIDADE DO 3º DIA, PARA TRÊS CONCENTRAÇÕES DE COCAÍNA (N = 3).....	70
TABELA 11 – RESULTADO ΔH DA COCAÍNA EM CDCl ₃ E COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA.	72
TABELA 12 – CONCENTRAÇÃO NOMINAL DE COCAÍNA, COEFICIENTE DE VARIAÇÃO E IC95% DOS DADOS DE CLAE-DAD.....	80
TABELA 13 – ADULTERANTES E OUTRAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADOS POR COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE MASSAS COM ESPECTROS DA BIBLIOTECA NIST® EM 13 AMOSTRAS DE CRACK POR CG-EM.	83
TABELA 14 – TEORES DAS AMOSTRAS DE CRACK OBTIDOS PELO MÉTODO DE RMNQ- ¹ H DESENVOLVIDO.	89
TABELA 15 – INTERVALO DE CONFIANÇA 95% DA MÉDIA DAS DEZ DETERMINAÇÕES.	91

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – TEOR MÉDIO DE COCAÍNA EM CADA AMOSTRA DE CRACK POR CLAE-DAD COM INTERVALOS DE CONFIANÇA 95% (N=3).....	79
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS APREENDIDAS DE ACORDO COM AS FAIXAS DE TEOR DE COCAÍNA PELO MÉTODO DE CLAE-DAD.	81
GRÁFICO 3 – TEOR MÉDIO DE COCAÍNA EM CADA AMOSTRA DE CRACK POR RMNQ- ¹ H COM INTERVALO DE CONFIANÇA 95% (N=10).....	88
GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS APREENDIDAS DE ACORDO COM AS FAIXAS DE TEOR DE COCAÍNA PELO MÉTODO DE RMNQ- ¹ H.	90
GRÁFICO 5 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MÉDIOS DOS TEORES DE COCAÍNA POR CLAE-DAD E RMNQ- ¹ H (P<0,0001).....	92
GRÁFICO 6 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS MÉDIOS DOS TEORES DE COCAÍNA POR CLAE-DAD E A DETERMINAÇÃO DO TEOR DA REGIÃO 7 POR RMNQ- ¹ H (P<0,0001).	92

LISTA DE ABREVIATURAS

CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CG	Cromatografia a gás
CG-DIC	Cromatografia a gás com detector de ionização de chama
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
FID	<i>Free induction decaiment</i>
IC95%	Intervalo de confiança 95%
IPC-PB	Instituto de Polícia Científica da Paraíba
LTF	Laboratório de Toxicologia Forense
ppm	partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN- ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RMNq	Ressonância magnética nuclear quantitativa
RMNq- ¹ H	Ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio
SNC	Sistema nervoso central
SR	Substância de referência
T	Tesla

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 <i>Erythroxylum coca</i> Lam.....	5
2.2 Alcalóides tropânicos	6
2.3 A cocaína e o crack.....	8
2.3.1 <i>Histórico</i>	8
2.3.2 <i>Formas de apresentação</i>	9
2.3.3 <i>Uso</i>	10
2.3.4 <i>Mecanismo de ação</i>	10
2.3.5 <i>Obtenção do crack</i>	10
2.4 Adulterantes e pureza.....	13
2.5 Espectroscopias de UV/Vis e de RMN de hidrogênio da cocaína.....	16
2.6 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)	18
2.7 Ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq).....	19
2.7.1 <i>Parâmetros espectrais</i>	22
2.7.2 <i>Parâmetros de aquisição para espectroscopia de RMNq</i>	22
2.7.3 <i>Obtenção de dados quantitativos</i>	25
2.7.4 <i>Parâmetros de processamento</i>	26
2.7.5 <i>Integração de sinais</i>	28
2.7.6 <i>Substância de referência (SR)</i>	28
2.7.7 <i>Aplicações químicas e farmacêuticas de RMNq</i>	30
3 OBJETIVOS	37
3.1 <i>Objetivo geral</i>	37
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 <i>Amostras de crack</i>	38
4.2 <i>Materiais e Equipamentos</i>	40
4.3 <i>Reagentes e solventes</i>	41
4.4 <i>Padrões de referência</i>	42
4.4.1 <i>Padrão de referência secundário</i>	42

4.4.2 Padrão de referência primário	43
4.5 Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	44
4.5.1 Desenvolvimento do método	44
4.5.2 Validação do método	44
4.5.3 Quantificação	48
4.6 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	51
4.6.1 Amostras	51
4.6.2 Método de análise qualitativo	51
4.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio (RMNq-¹H).....	52
4.7.1 Desenvolvimento do método	52
4.7.2 Quantificação	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1 CLAE-DAD.....	58
5.1.1 Desenvolvimento do método	58
5.1.2 Validação do método	61
5.2 RMNq-¹H.....	70
5.2.1 Desenvolvimento do método	70
5.2 Pureza de amostras de crack por CLAE-DAD x RMNq-¹H e identificação dos principais adulterantes por CG-EM e RMN-¹H	79
6 CONCLUSÕES	96
7 PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

O tráfico de drogas associado ao uso abusivo de substâncias psicoativas é um dos maiores problemas em todo mundo, ceifando vidas e, de certo modo, impedindo o desenvolvimento da sociedade.

O Relatório Mundial sobre Drogas estima que o número total de pessoas que usaram cocaína ao menos uma vez em 2007 variou entre 16 e 21 milhões, sendo que esta droga constitui uma das mais consumidas. O maior mercado consumidor de cocaína continua sendo a América do Norte, onde a cocaína é a segunda droga ilícita de uso geral (depois da maconha) (UN, 2009).

No Brasil, de acordo com o “I Levantamento Domiciliar sobre o uso de Drogas”, realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas da Universidade Federal de São Paulo (CEBRID) no ano de 2004, constatou-se que 7,2% dos indivíduos do sexo masculino, entre 25 e 34 anos de idade, já haviam usado cocaína (CEBRID, 2004a).

Ainda, segundo o CEBRID em seu “V Levantamento Nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras” realizado em 2004, foi demonstrado que o uso de cocaína na forma de crack no Brasil, referido ao menos uma vez na vida, apresentou maiores porcentagens na região Sul (1,1%) e Sudeste (0,8 %). Neste levantamento, o município de João Pessoa-PB aparece como sendo a capital do país com maior incidência de consumo de crack entre estudantes do ensino médio e fundamental (2,5% entre os estudantes que compunham a população do estudo), um dado alarmante até mesmo para os pesquisadores do CEBRID (CEBRID, 2004b).

As apreensões de crack apresentam atualmente grande aumento no estado da Paraíba traduzido pelo avanço no número de exames químico-toxicológicos relacionados a esta droga procedidos nos Laboratórios de Toxicologia Forense do Instituto de Polícia Científica da Paraíba (LTF/IPC-PB). Em 2007 foram realizados 250 exames (referentes ao peso líquido de 4.486,50 g), 297 exames em 2009 (referentes ao peso líquido de 23.986,30 g), um incremento de mais de 530% no período, se considerarmos o peso anual de amostras apreendidas. O mesmo patamar quanto ao peso líquido total apreendido prosseguiu durante o ano de 2010, onde 575 exames foram realizados relativos a 24.557,71 g (SEDS, 2011).

A perícia forense é a atividade especializada em produzir a prova técnica desenvolvida pelos peritos oficiais, mediante a análise científica de evidências relacionadas a prática de delitos. A perícia forense estuda todos os objetos envolvidos em delitos, examina o local dos fatos, efetua

exames laboratoriais, reproduz de forma simulada o mecanismo do crime, entre outras análises, que possibilitam a produção da prova material (SENASP, 2010).

O estado brasileiro conta com 28 perícias forenses, entre estaduais, distrital e federal, com as mais diversas estruturas organizacionais e físicas, metodologias de trabalho, recursos profissionais e financeiros.

A perícia forense na área química/toxicológica compreende estas duas grandes disciplinas científicas interdependentes. A química forense é o ramo das ciências forenses voltado para a produção de provas materiais para a justiça, através da análise de substâncias diversas, tais como drogas lícitas e ilícitas, venenos, acelerantes e resíduos de incêndio, explosivos, resíduos de disparo de armas de fogo, combustíveis, tintas e fibras. Embora a química forense seja um tema muito importante e que desperte cada vez mais interesse perante a sociedade científica, a sua aplicação no campo da criminalística ainda constitui uma linha de pesquisa recente no Brasil (ROMAO, 2011).

A análise de drogas de abuso é uma das áreas que desperta grande interesse da comunidade científica no que tange à química forense. O combate ao narcotráfico e o aumento de dependentes químicos são grandes desafios que a humanidade enfrenta diariamente. A química forense, além de identificar os principais componentes que constituem uma amostra de droga e caracterizá-la como ilícita, pode ser utilizada na identificação de compostos químicos remanescentes do processo de refino ou fabricação, fornecendo perfis químicos e elementos que correlacionam amostras de diferentes apreensões, identificando rotas e origens geográficas de produção (SHIBUYA, 2007).

Todavia, as limitações de recursos e a grande demanda de exames impõem ao perito oficial a necessidade de responder a um primordial questionamento no prazo legal: qual a identidade do material apreendido? Neste panorama, métodos de análises rápidos são utilizados na caracterização das substâncias químicas ilícitas, ou seja, as metodologias empregadas são estritamente qualitativas.

As metodologias mais empregadas para identificação de drogas de abuso nas perícias forenses são as reações colorimétricas de complexação e o uso da cromatografia em camada delgada. Os métodos colorimétricos são utilizados como testes preliminares para delimitar o campo de pesquisa das possíveis substâncias e apresenta a possibilidade de diversos falso-positivos nos seus resultados, principalmente na identificação de cocaína através do método colorimétrico clássico de Scott ou Scott modificado (TSUMURA, 2005).

A cromatografia em camada delgada pode ser utilizada na análise definitiva das substâncias químicas devido a praticidade quanto a seleção de fases móveis, rapidez e simplicidade, contudo, necessita de um padrão de referência de difícil aquisição (devido a necessidade de autorizações especiais). Além disso, a técnica depende da temperatura ambiente, da adequada saturação do sistema de solventes eluentes, do modo de aplicação na placa cromatográfica, da correta seleção de substâncias reveladoras e da técnica adequada de aplicação da amostra.

Dados quanto ao teor de cocaína nas amostras de crack no estado da Paraíba são desconhecidos e podem indiretamente explicar o incremento no número de apreensões desta droga regionalmente, pois, quanto maior o teor de cocaína nas amostras apreendidas maior a possibilidade de desenvolvimento de dependência.

Diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas na determinação quantitativa do teor de cocaína em amostras de crack, como a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e especialmente a ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq) que pode ser uma ferramenta quantitativa precisa e exata (PAULI, 2005).

A utilização da RMNq baseia-se, principalmente, no fato de que a intensidade integrada (ou seja a área sob o sinal de um pico de RMN) é diretamente proporcional ao número de núcleos que originam este sinal, independente da natureza química da amostra. Portanto é teoricamente possível quantificar substâncias sem a necessidade de curvas de calibração e padrões de referências primários do analito alvo (que no caso de drogas de abuso são de difícil aquisição até pelos órgãos policiais). Além disso, a técnica de espectroscopia de RMN é um método de análise não destrutivo, o que se constitui em uma vantagem quando se trata de amostras presentes em pequenas quantidades (ARAÚJO FILHO, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Erythroxylum coca* Lam.

A Família Erythroxylaceae compreende quatro gêneros e possui cerca de 250 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais. No Brasil, foram listadas 25 espécies nativas, cujos habitats variam de floresta a cerrado (AMARAL Jr., 1980; EITEN, 1982; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1983).

O gênero *Erythroxylum* reúne representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos, de folhas e ramos alternos ou opostos. As folhas são glabras, inteiras, membranáceas, cartáceas ou coriáceas e possuem estípulas interpeciolares, persistentes ou caducas, de tamanho e consistência variável que podem ser fimbriadas ou enervadas e apresentar ápice bi, tri ou não setuloso. Várias espécies do gênero possuem propriedades medicinais, sendo as populares cocas (*Erythroxylum coca* Lam. e *Erythroxylum novogranatense*) e suas variedades as mais conhecidas e estudadas, devido à presença de alcalóides em suas folhas (SANTOS, 2008). Trabalhos como os de Bohm *et al.* e Plowman *et al.* salientam a dificuldade para delimitar corretamente os representantes de coca que são muitas vezes tratados como sendo único (*Erythroxylum coca*) (BOHM, 1982; PLOWMAN, 1982; PLOWMAN, 1984).

O interesse pelo gênero intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca* Lam., que secularmente eram empregadas pelos indígenas da região andina da América do Sul (ZUANAZZI, 2001). Quimicamente, o gênero caracteriza-se pela presença de alcalóides do tipo tropânico, dentre os quais se destaca a cocaína, um alcalóide natural produzido por *E. coca*, que já foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (BOHM, 1988). Todavia, a cocaína ganhou notoriedade por sua atividade psicoativa no sistema nervoso central (SNC), tornando-se um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade (TAMAGNAN, 2005).

A Tabela 1 (pág. 6), extraída de Moore *et al.*, ilustra o conteúdo de cocaína em função de algumas espécies de *Erythroxylum* (MOORE, 1994).

Tabela 1 - Conteúdo de cocaína em função da espécie de *Erythroxylum*.

Vegetal	Conteúdo em cocaína*	Média
<i>Erythroxylum coca</i> v. <i>coca</i>	0,23 – 0,96	0,63
<i>Erythroxylum coca</i> v. <i>ipadu</i>	0,11 – 0,41	0,25
<i>Erythroxylum novogranatense</i> v. <i>novogranatense</i>	0,55 – 0,93	0,77
<i>Erythroxylum novogranatense</i> v. <i>truxillense</i>	0,42 – 1,02	0,72

* em mg / 100 mg de folhas secas.

2.2 Alcalóides tropânicos

Os alcalóides formam um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas, cuja similaridade molecular mais significativa é a presença de nitrogênio, geralmente na forma de uma função amina. Existem várias classes de alcalóides, e muitos apresentam alguma ação fisiológica, geralmente no sistema nervoso central, o que tem sido utilizado para o benefício do homem na produção de medicamentos, como, por exemplo, a morfina, codeína, atropina, hiosciamina e também para o uso ilícito (SANTOS, 2008).

As funções destes compostos nas plantas não estão bem esclarecidas. Inicialmente, foram atribuídos aos alcaloides os papéis de proteção, resultante da toxicidade elevada que conferem ao vegetal. No entanto, acredita-se que os alcaloides atuem também como reserva da síntese de proteínas, estimulantes ou reguladores do crescimento, do metabolismo interno ou da reprodução sendo, ainda, agentes finais da desintoxicação e da transformação simples de outras substâncias, cujo acúmulo pode ser nocivo ao vegetal (CORREIA, 2001).

Alcalóides tropânicos apresentam em sua estrutura um anel bicíclico, denominado tropano 8-azabicyclo[3.2.1]octano, que é formalmente constituído pelos anéis pirrolidina e piperidina (Figura 1, pág.6).

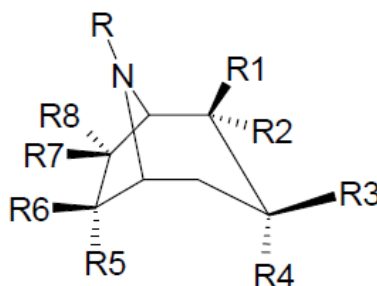


Figura 1 - Estrutura química do anel tropano (8-azabicyclo[3.2.1]octano).

São conhecidos cerca de 200 alcalóides tropânicos como: higrolina, cuscohigrina e os principais atropina, hiosciamina, escopolamina e cocaína (BACCHI, 1999).

As folhas de coca contêm três tipos básicos de alcalóides:

- derivados da ecgonina: metilecgonina, benzoilecgonina, cocaína, cinamoilcocaína, truxilinas, etc (Figura 2 – pág. 7);
- derivados da tropina: tropacocaína e valerina (Figura 3 – pág. 7);
- derivados da higrina: higrolina e cuscohigrina (Figura 4 – pág. 8).

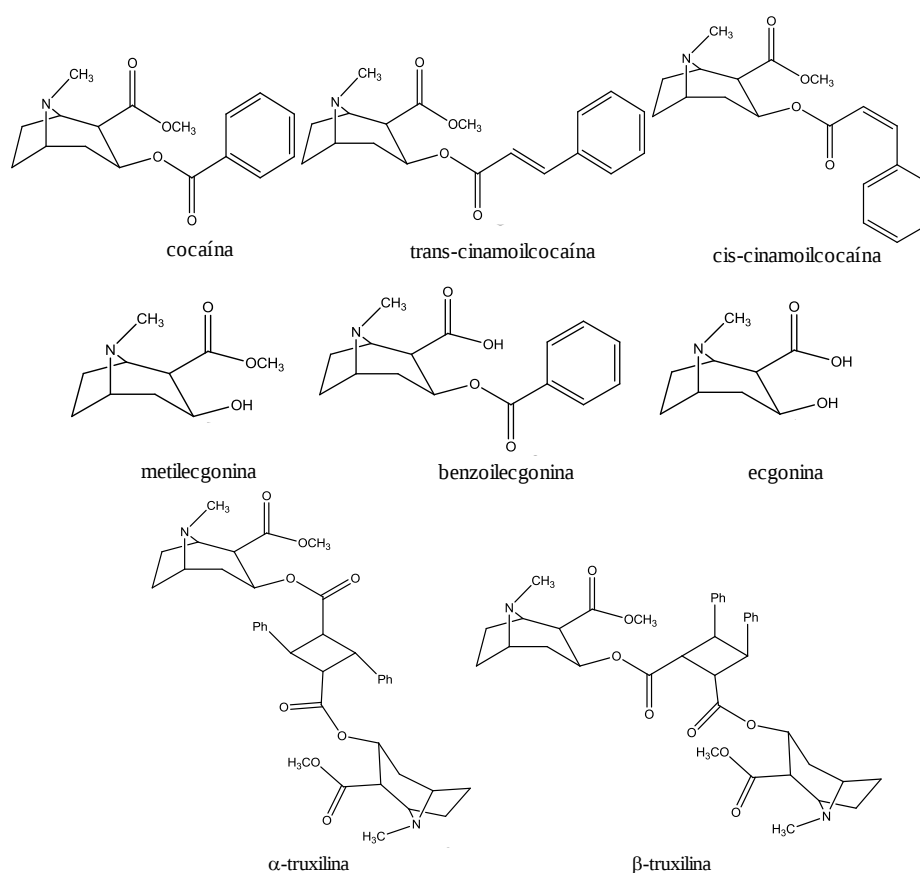


Figura 2 - Alcalóides derivados da ecgonina presentes nas folhas de coca segundo Almeida (2003).

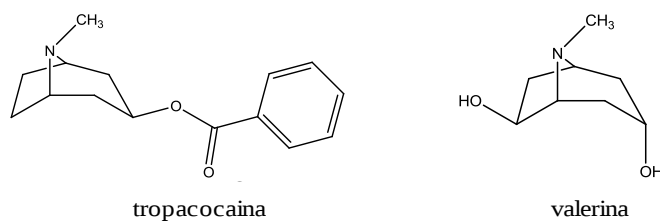


Figura 3 - Alcalóides derivados da tropina presentes nas folhas de coca segundo Almeida (2003).

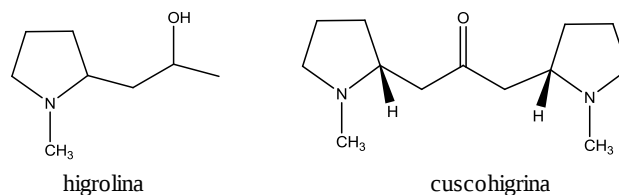


Figura 4 - Alcalóides derivados da higrina presentes nas folhas de coca segundo Almeida (2003).

2.3 A cocaína e o crack

A cocaína, anestésico local e estimulante do sistema nervoso central (SNC), é um dos principais alcalóides extraídos das folhas de plantas do gênero *Erythroxylum* (família Erythroxylaceae) (ALMEIDA, 2003).

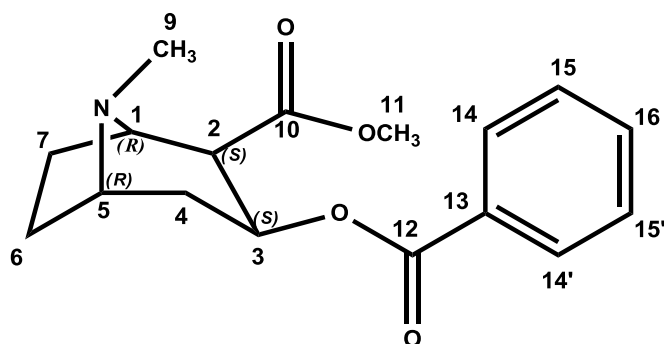


Figura 5 – Estrutura química da cocaína.

O nome da cocaína preconizado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) é éster metílico do ácido (1R, 2S, 3S, 5R)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxílico, sendo também conhecida como benzoilmetilecgonina. Apresenta em sua estrutura, assim como a maioria dos anestésicos locais, um sítio hidrofílico, representado pela amina terciária do anel tropano, e um grupo hidrofóbico, que é a estrutura aromática presente como éster do ácido benzóico.

2.3.1 Histórico

Dados arqueológicos datados de 3000 a.C. são a mais antiga prova do uso da folha de coca pelo homem. A folha de coca continuou sendo mascarada pelos Incas (900 d.C.) até chegar a Europa onde começou a ser comercializada no ano de 1580. A cocaína foi isolada por Albert Niemann no ano de 1860. As folhas de coca passaram a ser maceradas em chás e incorporadas

em outras bebidas como a Coca-Cola, que até algum tempo atrás apresentava a cocaína entre os seus ingredientes. Entre os anos de 1880 e 1890, o uso da cocaína era bastante popular, chegando a conquistar muitos usuários ilustres. No ano de 1921, no Brasil, o Congresso Nacional aprovou o Decreto-lei nº 4.292 que, entre outras coisas, estabeleceu: a) penalidades (multa e prisão) para as contravenções na venda de cocaína e outras drogas; b) criação de estabelecimento especial para tratamento de dependentes com duas seções, uma para internados judiciários e outra para internados voluntários (BAHLS, 2002). No ano de 1970, a fabricação, a distribuição e a posse da cocaína foram definitivamente proibidas nos EUA, entretanto, nos anos 70 e 80 o consumo da cocaína foi revolucionado com a criação de formas de cocaína que poderiam ser inaladas, como o crack (WARNER, 1993).

Atualmente no Brasil, a Lei Federal nº 11343/2006, que instituiu o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas (SISNAD), prescreveu medidas para prevenção do uso indevido, atenção e reinserção social de usuários e dependentes de drogas e estabeleceu normas para repressão à produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas. Em seu Art. 66, a Lei denomina como drogas, as substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras sob controle especial relacionadas pela Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 2006). Por sua vez, a mencionada Portaria, em sua Lista F (Lista das substâncias de uso proscrito no Brasil) e sub-lista F1 (Substâncias entorpecentes) elenca a cocaína ou o éster metílico da benzoilecgonina (BRASIL, 1998).

2.3.2 Formas de apresentação

Por ser um alcalóide, a cocaína possui basicidade intrínseca ($pK_a = 8,6$) que lhe permite reagir com soluções de ácidos, orgânicos ou inorgânicos, formando sais, como o cloridrato de cocaína e o sulfato de cocaína. Essa simples transformação química é uma das mais eficientes ferramentas para se efetuar o isolamento de alcalóides de matrizes complexas, visto que, geralmente, as propriedades de solubilidade dos produtos de reação são completamente antagônicas às da base livre correspondente (ALMEIDA, 2003).

É encontrada com mais frequência na forma de pasta de coca, cloridrato de cocaína ou na sua forma alcalóide, como crack (base livre) (OGA, 1995; WARNER, 1993).

2.3.3 *Uso*

O cloridrato de cocaína é frequentemente utilizado por via intranasal ou por via intravenosa. Em função do seu alto ponto de ebulição (180 °C) e de sua decomposição em temperaturas elevadas, o cloridrato de cocaína não pode ser inalado, em consequência disto, o cloridrato de cocaína vem sendo gradativamente substituído pelo crack, no qual a cocaína se apresenta na forma de base livre.

O crack (base livre) pode ser fumado em cachimbos ou cigarros e misturado com maconha ou tabaco. A presença residual de éter em amostras pode provocar queimaduras em usuários desta forma de cocaína.

As folhas de coca continuam sendo mascaradas na América do Sul. Entretanto, não produzem os efeitos gerados pelo consumo das formas purificadas em função da limitada absorção gastrointestinal e da, relativamente, pequena quantidade de cocaína presente nas folhas de coca (vide Tabela 1, pág. 6) (WARNER, 1993).

2.3.4 *Mecanismo de ação*

O átomo de nitrogênio combina-se com receptores da membrana celular e bloqueia a condução de íons sódio e potássio, impedindo assim tanto a geração como a condução do impulso nervoso. A estrutura éster é importante, pois esta ligação é facilmente hidrolisada durante a degradação metabólica e a inativação no organismo.

Em adição ao bloqueio na condução pelo sistema nervoso periférico, a cocaína interfere com a função de todos os órgãos em que a transmissão de impulsos ocorre. Apresenta efeitos importantes no sistema nervoso central (SNC), nos gânglios autônomos, na junção neuromuscular e em todas as formas de fibra muscular. O efeito sistêmico mais notável é a estimulação do SNC, onde atua em processos que reduzem a recaptação da dopamina elevando o nível desse neurotransmissor. A ação da cocaína no córtex cerebral e a liberação de dopamina no sistema límbico são particularmente fortes, propriedades responsáveis pelo seu potencial para o uso abusivo (OGA, 1995).

2.3.5 *Obtenção do crack*

Os procedimentos de extração de cocaína a partir das folhas de coca para obtenção do crack seguem duas etapas principais:

a) imersão das folhas de coca em soluções aquosas ácidas ou alcalinas ou diretamente em um determinado solvente orgânico; e

b) processos de purificação baseados em precipitações e solubilizações sucessivas.

Tais processos de purificação, independentemente de suas particularidades individuais, são chamados genericamente de refino e são responsáveis pela obtenção da cocaína em suas diversas formas de apresentação.

Há uma infinidade de substâncias capazes de atuar com eficiência em cada etapa. A produção ilícita de cocaína envolve solventes e reagentes pouco dispendiosos e de fácil obtenção. Os processos descritos nos fluxogramas a seguir (Figura 6 – pág. 11, Figura 7 – pág. 12 e Figura 8 – pág. 12) são considerados como sendo os mais utilizados para a obtenção do crack (ALMEIDA, 2003; MORELLO, 1995).

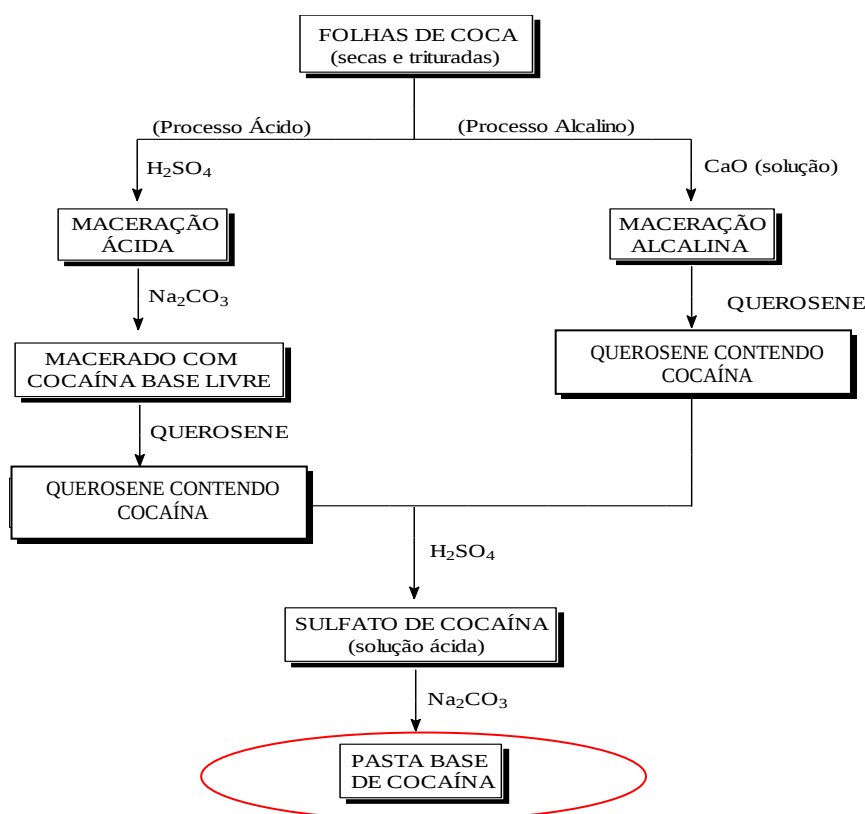


Figura 6 - Obtenção da pasta base de cocaína segundo Almeida (ALMEIDA, 2003).

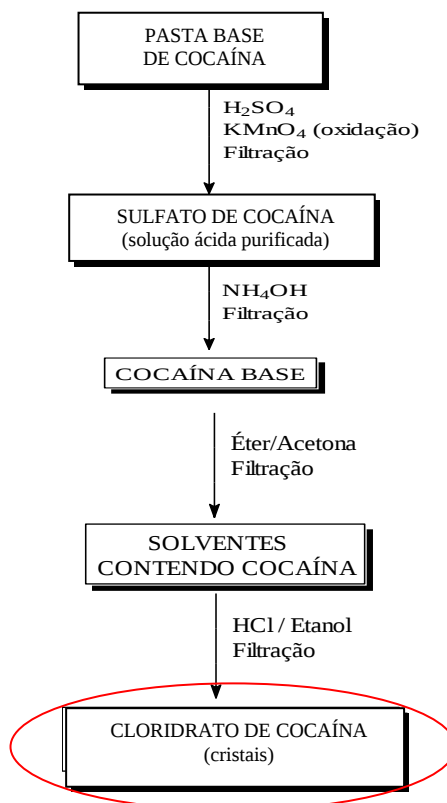


Figura 7 – Obtenção do cloridrato de cocaína a partir da pasta base segundo Almeida (ALMEIDA, 2003).

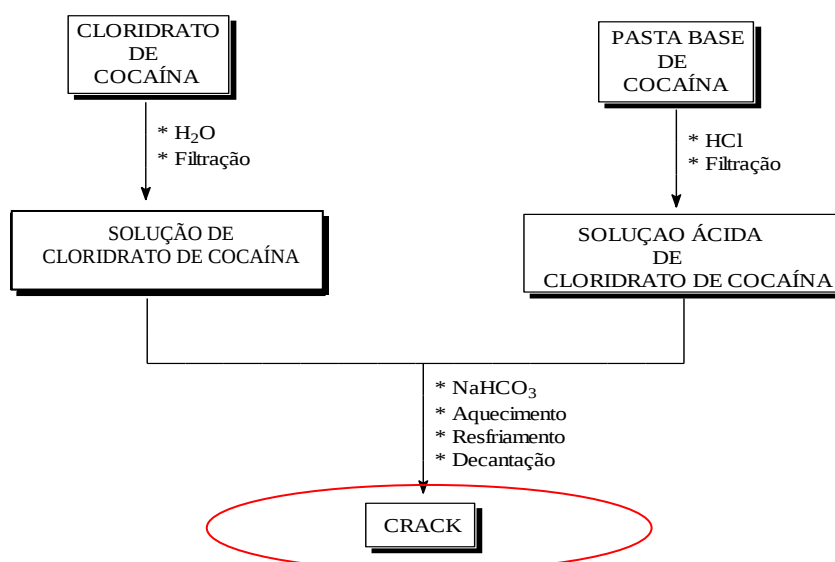


Figura 8 – Obtenção do crack a partir da pasta base ou do cloridrato de cocaína segundo Almeida (ALMEIDA, 2003).

2.4 Adulterantes e pureza

Diversas substâncias podem ser adicionadas pelos narcotraficantes aos produtos constituídos de cocaína para aumentar-lhes o peso, visando proporcionar maior margem de lucro no comércio da droga.

Qualquer substância que tenha aparência semelhante à cocaína, principalmente em termos de cor, pode ser utilizada. Aquelas que possuem sabor amargo, propriedade anestésica e cor branca são mais difíceis de serem percebidas pelos usuários, porque se confundem com as propriedades do referido alcalóide.

Amostras de cloridrato de cocaína são frequentemente diluídas com manitol e lactose para dar volume ao pó, adulteradas com cafeína para simular o efeito estimulante da cocaína e/ou com procaína e lidocaína para imitar o efeito de anestesia local (OGA, 1995; WARNER, 1993).

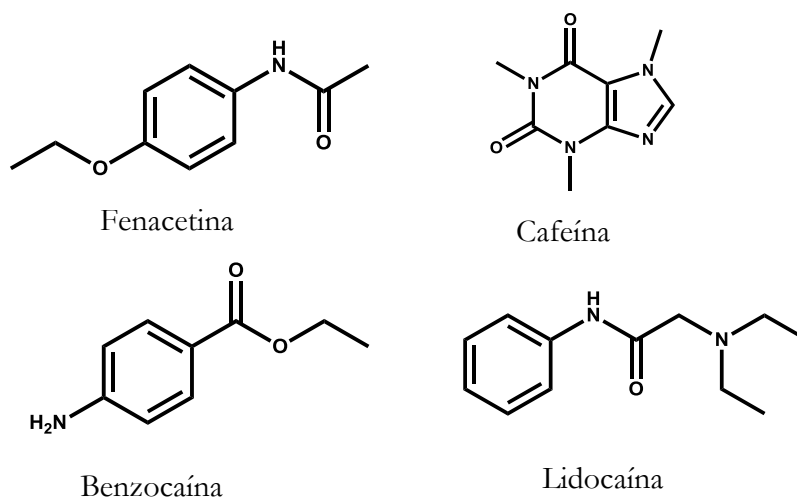


Figura 9 – Estrutura química dos principais adulterantes.

É importante frisar que existe grande variação nas quantidades e tipos de adulterantes e diluentes adicionados às amostras de cocaína. Barrio *et al.* (1997) analisaram 9.681 amostras de cloridrato de cocaína apreendidas em 16 províncias da Espanha entre 1985 e 1993. Os teores de cocaína em amostras provenientes da província de Ibiza situaram-se entre 26 e 45%, enquanto na província de *La Coruna* foram encontrados teores de cocaína de até 73%. A lidocaína foi o principal adulterante detectado entre os anos de 1985 e 1987 (69,6% das amostras em 1985), mas não foi encontrada em nenhuma amostra apreendida entre 1992 e 1993, período em que a cafeína passou a ser o diluente mais comum (BARRIO, 1997).

Fucci & de Giovanni (1998) pesquisaram 156 amostras de cloridrato de cocaína apreendidas no mercado ilegal de Roma, entre janeiro de 1996 e junho de 1997. A pureza da cocaína e a presença de substâncias empregadas para diluição foram determinadas para cada amostra, sendo encontrados adulterantes em muitas das amostras de rua analisadas. A lidocaína (média de 14,7%) e cafeína (média de 9%) mostraram ser os adulterantes mais frequentemente encontrados nas amostras de cloridrato de cocaína (FUCCI, 1998).

A adulteração de amostras de cocaína é um problema comum entre os mercados de drogas ilegais em todo o globo. King (1999) mostrou que a média do teor de cocaína das amostras apreendidas no Reino Unido atingiu apenas 51% (KING, 1999).

No território brasileiro, Bernardo *et al.* (2003) quantificaram o conteúdo de cocaína e checaram a presença de adulterantes em 209 amostras ilícitas de cloridrato de cocaína apreendidas pelos distritos policiais de entorpecentes e substâncias tóxicas das cidades de Alfenas e Varginha, MG, no ano de 2001, usando uma triagem por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e confirmando/quantificando por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC). Os diluentes (amido, carbonatos/bicarbonatos e açúcares) foram analisados por testes qualitativos ou CCDA. Das amostras analisadas, 88,9% apresentaram resultados positivos para cocaína em concentrações entre 4,3 e 87,1% do pó. Os adulterantes detectados foram lidocaína (50,2% das amostras, em concentrações que variaram entre 2,8 a 63,3% do pó), cafeína (65% das amostras, as concentrações variando entre 0,5-92%) e prilocaína (11% das amostras, com as concentrações que variavam entre 1,4-20,7%). O teste para carbonato/bicarbonato apresentou resultados positivos em 41,2% das amostras e 51,2% das amostras apresentaram açúcares (BERNARDO, 2003).

Por sua vez, Carvalho & Mídio (2003) avaliaram a pureza do cloridrato de cocaína presente no mercado ilícito da cidade de São Paulo. Do universo de 1.958 amostras de “pó branco” apreendidas, 389 foram usadas para determinar o conteúdo de cocaína e adulterantes, bem como a identificação de vários diluentes usando cromatografia em camada delgada analítica, CG-DIC e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados demonstraram: (a) que nem cocaína nem adulterantes foram detectados em 17 amostras (4,4%), (b) de todas as amostras positivas (95,6%) para a cocaína, 14% consistiam em não mais que 200 mg/g (20%), (c) que a pureza da cocaína em 70% das amostras variou de 201 a 550 mg/g (20,1-55%) e (d) em 16% das amostras a pureza foi maior do que 700 mg/g (70%). Os anestésicos locais lidocaína e procaína foram detectados em 19 amostras (4,9%) em um intervalo entre 10-602 mg/g. A cafeína foi encontrada em duas amostras (179 e 356 mg/g). Os principais diluentes detectados foram carbonatos e bicarbonatos (19,2%); silicatos (13,8%), açúcar (9,59%), amido

(5,6%), borato (3,8%) e sulfatos (2,8%). Contaminantes (produtos secundários) originados de refino de folhas de coca ou processos de decomposição não foram analisados (CARVALHO, 2003).

Características de amostras de cocaína provenientes dos estados do Amazonas (AM) e do Rio Grande do Sul (RS), apreendidas entre janeiro de 2000 e agosto de 2001, foram analisadas com relação a sua forma de apresentação (cocaína base ou cloridrato de cocaína), a presença de fármacos e açúcares empregados como adulterantes e diluentes, medidas de coloração e luminosidade, os espectros de reflexão total atenuada no infravermelho médio (FTIR/ATR) e os teores de Ag, Al, Mn e Ni. Com base nos resultados obtidos foi possível inferir-se a origem de uma dada amostra, pois as amostras originárias do estado do Amazonas apresentaram características distintas daquelas do Rio Grande do Sul. Também foram obtidos espectros de FTIR/ATR de amostras de cocaína originárias dos estados do Ceará (CE), do Mato Grosso (MT), de Roraima (RR) e de Santa Catarina (SC). Com o objetivo da classificação geográfica, todos os espectros adquiridos (6 estados) foram estudados simultaneamente, empregando-se análise hierárquica de agrupamentos (HCA). Foram encontradas similaridades entre as amostras provenientes do AM, CE, MT e RR, o mesmo ocorrendo entre amostras do RS e SC (ALMEIDA, 2003).

Brunt *et al.* (2009) relataram a identificação de fenacetina, hidroxizina e diltiazem como responsáveis por efeitos adversos em usuários de cocaína, entre 1999 e 2007, onde 3.230 amostras de cloridrato de cocaína foram analisadas em pesquisa na Holanda. Além disso, os pesquisadores evidenciaram teores baixos de cocaína e consequente aumento nas quantidades dos adulterantes, principalmente fenacetina, cafeína, levimasol, hidroxizina e diltiazem (BRUNT, 2009). Maietti *et al.* corroboraram com estes resultados apresentados ao também identificarem o levimasol e o diltiazem em 259 amostras de cloridrato de cocaína pesquisadas na Itália entre março de 2006 e setembro de 2007 (MAIETTI, 2009).

Hays (2005) utilizando a técnica de RMNq-¹H, determinou a pureza de uma amostra de apreendida de cloridrato de cocaína em 79,5%, enquanto que a mesma amostra quantificada pela técnica de CG-DIC teve um valor médio de teor de 77,3% e evidenciou ainda a presença de outros derivados da ecgonina nas amostras, como *cis*- e *trans*-cinnamoilcocaína, e de hidroxizina (HAYS, 2005).

Em recente trabalho, pesquisadores da França entrevistaram 373 usuários de cocaína entre maio e dezembro de 2006, sobre a última amostra de cocaína que tinham consumido e quantidades residuais das substâncias efetivamente utilizadas foram analisadas por cromatografia

a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os usuários classificaram a percepção da qualidade de seu produto (“bom”, “médio” e “pobre”) e a porcentagem que estimavam de cocaína que a amostra continha. O teor de cocaína mediano foi de 22%. No total, 343 amostras continham cocaína, entre as quais 75% continham pelo menos um adulterante. A fenacetina foi a mais frequente (54% das amostras), cafeína (17%), paracetamol (14%), diltiazem e lidocaína (11%). Os usuários entrevistados mostraram uma capacidade de discriminação relativamente fraca quanto a pureza da cocaína que consumiram, e apenas 12% relataram pelo menos um dos adulterantes detectados. A composição de cocaína de rua é praticamente desconhecida para os usuários e suas percepções da qualidade de cocaína baseiam-se, em parte, por falsas crenças e modos de administração. Isso pode contribuir para favorecer muitas práticas de risco a saúde (EVRARD, 2010).

As pesquisas relatadas apresentaram diversos resultados, principalmente quanto à presença de adulterantes e aos graus de pureza de amostras cloridrato de cocaína, contudo, a literatura é escassa quanto a informações sobre a cocaína na forma de crack.

Oliveira *et al.* (2009) analisaram 10 amostras de cocaína apreendidas pela polícia do estado de São Paulo (seis na forma cloridrato e quatro na forma de crack), utilizando CLAE com detector UV/Vis. Os resultados obtidos indicaram a presença de cocaína em todas as amostras analisadas, com teores compreendidos entre 37,4% e 95,6% para amostras de cloridrato e entre 13,6% e 21,6% para amostras de crack (OLIVEIRA, 2009).

Em trabalho recente, o perfil de 404 amostras de crack oriundas do estado de São Paulo foi determinado por CG-DIC. Os resultados obtidos mostraram que 9,16% das amostras continham lidocaína, benzocaína e cafeína como adulterantes e 14,57% continham outros adulterantes totalizando 23,73%. O percentual em teor médio de cocaína presentes nas amostras de crack foi de 71,3%, mostrando um maior teor de cocaína em relação à cocaína apresentada na forma de sal (cloridrato ou sulfato) comercializada como “droga de rua” (FUKUSHIMA, 2010).

2.5 Espectroscopias de UV/Vis e de RMN de hidrogênio da cocaína

A cocaína apresenta espectros de ultra-violeta/visível e ressonância magnética nuclear de hidrogênio descritos na literatura.

O espectro de ultra-violeta/visível da cocaína apresenta $\lambda_{\text{máx}} = 233 \text{ nm}$ quando em concentração de 1 mg/100mL (em meio aquoso ácido) e caminho óptico de 1cm com absorbância de 430 (MOFFAT, 2003).

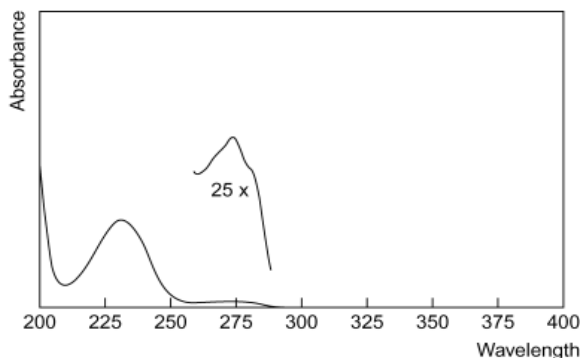


Figura 10 – Espectro de Uv/Vis da cocaína adaptado de Moffat *et al.* (MOFFAT, 2003).

Os assinalamentos do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) da cocaína nas formas de alcalóide (base livre) e cloridrato estão presentes na Tabela 2 e de acordo com a Figura 11.

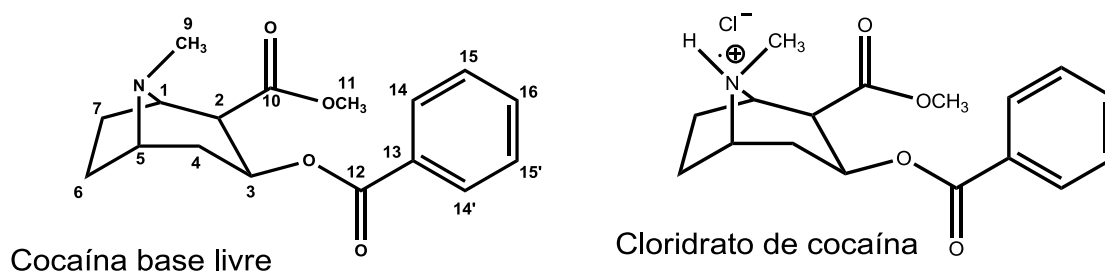


Figura 11 – Estrutura da cocaína (base livre e cloridrato) com numeração.

Tabela 2 - Assinalamentos de RMN- ^1H da cocaína (CARROLL, 1982).

Numeração	δ_{H} da base livre [J (Hz)]	δ_{H} do cloridrato de cocaína [J (Hz)]
H-1	3,5 [3,3; 1,0]	4,3 [2,4]
H-2	3,0 [3,3; 6,0]	3,5 [6,8]
H-3	5,3 [6,0; 12,0; 6,0]	5,5 [6,8; 11,8; 6,8]
H-4 _{ax}	2,5 [12,0; 12,9; 1,8]	2,7 [11,8]
H-4 _{eq}	1,8 [6,0; 12,9; 3,0]	2,3 [6,8; 2,7]
H-5	3,3 [1,0; 1,8; 3,0]	4,2 [2,7]
H-9	2,2	3,0
H-11	3,7	3,7

2.6 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia surgiu como uma ciência a partir de 1906 por Michael Tswett, um botânico russo, que usou uma versão rudimentar da técnica para separar pigmentos de plantas (CIOLA, 1998). Esta técnica desenvolveu-se e ampliou-se até uma forma instrumental com elevada sofisticação, inicialmente com a cromatografia a gás (CG), posteriormente, a cromatografia a líquido (CL) e, finalmente, a cromatografia com fluido supercrítico (CFS), concebida nos anos 60, mas empregada muito tempo depois de seu desenvolvimento. Na década de 70, os sistemas cromatográficos existentes eram a CG e CL, como técnicas bem distintas, mas complementares. Nos anos 80, buscou-se um aumento da resolução nestes modos cromatográficos, consolidando-se a cromatografia a gás de alta resolução e a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Nessa década houve o desenvolvimento da técnica de injeção e do controle da fase móvel de CLAE. Cada sistema cromatográfico foi desenvolvido separadamente (CG, CL, CFS), de forma que a instrumentação envolvida em cada método é diferente (MÜHLEN, 2004).

A técnica por CLAE apresentou importantes avanços nos últimos anos, enfocados na miniaturização, velocidade e desenvolvimentos para necessidades específicas. Estudos teóricos e práticos sobre cromatografia no fim dos anos 60 e anos subsequentes demonstraram a necessidade de avanços tecnológicos na cromatografia a líquido. Empregos de altas pressões determinaram o primeiro nome da técnica para diferenciá-la da cromatografia líquida clássica que operava a pressão ambiente (CIOLA, 1998).

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contém um grande número de compostos (COLLINS, 2006).

A CLAE separa por particionamento entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase móvel carrega o analito pela fase estacionária, durante essa passagem os analitos da mistura interagem ora com a fase móvel, ora com a fase estacionária o que retém seletivamente cada analito. Ao sair da fase estacionária o analito passa por um sistema de detecção que registra sua passagem em função do tempo, esse registro denomina-se cromatograma. Os detectores devem apresentar alta sensibilidade em resposta à passagem do analito (COLLINS, 2006) (Figura 12, pág. 18).

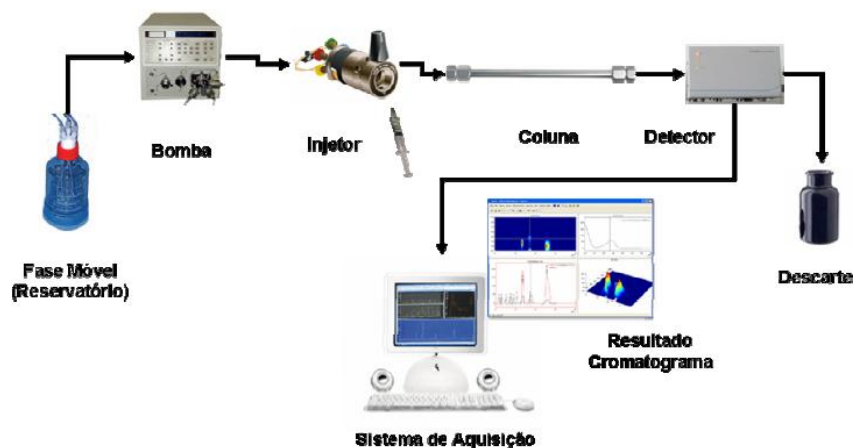


Figura 12 – Esquema do sistema de CLAE adaptado de Santos (SANTOS, 2008).

2.7 Ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq)

Todas as técnicas espectroscópicas são baseadas no princípio da diferença de energia entre dois estados. O mesmo aplica-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq). Um núcleo atômico pode apresentar dois estados com número quântico de spin nuclear de $\frac{1}{2}$ (comumente denominados de estados α e β), que correspondem a diferentes níveis de energia. Na ausência de um campo magnético externo os dois estados são degenerados (igualmente populados), mas uma diferença de população entre os dois estados pode ser observada na presença de um campo magnético externo (B_0) resultando em um momento magnético do núcleo atômico. A diferença de energia (ΔE) entre esses dois estados é pequena e pode ser dada por:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad \text{Eq. 1}$$

sendo γ a razão giromagnética (razão entre o momento dipolar magnético e o seu momento angular) para um dado núcleo e $\hbar$ a constante reduzida de Planck (SOININEN, 2008).

Cada núcleo possui uma razão giromagnética diferente, por exemplo, a razão giromagnética do hidrogênio (^1H) e do carbono-13 (^{13}C) são 42,58 e 10,71 $\gamma/2\pi/\text{MHz}\cdot\text{T}^{-1}$, respectivamente.

Havendo uma diferença de energia entre os dois estados, também haverá uma diferença entre a ocupação de spins nos estados α e β . A população relativa de spins em um estado é dada pela distribuição de Boltzmann.

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} = e^{\frac{-\gamma \hbar B_0}{kT}} \approx 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{kT} \quad \text{Eq. 2}$$

sendo N o número de núcleos em uma orientação de spin, k a constante de Boltzmann e T a temperatura. Uma vez que a diferença de energia entre os dois estados é muito pequena, a diferença na população relativa correspondente é similarmente pequena. Por exemplo, em um campo magnético de 11,74 Tesla, a razão da população de núcleos de hidrogênios nos dois estados em temperatura ambiente é de 0,999987. Isto torna a RMN uma técnica insensível e única quando comparada com outras técnicas, como infravermelho e ultravioleta, em que após excitação promovem a maioria da população a um estado de maior energia. Todavia, um ínfimo excesso de núcleos em estado α mais favorável gera uma magnetização líquida e é de fundamental importância na espectroscopia de RMN (CLARIDGE, 1999).

Como foi exposto na equação 2, a razão da população entre os dois estados é afetada por diversos fatores. Núcleos que possuem razões giromagnéticas maiores são mais sensíveis que aqueles com razões menores. O hidrogênio (^1H), além de possuir uma razão giromagnética maior do que a do ^{13}C é o isótopo mais abundante do hidrogênio, enquanto o ^{13}C possui uma abundância de apenas 1,1% daquela do isótopo mais abundante deste elemento (^{12}C), isótopo este que não apresenta momento angular de spin e, portanto, não exhibe o fenômeno de ressonância nuclear. Isto torna a espectroscopia de RMN de ^1H muito mais sensível do que a de ^{13}C . A sensibilidade da técnica pode ser aumentada pela diminuição da temperatura durante a medição ou pelo aumento do campo magnético externo (B_0).

Obrigatoriamente para observar a magnetização resultante, o estado de equilíbrio térmico deve ser perturbado pela geração de um campo magnético externo e um pulso de radiofrequência que possua duração e amplitude definida. Este pulso impõe um torque ao momento magnético resultante e isto modificará a magnetização líquida perpendicularmente ao pulso. Pelo ajuste da largura do pulso (tempo de pulso), pode-se definir o ângulo de inclinação para o vetor de magnetização resultante.

Após um pulso de 90° , não existe magnetização ao longo do eixo z , e a diferença populacional entre os estados α e β é eliminada. A magnetização encontra-se agora no plano x - y . Após o pulso, o vetor da magnetização construído terá a tendência de retornar ao tamanho e posição de origem. Este processo é conhecido como relaxação. A relaxação acontece em ambas as direções, na direção do eixo z (relaxação longitudinal) e na do plano x - y (relaxação transversa) (SOININEN, 2008) (Figura 13).

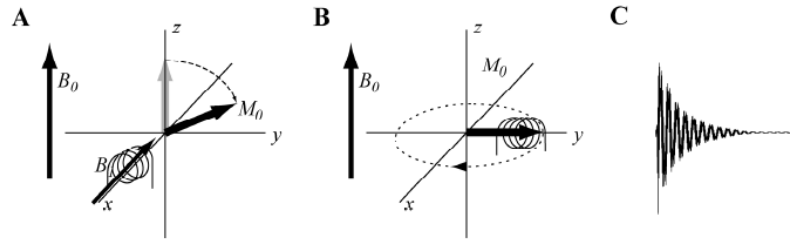


Figura 13 – Princípio de funcionamento de um espectrômetro de RMN. (A) Um pulso é aplicado com uma bobina transmissora na direção do eixo-x e após a excitação, (B) o vetor de magnetização iniciar uma rotação ao redor do eixo-z (no plano x-y) e induz uma voltagem na bobina receptora localizada no eixo-y e (C) o sinal detectado é amostrado na escala do tempo (adap. de Soininen) (SOININEN, 2008).

Caso a excitação seja feita com um pulso de 90° , a recuperação para o eixo $+z$ (M_z) segue a expressão:

$$M_z = M_0 \left(1 - e^{\frac{-t}{T_1}}\right) \quad \text{Eq. 3}$$

sendo M_0 a magnetização no equilíbrio térmico, t o tempo e T_1 a constante tempo de primeira ordem para este processo. O tempo de relaxação pode ocorrer em segundos, o que faz a espectroscopia de RMN um método relativamente lento quando comparado a outras técnicas espectroscópicas onde a aquisição de dados pode ser repetida diversas vezes a cada segundo (CLARIDGE, 1999).

O vetor de magnetização ao girar produzirá uma voltagem oscilante fraca em bobinas e a voltagem será então detectada. Eventualmente, isto levará a observar um sinal de RMN. A relaxação do vetor de magnetização resultante causa a oscilação da voltagem até desaparecer, e isto causa o sinal de RMN a decair com o tempo, produzindo o decaimento de indução livre (do inglês, *free induction decay* - FID).

A fase final para obtenção do espectro de RMN é a transformação do FID na escala do tempo para um espectro dependente da frequência. Esses dois domínios, tempo e frequência, são relacionados por uma função matemática denominada de Transformada de Fourier:

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{i\omega t} dt \quad \text{Eq. 4}$$

onde, $f(\omega)$ e $f(t)$ representam os dados no domínio da frequência e do tempo, respectivamente (CLARIDGE, 1999).

2.7.1 *Parâmetros espectrais*

Os parâmetros espectrais mais importantes na espectroscopia de RMN são o deslocamento químico, que diz-nos o tipo de núcleo, a divisão e constante de acoplamento (J), que descreve o ambiente que o núcleo encontra-se, e a área do pico que é proporcional ao número de núcleos, ou no caso de moléculas diferentes é proporcional a concentrações (PAVIA, 2010).

Cada núcleo na molécula possui diferentes ambientes químicos, e assim, diferentes ambientes eletrônicos. Elétrons ao redor do núcleo blindam-no do campo magnético externo, e assim a frequência de ressonância desse núcleo será diferente. A diferença entre a frequência do sinal de referência e a frequência do sinal é dividido pela frequência do sinal de referência para obter o deslocamento químico, que é da ordem de partes por milhão (ppm). Em espectroscopia de hidrogênio, deslocamento químicos são usualmente referenciados pelas substâncias tetrametilsilano (TMS) ou sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-d4 (TSP), cujo deslocamento químico de hidrogênio é atribuído como 0 ppm.

O estado de energia de um núcleo pode também ser afetado pelo estado de spin do núcleo próximo, em tais casos, os núcleos serão influenciados um pelo outro de forma recíproca, e diz-se que terão acoplamento do tipo spin-spin. Isto pode ser observado no espectro como a divisão dos picos (multiplicidade dos sinais). A multiplicidade dos picos depende do número de núcleos adjacentes acoplando. A magnitude (Hz) da divisão é conhecida como constante de acoplamento, e dela depende a intensidade do acoplamento (PAVIA, 2010).

O terceiro, e mais importante parâmetro quando se discute RMNq-¹H, é a área do próprio sinal de RMN. A área sobre cada sinal de hidrogênios não trocáveis é diretamente proporcional ao número de núcleos equivalentes responsáveis pelo sinal, ou em outras palavras, é diretamente proporcional a quantidade molar do analito detectado (SOININEN, 2008).

Nos dias atuais, rotinas de integração são feitas sem muita preocupação com a teoria por trás do processo de integração. Todavia, não é a integração em si que é a principal fonte de erros em RMNq-¹H, mas os parâmetros relacionados a integração tal como a linha de base como discutido por Pauli *et al* (2005). Isto será mais discutido em detalhes em tópico abaixo.

2.7.2 *Parâmetros de aquisição para espectroscopia de RMNq*

O esquema básico de aquisição para experimentos de RMN segue a sequência relaxação-excitação-aquisição. Cada uma dessas três partes atua como papel chave na técnica de RMNq.

Antes da aquisição em si, existem etapas que devem ser cuidadosamente levadas em consideração.

Uma condição básica para quantificação de forma exata e para espectroscopia de alta resolução é um campo magnético altamente homogêneo. Inhomogeneidades no campo magnético são corrigidas por um procedimento denominado *shimming*, onde o campo magnético externo (B_0) é apropriadamente sintonizado e linhas de campo magnético com formas adequadas e melhores razões sinal:ruído (S/N) são obtidos. O *shimming* pode ser feito manualmente ou automaticamente e atualmente as rotinas dos gradientes de *shimming* oferecem as melhores relações tempo:benefício (BARJAT, 1997; SUKUMAR, 1997).

O tubo de RMN posicionado no *probe* ao girar pela ação de um rotor pode melhorar a resolução de um espectro de RMN. Todavia, o giro da amostra apresenta pequenos sinais não esperados no espectro, as chamadas *spinning sidebands* que são proporcionais a razão de giro desta amostra, ou seja, surgem bilateralmente na mesma razão em Hz do giro (SOININEN, 2008). Para melhorar o processo de integração é necessário removê-las e o modo mais conveniente para evitá-las em um equipamento de RMN moderno e de alta-qualidade é adquirir os dados com a amostra sem girar (BORER, 1998).

O tempo de atraso antes da excitação (do inglês *delay*) é usualmente denominado como atraso de relaxação. O vetor de magnetização a líquido excitado retorna ao seu estado de equilíbrio durante este tempo. É crucial para um trabalho quantitativo permitir completamente este retorno antes da aplicação de um novo pulso. Ao pulsar muito rapidamente e usando tempos de repetição muito curtos relativos ao T_1 uma diminuição substancial da intensidade do sinal ocorrerá. Em casos extremos a magnetização pode não ter tempo para recuperar-se entre os pulsos e eventualmente nenhum sinal será observado. Esta condição é conhecida como saturação. Para os spins relaxarem completamente após um pulso de 90° , é necessário esperar um período de pelo menos $5 \times T_1$ do núcleo que relaxa mais lentamente onde a magnetização será recuperada em 99,33% (PAULI, 2005).

Enquanto o sinal máximo resulta de um pulso de 90° , talvez seja mais eficiente usar um ângulo menor para um experimento quantitativo visando reduzir o tempo de recuperação para a magnetização. Este ângulo adequado e otimizado, conhecido como ângulo de Ernst, pode ser calculado usando a expressão:

$$\cos \alpha = e^{\frac{-t_r}{T_1}} \quad \text{Eq. 5}$$

sendo α o ângulo adequado para um tempo de repetição de pulsos t_r . Ao calcular-se o ângulo

usando o maior tempo de relaxação T_1 na amostra e um tempo de repetição razoável pode-se conseguir uma maior relação sinal:ruído no menor tempo (CLARIDGE, 1999).

A janela espectral ou varredura espectral (do inglês *spectral window* - SW) define o tamanho da janela contendo as frequências observadas. Este tamanho não deve ser tão estreito para assegurar que os filtros de recepção não interfiram na intensidade dos sinais nas bordas laterais do espectro. A adição de uma região adicional de 2 ppm em ambas as laterais da janela espectral é recomendada uma vez que o pulso, que excita o espectro, é dado automaticamente no centro da janela espectral. Isto também levará a uma linha de base mais plana (CLARIDGE, 1999; MALZ, 2003).

De acordo com o teorema de Nyquist, um sinal oscilante deve ser definido por pelo menos 2 pontos de dados por comprimento de onda. Em RMN, um sinal deve ser amostrado com intervalos de tempos iguais ou menores que o dado na equação abaixo:

$$DW = \frac{1}{2 \times SW} \quad \text{Eq. 6}$$

sendo DW o tempo entre dois pontos de dados (do inglês *dwell time*) e SW a janela espectral em Hz (do inglês *spectral width*). Nos dias atuais, onde filtros digitais e *oversampling* são técnicas padrões no espectrômetro de RMN moderno, não é tão necessário perder tempo com estes pontos. Todavia, *oversampling* é usada rotineiramente para melhorar a faixa dinâmica e a relação S/N, e para aplanar a linha de base (CLARIDGE, 1999).

Quando o sinal emitido é detectado, é amostrado e convertido com um conversor analógico para digital (do inglês *analogue-to-digital converter* - ADC). O processo de digitalização converte a voltagem em um número binário proporcional à magnitude do sinal. O ADC tem uma faixa dinâmica limitada manuseável e fornece os limites dos sinais menores que são medidos na presença dos sinais maiores. Resoluções típicas em RMN são 16 e 18 bits. Para o ADC de 18 bit a razão entre o menor e o maior valor detectável é 1:262.144 ou seja $1/2$ elevado a 18, e este valor também é a faixa dinâmica do digitalizador. Quando o espectro quantitativo é medido, é necessário ajustar o ganho do receptor para que o maior sinal do FID fique dentro da faixa dinâmica do digitalizador. Caso o ganho do receptor esteja muito alto, a saturação pode ocorrer e resulta na atenuação ou, em alguns casos, eliminação do sinal. Em espectrômetros modernos, todavia, a mudança no ganho do receptor pode ser feita automaticamente (MALZ, 2003; SOININEN, 2008).

O tempo de aquisição (do inglês *acquisition time* - AQ) é o tempo necessário para conter todo o FID e é relacionado com a janela espectral (SW) e ao dwell time (DW) de acordo com a

seguinte expressão:

$$AQ = DW \times TD = \frac{TD}{2 \times SW} \quad \text{Eq. 7}$$

sendo TD (do inglês *time data*) o número de pontos de dados no domínio do tempo. Por exemplo, para RMNq-¹H, em uma diferença entre frequências ao redor de 1 Hz uma resolução digital (do inglês *digital resolution* - DR) menor que 0,5 Hz é necessária para separar os sinais. Os pontos do domínio do tempo e o tempo de aquisição adequados podem ser calculados usando a seguinte expressão:

$$DR = \frac{2 \times SW}{TD} = \frac{1}{AQ} \quad \text{Eq. 8}$$

Caso a DR requerida seja, por exemplo, 0,25 Hz/pt e a SW seja ao redor de 5000Hz, o tempo de aquisição deverá ser de 4 segundos e os pontos no domínio do tempo serão de 40.000 (CLARIDGE, 1999).

Alta relação sinal/ruído (S/N) é necessária em trabalhos quantitativos exatos. Quanto maior a relação S/N melhor será o resultado da análise quantitativa. A relação S/N pode ser melhorada de três modos: (1) pelo aumento nas concentrações de substâncias na amostra e suas impurezas, (2) pela repetição de aquisições e soma dos FIDs, por exemplo, pelo aumento no número de scans ou (3) pelo uso de um volume maior ou *probes* mais sensíveis, por exemplo, *probes* criogênicas.

O uso de *probes* criogênicas ainda não é rotina nas análises quantitativas e a concentração das substâncias não pode ser aumentada indefinidamente uma vez que as solubilidades podem ser limitadas. Então, o modo mais usual é aumentar o número de scans para obter a relação S/N desejada. A relação S/N é proporcional a raiz quadrada do número de scans, em outras palavras, para dobrar a relação é necessário adquirir 4 vezes mais scans (CLARIDGE, 1999; PAULI, 2005).

2.7.3 Obtenção de dados quantitativos

Para obter a concentração absoluta de um composto em uma amostra usando o RMNq-¹H, a área do sinal deve ser determinada e comparada à área de uma substância referência (SR) que tenha uma concentração conhecida, sem a necessidade desta substância ter a mesma identidade do analito. Caso os espectros sejam adquiridos seguindo parâmetros quantitativos, a concentração pode ser calculada com a equação abaixo:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{A_x}{A_y} x \frac{N_y}{N_x} \quad \text{Eq. 9}$$

onde n é a quantidade da substância, A é a área de um sinal e N é o número de núcleos que geraram o sinal correspondente. Os símbolos x e y correspondem às substâncias desconhecidas e conhecidas, respectivamente.

Para a determinação da pureza de uma substância, um padrão interno com pureza conhecida é necessariamente usado como substância de referência. Então a pureza P_x (%) do analito alvo pode ser calculada pela equação:

$$P_x = \frac{A_x}{A_{ref}} x \frac{N_{ref}}{N_x} x \frac{M_x}{M_{ref}} x \frac{m_{ref}}{m} x P_{ref} \quad \text{Eq. 10}$$

onde M_x e M_{ref} são as massas molares do analito alvo e da substância referência, m é a massa pesada do analito alvo, m_{ref} e P_{ref} são a massa pesada e a pureza da substância referência e N_{ref} e A_{ref} correspondem ao número de spins (núcleos) e a área do sinal integrado de um sinal de RMN da substância referência (SR) respectivamente (HAYS, 2005; HAYS, 2009; SOININEN, 2008).

2.7.4 Parâmetros de processamento

Existem diversos modos pelos quais pode-se melhorar os dados adquiridos antes da transformada de Fourier (do inglês *fourier transform* – ft). Dependendo do resultado desejado, a resolução, a relação S/N e a variação na linha de base podem ser melhoradas com funções matemáticas apropriadas.

A melhora mais comum que pode ser feita no FID é a redução do ruído. Em um espectro, muito dos sinais decaem para zero após alguns segundos. Uma vez que, usualmente, o tempo da aquisição possui diversos segundos, o final do FID contém somente ruído, que pode ser facilmente reduzido caso todos os pontos de dados do FID forem multiplicados por uma função exponencial de decaimento (GUNTHERT, 1994; SOININEN, 2008).

A função exponencial de decaimento pode alterar a cauda do FID para torná-la zero e, assim, aumentar a taxa de decaimento aparente do sinal de RMN. Isto causa o alargamento dos sinais por um fator de $-1/\pi$ (geralmente conhecido como *line broadening*, lb, e expresso em Hz). A aplicação desta função precisa ajustar-se entre a melhor resolução e S/N. A otimização entre a redução do ruído e o excessivo alargamento do sinal é alcançado quando o decaimento da função encontra-se com o decaimento natural do sinal de RMN, como resultado ocorrerá o dobro da largura do sinal de ressonância. Todavia, isto não pode ser obtido sempre em RMNq-¹H, uma vez que pode resultar em perda excessiva da resolução de dois sinais localizados próximos, e assim,

pequeno alargamento deve ser aplicado (MALZ, 2003).

Inferese que pelo dobro do número de pontos de dados no domínio do tempo ao adicionar zeros ao final do FID é possível aumentar ao máximo a relação S/N por um fator da raiz quadrada de dois, este processo é conhecido como *zero-filling* (SAITO, 2004).

A razão para a melhora da resolução parece derivar do fato que somente metade da informação do FID está em uso após a transformação de Fourier, uma vez que a parte imaginária é negligenciada. Todavia, a ferramenta de *zero-filling* pode somente interpolar pontos de dados e dar uma melhora artificial na resolução, uma vez que nenhuma informação nova é adquirida. Ebel *et al.* demonstrou que a aplicação de *zero-filling* acima de $N' = 2N$, onde N' é o número de pontos do espectro após *zero-filling* em unidades de N , pode não levar a qualquer redução maior no desvio padrão da integração do sinal. Além disso, Ebel *et al.* também demonstrou que ao combinar o *zero-filling* com uma função exponencial, não ocorre melhora no desvio padrão da integração do sinal, somente quando se usa leve apodização (ex. 0,2 Hz) uma redução no desvio padrão devido ao *zero-filling* pode ser alcançada (EBEL, 2006).

Caso a resolução do espectro de RMN precise ser aprimorada, o FID deve ser multiplicado por uma função exponencial. Todavia, isto aumenta também o ruído do espectro, e em vez de uma função exponencial, uma função Lorentz-Gauss pode ser usada. A função é determinada por duas variáveis, o grau de estreitamento e o ponto no tempo de aquisição o qual a função atinge o seu valor máximo. A escolha do valor adequado é usualmente feita com método de tentativa e erro e podem ocorrer valores diferentes para sinais diferentes dentro de um espectro (TRAFICANTE, 2000).

Uma vez que a fase do receptor pode não ser a mesma daquela do vetor de magnetização, o espectro requer a chamada correção de fase após a transformada de Fourier. A fase de um espectro é corrigida pela aplicação de uma correção de fase de ordem-zero ou primeira-ordem. Em RMNq-¹H, corrigir a fase cuidadosamente é essencial. Desvios da absorção modificam as formas dos sinais e reduzem a área integrada. Todos os softwares de processamento de RMN incluem também a correção de fase automática, mas, como Pauli *et al.* (2005) têm notificado, a correção de fase manual do espectro para análises quantitativas é a mais indicada (PAULI, 2005).

A determinação da área do sinal depende enormemente da linha de base do espectro. Em um espectro de RMNq-¹H, a linha de base deve ser plana e tender a zero onde a área de um sinal isolado deverá ser facilmente determinada. Todavia existem diversas fontes de distorção da linha de base. Em uma integração de rotina, uma linha de base é estimada pela comparação com

uma linha reta. Todavia, a linha reta não representa a linha real e assim poderão ocorrer erros na determinação da área dos sinais (PAULI, 2005).

2.7.5 Integração de sinais

Como já mencionado, a área de um sinal de RMN é diretamente proporcional aos núcleos correspondentes. A determinação da área do sinal e a integração são partes importantes da RMNq. Os softwares oferecem uma ferramenta que pode fazer o trabalho com a exatidão adequada para a elucidação da estrutura. A integração clássica é feita pela medida da altura relativa de uma curva produzida durante o procedimento de integração. Todavia, para ser útil na determinação exata da área de sinais, existem alguns pontos que precisam ser considerados para a integração. (SOININEN, 2008)

Erros nas áreas de sinais integrados podem ser causados por: (a) ruído no espectro de RMN, (b) erros na fase, (c) aproximação da linha de base e (d) descuido na correção da curva e das tendências na integração (GRIFFITHS, 1998). Erros grosseiros na exatidão das integrações de rotina aparecem provavelmente pela aproximação causada por partes de sinais que deveriam estar fora da faixa de integração. Obrigatoriamente para incluir 100% da área do pico, uma integral deveria ter que estender-se aos infinitos em cada direção. Griffiths & Irving estudaram o efeito da largura da integral sobre a exatidão de uma área de sinal com formato Lorentzian. Eles concluíram que 99,5% das áreas dos sinais são obtidas se a integral estender-se por 39 vezes a largura do sinal. Caso erros menores que 0,1% sejam desejados, a largura da integral deve ser 76 vezes a largura do sinal em ambas as direções (GRIFFITHS, 1998). Por exemplo, em um espectro de RMN de 500 MHz de rotina, onde a largura do sinal é ao redor de 1Hz, a região integrada deverá ser de 152 Hz (~0,30ppm). Por outro lado, quando os sinais são alargados devido a campo magnético não homogêneo (por exemplo devido ao *shimming* pobre), a largura da integral deverá ser maior (GRIFFITHS, 1998).

2.7.6 Substância de referência (SR)

A RMNq-¹H é uma técnica primária (HAYS, 2005; PAULI, 2005; SAITO, 2004) e desta forma é possível realizar análises quantitativas sem padrões dos analitos-alvos, ou seja, a determinação quantitativa pode ser obtida a partir da razão entre a integração de um sinal específico do analito-alvo e a integração de um sinal específico de um composto padrão, doravante denominado de substância de referência (SR). Esta SR pode ser interna ou externa. Ao

usar uma SR como interna, a mesma é adicionada diretamente ao tubo que contenha a amostra e ao usar como externa, a SR será determinada em um tubo de ressonância do tamanho de um capilar (SOININEN, 2008), geralmente introduzido ao tubo de ressonância do analito alvo e analisada simultaneamente.

Existem alguns requisitos para SR que precisam ser completamente seguidos: (a) deve ser disponível em forma altamente pura, estável, não volátil, pesável, solúvel e inerte, e (b) o espectro de RMN deve ser simples e com sinais que não sobreponham-se ao do analito (HAYS, 2005; PAULI, 2005). Esses requisitos limitam a quantidade de moléculas adequadas e assim, é comum propor-se diferentes compostos para cada nova aplicação.

a) Substância de referência interna

As mais comuns SR internas usadas em espectroscopia de RMN são tetrametilsilano (TMS) em solventes orgânicos e o sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-d₄ (TSP) ou sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanesulfônico-d₆ (DSS) em amostras aquosas. Essas substâncias são usadas normalmente como referenciais para deslocamento químico atribuindo o valor de 0 ppm. O TSP também pode ser usado como uma SR interna para quantificação (del CAMPO, 2006; HAYS, 2005).

Uma SR interna usada frequentemente em RMNq-¹H é o ácido (Z)-2-butanodióico (ácido maléico), que têm sido usada em estudos de RMNq-¹H envolvendo padrões analíticos (HAYS, 2005), drogas antibióticas em produtos farmacêuticos (SALEM, 2005) e em amostras de urina (SALEM, 2006) e fitoterápicos (BILIA, 2002; VAN BEEK, 1993). O ácido maléico possui um forte singleto em aproximadamente 6,5 ppm (dependendo do solvente) que pode ser usado como sinal referência em análises quantitativas, além disso é disponível em forma muito pura e solúvel em diversos solventes (HAYS, 2005).

Outras SR têm sido usadas como internas, como o ácido fórmico, o acetato de sódio, a dimetilsulfona, o 1,4-dioxano, o *terc*-butanol, a *n,n*-dimetilformamida, o 2,5-dimetilfurano, hexametildisilozano, o ácido cadodílico, o ácido 1,3,5-benzeno-tricarboxílico, o benzeno-1,3,5-triol (floroglucinol), o antraceno (utilizado como SR na quantificação de canabinóides presentes na planta *Cannabis sativa* Linneu (HAZEKAMP, 2004). Outros compostos aromáticos que têm sido usados como SR incluem dimetil-isoftalato, 2,3,5,6-tetrametilpirazina e 2 - [2,3-dicloro-4-(2-metileno-1-oxobutil) fenoxi] - ácido acético (ácido etacrínico) (SOININEN, 2008).

b) Substância de referência externa

As concentrações de analitos em RMNq também podem ser determinadas com uma SR externa. No ano de 1999, Akoka *et al.* propôs uma alternativa para uso de SR internas com base em um sinal de referência calibrado. O sinal de referência é uma linha de RMN “não real”, ou seja, é um sinal simulado eletronicamente. A abordagem aplicou o método ERETIC (Referência eletrônica para acessar concentrações *in vivo*, do inglês *Electronic REference To access In vivo Concentrations*) e foi comprovado que ERETIC tem exatidão igual ou melhor a obtida ao uso de uma SR interna. Além disso, o sinal de referência não se sobrepõe com sinais de analitos-alvo, porque os parâmetros da ERETIC podem ser escolhidos livremente (AKOKA, 1999).

A SR deve estar localizada necessariamente em um capilar coaxial que será previamente calibrada em relação a soluções de concentração conhecidas de analitos, além do que possuem outras vantagens:

- (i) um único capilar calibrado pode servir para grande número de amostras;
- (ii) a SR pode ser dissolvida em um solvente deuterado, que também fornece o campo/frequência para o aparelho;
- (iii) não há contaminação da amostra, ficando a mesma disponível para técnicas analíticas alternativas subsequentes;
- (iv) a SR pode ser usada para a análise de sangue, líquido, urina e outros fluidos sem problemas com fenômenos de ligação às proteínas ou permuta química (SOININEN, 2008).

2.7.7 Aplicações químicas e farmacêuticas de RMNq

A literatura possui diversas aplicações da RMNq, principalmente de hidrogênio, na quantificação e determinação de substâncias químicas em formulações farmacêuticas, produtos comerciais naturais, entre outras.

Nas análises forenses, a quantidade de amostra a ser analisada é geralmente pequena e a necessidade de armazenar a mesma quantidade de analito utilizada no exame primário para possível reanálise por tempo indeterminado torna essencial a otimização de processos de análise que não destruam ou modifiquem a amostra, o que estabelece a RMN como uma excelente opção para caracterização de amostras de cocaína e outras drogas de abuso com finalidades forenses (ARAÚJO FILHO, 2006).

Hays (2005) apresentou a RMNq-¹H como um método rápido, sensível, exato, preciso, reprodutível e versátil para determinação da pureza de medicamentos, de padrões de referência e em análises de rotina de drogas ilícitas e adulterantes. A metodologia do pesquisador utilizou amostras pesadas e dissolvidas em solução de solvente deuterado contendo SR interna de alta pureza. O desvio padrão relativo (RSD) destes sinais foi geralmente inferior a 1% para os padrões de referência e os resultados concordam com outros métodos de determinação de pureza. Os espectros de heroína ilícitas, da metanfetamina, do MDMA, e de amostras de cloridrato de cocaína são apresentados (HAYS, 2005).

A técnica de RMNq-¹H apresenta diversas vantagens sobre técnicas cromatográficas no tocante a especificidade, velocidade de análise, precisão e flexibilidade, principalmente quanto a quantificação de substâncias químicas, fornecendo dados sobre a estrutura molecular do composto, com a vantagem de ser uma técnica não destrutiva (HAYS, 2005).

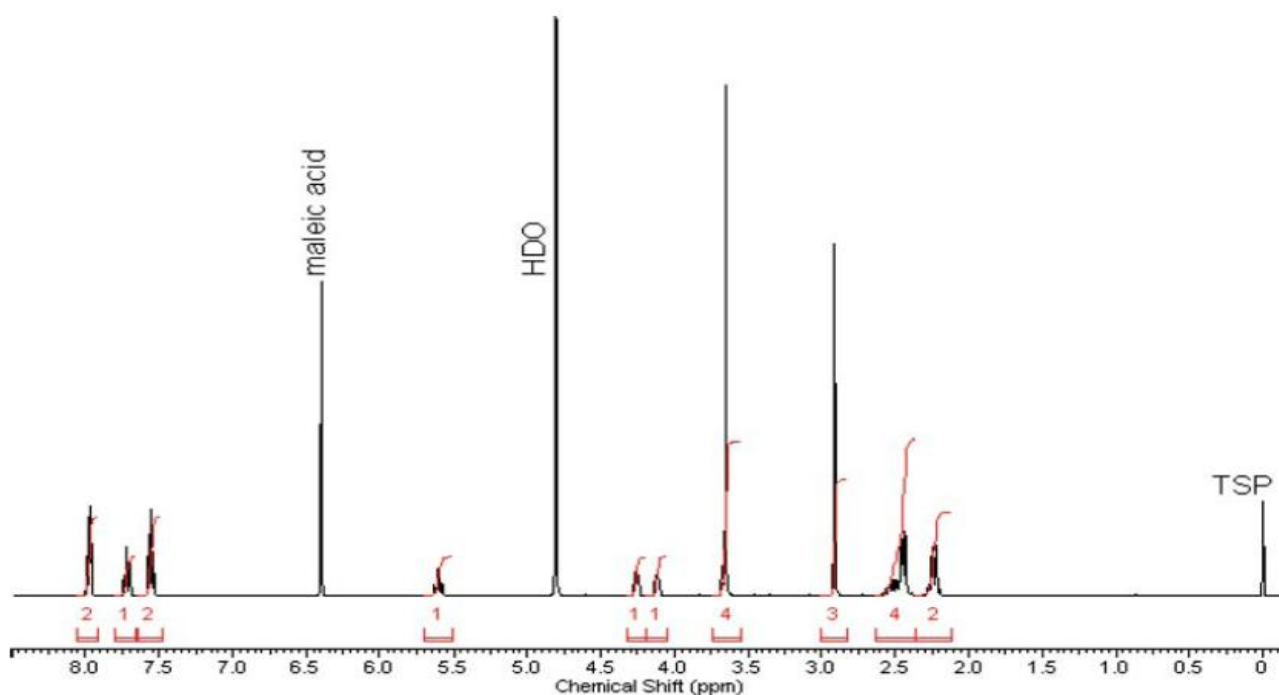


Figura 14 – Espectro de RMN-¹H (500MHz) de padrão de referência de cocaína tendo o ácido maléico como SR interna em D₂O (Adap. de Hays) (HAYS, 2005).

A quantificação usando a RMNq pelo uso da área dos sinais é o método mais comum presente na literatura, por outro lado, a quantificação pela altura do sinal não tem sido usada, tanto por causa da baixa precisão e linearidade como devido as formas e larguras inconsistentes dos sinais (medidas a meia altura). Para resolver este problema, o uso de um processamento após a aquisição empregando um método de Gauss ou pela ampliação do sinal ao usar uma função exponencial ou apodização para normalizar a forma e a largura do sinal da SR como padrão

interno (ISTD), as alturas de um espectro de calibração do analito podem ser comparadas as alturas dos sinais do analito, obtendo-se resultados quantitativos exatos e precisos.

Utilizando a abordagem descrita, centenas de amostras ilícitas de cloridrato de metanfetamina, de cloridrato de cocaína e de cloridrato de heroína, de composição e pureza diversas, foram quantificadas por meio de análises automatizadas, aumentando a confiança nos valores de pureza determinados, e comparadas com um método de quantificação por eletroforese capilar (EC). Para a análise de amostras de cloridrato de cocaína, os coeficientes de correlação (r^2) foram de 0,9984 (HAYS, 2009; LURIER, 2004).

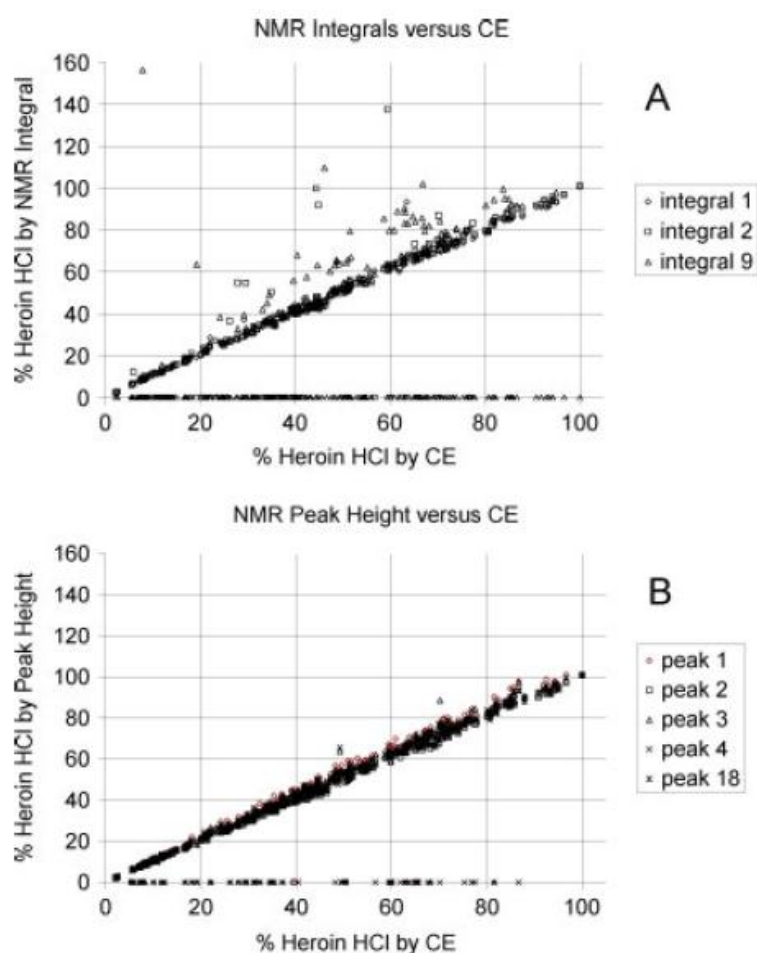


Figura 15 – (A) Comparação entre resultados da integração de três picos e eletroforese capilar de 291 amostras de cloridrato de heroína e (B) comparação entre resultados da medição da altura associadas com as integrações de cinco picos e eletroforese capilar (adap. de Hays & Thompson) (HAYS, 2009).

Outro material ilícito analisado por RMNq-¹H foram os derivados da planta *Cannabis sativa* L. Os canabinóides da maconha foram quantificados por Hazekamp & Veeport (2004) utilizando a RMNq-¹H sem qualquer purificação cromatográfica. Os pesquisadores utilizaram

metanol-clorofórmio durante a extração e o antraceno como SR interna (HAZEKAMP, 2004).

Holzgrabe *et al.* (1998), em extensa e excelente revisão, dissertaram sobre as aplicações da espectroscopia de RMNq na análise de fármacos tanto em formulações como em estudos do metabolismo, em particular, descreveram os métodos presentes em farmacopéias internacionais. Os autores repetiram muitos dos métodos descritos em seus próprios laboratórios, por exemplo para análise de heparinas de baixo peso molecular, hidrocortisona, orfenadrina, lovastatina, captopril e diversas outras aplicações (HOLZGRABE, 1998).

Plantas medicinais têm sido estudadas extensivamente por RMNq-¹H. Naqvi *et al.* (1998) tem apresentado no final dos anos noventa a determinação quantitativa de atropina e escopolamina em diferentes partes de plantas (NAQVI, 1998).

Um método rápido de RMNq desenvolvido por Choi *et al.* (2003) foi aplicado na análise quantitativa da bilobalida, ginkgolides A, B e C das folhas de *Ginkgo biloba* em produtos comerciais de Ginkgo. Em seu estudo, os pesquisadores utilizaram o benzeno-1,3,5-triol como SR e uma mistura de acetona e benzeno como solventes deuterados (CHOI, 2003).

RMNq tem sido aplicada para estudar as quantidades de triterpenolactonas da *Ginkgo biloba* que variam muito com pequenas mudanças tais como local de coleta, época da colheita e estágio do crescimento de plantas (LI, 2004).

Burton *et al.* usaram cafeína, teofilina e soluções de sacarose como SR externas em estudo quantitativo de toxinas de algas e alguns outros produtos naturais, concluindo que a exatidão em torno de 99% é alcançada caso sejam utilizadas amostras em tubos de alta precisão e parâmetros constantes de medição (com exceção do pulso de excitação que tem de ser calibrado para cada amostra) (BURTON, 2005).

Malz & Jahnke (2005) examinaram a precisão da RMNq de acordo com o “Guia para Expressão da Incerteza” do Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM) e com as diretrizes da corporação internacional EURACHEM, e descobriram que a RMNq possui uma incerteza de medição inferior a 1,5% de acordo com três modelos utilizados. (BIPM, 1995; EURACHEM, 2000; MALZ, 2005)

Em aplicações de RMNq, existem múltiplos parâmetros de aquisição e processamento que podem afetar o resultado da quantificação. Malz & Jahnke (2005) exaustivamente trabalharam e testaram a robustez do método de RMNq. Os pesquisadores dividiram os parâmetros analisados em três categorias de acordo com sua influência na precisão quando foram variados dentro de uma faixa razoável: (i) nenhuma influência significativa (robusta), (ii)

influência significativa sobre a razão S/N e (iii) mudança sistemática da intensidade do sinal correto.

Descobriram que os parâmetros que não têm influência significativa sobre os resultados incluíam a energia do pulso, o tempo do atraso de pré-aquisição, o ganho do receptor, a temperatura da amostra, o *zero-filling* e o número de pontos de dados da frequência, sendo a influência destes parâmetros sobre o desvio do valor de referência gravimetricamente obtido de menos de 1%.

Os parâmetros que tiveram uma influência significativa sobre a razão S/N foram (i) ângulo de incidência do pulso, (ii) o número de scans e (iii) a ampliação da largura do sinal por uma função exponencial. Após uma investigação detalhada, Malz & Jahnke puderam determinar que uma razão S/N de pelo menos 150 seria necessária para obter uma incerteza de medição menor que 1% (MALZ, 2005).

Quanto a linearidade, a RMNq apresentou resultados sempre superiores a 0,999 (BURTON, 2005; MALZ, 2005).

Em RMNq, a atribuição inequívoca de todos os picos, que pertencem ao analito e as impurezas que estão ou podem estar presentes, pode ser obtida com a seleção cuidadosa de sinais cuja integração deve ser determinada, pois os sinais do analito-alvo devem estar livres da sobreposição de sinais de impurezas. Uma maneira comum para avaliar a especificidade é executar espectros do analito com alto grau de pureza ou pode-se também pesquisar a sobreposição de sinais pelo aumento da força do campo magnético ou pela mudança do solvente deuterado (MALZ, 2005).

O conceito de limites de detecção e quantificação não são aplicáveis em sentido estrito a RMNq pois os parâmetros experimentais podem ser ajustados de maneira adequada para a detecção e quantificação. Além disso, os limites são variáveis de acordo com o campo magnético, pois aqueles aparelhos que possuem maior campo magnético apresentam menores limites com formas e sinais melhores definidos (SOININEN, 2008).

Dagninoa & Schripsemab (2005) descreveram um procedimento completo para extração, detecção e quantificação de anatoxina-a em amostras biológicas, onde a utilização de RMNq-¹H permitiu a quantificação precisa de microgramas de anatoxina-a (DAGNINOA, 2005).

Pauli *et al.* (2005) têm apresentado uma excelente revisão sobre RMNq-¹H em relação aos produtos naturais e métodos para determinar a análise de impurezas e a concentração de taxol em extratos de cascas de *Taxus brevifolia* (PAULI, 2005).

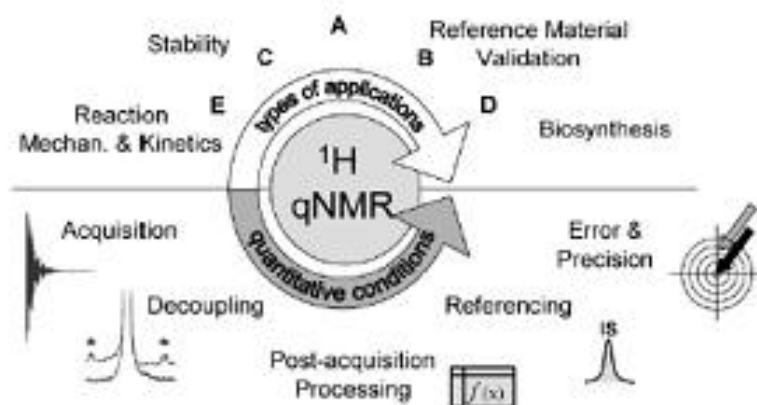


Figura 16 – Parâmetros de aquisição e processamento e tipos de aplicação de RMNq-¹H segundo Pauli *et al.* (PAULI, 2005).

Holzbrabe *et al.* (2010) e Holzgrabe *et al.* (2005) dissertaram a respeito da RMNq acerca de diversos pontos teóricos importantes da aplicação da técnica e análises farmacêuticas (HOLZGRABE, 2010; HOLZGRABE, 2005).

Rundlof *et al.* (2010) pesquisaram e qualificaram o desempenho de algumas SR como padrões internos para quantificação por espectroscopia de RMNq-¹H e demonstraram seus resultados pela análise de paracetamol em produtos farmacêuticos (RUNDLOF, 2010).

Em recente trabalho, Podgorskii *et al.* (2011) apresentaram os resultados de uma análise comparativa do uso de RMNq no controle de qualidade de fármacos e drogas. O flavonóide dihidroquercetina (taxifolina, 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavanona), foi usado como exemplo. A espectroscopia de RMNq-¹H pôde ser recomendada com base nesta análise comparativa para identificar todas as possíveis impurezas ou para confirmar a ausência de contaminantes tóxicos e também para a análise rápida de amostras (PODGORSKII, 2011).

Gadape & Parikh (2011), por sua vez, utilizaram a RMNq-¹H para determinar o cloridrato de metformina na formulação de comprimidos farmacêuticos. O método foi baseado no uso do ácido maleico como SR interna e óxido de deutério (D₂O) como solvente deuterado. O método foi validado para os parâmetros de especificidade e seletividade, precisão, linearidade, intervalo, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), precisão, estabilidade da solução e robustez. A linearidade da curva de calibração para o analito na faixa de concentração desejada foi bom ($r^2 = 0,9993$). O método foi exato e preciso, com boa recuperação. A vantagem do método é que nenhum padrão de referência do analito-alvo é necessário para a quantificação. Além disso devido ao método não ser destrutivo, pôde ser aplicado para a quantificação de cloridrato de metformina em produtos de formulação comercial (GADAPE, 2011).

Pelo levantamento bibliográfico, várias metodologias da técnica de RMNq-¹H foram desenvolvidas para inúmeras aplicações, contudo nem metodologia e nem resultados são reportados na literatura a respeito da utilização para amostras de cocaína na forma de crack.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver metodologia baseada no uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio para avaliar o grau de pureza de amostras de crack apreendidas no estado da Paraíba.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Aplicar e avaliar o desempenho da espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio (RMNq-¹H) para determinar o teor de cocaína em amostras de crack apreendidas no estado da Paraíba;
- ✓ Desenvolver e validar método rápido de análise quantitativa de cocaína em amostras de crack por meio da técnica de cromatografia a líquido com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD);
- ✓ Determinar o grau de pureza de amostras de crack utilizando os métodos desenvolvidos (CLAE-DAD e RMNq-¹H) e analisar o desempenho dos mesmos;
- ✓ Identificar os principais adulterantes presentes nas amostras de crack analisadas utilizando a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras de crack

As amostras do presente trabalho foram obtidas de apreensões realizadas pela Polícia Civil do Estado da Paraíba e encaminhadas aos Laboratórios de Toxicologia Forense subordinados a Gerência de Laboratório Forense do Instituto de Polícia Científica da Paraíba durante todo o ano de 2010.

As amostras eram constituídas de formas sólidas e fragmentos com cores que variavam do branco ao marrom passando pelo amarelo (Figura 17).

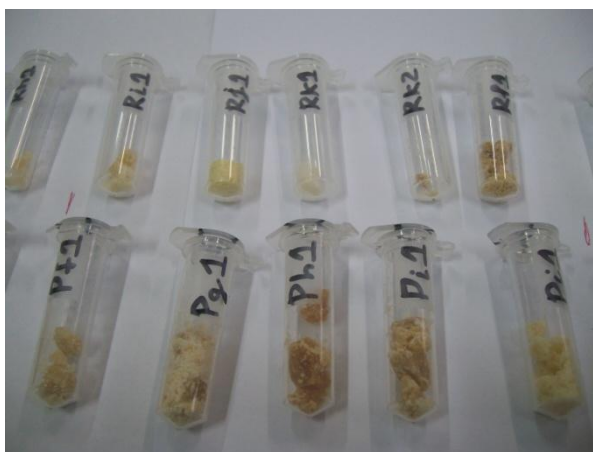


Figura 17 – Amostras de crack utilizadas no estudo.

A amostragem deu-se por um processo de fracionamento das apreensões após o início da cadeia de custódia laboratorial, sendo apenas coletadas aquelas amostras que possuíam quantidade suficiente para análise e armazenamento para eventual nova perícia. Aquelas apreensões que não continham quantidade suficiente de material para os procedimentos legais foram excluídas da amostragem.

A quantidade amostrada foi calculada segundo a equação abaixo (LEITE, 2003):

$$\text{Amostragem} = \sqrt{N} \pm 1 \quad \text{Eq. 11}$$

$$\text{Amostragem} = \sqrt{575} \pm 1 = 23,9 \pm 1$$

Para ampliar a amostragem, foi duplicada a quantidade de apreensões e retirou-se 1 unidade, logo o cálculo final ficou a seguinte:

$$\text{Amostragem} = 2 \times \sqrt{575} - 1 = 2 \times 23,9 - 1 \cong 47 \text{ amostras}$$

Ao final, 47 (quarenta e sete) amostras de crack foram amostradas entre aquelas apreensões analisadas durante todo o ano de 2010.

As amostras foram acondicionadas em tubos de polipropileno cônicos (*eppendorffs*) de 2 mL e preservadas a temperatura ambiente em local escuro e seco.

Foram analisadas amostras em forma de pedras e fragmentos, triadas previamente por testes presuntivos colorimétricos com agente cromogênico de precipitação tiocianato de cobalto a 1% e cromatografia em camada delgada realizados pelos peritos dos Laboratórios de Toxicologia Forense.

As quantidades amostradas destas 47 apreensões oscilaram entre 220 a 840 mg de cada, conforme o disposto na Tabela 3, pág. 39.

Tabela 3 – Quantidades amostradas das apreensões.

Número da amostra	Código da amostra	Massa da alíquota retirada (g)
1	Ra1	0,43
2	Ra3	0,47
3	Rb1	0,45
4	Rc1	0,53
5	Rh1	0,40
6	Ri1	0,54
7	Rj1	0,48
8	Rk1	0,43
9	Rk2	0,40
10	Rl1	0,36
11	Rm1	0,39
12	Rn1	0,46
13	Ro1	0,36
14	Rp1	0,31
15	Rq1	0,39
16	Rs1	0,33
17	Rt1	0,86
18	Ru1	0,33
19	Rv1	0,84
20	Rv2	0,34
21	Rx1	0,17
22	Ry1	0,22
23	Pa1	0,31

24	Pa2	0,35
25	Pb2	0,36
26	Pc1	0,30
27	Pe1	0,65
28	Pf1	0,32
29	Pg1	0,68
30	Ph1	0,50
31	Pi1	0,60
32	Pj1	0,57
33	Pk1	0,54
34	Pl1	0,43
35	Pm1	0,57
36	Pn1	0,44
37	Po1	0,33
38	Pp1	0,33
39	Pr1	0,37
40	Ps1	0,50
41	Pt1	0,40
42	Pu1	0,33
43	Pv1	0,33
44	Pw1	0,35
45	Px1	0,48
46	Py1	0,37
47	Pz1	0,61

A coleção de amostras selecionadas foi acondicionada em local predeterminado, com segurança, sob custódia laboratorial e seguindo o procedimento operacional padrão específico da Gerência de Laboratório Forense do IPC/PB. O mesmo procedimento foi adotado com o remanescente das amostras após as análises.

4.2 Materiais e Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Thermo Scientific® modelo Surveyor®, com injetor automático, modelo Thermo Scientific® Surveyor Autosampler Plus®, detector de arranjo de diodos, modelo Thermo Scientific® PDA Plus® e acoplado a um computador, munido de software de aquisição e tratamento de dados ChromQuest® versão 5.0 e biblioteca de espectros de UV/Vis UVTox®;
- Coluna de cromatografia a líquido com fase C-18 (15cm x 4.6 mm id x 5µm) Ace®;
- Pré-coluna de cromatografia a líquido com fase C-18 Ace®;

- Cromatógrafo à gás, Thermo Scientific[®] modelo FOCUS GC[®], acoplado com um espectrômetro de massas tipo simples quadrupolo, Thermo Scientific[®] modelo DSQ II[®], injetor do tipo *split/splitless*, injetor automático XYZ para líquidos e voláteis Thermo Scientific[®] Triplus[®], acoplado a um computador, munido de software de aquisição e tratamento de dados XCalibur[®] e biblioteca NIST[®] 2008 versão 2.0;
- Coluna capilar para cromatografia a gás com fase estacionária 5% Fenilpolisil fenileno-siloxano, do tipo BPx5 - MS[®] (30m x 0,25mm d.i. x 0,25µm de espessura do filme) SGE[®];
- Gás especial para a cromatografia a gás (GC) hélio grau 5.0 Air Liquide[®];
- Microseringa de CG 10 µl Thermo Scientific[®];
- Pipetas automáticas Eppendorf Research[®], com diferentes capacidades volumétricas;
- Espectrômetro Varian[®] Unity Plus 300[®] (7.04 T) operando a 300 MHz para Hidrogênio (¹H) e 75,4 MHz para carbono-13 (¹³C);
- Espectrômetro Varian[®] Mercury[®] operando a 200 MHz para hidrogênio e 50 MHz para Carbono-13;
- Espectrômetro Varian[®] 500 operando a 500 MHz para hidrogênio e 75 MHz para Carbono-13;
- Ultrapurificador de água Elga[®] modelo Option Q;
- Balança analítica Shimadzu[®] modelo AY220;
- Peagâmetro Hanna[®] modelo pH21;
- Banho de Ultrassom Branson[®] modelo 1510;
- Vials de vidro de CLAE com rosca e tampas;
- Vials de vidro de CG com rosca e tampas;
- Bastões de vidro, béqueres, balões volumétricos;
- Tubos de RMN 5mm 7" 500MHz Wildmad[®];
- Tubos de RMN 5mm 600MHz Norell[®].

4.3 Reagentes e solventes

- Acetonitrila grau HPLC Tedia[®];
- Diclorometano grau PA Merck[®];
- Solução aquosa de Trietilamina Merck[®] a 0,01%;
- Metanol grau HPLC Tedia[®];
- Ácido maléico Spectrum[®];
- *Terc*-butanol Dinâmica[®];

- Clorofórmio deuterado Cambridge Isotope Laboratories[®];
- Metanol deuterado Cambridge Isotope Laboratories[®];
- Óxido de deutério (Água deuterada) Cambridge Isotope Laboratories[®];
- Cloreto de deutério a 35% em óxido de deutério Sigma-Aldrich[®];
- Sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-d₄ (TSP) Cambridge Isotope Laboratories[®].

4.4 Padrões de referência

4.4.1 Padrão de referência secundário

Foi utilizada uma amostra de cocaína (base livre) como padrão de referência secundário para desenvolver a metodologia de análise e para a validação do método por cromatografia a líquido de alta eficiência. Trata-se de amostra gentilmente preparada e cedida pelo Perito Oficial Químico-Legal, o Prof. Dr. Ticiano Pereira Barbosa.

A amostra do padrão secundário (base livre) foi preparada a partir de amostras apreendidas por uma adaptação da marcha para isolamento e purificação de alcalóides com as seguintes etapas:

- a) dissolução lenta de 1 g de “pedras de crack” em 5 mL de ácido clorídrico a 0,1N;
- b) filtração em papel de filtro para um erlenmeyer;
- c) basificação com gotas de hidróxido de amônio PA até que todo o líquido adquira-se aspecto leitoso;
- d) transferência para funil de separação e extração com 15 mL de clorofórmio PA por três vezes para béquer de vidro; e
- e) secagem a temperatura ambiente.

Em seguida, a amostra foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes metanol : hidróxido de amônio (100:1,5). Após eluição, a cocaína foi observada sob luz ultravioleta em 254 nm de comprimento de onda e a sílica foi retirada da placa para um erlenmeyer, sendo dissolvida em clorofórmio PA e posteriormente filtrada em funil com placa de vidro sinterizado. O filtrado foi seco a temperatura ambiente, obtendo-se ao fim 157 mg de um granulado grosseiro.

Parte da amostra citada (72 mg) foi encaminhada para o Instituto Nacional de Criminalística da Diretoria Técnico-Científica da Polícia Federal em Brasília-DF, para

determinação do teor de cocaína por metodologia adotada no Projeto Perfil Químico de Drogas (PeQui) da Polícia Federal. Através da Informação Técnica nº 109/2011-INC/DITEC/DPF determinou-se que a amostra continha um teor de **72,91%** de cocaína.

A metodologia de quantificação adotada para a análise do teor deste padrão secundário pela Polícia Federal utilizou um cromatógrafo à gás com detector de ionização por chama marca Agilent® modelo 6890. A programação do equipamento foi a seguinte:

- Injetor a 250 °C;
- Modo split numa razão de 50:1;
- Fluxo de gás hélio a 53,4 mL e de split a 49,6 mL;
- Coluna capilar tipo DB-1ms de 25m (comprimento) x 200 µm (diâmetro) x 0,33 µm (espessura do filme);
- Temperatura inicial a 150 °C por dois minutos e uma rampa de aquecimento a 40 °C por minuto até 315°C em 3,87 minutos e fim da corrida em 9,99 minutos;
- Detector a 320 °C com fluxo de hidrogênio a 35 mL/min e ar sintético a 350 mL/min em modo constante.

A quantificação ocorreu após a confecção de curva de calibração com padrão de cocaína e padrão interno, o dipentiltalato, em seis pontos (entre 0,0270 µg/mL e 0,6744 µg/mL). A linearidade do método foi determinada por regressão linear e o coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,999864.

O teor de cocaína do padrão de referência secundário também foi confirmado através de análise pelo método de cromatografia a líquido de alta eficiência desenvolvido e validado durante este trabalho, frente a um padrão primário de cocaína (ver item 4.4.2) e o resultado foi um teor de 74,47% (IC95%: 73.47-75.47%).

4.4.2 Padrão de referência primário

Foram adquiridas, da empresa CMS Científica Ltda, 05 ampolas de padrão de referência de cocaína (1 mg/mL de acetonitrila) da marca Cerilliant® (lote FC062807-01) após a devida autorização especial simplificada para estabelecimentos de ensino e pesquisa obtida junto a Agência Nacional de Vigilância Nacional, cujo certificado de análise atesta um teor de 98,8% de cocaína por meio do método SP10-0101 por cromatografia a gás com detector de ionização de chama.

4.5 Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

4.5.1 Desenvolvimento do método

O desenvolvimento do método teve como referência inicial o trabalho de Oliveira *et al.* (OLIVEIRA, 2009) com o padrão de referência secundário. Na fase de desenvolvimento do método por CLAE-DAD foram observados principalmente os seguintes parâmetros de desempenho: a seletividade do método para separação do pico da cocaína (confirmado pela análise do espectro de ultravioleta obtido com o detector DAD) dos interferentes presentes nas amostras de crack, o formato do pico (simetria e ausência de cauda), a obtenção de separação cromatográfica com tempo de análise adequado (menor que 10 minutos) e a análise preliminar da linearidade no comprimento de onda escolhido para a análise.

Adaptando a metodologia de Oliveira *et al.* (2009), foram preparadas amostras do padrão de referência secundário na concentração de 50 a 80 µg/mL nas seguintes etapas:

- Pesou-se exatamente 10 mg do padrão de referência secundário;
- Transferência para balão volumétrico de 10 mL;
- Adição de acetonitrila qsp 10 mL, concentração de 1 mg/mL;
- Diluição para obtenção da concentração nominal de 50 a 80 µg/mL em balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila/água (50:50, v/v);
- Filtração com filtro de seringa de 45 µm para vial de CLAE de 1,8 mL;
- Injeções no CLAE-DAD durante o desenvolvimento do método.

4.5.2 Validação do método

A validação do método desenvolvido foi realizada de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

O método foi considerado de categoria I e os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão, limite de detecção e quantificação.

A validação do método desenvolvido utilizou o padrão de referência secundário (ver item 4.4.1) e obedeceu ao seguinte protocolo em três dias alternados para ensaios:

- Pesou-se três vezes exatamente cerca de 10 a 20 mg do padrão de referência secundário;
- Transferiu-se quantitativamente para três balões volumétricos de 10 mL;

- c) Dissolveram-se as três amostras em solução de água-acetonitrila (20:80, v/v) nos balões volumétricos (soluções-mãe) e completaram-se os volumes. As três soluções-mãe foram acondicionadas em tubos tipo falcon de 15 mL até o momento de cada ensaio;
- d) Amostras para as curvas de calibração foram obtidas em solução de água-acetonitrila (60:40, v/v) utilizando-se micropipeta calibrada de acordo com os volumes abaixo para confecção das três curvas de calibrações:
- 995 µl de água-acetonitrila (60:40, v/v) e 5 µl da solução-mãe obtendo-se concentrações nominais de 3,4, 3,1 e 3,7 µg/mL;
 - 990 µl de água-acetonitrila (60:40, v/v) e 10 µl da solução-mãe obtendo-se concentrações nominais de 6,9, 6,2 e 7,4 µg/mL;
 - 975 µl de água-acetonitrila (60:40, v/v) e 25 µl da solução-mãe obtendo-se concentrações nominais de 17,2, 15,5 e 18,6 µg/mL;
 - 950 µl de água-acetonitrila (60:40, v/v) e 50 µl da solução-mãe obtendo-se concentrações nominais de 34,5, 31,0 e 37,2 µg/mL;
 - 900 µl de água-acetonitrila (60:40, v/v) e 100 µl da solução-mãe obtendo-se concentrações nominais de 69,1, 62,0 e 74,4 µg/mL;
 - 850 µl de água-acetonitrila (60:40, v/v) para 150 µl da solução-mãe obtendo-se concentrações nominais de 103,6, 93,0 e 111,5 µg/mL.
- e) Transferência de 5, 75 e 150 µl das três soluções-mãe para tubos eppendorffs de 2 mL com micropipeta calibrada (três amostras para cada nível de concentração em triplicata) e diluição para volume final de 1 mL (estas amostras foram tratadas como amostras de controle de qualidade das concentrações baixa, média e alta respectivamente, durante a fase de desenvolvimento e validação do método);
- f) Filtração das soluções através de filtros de seringa 0,45 µm para vials de CLAE;
- g) Confecção de três sequências de análise no CLAE-DAD em três dias diferentes tendo: seis amostras de calibração e nove amostras correspondendo as amostras de controle de qualidade nos níveis de concentração baixo, médio e alto analisadas em triplicata para cada nível.

Depois de preparados os pontos da curva, as quantidades esperadas de cocaína para as amostras de controle de qualidade foram calculadas levando em consideração o grau de pureza do padrão de referência secundário (1º dia: 3,4; 51,7 e 103,6 µg/mL; 2º dia: 3,1; 46,5 e 93,0 µg/mL; 3º dia 3,7; 55,8 e 111,3 µg/mL).

a) Seletividade/Especificidade

Neste trabalho a seletividade/especificidade do método de análise por CLAE-DAD foi avaliada utilizando as seguintes estratégias:

a.1 Utilizando a ferramenta do software ChromQuest[®] que determina o grau de pureza espectral dos picos cromatográficos (do inglês *peak purity*) foi avaliada a possível sobreposição de picos de substâncias com absorção UV/Vis na faixa da varredura do scan do detector de arranjo de diodos e com tempo de retenção entre 5,8 e 6,2 minutos. Correlação de purezas aceitáveis para o pico cromatográfico da cocaína foi estabelecida para valores $\geq 0,99$.

a.2 Utilizando outra ferramenta do software ChromQuest[®] que busca relacionar o perfil de um espectro de UV/Vis de um pico cromatográfico de uma amostra desconhecida com o perfil cromatográfico de espectro presente no banco de dados UVTox[®] selecionado-se um número de pontos coincidentes. Após selecionar-se a comparação com três pontos de comparação, foram aceitos resultados com mais de 0,95 de similaridade.

a.3 Através da análise de amostras submetidas a ensaios de degradações alcalinas forte e branda realizadas sobre duas amostras sorteadas. Foram transferidos 2 mL de cada solução-mãe das amostras Rk1 e Pf1 a 1 mg/mL para tubos de ensaio, 1 mL para cada tubo rotulado com as letras **a** e **b**.

Para degradação forte, aos tubos **a** das amostras Rk1 e Pf1 foi adicionado 1 mL de solução aquosa de NaOH a 1 molar e submetidos a uma temperatura de 100 °C em estufa de fluxo forçado por 20 minutos.

Para degradação branda, aos tubos **b** das amostras Rk1 e Pf1 foi adicionado 1 mL de solução aquosa de NaOH a 0,1 molar e submetidos a uma temperatura de 80 °C em estufa de fluxo forçado por 10 minutos.

Após o resfriamento, as soluções nos 04 tubos de ensaio foram neutralizadas com gotas de solução tampão fosfato até pH 8,0 e preparadas para análises de acordo com o método desenvolvido e a capacidade do método de separar o pico correspondente a cocaína dos produtos de degradação e impurezas da amostra foi avaliada.

a.4 Amostras deliberadamente contaminadas (através de adição) com cafeína e procaína foram analisadas para avaliar a capacidade do método em separar a cocaína destes adulterantes, frequentemente descritos na literatura.

b) Linearidade

A linearidade do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise de seis concentrações do padrão de referência secundário repetidas em três dias diferentes, cobrindo uma faixa de concentração nominal entre 3,1 a 111,5 µg/mL. O ensaio foi realizado de acordo com as condições experimentais previamente estabelecidas. A linearidade foi avaliada pelo valor do critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r^2), que deve ser $\geq 0,999$ (BRASIL, 2003).

As concentrações foram preparadas a partir da diluição das soluções-mãe do padrão de referência secundário pesado antes de cada ensaio de acordo ao protocolo citado acima e obedecendo ao disposto na Tabela 4.

Tabela 4 – Preparação de amostras do padrão de referência secundário de cocaína para ensaio da linearidade.

Ensaio	Pesagem do padrão por diferença (mg)	Pureza da amostra (%)	Concentração obtida (mg/mL)	Diluições para ensaio (µL) e concentrações obtidas (µg/mL)	
1	9,4	0,7291	0,69	5+995	3,4
				10+990	6,9
				25+975	17,3
				50+950	34,5
				100+900	69,1
				150+850	103,6
2	8,5	0,7291	0,62	5+995	3,1
				10+990	6,2
				25+975	15,5
				50+950	31,0
				100+900	62,0
				150+850	93,0
3	10,2	0,7291	0,74	5+995	3,7
				10+990	7,4
				25+975	18,6
				50+950	37,18
				100+900	74,4
				150+850	111,5

c) Precisão e exatidão

Para avaliação da precisão e exatidão foram preparadas concentrações do padrão de referência secundário em triplicata (baixas: 3,4, 3,1 e 3,7 µg/mL, médias: 51,7, 46,5 e 55,8 µg/mL e altas: 103,6, 93,0 e 111,3 µg/mL) que foram analisadas ao longo de três dias com as curvas de calibração nas concentrações conforme descritas na Tabela 4.

d) Limite de Detecção e Quantificação

O Limite de Detecção (do inglês *lower detection* - *LOD*) e o Limite de Quantificação (do inglês *lower quantification* - *LOQ*) de cocaína foram calculados a partir dos resultados obtidos de três curvas de calibração utilizando as equações 12 e 13.

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{s} \quad \text{Eq. 12}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{s} \quad \text{Eq. 13}$$

4.5.3 Quantificação

As 47 amostras de crack foram preparadas para determinar o teor de cocaína pelos métodos de CLAE-DAD e RMNq-¹H desenvolvidos.

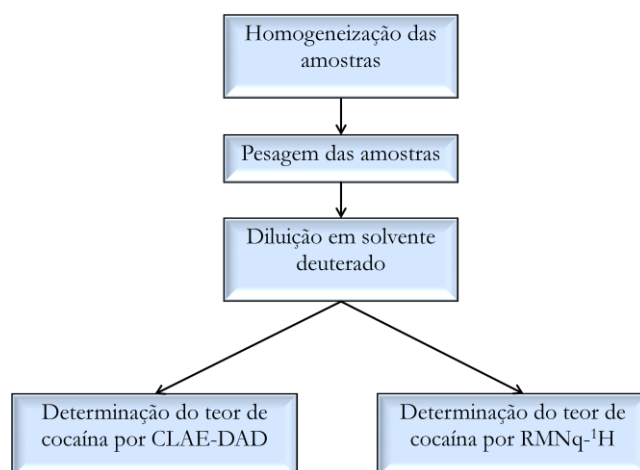


Figura 18 – Fluxograma para determinação do teor de cocaína pelos métodos desenvolvidos.

As etapas abaixo foram utilizadas na preparação das amostras:

- Homogeneização das amostras com alça de amostragem;

- b) Pesagem de quantidades de cada amostra em tubos polipropileno cônicos (*eppendorff*) de 2 mL (Tabela 5);
- c) Adição às amostras de 1,8mL da solução de óxido de deutério (D_2O) contendo cloreto de deutério (DCl) e sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico- d_4 (TSP) com pipeta calibrada;
- d) Agitação no vórtex por 1 minuto e em banho de ultrassom por 5 minutos caso materiais insolúveis estivessem presentes;
- e) Transferência das soluções-mãe para vials de CLAE de 1,8 mL;
- f) Obtenção das concentrações estimadas das soluções-mãe (Tabela 5);
- g) Preparação de solução de $H_2O:ACN$ (60:40, v/v);
- h) Transferência de 990 μ L da solução de $H_2O:ACN$ (60:40, v/v) para vials de CLAE de 1,8 mL com micropipeta calibrada;
- i) Transferência de 10 μ L de cada solução-mãe com micropipeta calibrada para os vials de CLAE com a solução de $H_2O:ACN$ (60:40, v/v);
- j) Obtenção das concentrações estimadas de cocaína (Tabela 5) para quantificação por CLAE-DAD;
- k) Confeção de três sequências de análise no CLAE-DAD em três dias alternados, possuindo, cada sequência, seis vials com padrões de referência primários e 47 vials com as amostras de crack preparadas.

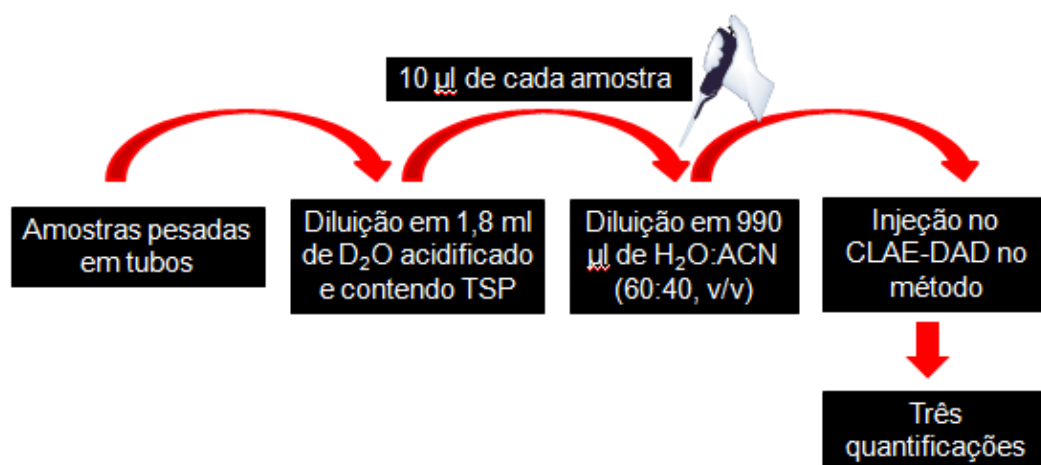


Figura 19 – Fluxograma para preparação das amostras para quantificação pelo método de CLAE-DAD.

Tabela 5 - Quantidade pesada das amostras, concentrações estimadas de cocaína após diluições

Número da amostra	Código da amostra	Quantidade pesada (mg)	Concentração estimada de cocaína após diluição em D ₂ O contendo DCl e TSP (mg/mL)	Concentração estimada de cocaína após diluição em H ₂ O:ACN (µg/mL)
1	Ra1	23,5	13,1	130,6
2	Ra3	21,8	12,1	121,1
3	Rb1	21,0	11,7	116,7
4	Rc1	21,9	12,2	121,7
5	Rh1	23,3	12,9	129,4
6	Ri1	21,7	12,1	120,6
7	Rj1	20,7	11,5	115,0
8	Rk1	20,8	11,6	115,6
9	Rk2	20,0	11,1	111,1
10	Rl1	20,5	11,4	113,9
11	Rm1	20,9	11,6	116,1
12	Rn1	21,8	12,1	121,1
13	Ro1	21,2	11,8	117,8
14	Rp1	20,2	11,2	112,2
15	Rq1	21,0	11,7	116,7
16	Rs1	21,1	11,7	117,2
17	Rt1	20,6	11,4	114,4
18	Ru1	20,7	11,5	115,0
19	Rv1	20,5	11,4	113,9
20	Rv2	20,6	11,4	114,4
21	Rx1	23,2	12,9	128,9
22	Ry1	21,0	11,7	116,7
23	Pa1	23,3	12,9	129,4
24	Pa2	22,8	12,7	126,7
25	Pb2	20,8	11,6	115,6
26	Pc1	23,2	12,9	128,9
27	Pe1	20,5	11,4	113,9
28	Pf1	23,4	13,0	130,0
29	Pg1	21,5	11,9	119,4
30	Ph1	22,5	12,5	125,0
31	Pi1	21,6	12,0	120,0
32	Pj1	23,2	12,9	128,9
33	Pk1	20,0	11,1	111,1
34	Pl1	21,4	11,9	118,9
35	Pm1	21,4	11,9	118,9
36	Pn1	21,6	12,0	120,0
37	Po1	20,3	11,3	112,8
38	Pp1	20,2	11,2	112,2
39	Pr1	21,0	11,7	116,7
40	Ps1	22,2	12,3	123,3
41	Pt1	22,1	12,3	122,8
42	Pu1	23,4	13,0	130,0
43	Pv1	20,8	11,6	115,6
44	Pw1	23,7	13,2	131,7
45	Px1	23,3	12,9	129,4
46	Py1	21,7	12,1	120,6
47	Pz1	21,2	11,8	117,8

As quantidades de cocaína foram obtidas nas sequências pela área sob o pico cromatográfico da cocaína em 5,8-5,9 minutos e aplicação da função da reta obtida pela confecção da curva de calibração com o padrão de referência primário.

A quantidade em mols de DCl adicionada às amostras para protonar o nitrogênio do anel tropano da cocaína foi calculada a partir da soma das massas das amostras (1015,10 mg) de crack e considerando o teor de cocaína nas amostras em 100%.

Foi obtido um pH de 3,0 após a dissolução do DCl a 35% em D₂O contendo TSP e um pH médio de 6,0 após a adição de 1,8 mL da solução a cada amostra.

4.6 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

4.6.1 Amostras

O cálculo para amostragem seguiu o previsto na equação Eq. 11 (pág. 38):

$$\text{Amostragem} = 2 \times \sqrt{47} - 1 = 2 \times 6,8 - 1 \cong 13 \text{ amostras}$$

A escolha das 13 amostras a serem avaliadas quanto ao perfil de impurezas se baseou nos cromatogramas obtidos durante a análise por CLAE, priorizando-se aquelas aonde se observavam picos adicionais àquele da cocaína. As amostras escolhidas foram: Rm1, Rn1, Rs1, Rv1, Pb2, Pc1, Pf1, Pg1, Pk1, Pm1, Pr1, Pv1 e Pw1.

As amostras foram pesadas (10 mg de cada) e diluídas em diclorometano utilizando balões volumétricos de 10 mL para obter-se concentrações de 1 mg/mL para cada amostra, 1 µL de cada balão foi diretamente injetado no CG-EM.

4.6.2 Método de análise qualitativo

Foi utilizada a metodologia desenvolvida por Suzuki & Watanabe para anestésicos locais na programação do cromatógrafo a gás para a pesquisa dos adulterantes (SUZUKI, 2005). A metodologia foi alterada para o uso do detector de massa e para assemelhar-se a metodologia do Projeto PeQui da Polícia Federal. A programação do CG-EM foi a seguinte:

- Injetor a 250 °C;
- Modo split numa razão de 10:1;
- Fluxo de gás hélio a 53,4 mL/min e de split a 49,6 mL/min;

- Coluna capilar tipo DBx-5ms de 25m (comprimento) x 200 μ m (diâmetro) x 0,25 μ m (espessura do filme);
- Temperatura inicial a 150° C por 2 minutos e uma rampa de aquecimento a 40° C por minuto até 315° C em 4.00 minutos e fim da corrida em 9.75 minutos;
- Linha de transferência a 250° C;
- Fonte de íons operando a 70 eV;
- Seletor de íons simples quadrupolo operando em modo *full scan* na faixa de razão massa:carga de 40 a 600.

O tratamento dos cromatogramas e dos espectros de massas obtidos foi realizado pelo software XCalibur[®] integrado a biblioteca NIST[®] 2008 versão 2.0. As comparações dos espectros atribuídos aos picos cromatográficos se deram pela similaridade entre as fragmentações. Aquelas similaridades superiores a 80% foram consideradas.

4.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio (RMNq-¹H)

4.7.1 Desenvolvimento do método

Dentre as 47 amostras de crack, foram escolhidas três com aspectos heterogêneos, Ra3, Rk1 e Rk2, para realizar testes de solubilidade em solventes deuterados e a obtenção de espectros de RMN de hidrogênios para análise dos perfis espectroscópicos.

As amostras foram pesadas (50 mg cada), transferidas para balões de 5 mL e dissolvidas em clorofórmio-d. Em seguida, 600 μ L foram colocados em tubos de RMN para aquisição de espectros de RMN-¹H.

Para desenvolvimento do método de quantificação por RMNq-¹H, foram usadas duas abordagens: o metanol-d₄ (CD₃OD) com ácido maléico como SR interna e o óxido de deutério (D₂O) acidificado com DCl com TSP como SR interna.

Para desenvolvimento do método, inicialmente, amostra do padrão de referência secundário foi diluída em metanol-d₄ contendo como SR interna o ácido maléico seguindo o protocolo abaixo:

- a) Pesagem exata de cerca de 15 mg do ácido maléico;
- b) Transferência quantitativa para balão volumétrico de 5 mL;

- c) Diluição com CD₃OD para volume final de 5 mL;
- d) Pesagem exata de cerca de 50 mg do padrão de referência secundário de cocaína;
- e) Transferência quantitativa para balão volumétrico de 5 mL;
- f) Diluição com solução do primeiro balão para volume final de 5 mL;
- g) Cálculo das concentrações presentes de ácido maléico e esperada de cocaína;
- h) Transferência com micropipeta calibrada de 600 µl da amostra para tubo de RMN;
- i) Obtenção do espectro de RMN-¹H

A aquisição dos espectros de RMN-¹H com finalidades quantitativas foi feita com espectrômetro da Varian[®] Mercury[®] operando a 200 MHz para Hidrogênio e 50 MHz para Carbono-13. A sequência de pulsos usada foi S2PUL que consistiu em atraso de relaxamento (*delay* - d1) de 10 s, pulso de 90° (*pulse angle*), tempo de aquisição de 2 s (*aquisition time* - aq). O *shimming* foi feito manualmente buscando definição e resolução do sinal do solvente metanol-d₄ em δ_H 3,31 ppm antes da aquisição, juntamente com o *Phase Lock*.

Os espectros foram adquiridos 16 vezes com uma janela espectral (*spectral width* – sw) de 2800 Hz (12 a -2 ppm) para 200 MHz. As aquisições ocorreram a temperatura ambiente de 28 °C com rotor da *probe* a 20Hz e desacoplador de satélites C₁₃ desligado.

O processamento do FID foi feito com software da ACDLabs[®] 1D NMR Processor[®] pela aplicação do dobro do *zero-filling* (32K) e de 0,5Hz da função exponencial *line-broadening* (lb), antes da função matemática da transformada de Fourier (ft). Foi feito ajuste manual de fase e da linha de base. Os deslocamentos químicos foram referenciados ao sinal do metanol-d₄ em δ_H 3,31 ppm. A integração foi feita manualmente nos sinais em δ_H 6,25 ppm do ácido maléico e δ_H 3,6 e 2,8 ppm da cocaína cobrindo 60Hz (0,3 ppm).

Devido a sobreposição de sinais, o solvente deuterado foi alterado para o óxido de deutério (D₂O) acidificado com cloreto de deutério (DCl) e como SR interna o sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-d₄ (TSP).

Foram escolhidas três amostras para testar a nova abordagem: Ra3, Rm1 e Pr1. O protocolo de preparo adotado para o desenvolvimento foi o descrito em 4.5.3 até a etapa f (pág. 49).

O preparo do D₂O acidificado com DCl e contendo TSP foi feito nas seguintes etapas:

- a) Pesagem exata de cerca de 16,6 mg do TSP;
- b) Transferência para balão volumétrico de 10 mL;
- c) Adição de 5 mL de D₂O;

- d) Adição de 27 µl de DCl a solução com pipeta calibrada;
- e) Adição de D₂O qsp para 10 mL;
- f) Medição do pH;
- g) Cálculo da concentração de TSP.

O volume de 27 µl de cloreto de deutério diluída em 10 mL de óxido de deutério, para haver a solubilização da cocaína (base livre) por meio da adição do D⁺ ao nitrogênio do anel tropano por meio de reação ácido-base formando o cloridrato de cocaína deuterada, foi calculada levando em consideração a massa total pesada das amostras de crack, o pK_b da cocaína (8,6) e o pH visando deslocar o equilíbrio químico para formação do produto pela equação de Handersson-Hansselbach (pH = 6,0).

Inferindo que as quantidades pesadas das amostras de crack não possuíam teor de 100% de cocaína e assim haveria excesso do cloreto de deutério na solução, pôde-se prever que esta diferença no meio seria suficiente para garantir o pH necessário a formação de 99,99% do cloridrato de cocaína deuterada.

Uma vez que para cada amostra apreendida duas alíquotas foram utilizadas para a análise por CLAE-DAD e RMNq-¹H (vide Figura 18, pág. 48), o procedimento de preparação das amostras foi o mesmo até a etapa f conforme descrita no item 4.5.3, pág. 49 (pesagem e diluição das amostras em D₂O acidificado com DCl e contendo TSP). Após essa etapa, 600 µl de cada amostra preparada na etapa f foram cuidadosamente pipetados para três tubos de RMN.

Os espectros foram adquiridos no espectrômetro Varian[®] Mercury[®] operando a 200 MHz para hidrogênio e 50 MHz para carbono-13 e no espectrômetro Varian[®] 500 operando a 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono-13 nas mesmas condições citadas acima, com exceção do atraso de relaxamento, 20 s, o tempo de aquisição do FID foi alterado para 4 s, a janela espectral de 2800 Hz (12 a -2 ppm) para 200 MHz e 7000 Hz para 500 MHz e a temperatura alterada para 25 °C. O *shimming* foi feito manualmente no espectrômetro de 200 MHz e com gradiente *shimming* no 500 MHz buscando definição e resolução do sinal do solvente óxido de deutério δ_H 0,0 ppm antes da cada aquisição. O *Lock* foi ajustado antes de cada aquisição.

O processamento do FID foi feito da mesma forma citada anteriormente, contudo os deslocamentos químicos foram referenciados ao sinal da SR interna, o TSP, em 0,0 ppm. A integração foi feita manualmente nos sinais em δ_H 3,6 e 2,9 ppm da cocaína cobrindo 60Hz e 150Hz (0,3 ppm) para o 200 MHz e 500 MHz, respectivamente, e o sinal δ_H 0,0 do TSP.

4.7.2 Quantificação

Observados o protocolo de preparo das amostras durante o desenvolvimento do método e seguindo o item 4.5.3, as 47 amostras de crack foram preparadas para quantificação pelo método desenvolvido utilizando o óxido de deutério acidificado com cloreto de deutério adicionado do sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-d₄ como substância de referência interna.

A preparação do D₂O acidificado adicionado do TSP deu-se de acordo com o protocolo abaixo:

- Pesagem exata de 200,8 mg do TSP;
- Transferência quantitativa para balão volumétrico de 100 mL;
- Adição de 50 mL de D₂O;
- Adição de 300 µl de DCl a solução;
- Adição de D₂O volume final de 100 mL;
- Medição do pH;
- Cálculo da concentração de TSP.

Prosseguindo com o protocolo disposto em 4.5.3 – pág. 49, 600 µl de cada amostra preparada (etapa f do item 4.5.3) foram cuidadosamente pipetados para tubos de RMN contendo as massas (mg) estimadas de cocaína e calculada de TSP (vide Tabela 6).

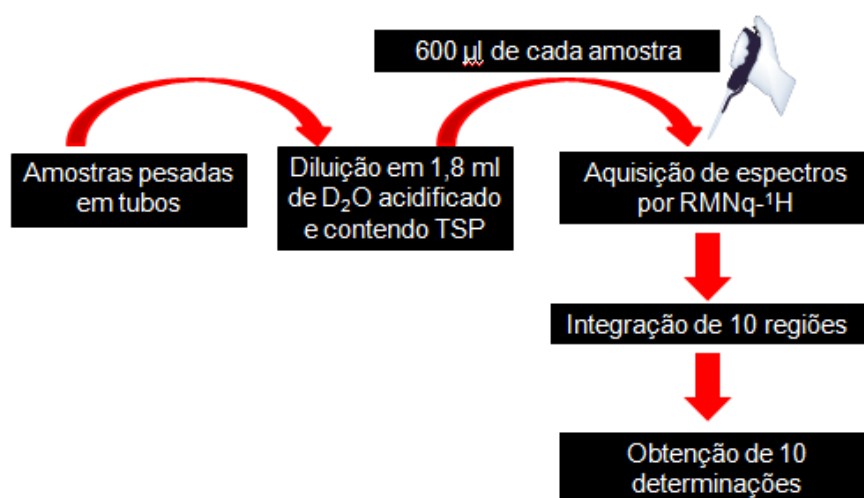


Figura 20 – Fluxograma para preparação das amostras para quantificação pelo método de RMNq-¹H.

Tabela 6 – Quantidade pesada das amostras, concentração estimada de cocaína após diluição e massas de cocaína e TSP após transferência em tubos de RMN.

Número da amostra	Código da amostra	Quantidade pesada (mg)	Concentração estimada de cocaína após diluição com D ₂ O contendo DCl e TSP (mg/mL)	Massa estimada de cocaína após transferência para tubos de RMN (mg)	Massa de calculada de TSP após transferência para tubos de RMN (mg)
1	Ra1	23,5	13,06	7,83	1,19
2	Ra3	21,8	12,11	7,27	1,19
3	Rb1	21,0	11,67	7,00	1,19
4	Rc1	21,9	12,17	7,30	1,19
5	Rh1	23,3	12,94	7,77	1,19
6	Ri1	21,7	12,06	7,23	1,19
7	Rj1	20,7	11,50	6,90	1,19
8	Rk1	20,8	11,56	6,93	1,19
9	Rk2	20,0	11,11	6,67	1,19
10	RI1	20,5	11,39	6,83	1,19
11	Rm1	20,9	11,61	6,97	1,19
12	Rn1	21,8	12,11	7,27	1,19
13	Ro1	21,2	11,78	7,07	1,19
14	Rp1	20,2	11,22	6,73	1,19
15	Rq1	21,0	11,67	7,00	1,19
16	Rs1	21,1	11,72	7,03	1,19
17	Rt1	20,6	11,44	6,87	1,19
18	Ru1	20,7	11,50	6,90	1,19
19	Rv1	20,5	11,39	6,83	1,19
20	Rv2	20,6	11,44	6,87	1,19
21	Rx1	23,2	12,89	7,73	1,19
22	Ry1	21,0	11,67	7,00	1,19
23	Pa1	23,3	12,94	7,77	1,19
24	Pa2	22,8	12,67	7,60	1,19
25	Pb2	20,8	11,56	6,93	1,19
26	Pc1	23,2	12,89	7,73	1,19
27	Pe1	20,5	11,39	6,83	1,19
28	Pf1	23,4	13,00	7,80	1,19
29	Pg1	21,5	11,94	7,17	1,19
30	Ph1	22,5	12,50	7,50	1,19
31	Pi1	21,6	12,00	7,20	1,19
32	Pj1	23,2	12,89	7,73	1,19
33	Pk1	20,0	11,11	6,67	1,19
34	Pl1	21,4	11,89	7,13	1,19
35	Pm1	21,4	11,89	7,13	1,19
36	Pn1	21,6	12,00	7,20	1,19
37	Po1	20,3	11,28	6,77	1,19
38	Pp1	20,2	11,22	6,73	1,19
39	Pr1	21,0	11,67	7,00	1,19
40	Ps1	22,2	12,33	7,40	1,19
41	Pt1	22,1	12,28	7,37	1,19
42	Pu1	23,4	13,00	7,80	1,19
43	Pv1	20,8	11,56	6,93	1,19
44	Pw1	23,7	13,17	7,90	1,19
45	Px1	23,3	12,94	7,77	1,19
46	Py1	21,7	12,06	7,23	1,19
47	Pz1	21,2	11,78	7,07	1,19

A aquisição dos espectros de RMNq-¹H foi feita no espectrômetro da Varian[®] Unity Plus[®] operando a 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para Carbono-13 instalado na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco e operado pelo Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva.

A sequência de pulsos usada foi S2PUL que consistia em atraso de relaxamento (*delay* - d1) de 20 s, pulso de 90° (*pulse angle*), tempo de aquisição de 3,6 s (*acquisition time* - aq).

O tempo de aquisição do FID foi calculado de acordo com o experimento de recuperação da inversão para o pulso de 90°, onde foi considerado o sinal do TSP em δ_H 0,0 como o t1 mais longo quando comparado aos demais sinais.

O *shimming* foi feito manualmente buscando a definição e resolução do sinal do solvente óxido de deutério em δ_H 0,0 ppm com largura a meia altura menor que 1 Hz antes da aquisição juntamente com o *Phase Lock* e otimizado em 0,5 Hz. O *tune* da *probe* foi checado constantemente durante as aquisições.

Os espectros foram adquiridos 16 vezes com uma janela espectral (*spectral width* – sw) de 3000 Hz (11 a -1 ppm) para 300 MHz. As aquisições ocorreram a temperatura de 25 °C com rotor da *probe* a 20Hz e desacoplador de satélites ¹³C desligado.

O processamento do FID foi feito usando macro desenvolvida por Dr. Patrick Hays do Laboratório de Pesquisa e Testes Especiais do Departamento de Justiça dos EUA pela aplicação do dobro do *zero-filling* (32K) antes da função matemática da transformada de Fourier (ft). Foi feito ajuste manual de fase e da linha de base. Os deslocamentos químicos foram referenciados ao sinal do TSP em 0,0 ppm. A macro utilizou linguagem de programação para o software Varian's Magical-II[®] (HAYS, 2005).

As áreas integradas de dez regiões do espectro de cocaína em D₂O acidificado com DCl e contendo TSP foram ajustadas para regiões contendo somente ruído e frente a área integrada do TSP que foi normalizada para 1000.

Com o valor das áreas integradas de dez regiões do espectro de cocaína, o teor de cocaína em cada amostra das 47 de crack foi determinado pelo uso da Eq.10 (pág. 26) e considerando a massa de TSP conferida e sua pureza em 100%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CLAE-DAD

5.1.1 Desenvolvimento do método

A metodologia de Oliveira *et al.* (2009) utilizou um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção UV-Vis Shimadzu[®], com fluxo da fase móvel a 1,0 mL/min em modo isocrático que era constituída de acetonitrila/água (95:5 v/v) com um tempo total de análise de 6 minutos. A coluna adotada foi uma de fase reversa C₁₈ de 15 cm da Labtron[®] acompanhada de uma pré-coluna C₁₈, de mesma marca. A injeção foi feita diretamente no cromatógrafo e usou-se uma alça de amostragem de 20 µl. A detecção foi feita a 224 nm e o pico da cocaína foi registrado em 3,5 minutos (OLIVEIRA, 2009).

Os resultados obtidos no trabalho de Oliveira *et al.* (2009) bem como a simplicidade do método descrito nos levou a considerar esta metodologia como ponto de partida para o desenvolvimento do método de quantificação das amostras de crack por CLAE-DAD neste estudo. Em particular, o uso de metodologia isocrática, geralmente mais robusta do que aquelas baseadas no uso de gradientes e a rapidez do método foram fatores importantes na escolha deste método frente a alguns existentes na literatura que descreviam análise de cocaína em amostras de urina, sangue e cabelo humano com a utilização de tampões e sistemas gradientes (FERNANDEZ, 2003; FOULON, 1999).

Após as primeiras corridas cromatográficas, constatou-se que a alta proporção de acetonitrila na fase móvel poderia estar levando a coeluição dos principais constituintes da amostra pela intensidade do sinal em 1,8 minutos (vide Figura 21, pág. 59).

A retenção de analitos em cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa é o resultado de interações entre esses analitos e fase móvel e a estacionária (coluna). A proporção alta de acetonitrila na fase móvel (95%) do método de Oliveira *et al.* (2009) faz com que a fase móvel torne-se menos polar, aumentando a sua força eluotrópica na cromatografia de fase reversa e consequentemente diminuindo a retenção (tempo de retenção) dos analitos na coluna cromatográfica (SNYDER, 2010).

Como solução optou-se por modificar a metodologia reduzindo-se a proporção de solvente orgânico na fase móvel (%B) em incrementos em 5% para aumentar a resolução. O tempo de corrida também foi aumentado para 10 minutos, mantendo-se todas as outras condições inalteradas.

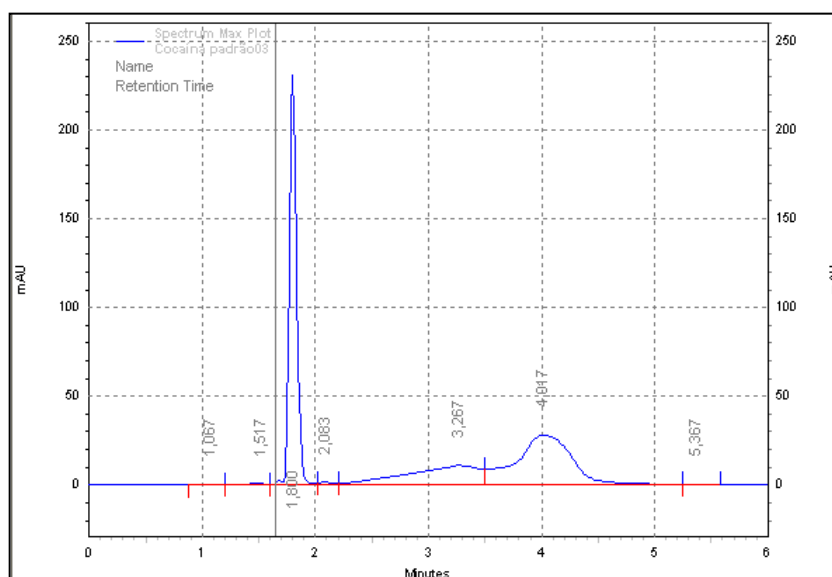


Figura 21 – Cromatograma inicial de amostra de padrão secundário de cocaína (50 µg/mL), obtido com as condições cromatográficas descritas na metodologia de Oliveira (Oliveira *et al.*, 2009).

Com o desenvolvimento de diversas corridas chegou-se a melhor resolução entre os picos e melhor tempo de análise com uma proporção de água/acetonitrila de 50:50 (v/v) e confirmou-se a presença de outros picos cromatográficos, contudo, a baixa intensidade e o alargamento do pico da cocaína em 3,6 minutos (Figura 22), forçou a revisão da metodologia novamente.

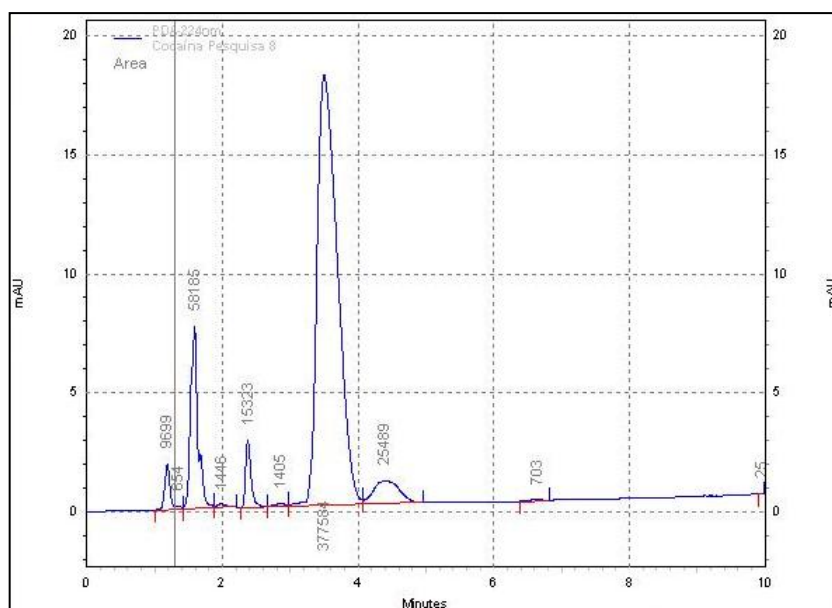


Figura 22 – Cromatograma do padrão secundário da cocaína (50 µg/mL) eluído com fase móvel constituída de água:acetonitrila (50:50, v/v).

As interações entre a cocaína, substância de pKb igual a 8,6, ou seja de caráter básico fraco, e os grupos silanóis residuais da coluna cromatográfica (de caráter ácido fraco) podem explicar o alargamento do pico cromatográfico com a sua consequente baixa intensidade. Esse fenômeno é conhecido como assimetria de pico gerada pelo fator cauda (do inglês *peak asymmetry* e *tailing factor*) (SNYDER, 2010). A fim de resolver o alargamento e assimetria do pico cromatográfico, foi alterada a fase móvel com um modificador de pH, a base trietilamina. A nova fase móvel foi preparada com uma solução de 0,05% de trietilamina em água:acetonitrila (40:60, v/v) e manteve-se todas as condições anteriores.

O cromatograma resultante apresentou picos negativos que interferiam com a integração do pico (Figura 23), mas pôde-se notar a melhoria na simetria e a ausência de cauda com o uso deste modificador da fase móvel.

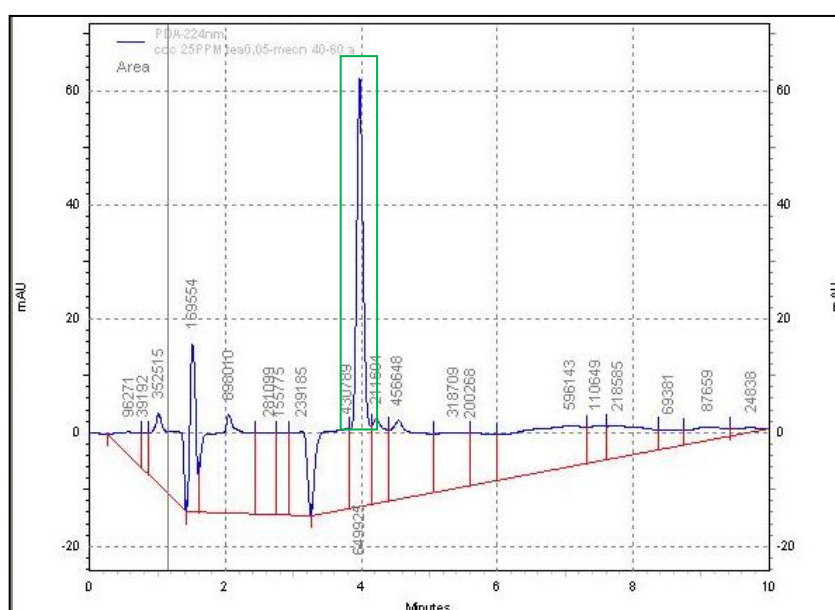


Figura 23 – Cromatograma do padrão secundário de cocaína (50 µg/mL), obtido após a adição de trietilamina a fase móvel (solução aquosa de trietilamina 0,05%: acetonitrila 50:50, v/v).

Para tentar evitar o aparecimento dos picos negativos e para melhorar a resolução do método, tentou-se diminuir a quantidade de trietilamina na fase móvel para 0,01%. Cumprindo o planejamento proposto, chegou-se ao perfil cromatográfico desejado (Figura 24 – pág. 61) e as condições finais definidas neste desenvolvimento foram as seguintes:

- Fase móvel: 0,01% de trietilamina em água:acetonitrila (45:55, v/v) a 1mL/min;
- Tempo de corrida: de 10 minutos;
- Detector de arranjo de diodos: scan de 180 a 320 nm e foco em 224nm;

- Temperatura do forno da coluna: 30 °C;
- Coluna C₁₈ (15cm x 4.6 mm id x 5µm) e pré-coluna C₁₈.

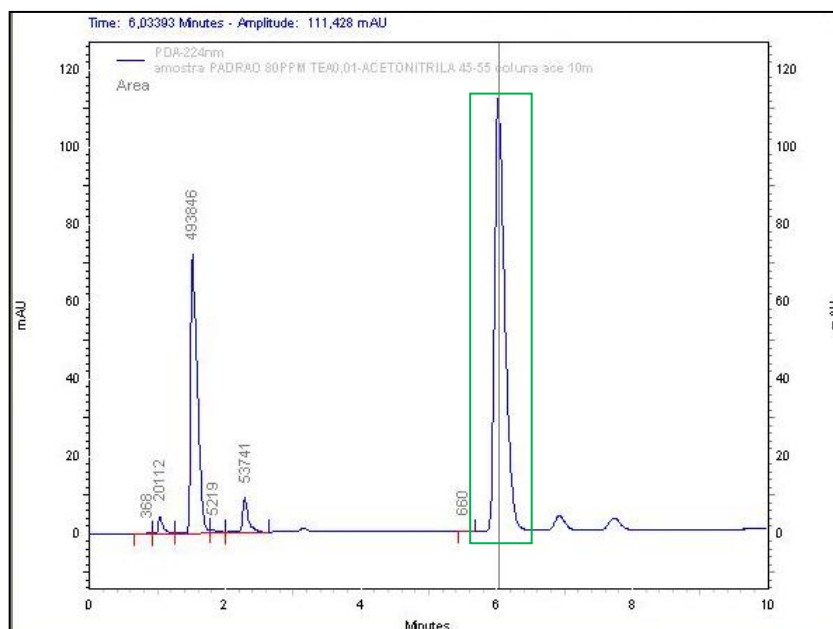


Figura 24 – Perfil cromatográfico final após desenvolvimento do método amostra de padrão secundário de cocaína a 80 µg/mL, com fase móvel consistindo de 0,01% de trietilamina em água:acetonitrila (45:55, v/v).

O pico cromatográfico da cocaína depois de desenvolvido o método apresentou elevada pureza do espectro de UV (superior a 0,99) ao se analisar a faixa de comprimento de onda com varredura entre 180 a 320 nm e selecionar-se o máximo de absorção no comprimento de onda de 224 nm.

5.1.2 Validação do método

a) Seletividade/Especificidade

A pureza do pico cromatográfico da cocaína no padrão de referência secundário e nas amostras de crack listadas foram superiores a 0,99 quando comparados os espectros no início, centro e fim dos picos.

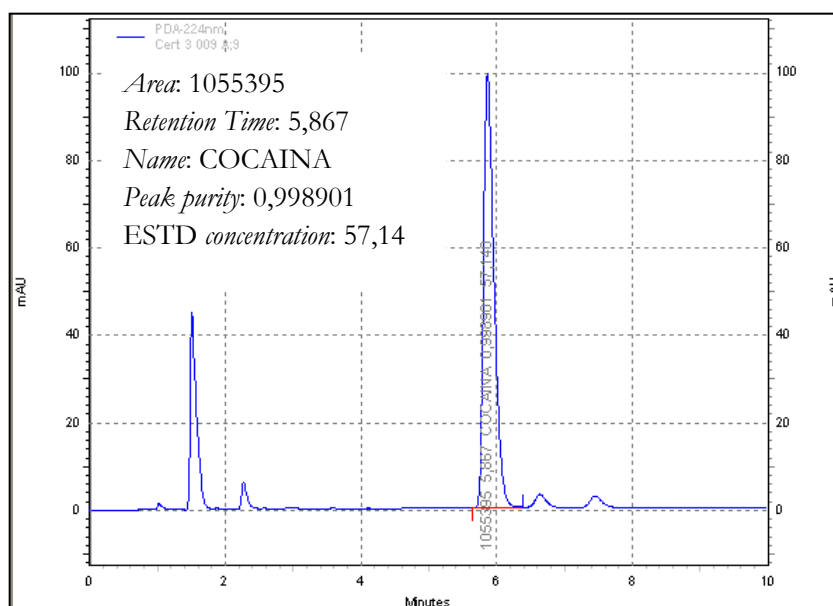


Figura 25 – Cromatograma do padrão de cocaína secundário (57,1 µg/mL) com dados da pureza do pico cromatográfico da cocaína (tempo de retenção de 5,9 minutos).

A comparação entre o espectro do pico de cocaína (6,40 minutos) na análise de um pool de 05 amostras de crack e o espectro da substância cocaína presente no banco de dados UVTox[®] ao selecionar-se 03 pontos de comparação, revelou similaridade entre espectros superior a 0,99.

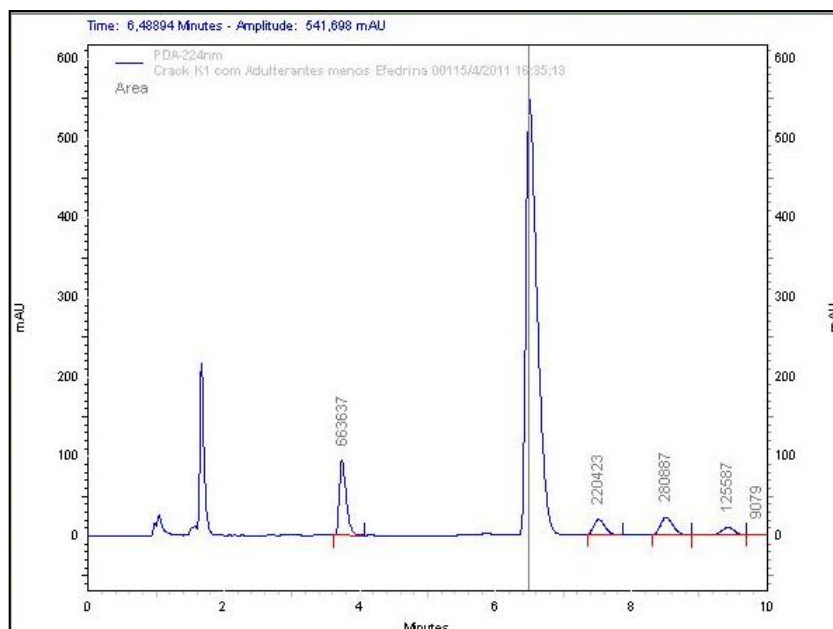


Figura 26 – Cromatograma de pool de cinco amostras de crack (400 µg/ml) com adulterantes cafeína (40 µg/ml) e procaina (40 µg/ml) em UV 224 nm.

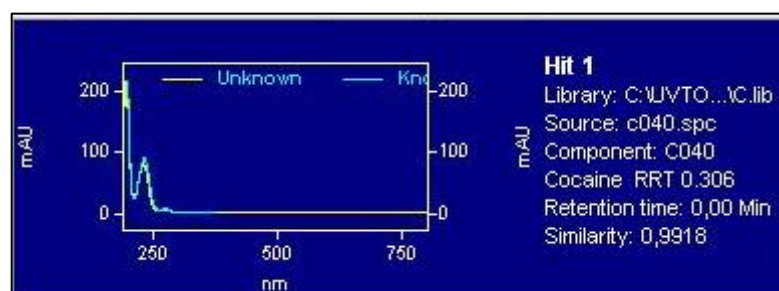
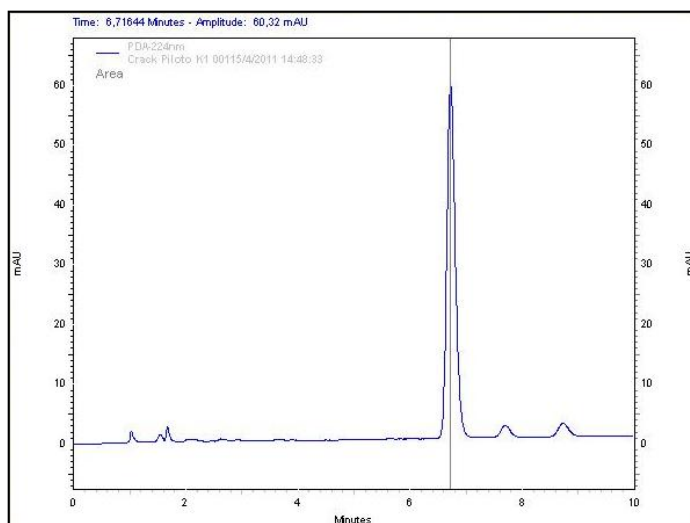


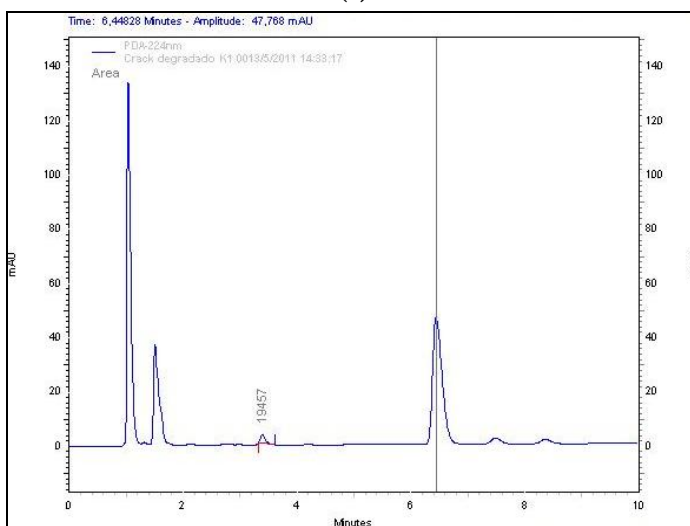
Figura 27 – Comparação de espectro de ultravioleta obtido após análise cromatográfica com o método desenvolvido de um pool de amostras de cocaína (crack) a 400 µg/mL com o espectro de ultravioleta de referência da biblioteca UVTox[®].

Para a confirmação da validação do parâmetro seletividade, as amostras Rk1 e Pf1 foram submetidas a degradação branda (hidrólise alcalina com NaOH a 0,1 molar e 80 °C por 10 minutos) e forte (hidrólise alcalina com NaOH a 1 molar e 100 °C por 20 minutos).

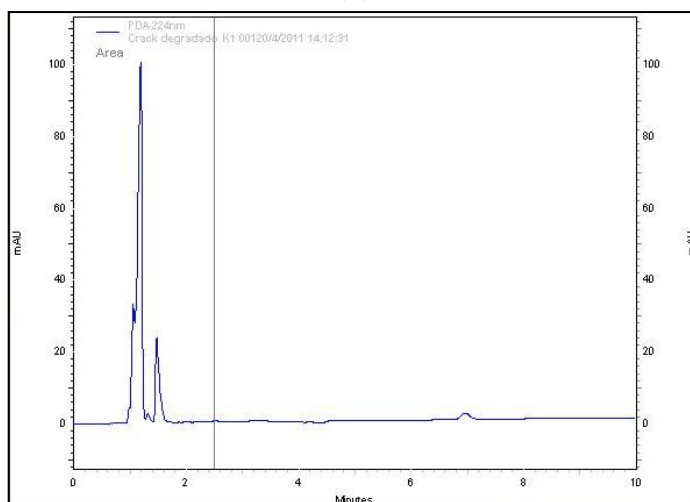
Nestas condições, as amostras de crack apresentaram o desaparecimento parcial e total do pico da cocaína (Figuras 28 e 29, págs. 63 e 64), mas nenhum dos interferentes assim formados apresentou tempo de retenção próximos ao da cocaína.



(a)

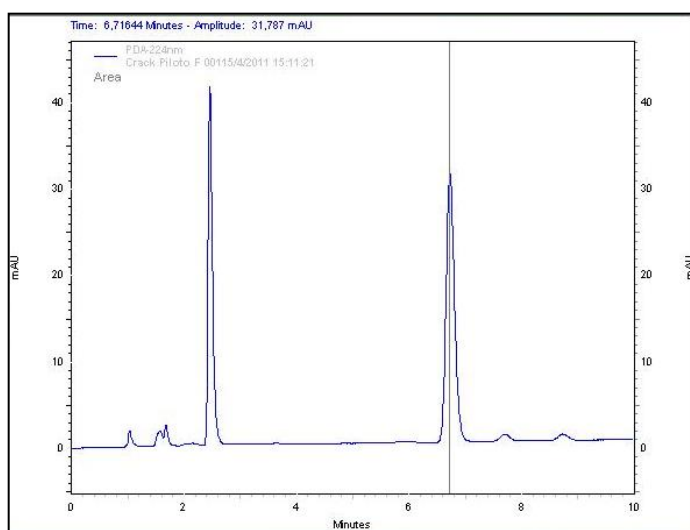


(b)

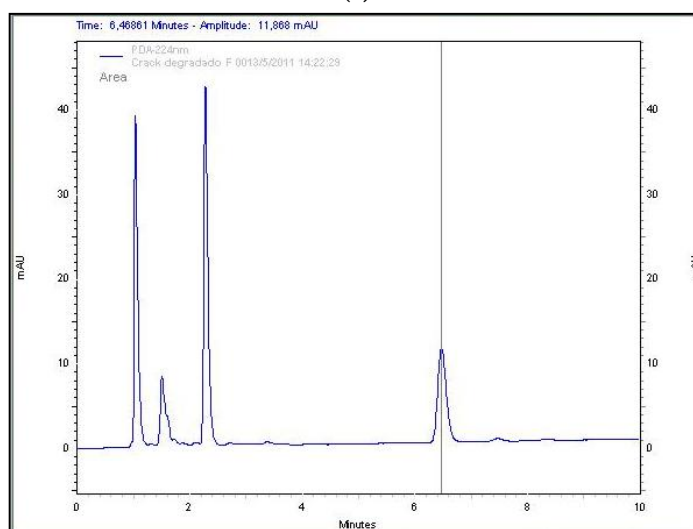


(c)

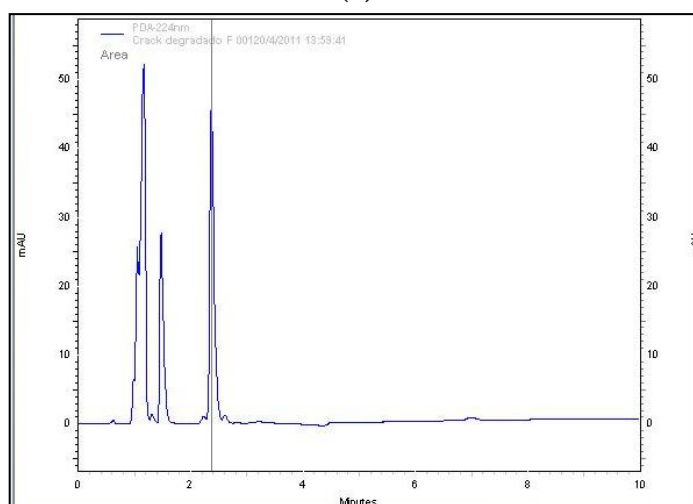
Figura 28 – Cromatograma da amostra íntegra de crack Rk1 a 80 µg/mL (a); sob degradação branda (b) e sob degradação forte (c).



(a)



(b)



(c)

Figura 29 – Cromatograma da amostra íntegra de crack Pf1 a 80 µg/mL (a); sob degradação branda (b) e sob degradação forte (c).

Foram avaliados também a seletividade frente a dois dos principais adulterantes relatados na literatura, a cafeína e procaína. Com o método desenvolvido a cafeína e procaína apresentaram tempos de retenção de 1,60 e 3,70 minutos, respectivamente (Figura 30 e Figura 31).

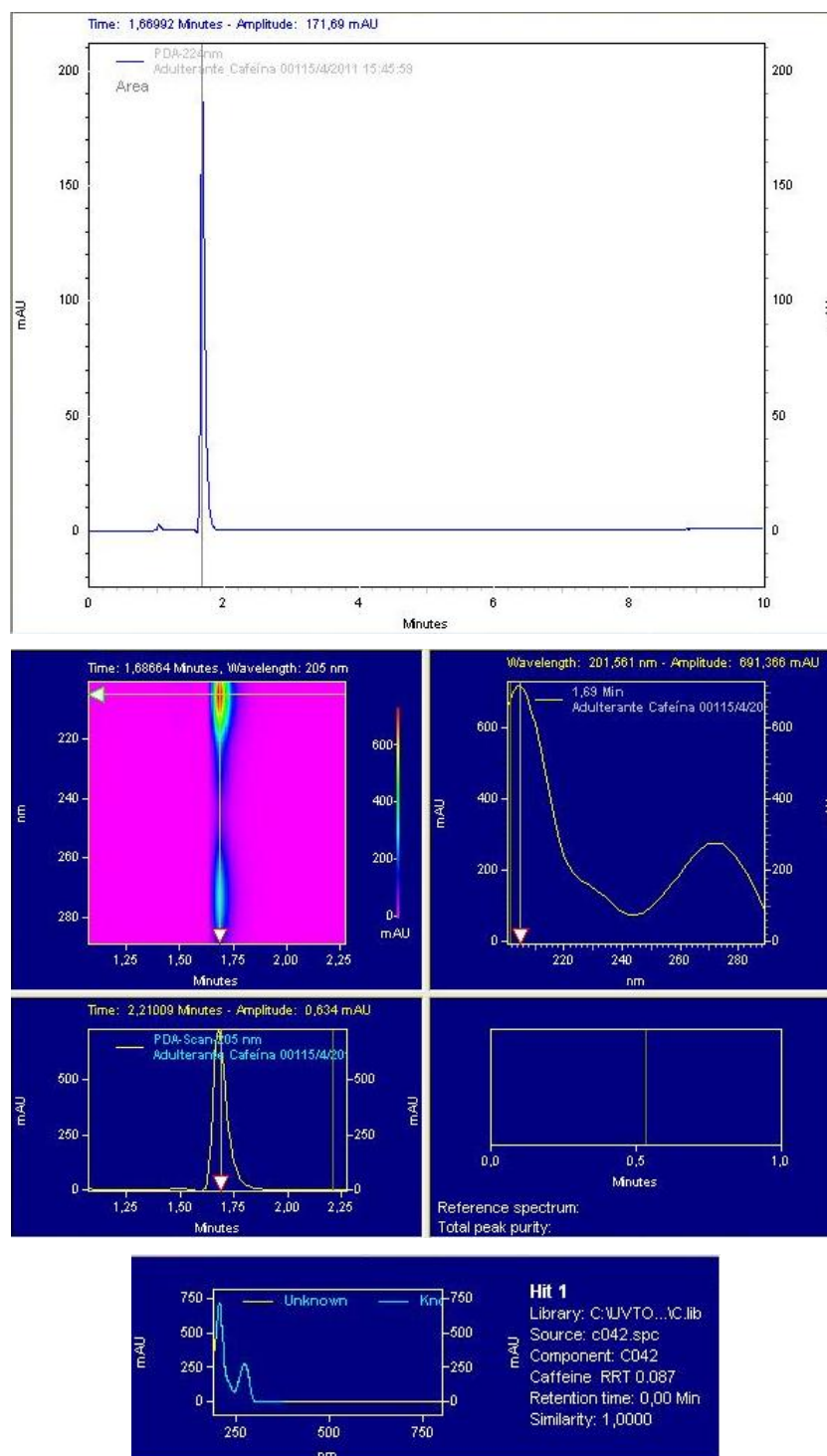


Figura 30 – Cromatograma, espectro de ultravioleta com detector de arranjo de fotodiodos e comparação com a biblioteca UVT^{ox}® de uma amostra de cafeína (40 µg/mL) analisada nas mesmas condições do método desenvolvido.

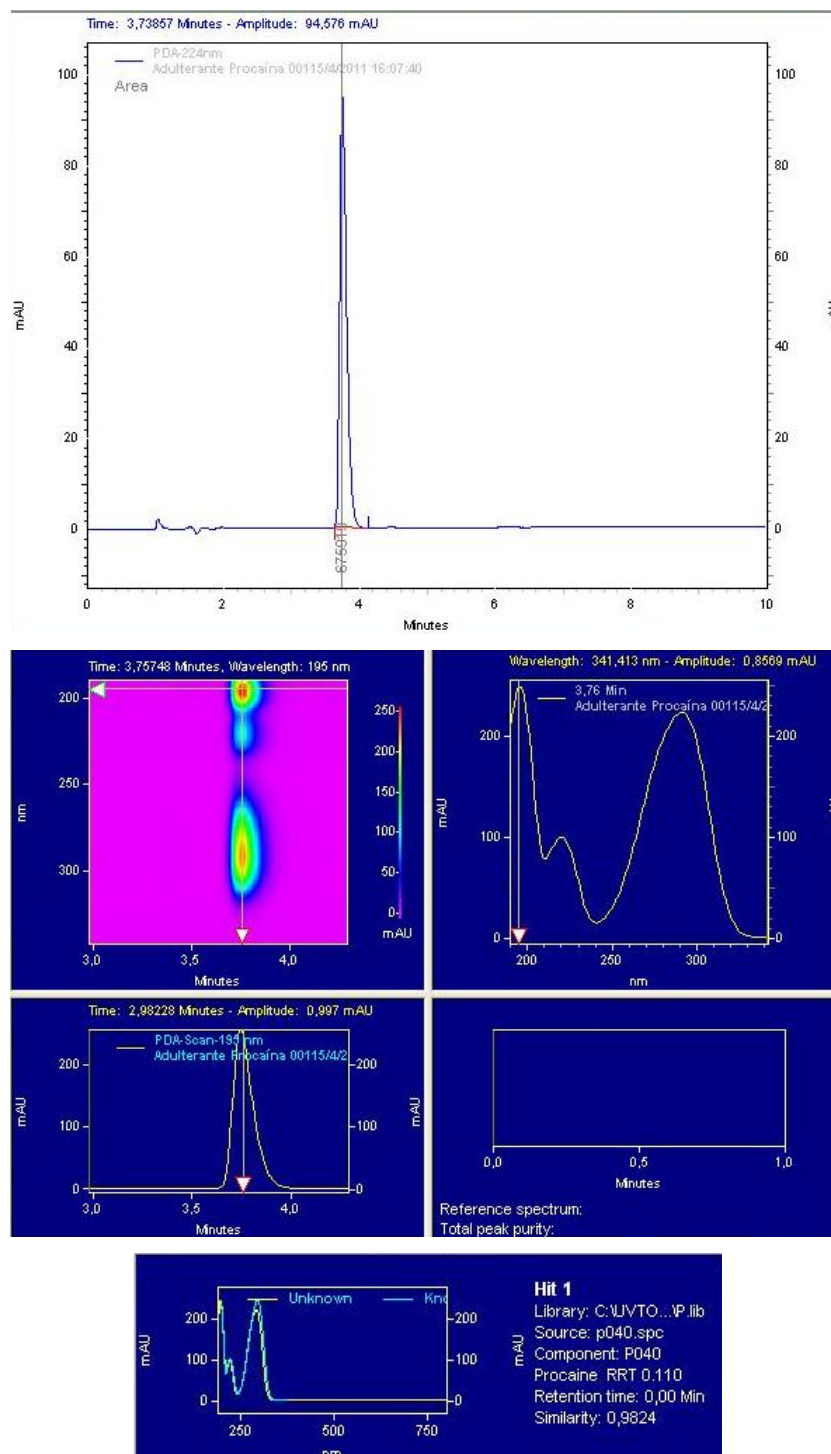


Figura 31 – Cromatograma, espectro de ultravioleta com detector de arranjo de fotodiodos e comparação com a biblioteca UVTox[®] de uma amostra de procaina (40 µg/mL) analisada nas mesmas condições do método desenvolvido.

b) Linearidade

As três curvas de calibração obtidas da cocaína apresentaram coeficiente de correlação (r^2) maior ou igual a 0,999, atendendo aos critérios estabelecidos pela Resolução da Anvisa nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 7 – Resultados dos ensaios de linearidade (n=3).

Ensaio de linearidade	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Inclinação	$4,26962 \times 10^{-5}$	$3,73980 \times 10^{-5}$	$4,35216 \times 10^{-5}$
Intercepto	1,03855	0,291813	0,520722
Coeficiente de correlação (r^2)	0,999734	0,999913	0,999558
Coeficiente de variação (%)	6,51579	5,03510	4,91499

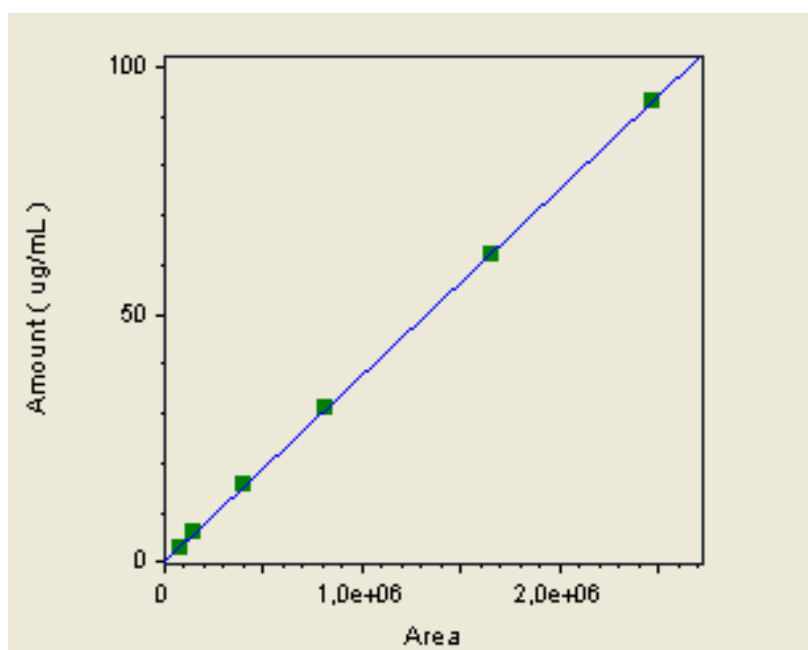


Figura 32 – Exemplo - curva de calibração do 2º dia.

c) Exatidão e Precisão

A Tabela 8 mostra os valores de exatidão e precisão (repetibilidade) do dia 1, para as concentrações de 3,4, 51,7 e 103,6 µg/mL de cocaína onde se observa o intervalo da exatidão para as concentrações, baixa, média e alta, de 95,7 a 99,5% e valores de precisão de até 7,0%, demonstrando valores dentro dos critérios estabelecidos pela Resolução ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 8 - Valores de exatidão e precisão para o teste de repetibilidade do 1º dia, para três concentrações de cocaína (n = 3).

Dia 1			
Amostras	Concentração nominal (µg/mL)		
n	3,4	51,7	103,6
1	3,1	51,4	102,6
2	3,4	51,6	102,6
3	3,5	51,5	102,1
Média	3,3	51,5	102,4
Exatidão (%)	95,7	99,5	98,8
Desvio de Padrão	0,2	0,1	0,3
Coeficiente de variação (%)	7,0	0,1	0,3

Na Tabela 9 são apresentados os valores de exatidão e precisão (repetibilidade) do dia 2, para as concentrações de 3,1, 46,5 e 93,0 µg/mL de cocaína onde se observa o intervalo da exatidão para as concentrações, baixa, média e alta, de 94,0 a 98,3% e valores de precisão de até 5,1%, demonstrando valores dentro dos critérios estabelecidos pela Resolução ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 9 - Valores de exatidão e precisão para o teste de repetibilidade do 2º dia, para três concentrações de cocaína (n = 3).

Dia 2			
Amostras	Concentração nominal (µg/mL)		
n	3,1	46,5	93,0
1	2,9	44,8	90,1
2	2,8	46,3	91,6
3	3,1	46,0	90,4
Média	2,9	45,7	90,7
Exatidão (%)	94,0	98,3	97,6
Desvio de Padrão	0,2	0,8	0,8
Coeficiente de variação (%)	5,1	1,8	0,9

A Tabela 10 mostra os valores de exatidão e precisão (repetibilidade) do dia 3, para as concentrações de 3,7, 55,8 e 111,3 µg/mL de cocaína onde se observa o intervalo da exatidão para as concentrações, baixa, média e alta, de 96,5 a 103,8% e valores de precisão de até 4,3%, demonstrando valores dentro dos critérios estabelecidos pela Resolução ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 10 - Valores de exatidão e precisão para o teste de repetibilidade do 3º dia, para três concentrações de cocaína (n = 3).

Dia 3			
Amostras	Concentração nominal (µg/mL)		
n	3,7	55,8	111,3
1	3,7	54,4	107,8
2	4,0	54,1	108,1
3	3,9	54,9	106,9
Média	3,9	54,5	107,6
Exatidão (%)	103,8	98,0	96,5
Desvio de Padrão	0,2	0,4	0,6
Coefficiente de variação (%)	4,3	0,8	0,6

d) Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) de cocaína calculados a partir dos resultados obtidos de três curvas de calibração utilizando as equações 12 e 13 (pág. 48) foram de 1,05 µg/mL para LOD e 3,51 µg/mL para LOQ.

A partir dos resultados da validação, o método desenvolvido de quantificação de cocaína em amostras de crack por CLAE-DAD apresentou-se exato, preciso, linear e bastante seletivo para o analito-alvo, sendo utilizado na quantificação das 47 amostras de crack.

5.2 RMNq-¹H

5.2.1 Desenvolvimento do método

Inicialmente, as amostras de crack designadas Ra3, Rk1 e Rk2 passaram por ensaios de solubilidade em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e metanol (CD₃OD) deuterado e as amostras apresentaram boa solubilidade nos solventes escolhidos.

Em seguida, para observação do perfil espectroscópico as amostras foram pesadas (10 mg) e diluídas em CDCl₃, sendo transferidas para tubos de RMN sem a adição de nenhuma SR interna. Um espectro de RMN-¹H representativo da amostra Ra3 em CDCl₃ encontra-se mostrado na Figura 33 a seguir.

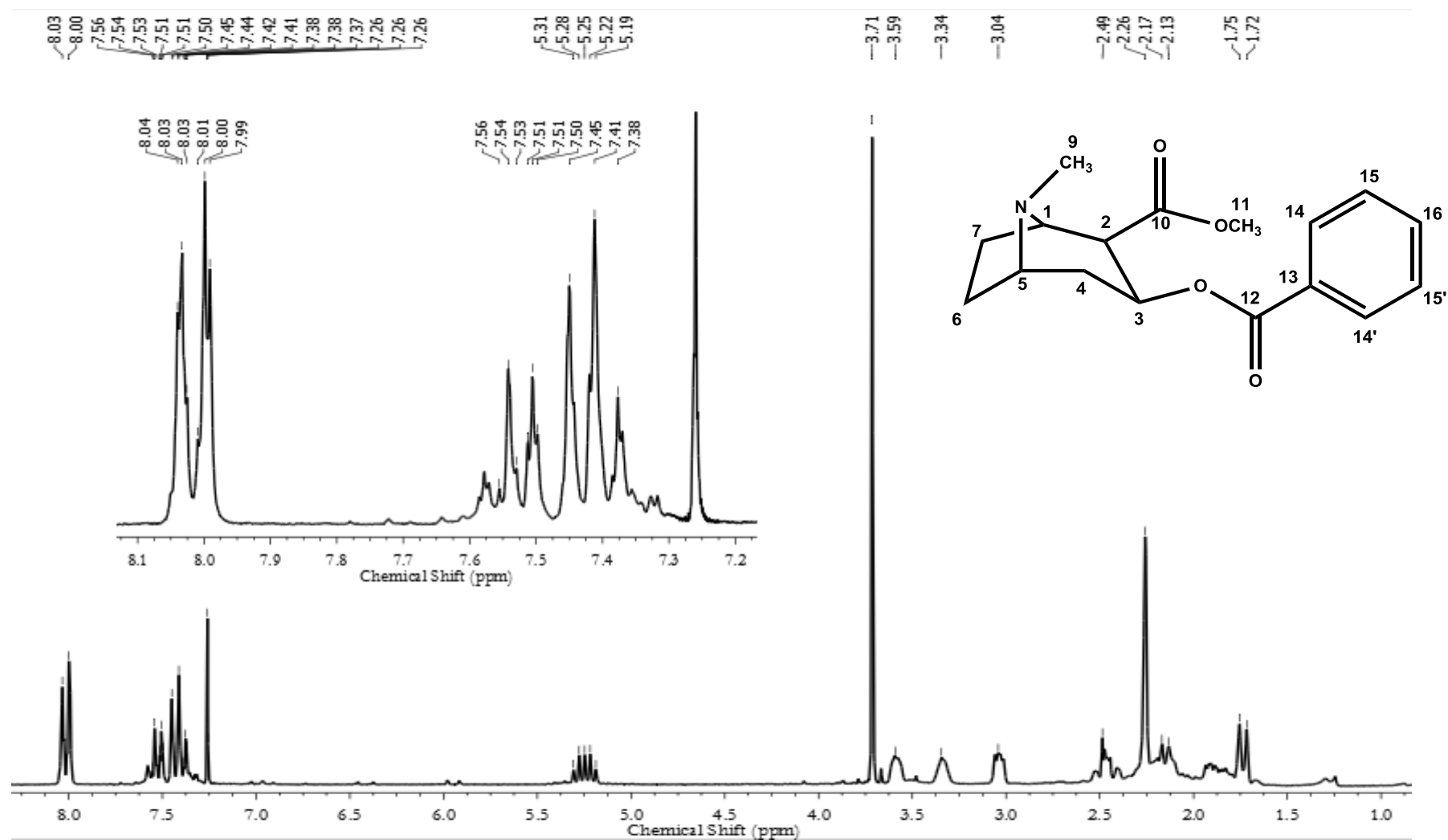
Figura 33 – Espectro de RMN-¹H da amostra Ra3 (200 MHz) em CDCl₃.

Tabela 11 – Resultado δ_H da cocaína em $CDCl_3$ e comparação com dados da literatura.

Numeração	δ_H da amostra Ra3 mult [J (Hz)]	δ_H da base livre [J (Hz)] (CARROLL, 1982)
H-1	3,34 sl	3,5 [3,3; 1,0]
H-2	3,00 sl [6,0]	3,0 [3,3; 6,0]
H-3	5,25 m [15,0; 6,0]	5,3 [6,0; 12,0; 6,0]
H-4 _{ax}	2,49 m [15,0; 6,0]	2,5 [12,0; 12,9; 1,8]
H-4 _{eq}		1,8 [6,0; 12,9; 3,0]
H-5	3,59 sl	3,3 [1,0; 1,8; 3,0]
H-6	1,72 sl	-
H-7	1,75 sl	-
H-9	2,26 s	2,2
H-11	3,71 s	3,7
H-14/H-14'	8,0 dd [8,0; 2,0]	-
H-15/H-15'	7,43 d [8,0]	-
H-16	7,53 t [8,0; 2,0]	-

Corroborando com o disposto na literatura (CARROLL, 1982), o espectro de RMN-¹H da cocaína apresentou absorções com maiores intensidades com δ_H 2,26 e 3,71 relativos a singletos de uma metila e uma metoxila em ambientes diferentes nas posições 9 e 11. δ_H de 2,26 pela ligação direta ao nitrogênio e δ_H 3,71 sofrendo desproteção por causa do efeito retirador de elétrons da carbonila da função éster.

O espectro apresenta sinais de absorção de sistema aromático monosubstituído com δ_H em 8,0 (dd) do H-14/14' acoplando-se em orto ($J = 8$ Hz) com H-15/15' e em meta ($J = 2$ Hz) com H-16. O H-16 em 7,53 ppm (em orto sendo tripleto ao acoplar-se com H-15/15' e duplete em meta com H-14, $J = 8,0$ e 2,0 Hz, respectivamente). O δ_H do H-15 em 7,43 (duplete, $J = 8,0$ Hz) mais protegido pela maior densidade eletrônica nas posições orto e para devido às contribuições das diversas formas de ressonância.

Interessante sinal do espectro da cocaína é o δ_H em 5,25 (m) relativo ao H-3 desprotegido pela ligação direta ao oxigênio. O H-3 acopla-se axial-axial com H-4 ($J = 15,0$ Hz) e axial-equatorial com H-4 e H-2 ($J = 6,0$ Hz).

Os sinais de hidrogênios de carbonos sp^3 protegidos podem ser atribuídos em δ_H 1,72 (aparentemente singlete) e 1,75 (aparentemente singlete) aos H-6 e H-7 do anel tropano. Da mesma forma, o sinal δ_H 2,49 (m) pode ser atribuído aos H-4 em posição β a elemento eletronegativo.

O sinal em δ_H 3,0 (triplete largo) pode ser atribuído ao H-2 por estar desprotegido pela ligação direta com a carbonila de éster e os sinais em δ_H 3,34 (singleto largo) e 3,59 (singleto largo) podem ser atribuídos aos hidrogênios restantes do anel tropano nas posições H-1 e H-5.

Com a finalidade de comparar as metodologias de CLAE-DAD utilizando coluna de fase reversa e RMNq-¹H, a amostra do padrão de referência secundário foi solubilizada em metanol-d₄ devido ser este solvente deuterado solúvel na fase móvel do método de CLAE-DAD desenvolvido (0,01% de trietilamina em água/acetonitrila (45:55)). A amostra conteve também o ácido maléico como SR interna e apresentou o perfil espectroscópico de RMN-¹H da Figura 34.

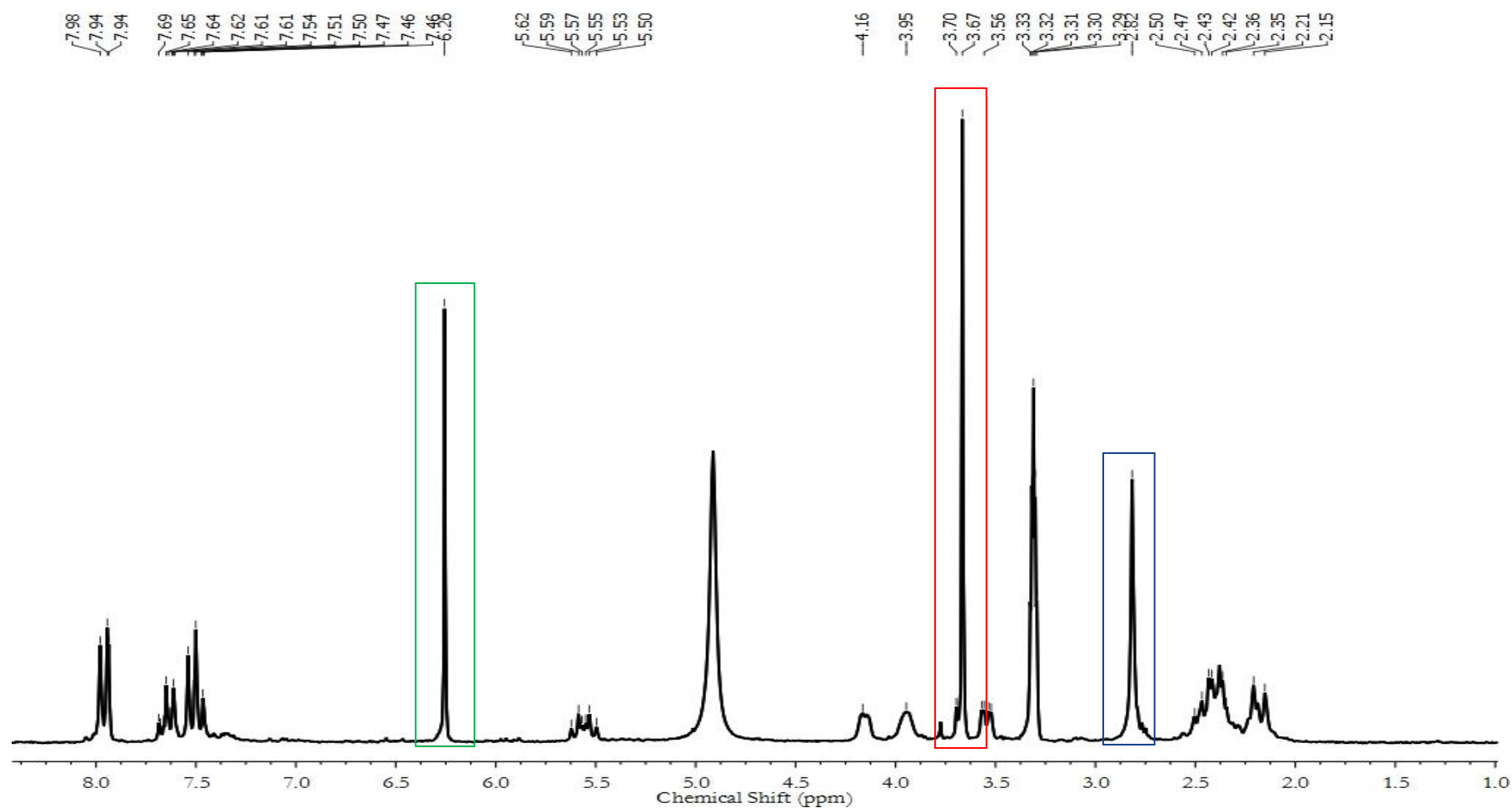


Figura 34 – Espectro de RMN-¹H do padrão de referência secundário (200 MHz) em CD₃OD contendo ácido maléico. Destaque para sinais utilizados no desenvolvimento do método.

Os sinais buscados, para fins de quantificação durante o desenvolvimento do método, foram os singletos relativos às metilas em δ_H 3,67 (destaque em vermelho na Figura 34, pág. 74) e em 2,82 (destaque em azul na Figura 34) por serem sinais com maior intensidade frente a multipletos, ou seja, a relação sinal:ruído é maior do que de outros sinais aumentando o limite de detecção e quantificação do método (MALZ, 2005).

Sinais sobrepostos aos dois singletos das metilas da cocaína inviabilizaram a quantificação por causarem erros nas áreas integradas (vide Figura 35). Contudo, o sinal intenso em δ_H 6,26 do ácido maléico foi adquirido isolado e bem definido para quantificação. A sobreposição de sinais foi apresentada como uma das maiores fontes de erros da quantificação em RMNq por Griffith & Irving (1998) que citam, além da sobreposição de sinais, outras fontes de grande erro na quantificação como a preparação da amostra e parâmetros de aquisição não adequados (GRIFFITHS, 1998). Por sua vez, Holzgrabe (2010) concluiu que a quantificação com sinais parcialmente sobrepostos é um método de quantificação limitado e inexato (HOLZGRABE, 2010).

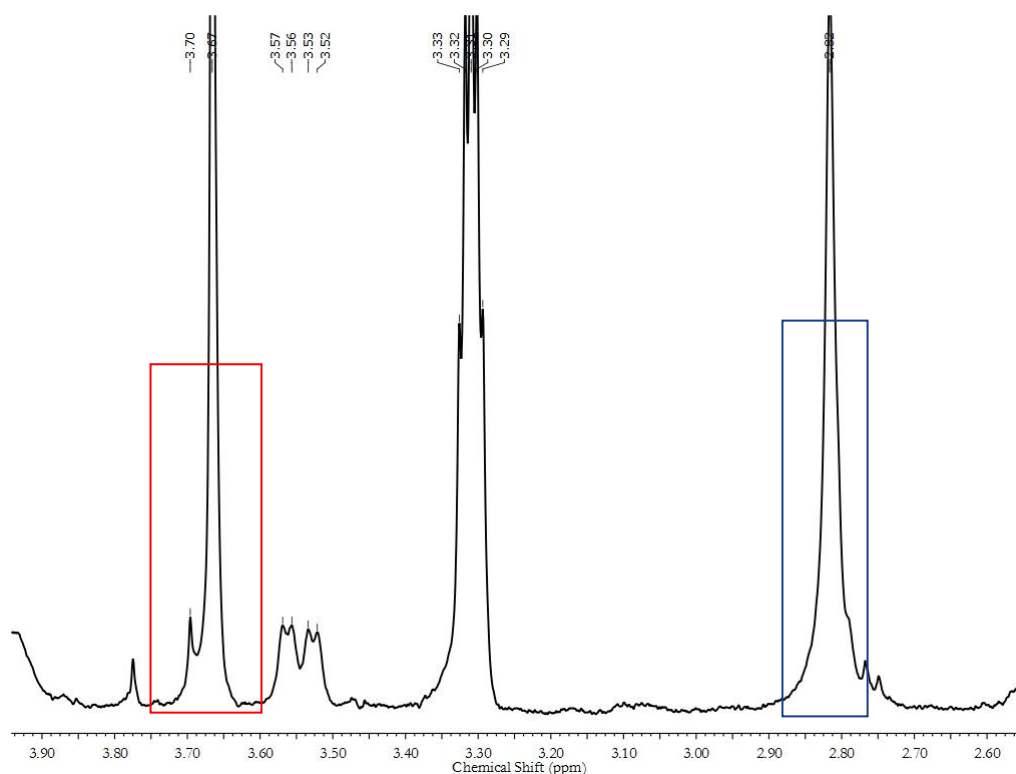


Figura 35 – Espectro de RMN-¹H do padrão de referência secundário (200 MHz) em CD₃OD contendo ácido maléico, destacados os sinais das metilas da cocaína com sobreposição de sinais. Escala vertical ajustada para visualização dos sinais menores e definição dos sinais na linha de base.

A resolução dos sinais é proporcional a intensidade do campo magnético aplicado (CLARIDGE, 1999; GRIFFITHS, 1998; PAULI, 2005), assim, a amostra foi submetida ao espectrômetro de 500 MHz a fim de observar-se a separação dos sinais sobrepostos. A aplicação do campo maior (11,7 T) não separou os sinais sobrepostos e a quantificação não foi possível devido aos erros na integração. Além do que, a volatilidade do CD_3OD forçou uma preparação, acondicionamento e preservação das amostras mais cuidadosa.

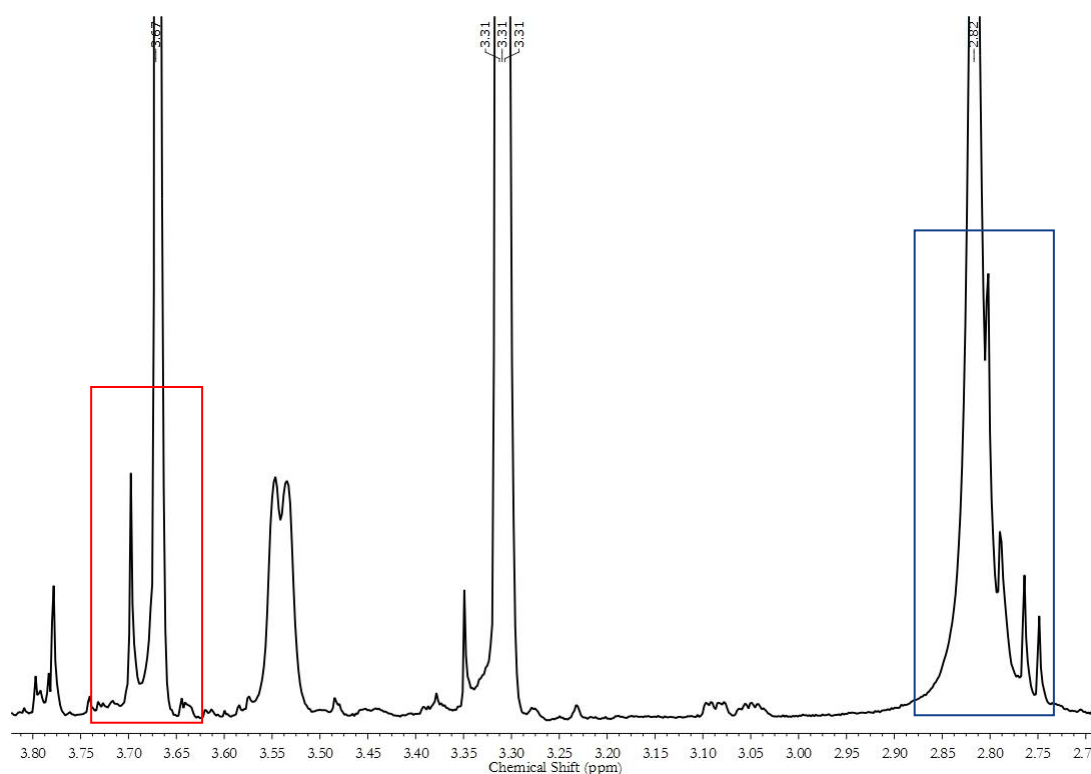


Figura 36 – Espectro de RMN- ^1H do padrão de referência secundário (500 MHz) em CD_3OD contendo ácido maléico, destacados os sinais das metilas da cocaína com sobreposição de sinais. Escala vertical ajustada para visualização dos sinais menores e definição dos sinais na linha de base.

A sobreposição de sinais elevou a área integrada relativa aos sinais da cocaína. Testando a alteração do solvente deuterado como solução para resolver a sobreposição, foram preparadas as amostras de crack Ra3, Rm1 e Pr1 (base livre) em óxido de deutério através de reação ácido-base da cocaína com cloreto de deutério. Além da motivação acima, nova abordagem foi adotada por outras duas questões: a possibilidade de utilização de um solvente deuterado solúvel na fase móvel do método de CLAE-DAD e a baixa volatilidade do óxido de deutério frente ao CD_3OD (GUNTHERT, 1994). Para esta abordagem foi utilizado TSP como SR interna.

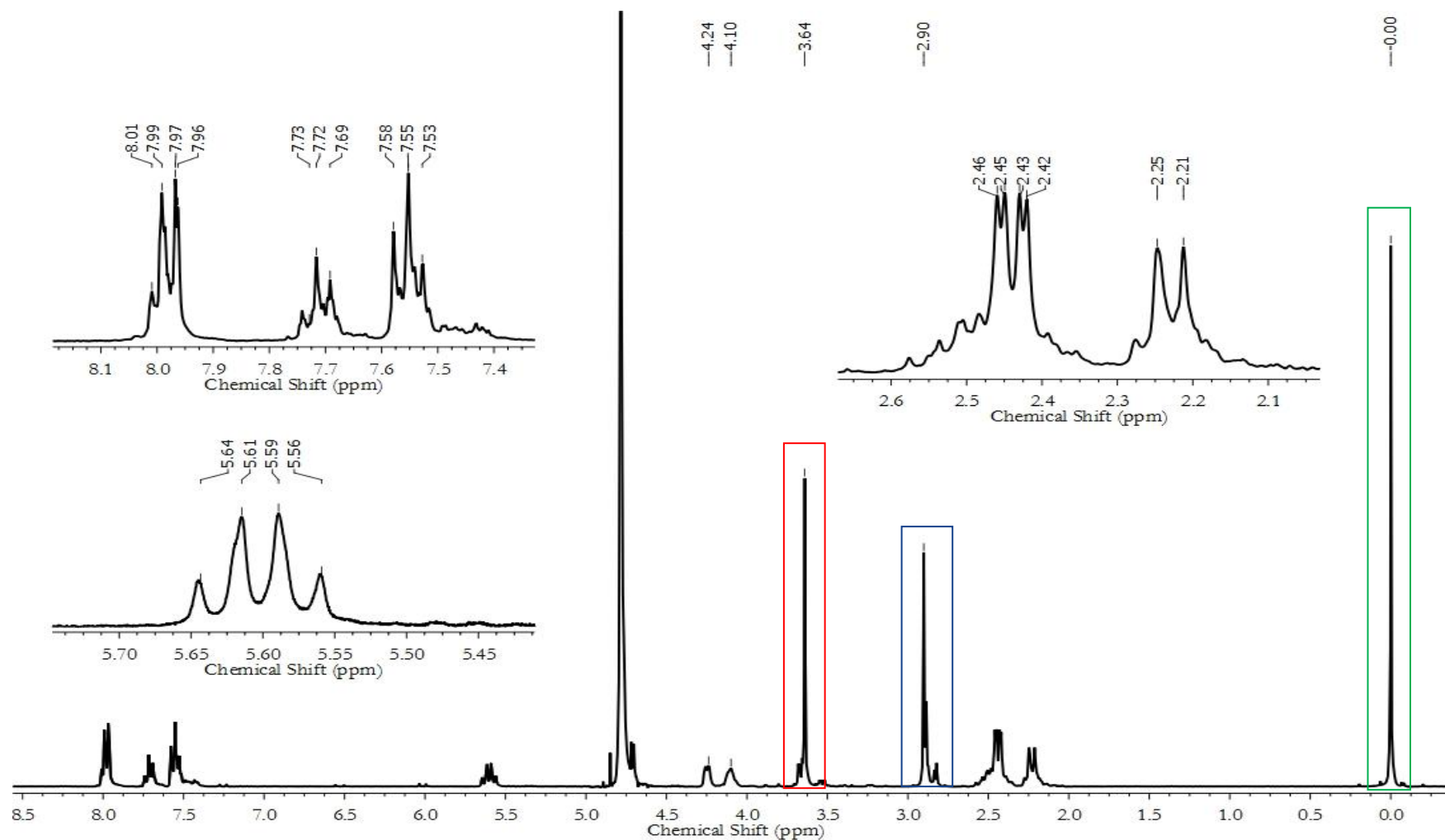


Figura 37 – Espectro de RMN-¹H da amostra Pr1 (200 MHz) em D₂O acidificado com DCl contendo TSP. Destaque para sinais utilizados no desenvolvimento do método.

Contudo, quando os espectros das amostras Ra3, Rm1 e Pr1 foram adquiridos em 200 MHz com D₂O acidificado e TSP, os singletos das metilas em δ_H 3,63 e 2,90 ppm ainda apresentaram sobreposição de sinais (Figura 38). Por sua vez, as aquisições em campo mais forte, no espectrômetro de 500 MHz, definiram os sinais e levaram a menor sobreposição dos sinais, principalmente o sinal em δ_H 3,64 ppm (vide Figura 39).

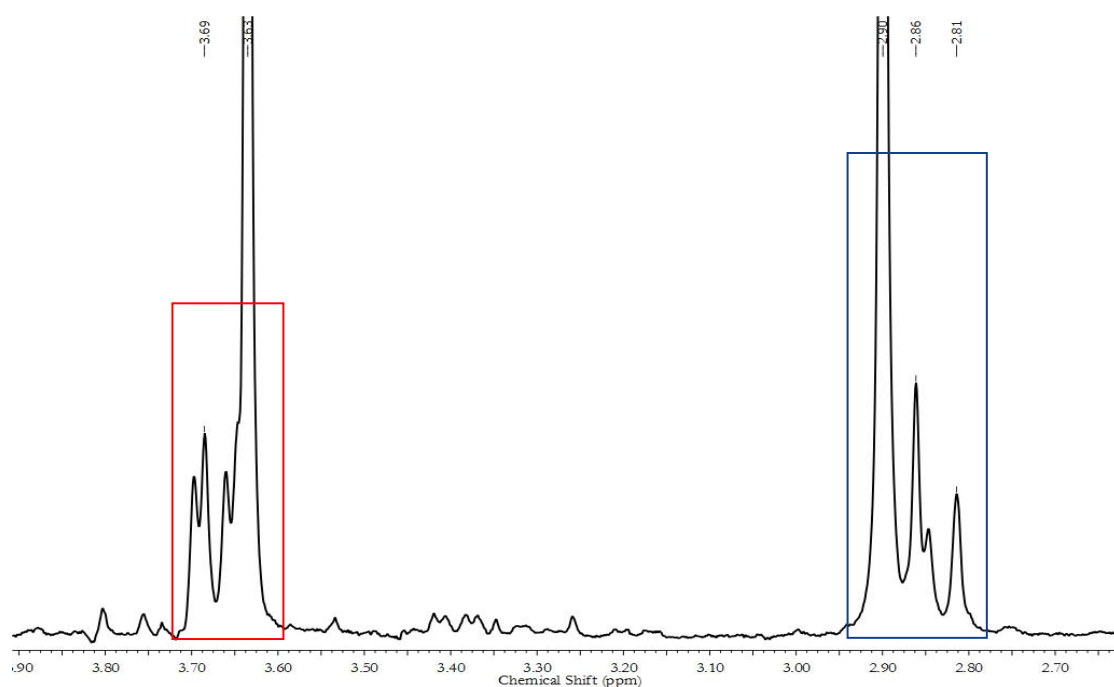


Figura 38 – Espectro de RMN-¹H da amostra Ra3 (200 MHz) em D₂O contendo TSP como SR interna, destacados os sinais das metilas da cocaína com sobreposição de sinais. Escala vertical ajustada para visualização dos sinais menores e definição dos sinais na linha de base.

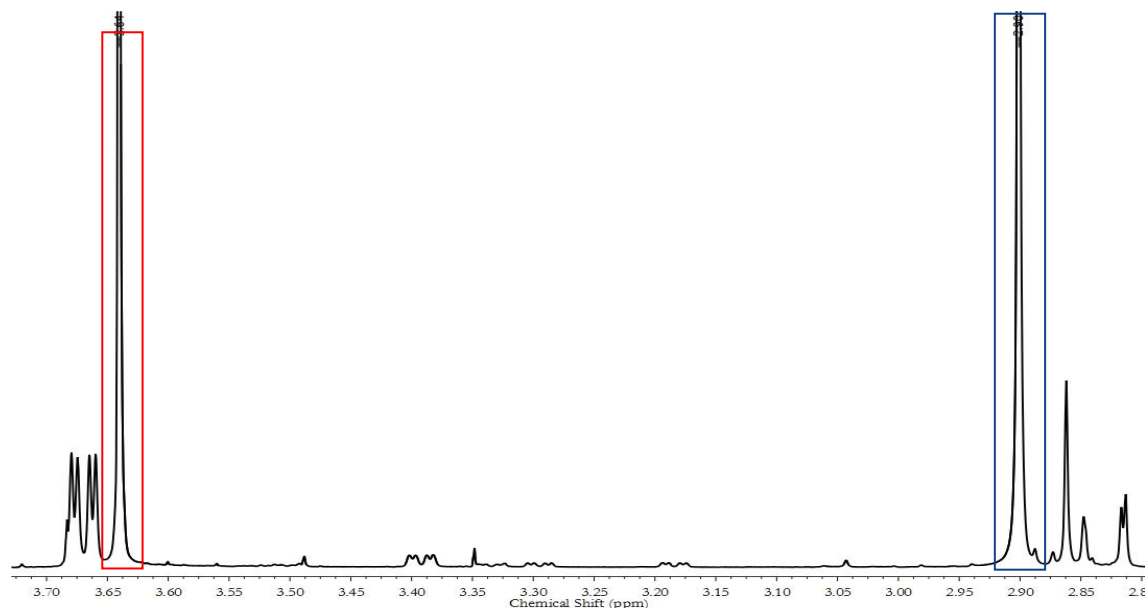


Figura 39 – Espectro de RMN-¹H da amostra Ra3 (500 MHz) em D₂O contendo TSP como SR interna, destacados os sinais das metilas da cocaína com menor sobreposição de sinais. Escala vertical ajustada para visualização dos sinais menores e definição dos sinais na linha de base.

O *shimming* realizado com técnicas automáticas de gradiente são mais rápidas, contudo este trabalho realizou o *shimming* de modo manual com maior gasto de tempo (BARJAT, 1997; SUKUMAR, 1997). Além do que, dificuldades na realização do *shimming* feito com o sinal do solvente (óxido de deutério) e do TSP motivaram a aquisição dos espectros com o rotor a 20 Hz gerando, assim, as *spinning sidebands*, não cumprindo o indicado por (BORER, 1998).

A partir dos resultados foi possível fazer a determinação do teor de cocaína nas amostras de crack Ra3, Rm1 e Pr1 com a aplicação de macro desenvolvida por Dr. Patrick Hays para obtenção das áreas integradas de 10 regiões do espectro de RMNq-¹H da cocaína. Este método desenvolvido foi adotado na determinação do teor de cocaína nas 47 amostras de crack.

5.2 Pureza de amostras de crack por CLAE-DAD x RMNq-¹H e identificação dos principais adulterantes por CG-EM e RMN-¹H

As 47 amostras de crack foram quantificadas inicialmente pelo método desenvolvido e validado de CLAE-DAD. O teor médio de cocaína em cada amostra está plotado no gráfico abaixo e discriminado na Tabela 12 (pág. 80).

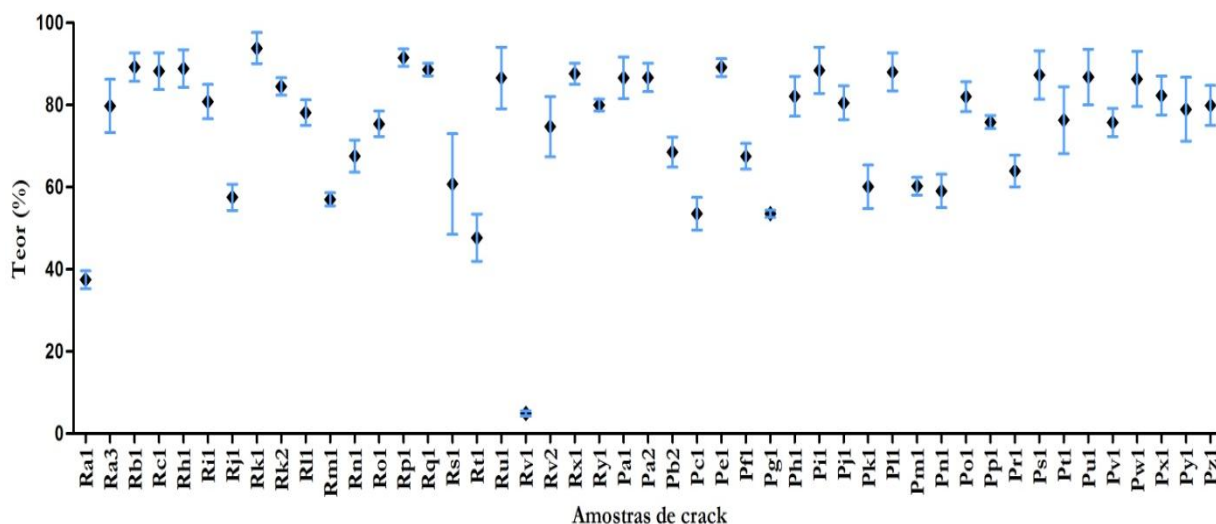


Gráfico 1 – Teor médio de cocaína em cada amostra de crack por CLAE-DAD com intervalos de confiança 95% (n=3).

Os resultados das três quantificações foram compilados ao fazer-se a média dos três resultados de cada amostra confrontando-se os dados com as quantidades de cocaína

considerando-se 100% de pureza e obtido o coeficiente de variação (%) e o IC95%. O método apresentou coeficientes de variação dos resultados menores que 5,0% com exceção das amostras Rs1 (8,1%) e Rv1 (5,4%).

Tabela 12 – Concentração nominal de cocaína, coeficiente de variação e IC95% dos dados de CLAE-DAD.

Amostra	Concentração estimada de cocaína em 100% (µg/mL)	Concentração média obtida por CLAE-DAD (µg/mL)	Teor médio de cocaína (%)	Coeficiente de variação (%)	Intervalo de confiança de 95% (%) n = 3
Ra1	130,6	48,9	37,4	2,4	35,3 - 39,6
Ra3	121,1	96,6	79,7	3,3	73,3 - 86,2
Rb1	116,7	104,0	89,2	1,6	85,7 - 92,6
Rc1	121,7	107,3	88,2	2,1	83,7 - 92,7
Rh1	129,4	115,0	88,8	2,1	84,3 - 93,4
Ri1	120,6	97,4	80,8	2,1	76,6 - 85,0
Rj1	115,0	66,1	57,5	2,2	54,3 - 60,7
Rk1	115,6	108,4	93,8	1,6	90,1 - 97,6
Rk2	111,1	93,9	84,5	1,0	82,4 - 86,6
RI1	113,9	89,0	78,1	1,6	75,0 - 81,2
Rm1	116,1	66,2	57,0	1,1	55,4 - 58,7
Rn1	121,1	81,8	67,5	2,3	63,6 - 71,5
Ro1	117,8	88,8	75,4	1,7	72,3 - 78,5
Rp1	112,2	102,7	91,5	0,9	89,4 - 93,6
Rq1	116,7	103,4	88,6	0,7	87,0 - 90,1
Rs1	117,2	71,2	60,7	8,1	48,5 - 73,0
Rt1	114,4	54,6	47,7	4,9	41,9 - 53,5
Ru1	115,0	99,5	86,5	3,5	79,0 - 94,1
Rv1	113,9	5,6	4,9	5,4	4,3 - 5,6
Rv2	114,4	85,5	74,7	4,0	67,3 - 82,1
Rx1	128,9	112,9	87,6	1,2	85,0 - 90,1
Ry1	116,7	93,3	79,9	0,7	78,5 - 81,4
Pa1	129,4	112,1	86,6	2,4	81,5 - 91,6
Pa2	126,7	109,8	86,7	1,6	83,2 - 90,1
Pb2	115,6	79,2	68,5	2,2	64,8 - 72,2
Pc1	128,9	69,0	53,5	3,0	49,5 - 57,5
Pe1	113,9	101,5	89,1	1,0	86,9 - 91,3
Pf1	130,0	87,7	67,5	1,9	64,3 - 70,6
Pg1	119,4	63,9	53,5	0,7	52,7 - 54,4
Ph1	125,0	102,6	82,1	2,4	77,3 - 87,0
Pi1	120,0	106,1	88,4	2,6	82,8 - 94,0
Pj1	128,9	103,7	80,5	2,1	76,3 - 84,6
Pk1	111,1	66,7	60,0	3,5	54,8 - 65,3
Pl1	118,9	104,6	88,0	2,1	83,4 - 92,6
Pm1	118,9	71,6	60,2	1,4	58,1 - 62,4
Pn1	120,0	70,9	59,1	2,8	55,0 - 63,1
Po1	112,8	92,5	82,0	1,8	78,3 - 85,7
Pp1	112,2	85,1	75,8	0,8	74,2 - 77,4
Pr1	116,7	74,6	63,9	2,4	60,1 - 67,8
Ps1	123,3	107,6	87,3	2,7	81,3 - 93,2
Pt1	122,8	93,7	76,3	4,3	68,2 - 84,4
Pu1	130,0	112,8	86,8	3,2	80,0 - 93,5
Pv1	115,6	87,5	75,7	1,8	72,3 - 79,1
Pw1	131,7	113,6	86,3	3,1	79,6 - 93,0
Px1	129,4	106,5	82,3	2,3	77,6 - 87,0
Py1	120,6	95,2	79,0	4,0	71,2 - 86,7
Pz1	117,8	94,0	79,8	2,5	75,0 - 84,7

Dos resultados obtidos, 45 das 47 amostras de crack (96%) apresentaram teor médio de cocaína superior a 40% e 39 amostras (83%) com teor superior a 60%. 22 amostras (47%) apresentaram teor superior a 80% (vide Gráfico 2).

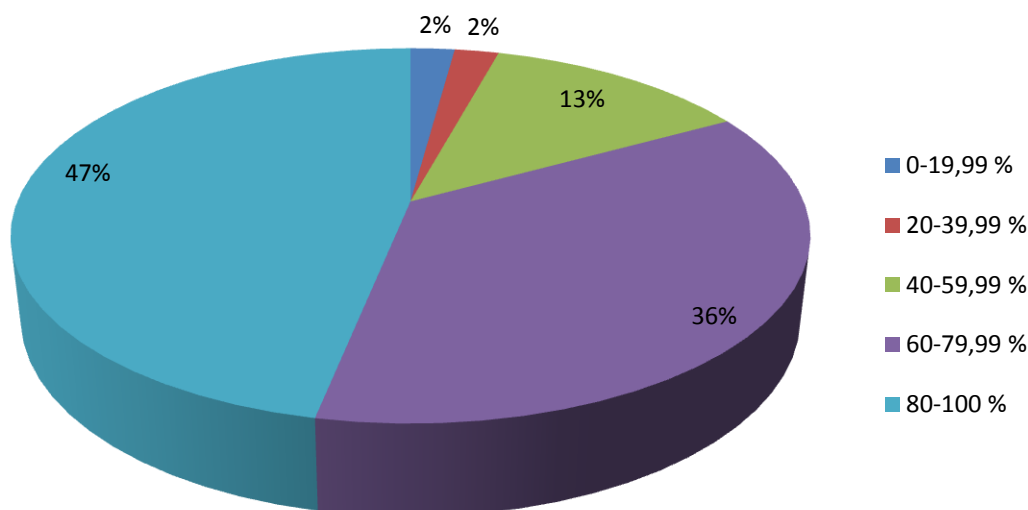


Gráfico 2 – Distribuição das amostras apreendidas de acordo com as faixas de teor de cocaína pelo método de CLAE-DAD.

As amostras Ra1 e Rv1 apresentaram teor médio de cocaína inferior a 40%, sendo que a amostra Rv1 apresentou teor de apenas 4,9%. Por outro lado, as amostras Rk1 e Rp1 apresentaram os maiores teores médios, com valores superiores a 90% de cocaína.

O teor médio das 47 amostras analisadas por CLAE-DAD foi de 74,4% de cocaína, valor próximo ao de Fukushima (2010) de 71,3% determinado em 404 “pedras” de apreensões da região metropolitana de São Paulo no período de tempo de vinte meses (entre os anos de 2008 a 2009) (FUKUSHIMA, 2010).

O teor médio também aproxima-se dos teores de amostras apreendidas em operações policiais na Inglaterra no ano de 2004 publicados por Schifano & Corkery (2008). O mesmo estudo apresenta teores de cocaína em amostras de crack entre os anos de 1991 e 2004 que foram decrescendo quase linearmente entre 90,75% e 63,67% no período citado. Por outro lado, as amostras apreendidas na alfândega inglesa mantiveram teores médios de 80% entre os anos de 1997 e 2004 (SCHIFANO, 2008).

Observa-se que, o teor médio de cocaína nas 47 amostras analisadas por CLAE-DAD (74,4%) foi bem superior ao teor encontrado em quatro amostras de crack apreendidas pela

polícia do estado de São Paulo (entre 13,6% e 21,6%) (OLIVEIRA, 2009) e ao teor mediano de 22% de cocaína em 343 amostras analisadas na França em 2010 (EVRARD, 2010).

Segundo trabalho do *Office of National Drug Control Policy* (ONDCP) pertencente ao *Executive Office of the President of United States*, amostras de crack apreendidas foram divididas em três faixas (menor que 1 g, 1 a 15 g e maior que 15 g), e analisadas entre os anos de 1986 e 2003. Estas amostras apresentaram purezas de 68 a 87% para 1ª faixa, 62 a 84% para 2ª faixa e 50 a 75% para a 3ª faixa, ou seja, amostras apreendidas em quantidades menores apresentaram pureza maior que amostras apreendidas em maior quantidade (ONDCP, 2004). Levando-se em consideração que as 47 amostras analisadas por este trabalho foram apreendidas em quantidades sempre inferiores a 10 g, os resultados estão concordantes com os do trabalho do ONDCP.

Os dados utilizados pelo ONDCP foram coletados do *System to Retrieve Information from Drug Evidence* (STRIDE) que é um banco de dados do *Drug Enforcement Agency* (DEA) dos Estados Unidos. O banco de dados STRIDE reúne os dados de análises de drogas por laboratórios oficiais americanos. Dados atualizados do STRIDE apontam uma redução na pureza média de cocaína nas amostras apreendidas e analisadas, entre 59 a 67%, a partir de março de 2007 (DEA, 2012).

A cocaína na sua forma de cloridrato é a forma mais frequentemente e amplamente adulterada e diluída. Uma vez que o cloridrato de cocaína é uma fonte para a produção do crack, é de supor que o crack também apresente produtos de ocorrência durante os processos de obtenção, adulterantes e diluentes em sua composição semelhantes ao cloridrato de cocaína (FUKUSHIMA, 2010), assim adulterantes como a benzocaína, fenacetina, lidocaína, hidroxizina, diltiazem e principalmente cafeína foram pesquisados pelo método de CG-EM.

Os principais adulterantes identificados pelo método de CG-EM foram a benzocaína e a fenacetina, além de outros produtos naturais da planta *E. coca*, Lam. como cinamoilcocaínas e tropacocaína (vide Tabela 13, pág. 83). A cafeína não foi detectada com o método proposto de CG-EM em nenhuma das 13 amostras analisadas.

A cocaína foi identificada em todas as amostras analisadas por CG-EM com tempo de retenção de 6,22/6,24 minutos.

Tabela 13 – Adulterantes e outras substâncias identificados por comparação dos espectros de massas com espectros da biblioteca NIST® em 13 amostras de crack por CG-EM.

SUBSTÂNCIA/RT	AMOSTRAS DE CRACK												
	Rm1	Rn1	Rs1	Rv1	Pb2	Pc1	Pf1	Pg1	Pk1	Pm1	Pr1	Pv1	Pw1
Ácido cinâmico 3,38	X	X			X		X	X	X	X			
Ecgonidina 3,43 – 3,44	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ecgonina 3,89					X								
Benzocaína 4,26		X ^b											
Fenacetina 4,68 – 4,69	X ^a	X ^a	X ^a		X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	X ^a	
Tropacocaína 5,59	X	X	X	X			X		X			X	X
Cocaína 6,22 – 6,24	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Trans-cinamoilcocaína 6,76 – 6,78	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c
Cinamoilcocaína 7,26	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c	X ^c

^aIdentificação de fenacetina confirmada por RMN-¹H.^bIdentificação de benzocaína confirmada por RMN-¹H (vide texto).^cIdentificação de sinais de RMN-¹H em todas as amostras analisadas.

Na amostra Rv1, a baixa intensidade dos sinais de RMN-¹H da cocaína corrobora o baixo teor encontrado pelo método de CLAE-DAD. O espectro de RMN-¹H da amostra Rv1 evidenciou singletos em δ_H 3,31, 3,49 e 3,95 condizentes com sinais dos hidrogênios das metilas das posições 13, 14 e 10, respectivamente, da substância cafeína (vide Figura 40, pág. 84).

Por outro lado, o tripleto presente em δ_H 1,35 – 1,37 ppm associado ao singlete em torno de δ_H 2,1 condizentes com os hidrogênios das posições 9 e 12 do adulterante fenacetina, foram utilizados como sinais norteadores deste adulterante (intensidades variadas destes sinais) em 19 amostras de crack por RMN-¹H.

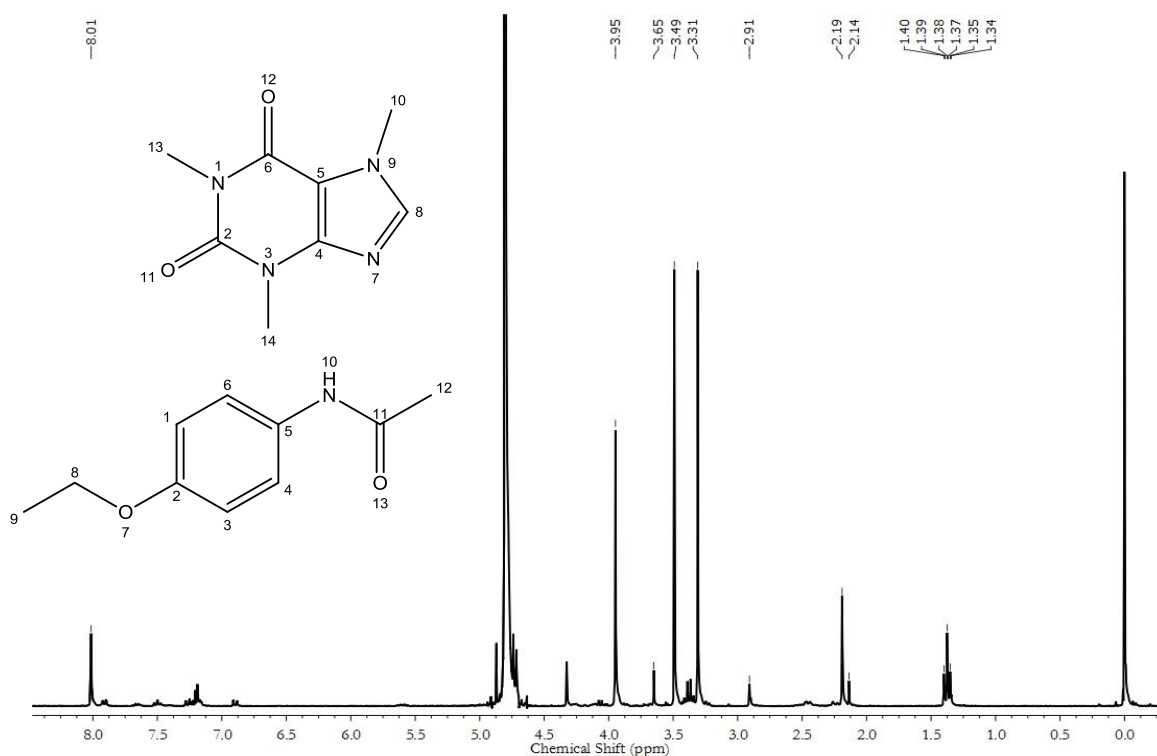


Figura 40 – Espectro de RMN-¹H da amostra Rv1 (300 MHz) em D₂O acidificado contendo TSP como SR interna e os adulterantes cafeína e fenacetina.

Em 11 das 13 amostras selecionadas para as análises por CG-EM, a fenacetina apresentou maior intensidade dos picos cromatográficos com tempo de retenção em 4,68/4,69 minutos, principalmente nas amostras Rm1 (Figura 42, pág. 85) e Pc1 (Figura 43, pág. 86). A amostra Rm1 destacou-se quanto a intensidade dos sinais de RMN-¹H da fenacetina frente aos sinais da cocaína, resultado concordante com o cromatograma obtido por CG-EM.

Em trabalhos publicados na década de 90, a cafeína foi o adulterante mais encontrado em amostras de cocaína na forma de pó (BARRIO, 1997; FUCCI, 1998). Contudo, dados de trabalhos atuais corroboram com a adulteração de amostras de cocaína pela adição de fenacetina e outras substâncias (BRUNT, 2009). Evrard *et al.* (2010) identificou a fenacetina como adulterante mais comum, presença em 54% de 343 amostras apreendidas (EVRARD, 2010), condizente com os achados deste trabalho.

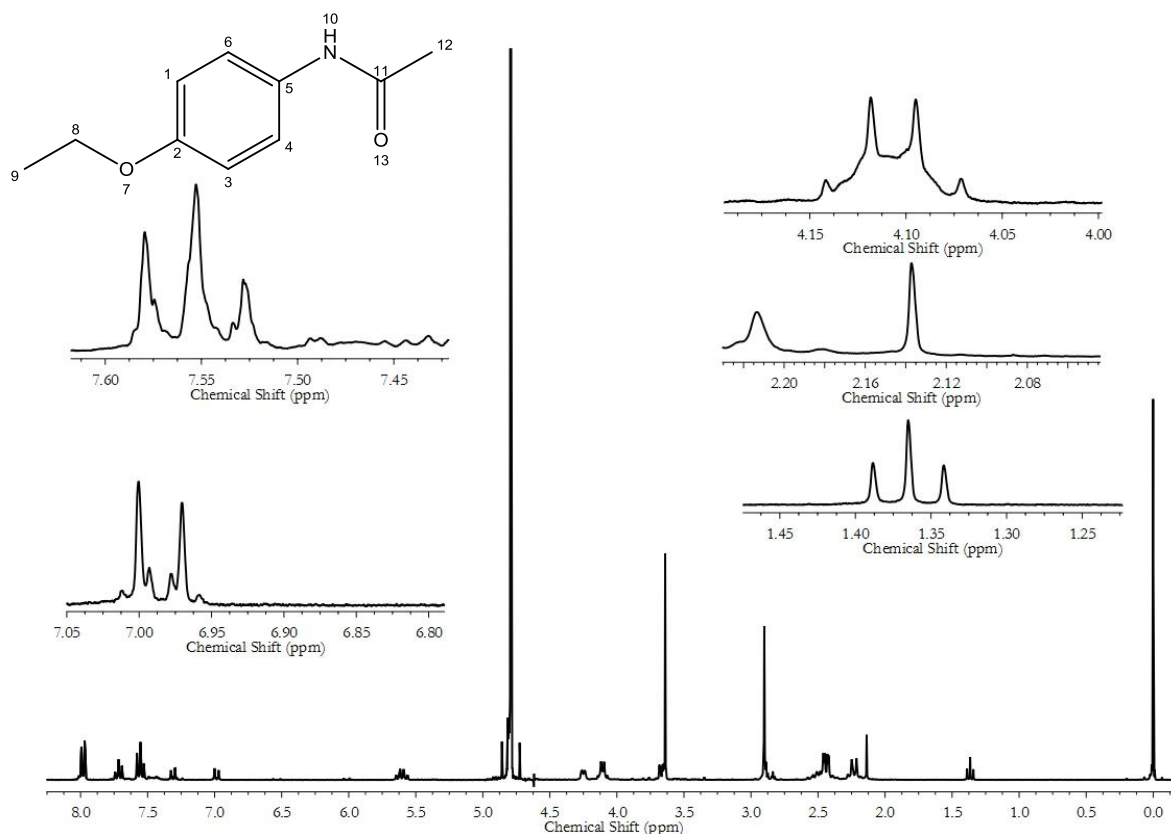


Figura 41 – Espectro de RMN-¹H da amostra Rm1 (300 MHz) em D₂O acidificado contendo TSP como SR interna e o adulterante fenacetina.

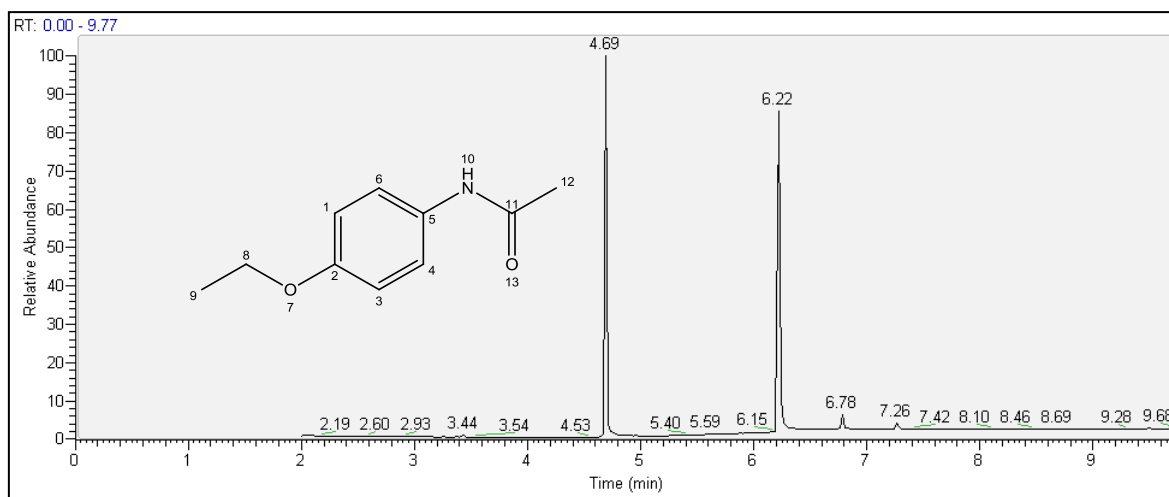


Figura 42 – Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de Rm1.

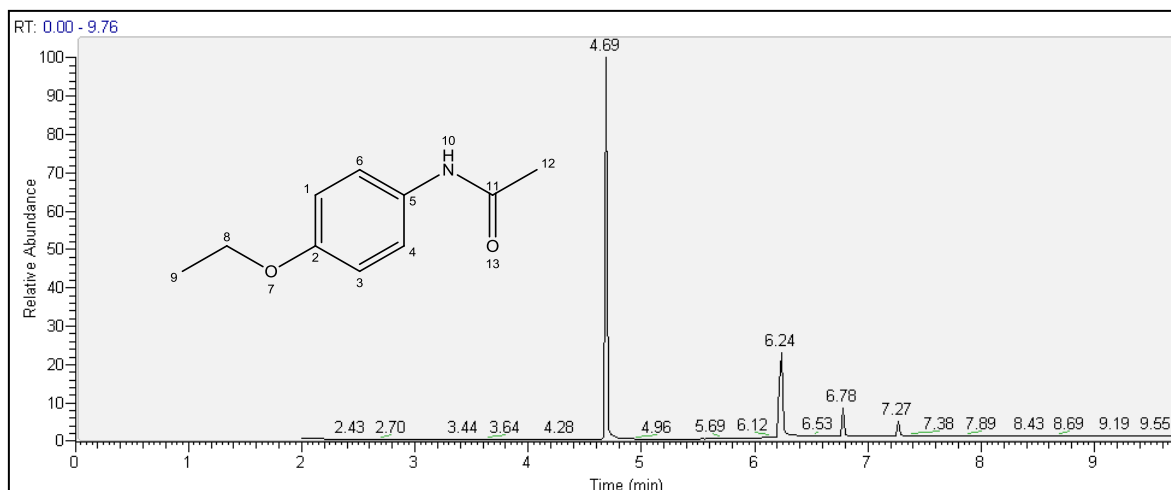


Figura 43 – Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de Pc1.

A benzocaína, por sua vez, foi identificada somente na amostra Rn1, entre as amostras analisadas por CG-EM, com tempo de retenção em 4,26 minutos e por RMN-¹H, o duplete em torno de δ_H 6,5 e o triplete em δ_H 1,4 ppm sugeriram a benzocaína em três outras amostras em pequenas quantidades relativamente aos sinais da cocaína, entre as quais a Pt1 (Figura 44).

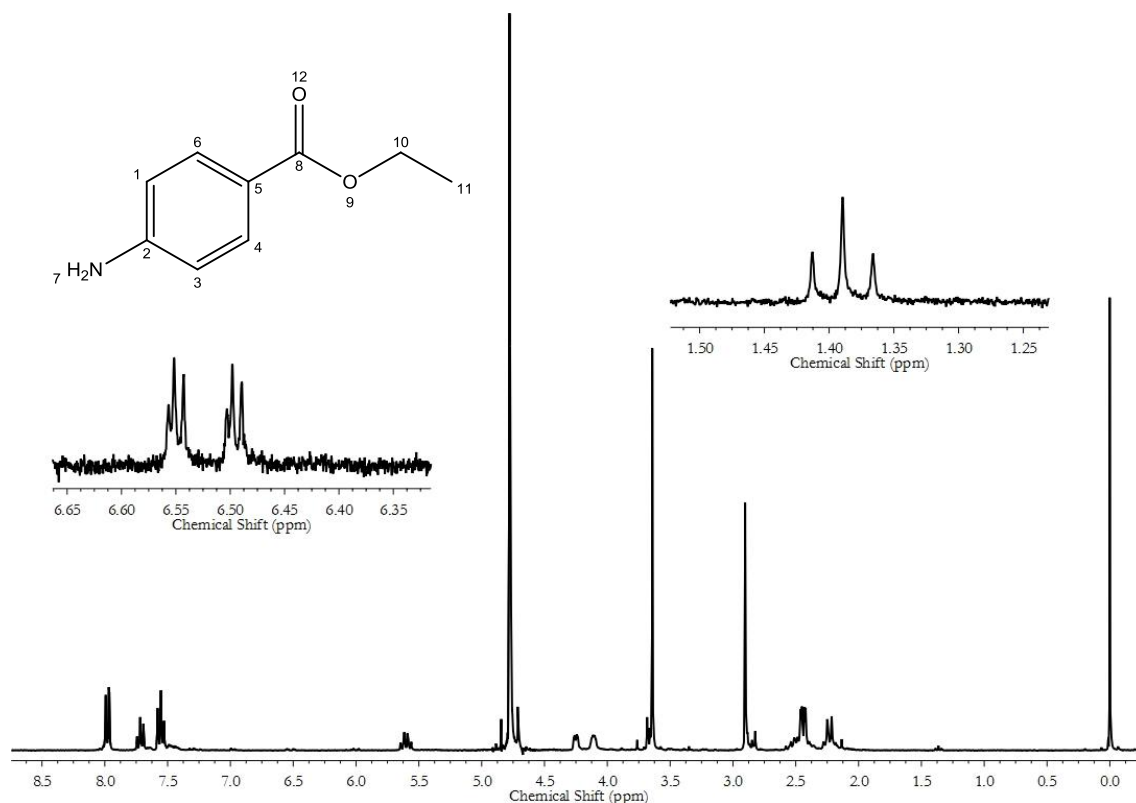


Figura 44 – Espectro de RMN-¹H da amostra Pt1 (300 MHz) em D₂O acidificado contendo TSP como SR interna e o adulerante benzocaína. Ampliação da escala vertical para visualização de sinais com baixa resolução S/N.

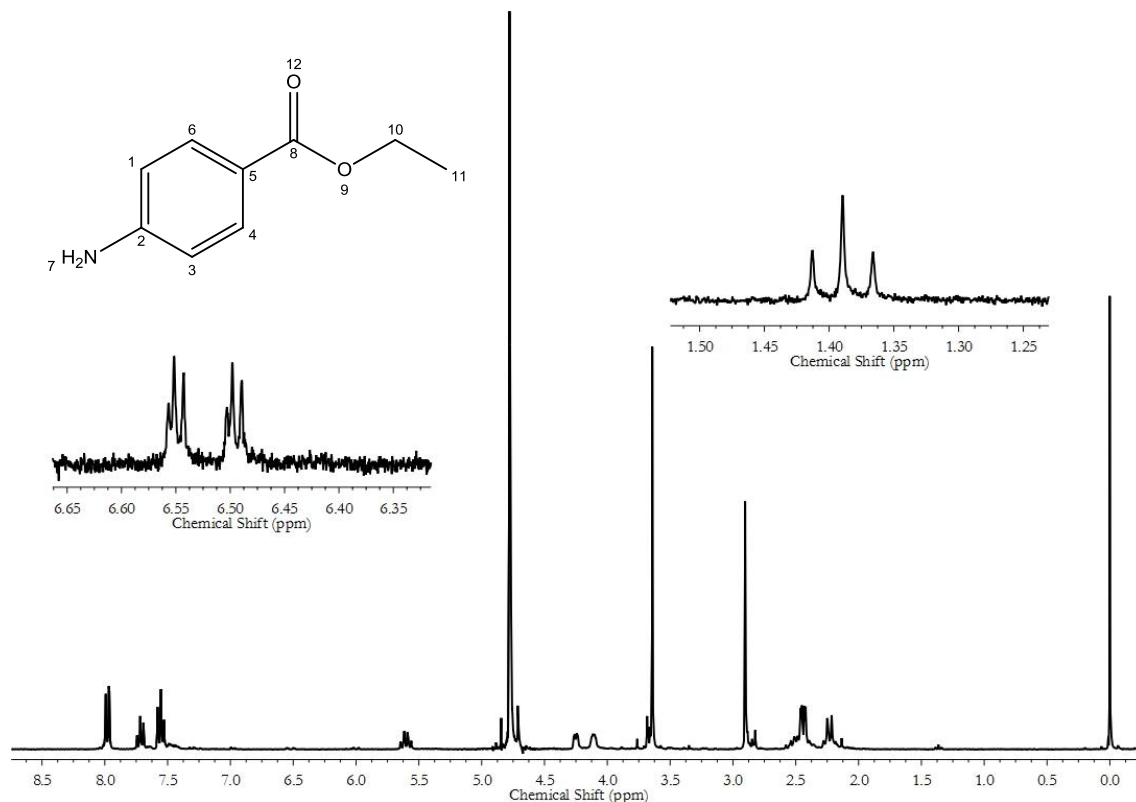


Figura 45 – Espectro de RMN-¹H da amostra Rn1 (300 MHz) em D₂O acidificado contendo TSP como SR interna e o adulterante benzocaína. Ampliação da escala virtual para visualização de sinais com baixa resolução S/N.

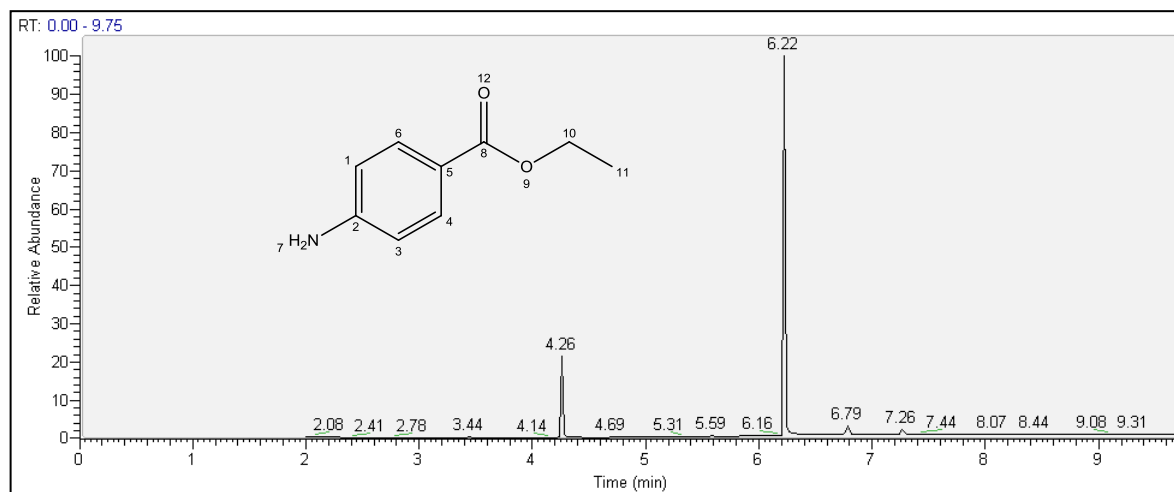


Figura 46 – Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de Rn1.

Os teores médios de cocaína nas 47 amostras de crack obtidos pela integração das áreas de dez regiões do espectro adquiridos pelo método desenvolvido de RMNq-¹H e quantificados pelo uso da macro de Dr. Patrick Hays foram plotados com intervalo de confiança de 95% para as dez determinações no Gráfico 3 e estão dispostos na Tabela 14 (pág. 89).

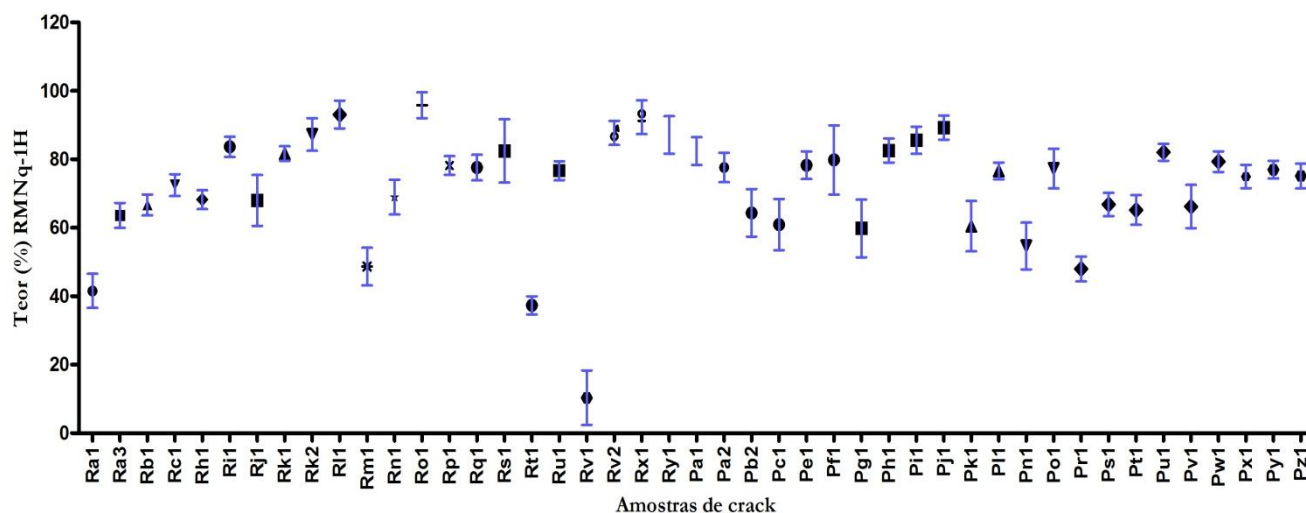


Gráfico 3 – Teor médio de cocaína em cada amostra de crack por RMNq-¹H com intervalo de confiança 95% (n=10).

A determinação do teor de cada amostra de crack pela integração das áreas das dez regiões separadas utilizou a equação 10 (pág. 26) substituindo as quantidades pesadas de cada amostra e do TSP de acordo com a Tabela 6 (pág. 56).

Os coeficientes de variação (%) das dez determinações foram superiores a 5%, mostrando dispersão dos resultados. Apenas as determinações de sete amostras de crack tiveram coeficientes de variação inferiores a 5,0% (Ri1, Rk1, Rp1, Ru1, Pl1, Pu1 e Py1).

Tabela 14 – Teores das amostras de crack obtidos pelo método de RMNq-¹H desenvolvido.

Amostras	Teor de cocaína (%)									
	Região 1	Região 2	Região 3	Região 4	Região 5	Região 6	Região 7	Região 8	Região 9	Região 10
Ra1	40,5	44,2	43,8	39,5	34,5	46,8	33,7	33,1	43,6	55,8
Ra3	60,0	63,0	61,9	61,0	64,7	71,6	53,8	63,2	68,2	69,0
Rb1	61,8	68,6	67,5	61,8	66,8	70,7	60,7	65,2	69,8	73,9
Rc1	67,3	73,1	73,3	66,2	73,0	76,1	67,4	71,7	76,6	80,0
Rh1	64,0	69,2	66,1	64,7	68,2	71,4	64,0	67,3	71,6	75,9
Ri1	80,5	84,9	85,0	78,6	83,5	86,7	76,5	83,0	88,7	89,1
Rj1	61,0	67,6	66,9	60,9	65,0	94,7	57,1	64,9	70,1	71,6
Rk1	77,1	83,2	79,7	77,8	83,0	82,0	83,2	80,2	84,5	86,2
Rk2	80,5	87,8	87,5	80,3	87,2	95,3	78,4	85,3	90,9	99,3
RI1	88,7	93,7	90,3	88,5	93,2	96,0	85,2	92,0	98,2	105,1
Rm1	44,2	47,7	45,0	44,5	47,8	69,3	41,6	46,3	50,2	50,1
Rn1	62,0	68,4	84,8	61,9	66,0	68,9	64,5	65,4	71,5	76,4
Ro1	89,8	97,5	97,6	90,1	95,4	97,2	89,1	94,6	100,7	106,1
Rp1	73,1	80,2	78,8	73,7	77,9	78,6	75,7	76,5	81,9	85,7
Rq1	72,0	78,9	74,2	71,9	78,3	80,2	74,3	75,1	82,6	88,5
Rs1	75,9	80,1	77,8	76,1	80,0	115,6	67,0	79,1	86,4	86,5
Rt1	34,5	39,0	36,0	34,0	34,9	44,2	33,7	35,4	39,6	42,2
Ru1	71,1	78,6	76,7	72,0	76,4	77,1	75,7	74,7	80,3	84,3
Rv1	6,6	5,8	6,0	5,9	7,5	13,0	5,2	5,6	6,5	41,4
Rv2	83,8	88,3	85,1	84,5	86,2	89,4	86,0	83,2	91,2	99,7
Rx1	86,8	89,9	90,5	85,7	90,3	105,8	87,6	89,3	93,9	103,3
Ry1	78,2	91,5	86,0	75,4	86,7	95,9	81,6	84,6	92,3	99,2
Pa1	77,8	83,7	85,0	75,8	79,5	80,2	76,5	87,5	83,9	94,3
Pa2	71,6	77,0	72,8	70,9	77,9	78,2	72,5	84,2	81,9	89,2
Pb2	58,0	61,1	59,6	58,6	62,1	90,1	56,3	66,8	65,0	65,9
Pc1	52,7	57,8	53,2	53,3	57,1	80,1	55,6	60,1	59,4	80,3
Pe1	71,9	75,8	73,3	72,8	78,2	78,3	76,3	84,5	82,2	89,5
Pf1	71,9	77,9	72,2	71,3	76,4	100,9	57,7	83,8	81,1	105,1
Pg1	51,4	53,8	51,9	51,5	54,8	81,9	53,3	59,9	58,5	81,2
Ph1	77,7	84,3	78,6	78,9	79,9	81,5	78,3	88,4	86,2	92,0
Pi1	78,9	84,6	79,5	81,2	83,1	86,7	83,5	92,4	90,5	95,3
Pj1	83,3	88,2	83,7	86,5	86,6	92,2	86,5	94,5	93,1	98,0
Pk1	54,5	57,2	55,4	53,6	57,5	87,4	51,3	62,9	61,3	63,9
Pl1	73,1	75,8	75,8	74,5	75,3	82,3	74,8	73,6	78,4	82,7
Pn1	48,5	52,4	56,5	48,1	51,5	80,6	48,9	50,3	54,8	55,3
Po1	72,3	76,2	71,5	71,0	76,5	97,1	70,0	74,8	81,3	82,1
Pr1	46,2	48,7	46,8	47,7	47,7	54,5	36,0	47,3	52,2	52,5
Ps1	63,3	67,8	63,5	63,9	65,3	68,7	62,2	64,6	71,0	77,8
Pt1	60,4	65,2	61,7	61,3	64,0	79,4	59,8	61,6	68,5	70,1
Pu1	79,4	83,2	78,6	80,2	81,2	84,4	79,7	79,2	85,3	89,3
Pv1	60,2	64,4	64,8	59,7	64,3	90,2	61,0	63,2	67,2	67,1
Pw1	73,7	79,6	80,3	74,5	79,9	80,2	75,4	78,6	83,3	87,6
Px1	69,7	76,2	71,5	70,7	75,8	78,6	69,6	74,3	79,2	84,2
Py1	71,2	76,4	73,3	73,1	78,4	80,3	79,9	75,4	80,7	81,2
Pz1	70,8	76,0	71,3	70,3	74,3	84,4	69,5	74,3	79,4	80,9

O teor médio de todas as 47 amostras pelo método desenvolvido de RMNq-¹H foi de 71,9% de cocaína, com amostras variando entre 5,2 a 89,1%.

Em comparação com o Gráfico 2 (pág. 81), a distribuição das amostras de crack pelo método de RMNq-¹H foi modificada, onde somente 18% das amostras apresentaram teor de cocaína superior a 80% frente a 47% do método de CLAE-DAD. 91% das amostras apresentaram teor de cocaína superior a 40% em relação a 96% com o método de CLAE-DAD (vide Gráfico 4).

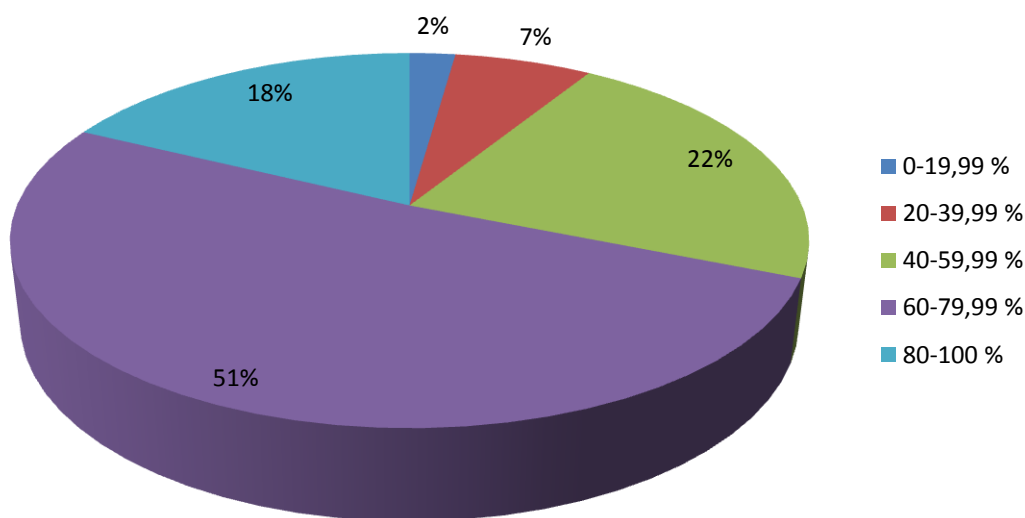


Gráfico 4 - Distribuição das amostras apreendidas de acordo com as faixas de teor de cocaína pelo método de RMNq-¹H.

O método de quantificação de cocaína por RMNq-¹H mostrou-se impreciso de acordo com os resultados. Por exemplo, tomando os resultados médios de cada amostra pelo método de CLAE-DAD e relacionando ao IC95% do método de RMNq-¹H, somente 15 amostras de crack (Ra1, Ri1, Rk2, Rn1, Rv1, Rx1, Pb2, Pc1, Pg1, Ph1, Pi1, Pk1, Pn1, Po1 e Py1) poderiam ter os mesmos teores determinados por RMNq-¹H.

Tabela 15 – Intervalo de confiança 95% da média das dez determinações.

Amostra	IC 95%	Amostra	IC 95%
Ra1	36,58 - 46,52	Pa1	78,35 - 86,49
Ra3	59,99 - 67,29	Pa2	73,31 - 81,93
Rb1	63,59 - 69,77	Pb2	57,41 - 71,29
Rc1	69,27 - 75,67	Pc1	53,48 - 68,44
Rh1	65,47 - 71,01	Pe1	74,25 - 82,31
Ri1	80,68 - 86,62	Pf1	69,72 - 89,94
Rj1	60,56 - 75,40	Pg1	51,38 - 68,26
Rk1	79,60 - 83,78	Ph1	79,05 - 86,11
Rk2	82,48 - 92,02	Pi1	81,59 - 89,55
RI1	89,02 - 97,16	Pj1	85,75 - 92,77
Rm1	43,14 - 54,20	Pk1	53,13 - 67,87
Rn1	63,91 - 74,05	Pl1	74,19 - 79,07
Ro1	92,02 - 99,60	Pn1	47,84 - 61,54
Rp1	75,49 - 80,93	Po1	71,48 - 83,08
Rq1	73,87 - 81,33	Pr1	44,34 - 51,58
Rs1	73,22 - 91,68	Ps1	63,41 - 70,21
Rt1	34,71 - 39,99	Pt1	60,86 - 69,54
Ru1	73,94 - 79,44	Pu1	79,59 - 84,51
Rv1	2,382 - 18,32	Pv1	59,90 - 72,52
Rv2	84,23 - 91,25	Pw1	76,32 - 82,30
Rx1	87,40 - 97,22	Px1	71,56 - 78,40
Ry1	81,68 - 92,60	Py1	74,40 - 79,58
		Pz1	71,52 - 78,72

Todavia, o desempenho do método de RMNq-¹H frente ao método de CLAE-DAD apresentou correlação significante entre os teores médios de cada amostra. Assumindo que as determinações pelos dois métodos possuem uma distribuição gaussiana, o *r* de Pearson obtido foi de 0,79.

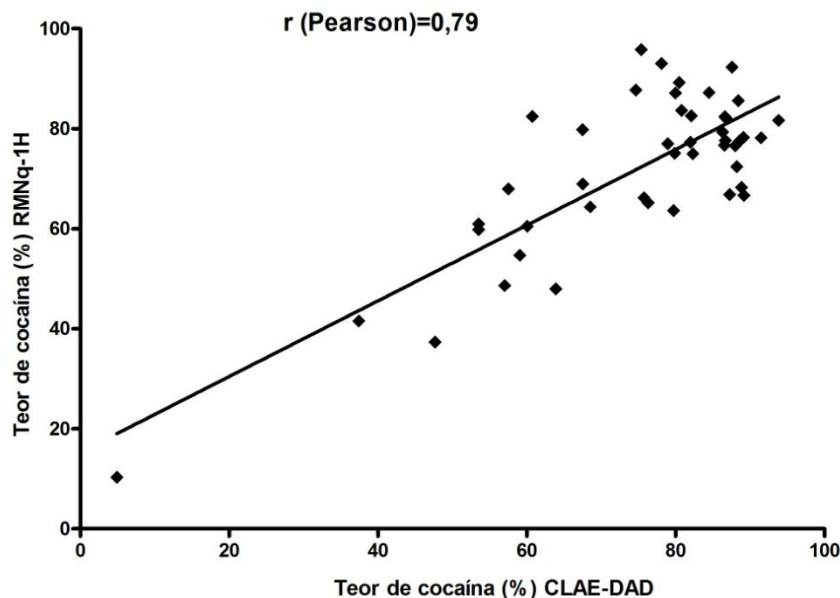


Gráfico 5 – Correlação entre os resultados médios dos teores de cocaína por CLAE-DAD e RMNq-¹H ($p < 0,0001$).

Quando a correlação é feita individualmente entre cada região integrada dos espectros adquiridos e o resultado do teor médio de cocaína nas amostras por CLAE-DAD, o melhor r de Pearson obtido é de 0,83 relativa a região 7 do espectro (vide Gráfico 6).

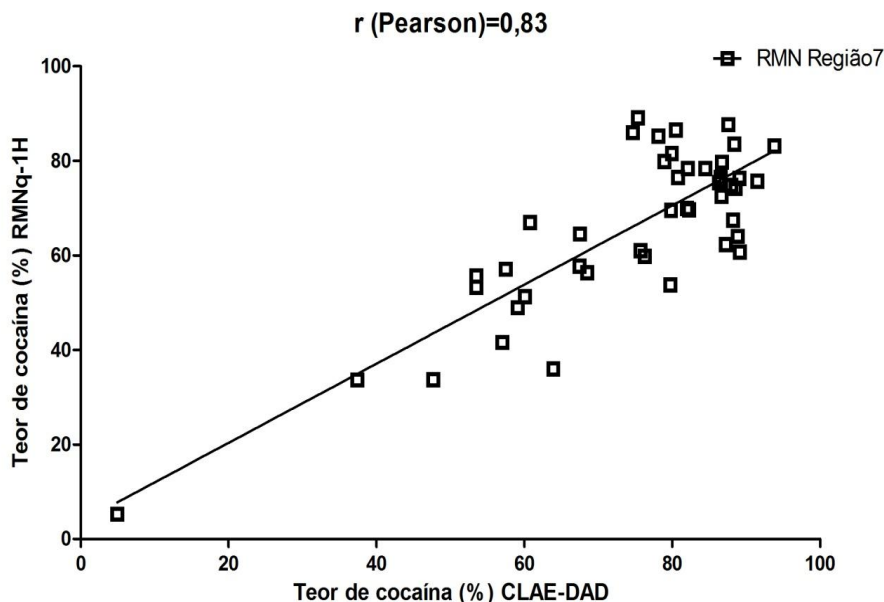


Gráfico 6 – Correlação entre os resultados médios dos teores de cocaína por CLAE-DAD e a determinação do teor da região 7 por RMNq-¹H ($p < 0,0001$).

Wells *et al.* (2002) comparando a RMNq com métodos cromatográficos (CG e CLAE) para determinação da pureza e de impurezas em substâncias agroquímicas, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o 2,2-dicloropropionato de sódio (Dalapon sódio), concluíram que

o método utilizado em RMNq foi mais exato e preciso do que os métodos cromatográficos utilizados. As impurezas orgânicas puderam ser identificadas e quantificadas pelo uso de espectros de RMNq para as análises de 2,4-D e o método mostrou-se mais versátil na pesquisa destas impurezas do que métodos cromatográficos devido as limitações dos detectores utilizados, por exemplo a ausência de cromóforos para utilização por CLAE-Uv ou CLAE-DAD e a alta polaridade de algumas impurezas para CG (WELLS, 2002).

Segundo Holzgrabe *et al.* (2005), as vantagens da espectroscopia de RMNq sobre os métodos de CLAE são as seguintes: a) as análises por RMNq são frequentemente mais precisas e exatas que os de CLAE; b) normalmente, não é necessário o isolamento de impurezas; c) não são necessárias substâncias químicas de referências caras; d) informação estrutural adicional sobre as impurezas são disponíveis com RMNq; e e) RMNq demanda menos tempo, é mais fácil de trabalhar e mais específico, levando a uma alta reprodutibilidade (HOLZGRABE, 2005).

O método de processamento dos espectros das amostras de crack utilizado neste trabalho também foi utilizado por Dr. Patrick Hays para comparar o desempenho da RMNq-¹H frente a método de CG utilizado na determinação da pureza de 32 amostras ilícitas de cloridrato de cocaína, que variaram entre 8 e 91%. A diferença obtida entre os métodos foi $\leq 6,7\%$, tendo o método de RMNq-¹H resultados de pureza superiores com exceção de um resultado onde por CG foi 9,0% e por RMNq-¹H foi de 8,1% de pureza (HAYS, 2005).

Por sua vez, Hays & Thompson (2009) comparando os resultados da determinação da pureza de 291 amostras ilícitas de cloridrato de heroína pelo uso de áreas obtidas pela integração de três regiões juntamente com o uso da altura de sinais frente a método de análise por eletroforese capilar, obtiveram concordância entre as purezas determinadas. Alguns pontos obtidos pelo uso somente da área de regiões integradas não obedeceram aos critérios de aceitação propostos porque as amostras continham adulterantes e diluentes. Por fim, os pesquisadores sugeriram a utilização da quantificação de substâncias utilizando, em conjunto, os dados obtidos da integração e da altura dos sinais por fornecerem maior confiança e evitarem: os erros causados por adulterantes e diluentes nas amostras, os erros de processamento (erro na correção da fase ou da linha de base) e inhomogeneidades no campo magnético (HAYS, 2009).

A região 7 integrada neste trabalho, que culminou em melhor correlação dos resultados de RMNq-¹H e CLAE-DAD, refere-se ao singlete da metila com deslocamento químico em δ_H 3,6 ppm.

Diversas fontes de erro podem ter afetado a determinação do teor de cocaína pelo método de RMNq-¹H.

A região 7 integrada cobriu uma faixa de 0,2 ppm do espectro de 300 MHz de RMN-¹H (60 Hz), esta mesma faixa foi utilizada na integração da área do sinal do TSP. A região integrada de 60 Hz atendeu o preconizado por Pauli *et al.* (2005). Contudo, para que erros menores que 0,1% fossem alcançados, a largura da integral deveria ter sido 76 vezes a largura do sinal em ambas as direções, conforme recomendou Saito *et al.* (2004).

A janela espectral (sw) não foi ampla suficiente para evitar a atenuação de sinais pelos filtros de recepção nas bordas laterais dos espectros. O recomendado seria 2 ppm a mais em cada lateral do espectro, afim de se obter um pulso mais homogêneo no centro do espectro (CLARIDGE, 1999; MALZ, 2003; SAITO, 2004). A janela espectral foi estreita para o sinal do TSP (a janela utilizada foi de 11 e -1 ppm), justamente aquele utilizado na quantificação.

As rotinas de *oversampling* sugeridas por Claridge (1999) não puderam ser utilizadas devido a dificuldades no espectrômetro da Varian[®] Unity Plus[®] da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

A presença das *spinning sidebands* a 20 Hz de cada sinal do espectro e alguma inhomogeneidade no campo magnético podem ter causado imprecisão na integração dos sinais das amostras (MALZ, 2003; MALZ, 2005).

O tempo de aquisição do FID foi fixado em 4,0 s observando-se o resultado do experimento de recuperação da inversão que mensurou o sinal do TSP como o sinal de relaxamento transversal mais lento (T1) entre os sinais do espectro com 3,891 s para o pulso de 90°. Conforme discutido por Pauli *et al.* (2005), o atraso de relaxação (d1) foi calculado para 5 x o T1 mais lento, assim o valor fixado de 20 s atendeu esta exigência (PAULI, 2005). Por sua vez, Saito *et al.* (2004) indicaram em seu trabalho que 5 x o T1 não fornece um valor de d1 suficiente para trabalhos quantitativos que visem maior precisão nos resultados (SAITO, 2004).

Por outro lado, pode-se prever outras fontes de erro do método de RMNq-¹H quanto a preparação das amostras como erro na transferência utilizando-se pipetas e diferentes solubilidades de amostras de crack no óxido de deutério acidificado com cloreto de deutério.

Contudo, os resultados deste trabalho obtidos através das duas metodologias desenvolvidas demonstram o grau de pureza das 47 amostras de crack com teores médios superiores a 70% de cocaína.

Contrariando o senso comum da população, o crack não é subproduto da cocaína, primeiro porque se trata da própria cocaína na forma de “pedras” e em segundo lugar porque o termo “subproduto” é utilizado tecnicamente para designar uma substância de importância

secundária gerada em determinado processo químico (FUKUSHIMA, 2010; OGA, 1995). Assim, a expectativa de que cocaína na forma de crack refletiria baixos teores e grande impureza não são condizentes com os resultados deste trabalho.

6 CONCLUSÕES

Uma correlação significativa pôde ser estabelecida entre as metodologias desenvolvidas por CLAE-DAD e RMNq-¹H.

A metodologia de RMNq-¹H desenvolvida para a determinação do teor de cocaína em 47 amostras de crack apresentou-se sensível frente a diversos parâmetros de aquisição que precisam ser otimizados para obter-se maior precisão e exatidão da quantificação e para uma melhor correlação com os resultados do método desenvolvido e validado por CLAE-DAD, o qual mostrou-se rápido, exato e preciso para quantificação de cocaína em 47 amostras de crack analisadas.

O teor médio de cocaína nas 47 amostras determinado pelo método de RMNq-¹H foi de 71,9%, com amostras variando entre 5,2 a 89,1%. Os resultados do método de CLAE-DAD foram superiores, onde o teor médio de todas as amostras foi de 74,4%, com amostras variando entre 4,9 e 93,8% de cocaína.

Os resultados das duas metodologias permitiram determinar que o teor médio de cocaína nas amostras foi superior a 70%.

Além disso, a análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e RMN-¹H demonstraram que o principal adulterante identificado em 40% das amostras foi a fenacetina.

7 PERSPECTIVAS

Reanálise das 47 amostras de crack com o método de RMNq-¹H utilizando parâmetros de aquisição mais adequados afim de obter melhor correlação com os dados de CLAE-DAD.

Estudo dos perfis espectroscópicos das 47 amostras de crack por RMN-¹H.

Análise das 47 amostras por CG-EM para caracterização dos perfis cromatográficos e espectrométricos.

Aplicação de diferentes métodos de análise quimiométrica para relacionar dados de RMN-¹H e CG-EM quanto à origem e perfil químico das amostras. Ex.: análise do componente principal - PCA (do inglês: *Principal Component Analysis*), regressão do componente principal - PCR (do inglês: *Principal Component Regression*), etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOKA SB, L.; TRIERWEILER, M. (1999). Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal. Chem.* **71**(13): 2554–2557.

ALMEIDA FLA Análise Comparativa de Amostras de Cocaína Apreendidas em Diferentes Estados Brasileiros. Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2003.

AMARAL Jr. A (ed) (1980). *Eritroxiláceas.* : Itajaí.

ARAÚJO FILHO VS Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) à toxicologia forense. Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2006.

BACCHI EA (1999). Alcalóides tropânicos. In: (ed)^(eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, edn, Vol. 1. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC. p^pp.

BAHLS FCB, S.C. (2002). Cocaína: origens, passado e presente. *Inter. Psicol.* **6**(2): 177-181.

BARJAT HC, P. B.; FETLER, B. K.; HORNE, T. J.; MORRIS, G. A. (1997). A practical method for automated shimming with normal spectrometer hardware. *J. Magn. Reson.* **125**(1): 197–201.

BARRIO GS, P.; de la FUENTE, L.; ROYUELA, L. (1997). Purity of cocaine seized in Spain, 1985-1993: variations by weight, province and year of seizure. *Forensic science international* **85**: 15-28.

BERNARDO NPS, M. E. P. B.; PAIVA, M.J.N.; MAIA, P.P. (2003). Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. *International Journal of Drug Policy* **14**: 331–334.

BILIA ARB, M. C.; LAZARI, D.; VINCIERI, F. F. (2002). Characterization of commercial kava-kava herbal drug and herbal drug preparations by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **50**(18): 5016–5025.

BIPM (1995). Guide to the Expression of Uncertainty Measurement. Geneva: International Organization for Standardization.

BOHM BAG, F. R.; PLOWMAN, T. (1982). Biosystematics and evolution of cultivated coca (Erythroxylaceae). *Systematic Botany* **7**(2): 121-133.

BOHM BAL, T.;NICHOLLS, K. W.PLOWMAN, T. (1988). Flavonoid variation in Erythroxylum. *Phytochemistry* **27**(3): 833-837.

BORER MWM, S. R. (1998). Control of spinning sidebands in high resolution NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **131**(2): 177–183.

BRASIL (2006). Lei Federal no 11343 - Institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas - Sisnad; prescreve medidas para prevenção do uso indevido, atenção e reinserção social de usuários e dependentes de drogas; estabelece normas para repressão à

produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas; define crimes e dá outras providências. Brasília-DF.

BRASIL (1998). Portaria SVS/MS nº 344 - Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Brasília-DF.

BRASIL (2003). Resolução da Diretoria Colegiada no 899/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, ANVISA (ed). Brasília.

BRUNT TMR, S.; HOEK, J.; VOGELS, N.; VAN DIJK, P.; NIESINK, R.J.M. (2009). An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. *Addiction* **104**: 798–805.

BURTON IWQ, M. A.; WALTER, J. A. (2005). Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal. Chem.* **77**(10): 3123–3131.

CARROLL FIC, M.L; LEWIN, A.H. (1982). Syntheses and Conformational Analyses of Isomeric Cocaines: A Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study. *Journal of Organic Chemistry* **47**: 13-19.

CARVALHO DGM, A. F (2003). Quality of cocaine seized in 1997 in the street-drug market of São Paulo city, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **39**: 71-75.

CEBRID (2004a). *I Levantamento Domiciliar sobre o uso de Drogas*. edn. Editora da UNIFESP: São Paulo, SP.

CEBRID (2004b). *V Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio da Rede Pública de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras*. edn. Editora da UNIFESP: São Paulo, SP.

CHOI YHC, H. K.; HAZEKAMP, A.; BERMEJO, P.; SCHILDERr, Y.; ERKELENS, C.; VERPOORTE, R. (2003). Quantitative analysis of bilobalide and ginkgolides from Ginkgo biloba leaves and ginkgo products using ¹H NMR. . *Chem. Pharm. Bull.* **51**(2): 158–161.

CIOLA R (ed) (1998). *Fundamentos da Cromatografia A líquido de Alto Desempenho – HPLC*. Editora Edgard Clucher LTDA: São Paulo, SP.

CLARIDGE TDW (ed) (1999). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Elsevier: Oxford.

COLLINS CB, G.;BONATO, P. (ed) (2006). *Fundamentos de Cromatografia*. . Editora UNICAMP: Campinas, SP.

CORREIA CRD (ed) (2001). *Síntese Estereosseletiva de Alcalóides e N-Heterociclos*. Edufscar - UFSCar.

DAGNINOA DS, J. (2005). ¹H NMR quantification in very dilute toxin solutions: application to anatoxin-a analysis. *Toxicon* **46**: 236–240.

DEA (2012). Cocaine Price/Purity Analysis of STRIDE Data Vol. 2012. Washington, DC: DEA.

del CAMPO GB, I.; CARACENA, R.; SANTOS, J. I. (2006). Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **556**(2): 462–468.

EBEL AD, W.; LEIBFRITZ, D. (2006). Effects of zero-filling and apodization on spectral integrals in discrete Fourier-transform spectroscopy of noisy data. *J. Magn. Reson.* **182**(2): 330–338.

EITEN G (1982). Brazilian savannas. In: B.J. Huntley & B.H. Walker e (ed)[^](eds). *Ecology of tropical savannas*, edn. Berlin: Springer-Verlag. p[^]pp p.25-47.

EURACHEM (2000). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements. London.

EVRARD IL, S.; CADET-TAIROU, A. (2010). Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *The International journal on drug policy* **21**(5): 399-406.

FERNADEZ PL, M.; BOUZAS, A.M.; BERMEJO, A.M.; TABERNERO, M.J. (2003). Use of High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Cocaine and Benzoylecgonine in Human Hair. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **26**(12): 2003-2012.

FOULON CM, C.-M.; MANUEL, N.; PHAM-HUY, C.; GALONS, H.; CLAUDE,J.-R.; GUYON, F. (1999). Rapid Analysis of Benzoylecgonine, Cocaine, and Cocaethylene in Urine, Serum, and Saliva by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Chromatographia* **50**(11/12): 721-727.

FUCCI NdG, N. (1998). Adulterants encountered in the illicit cocaine market. *Forensic science international* **95**(3): 247-252.

FUKUSHIMA AR Perfil da cocaína comercializada como crack na região Metropolitana de São Paulo em período de vinte meses (2008-2009). Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GADAPE HHP, K.S. (2011). Quantitative Determination and Validation of Metformin Hydrochloride in Pharmaceutical Using Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy *E-JOURNAL OF CHEMISTRY* **8**(2): 767-781.

GRIFFITHS LI, A. M. (1998). Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits. *Analyst* **123**(5): 1061–1068.

GUNTHER H (ed) (1994). *NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry*. John Wiley & Sons Ltd: Chichester.

HAYS PA (2005). Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods for determining the purity of reference drug standards and illicit forensic drug seizures. *Journal of forensic sciences* **50**(6): 1342-1360.

HAYS PAT, R. A. (2009). A processing method enabling the use of peak height for accurate and precise proton NMR quantitation. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **47**(10): 819-824.

HAZEKAMP AC, Y. H.; VERPOORTE, R. (2004). Quantitative analysis of cannabinoids from Cannabis sativa using ¹H NMR. *Chem. Pharm. Bull.* **52**(6): 718–721.

HOLZGRABE U (2010). Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **57**: 229-240.

HOLZGRABE UD, B. W.; WAWER, I. (1998). NMR spectroscopy in pharmacy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **17**(4-5): 557-616.

HOLZGRABE UD, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL. (2005). Quantitative NMR spectroscopy - Applications in drug analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **38**: 806-812.

KING LA (1999). Drug content of powders and other illicit preparations in the UK. *Forensic science international* **85**(2): 135-147.

LEITE F (2003). Amostragem analítica em laboratório. *Revista Analytica*(6): 52-58.

LI CYL, C. H.; WU, C. C.; LEE, K. H.; WU, T. S. (2004). Efficient ¹H nuclear magnetic resonance method for improved quality control analyses of ginkgo constituents. *J. Agric. Food Chem.* **52**(12): 3721–3725.

LURIER ISH, P. A.; GARCIA, A. E.; PANICKER, S. (2004). Use of dynamically coated capillaries for the determination of heroin, basic impurities and adulterants with capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. A* **1034**(1-2): 227-235.

MAIETTI SC, F.; MOLIN, L.; FERRARA, S.D.; TRALDI, P. (2009). Cocaine adulterants used as marker compounds. *J. Mass. Spectrom.* **44**: 1124–1126.

MALZ F Quantitative NMR-Spektroskopie als Referenzverfahren in der analytischen Chemie. PhD, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 2003.

MALZ FJ, H. (2005). Validation of quantitative NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**(5): 813–823.

MOFFAT ACO, M.D.; WIDDOP, B. (2003). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Galichet LY (ed). London: Pharmaceutical Press.

MOORE JMC, J. F. KLEIN, R. F.; COOPER, D. A.; LYDON, J. (1994). Determination and in-depth chromatographic analyses of alkaloids in South American and greenhouse-cultivated coca leaves. *Journal of chromatography. A* **659**(1): 163-175.

MORELLO DRM, R. P (1995). Qualitative and Quantitative Determination of Residual Solvents in Illicit Cocaine HCl and Heroin HCl. *Journal of forensic sciences* **40**: 957-963.

MÜHLEN CV, LANÇAS, F. M. (2004). Cromatografia unificada. *Química Nova* **27**: 747-753.

NAQVI AAM, S.; VERMA, R. K. (1998). Determination of atropine and scopolamine by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochem. Anal.* **9**(4): 168–170.

OGA S (ed) (1995). *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu Editora: São Paulo, SP.

OLIVEIRA MFA, J.Q.; ANDRADE, J.F.; SACZK, A.; OKUMURA, L.L. (2009). Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. *Eclética Química* **34**(3): 77-83.

ONDCP (2004). The Price and Purity of Illicit Drugs: 1981 Through the Second Quarter of 2003, President EOot (ed) Vol. 1, p 109. Washington: Executive Office of the President.

PAULI GFB, U.J.; LANKIN, D.C. (2005). Quantitative ¹H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *J. Nat. Prod* **68**: 133-149.

PAVIA DLL, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. (ed) (2010). *Introdução a Espectroscopia*. Cengage Learning: São Paulo.

PLOWMAN T (1982). The identification of coca (Erythroxylum species) - 1860-1910. . *Botanical Journal of the Linnean Society* **84**(4): 329-353.

PLOWMAN T (1984). New taxa of Erythroxylum (Erythroxylaceae) from the Venezuelan Guayana. *Acta Amazonica* **14**(2): 117-143

PODGORSKII VVM, A.S.; KALABIN, G.A. (2011). Quantitative NMR Spectroscopy for quality control of drugs and pharmaceuticals. *PHARMACEUTICAL CHEMISTRY JOURNAL* **45**(3): 194-197.

ROMAO WS, N. V.; BUENO, M. I. M. S.; SPARRAPANL, R.; EBERLIN, M.; MARTINI, A.; SABINO, B. D.; MALDANER, A. O. (2011). Química forense: perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. *Química Nova* **34**(10).

RUNDLOF TM, M.; BEKIROGLU, S.; HAKKARAINEN, B.; BOWDEN, T; ARVIDSSON, T. (2010). Survey and qualification of internal standards for quantification by (¹H) NMR spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **52**(5): 645-651.

SAITO T, NAKAIE, S., KINOSHITA, M., IHARA, T., KINUGASA, S., NOMURA, A., MAEDA, T. (2004). Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia* **41**: 213–218.

SALEM AAM, H. A.; BARSOUM, B. N. (2006). Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**(2): 654–661.

SALEM AAM, H. A.; BARSOUM, B. N. (2005). Quantitative determinations of levofloxacin and rifampicin in pharmaceutical and urine samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Spectrochim. Acta A* **62**(1-3): 466-472.

SANTOS SG Desenvolvimento e validação de metodologia analítica: perfil cromatográfico de espécies de Erythroxyllum e quantificação simultânea de dois alcalóides tropanos. Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2008.

SCHIFANO FC, JOHN. (2008). Cocaine/crack cocaine consumption, treatment demand, seizures, related offences, prices, average purity levels and deaths in the UK (1990–2004). *Journal of Psychopharmacology* **22**(1): 71-79.

SEDS (2011). Exames realizados em drogas apreendidas (2007-2010), Paraíba IdPCd (ed). João Pessoa: Secretaria de Estado da Segurança e Defesa Social.

SENASP (2010). Vade Mecum - Segurança Pública, Justiça Md (ed), p 348. Brasília, DF.

SHIBUYA EKS, J. E. S.; NEGRINI-NETO, O.; OMETTO, J. P. H. B. (2007). Multivariate classification based on chemical and stable isotopic profiles in sourcing the origin of marijuana samples seized in Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* **18**(1): 205-214.

SILBERBAUER-GOTTSBERGER IE, G. (1983). Fitossociologia de um hectare de cerrado. *Brasil Florest.* **13**(54): 55-70.

SNYDER LRK, J.J.; DOLAN, J.W. (ed) (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA.

SOININEN P Quantitative IH NMR Spectroscopy - Chemical and Biological Applications. PhD, University of Kuopio, Kupio, 2008.

SUKUMAR SJ, M. O.; HURD, R. E.; VAN ZIJL, P. C. M. (1997). Automated shimming for deuterated solvents using field profiling. *J. Magn. Reson.* **125**(1): 159–162.

SUZUKI OW, S. (2005). *Drugs and Poisons in Humans - A Handbook of Practical Analysis*. 672.

TAMAGNAN GA, D.; FU, X.; KULA, N. S.; BALDESSARINI, R. J.; INNIS, R. B.; BALDWIN, R. M. (2005). Synthesis and monoamine transporter affinity of new 2beta-carbomethoxy-3beta-[4-(substituted thiophenyl)]phenyltropanes: discovery of a selective SERT antagonist with picomolar potency. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **15**(4): 1131-1133.

TRAFICANTE DDR, M. (2000). Optimum window function for sensitivity enhancement of NMR signals. *Concept. Magnetic Res.* **12**(2): 83–101.

TSUMURA YM, T.; KIMOTO, S. (2005). False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision. *Forensic science international* **155**: 158-164.

UN (2009). *World drug report*. edn, vol. 1. Office on Drug on Crime: Washington, DC.

VAN BEEK TAVV, A.; LELYVELD, G. P.; PIRON, I.; LANKHORST, P. P. (1993). Quantitation of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochem. Anal.* **4**(6): 261–268.

WARNER E (1993). Cocaine Abuse. *Ann Intern Med.* **119**(3): 226-235.

WELLS rjH, J.M.; AL-DEEN, T.S.; HIBBERT, D.B. (2002). Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) Spectroscopy for Assessing the Purity of Technical Grade Agrochemicals: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Sodium 2,2-Dichloropropionate (Dalapon Sodium). *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3366-3374.

ZUANAZZI JAS, TREMEA, V., LIMBERGER, R. P., SOBRAL, M. HENRIQUES, A. T. (2001). Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**(8): 2001-2008.