

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**

**Elisângela Jaqueline Magalhães**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE DROGAS EM  
MATRIZES DE INTERESSE FORENSE**

**Belo Horizonte**

**2012**

**UFMG – ICExDQ.892<sup>a</sup>**

**T. 389<sup>a</sup>**

**Elisângela Jaqueline Magalhães**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE DROGAS EM  
MATRIZES DE INTERESSE FORENSE**

Tese apresentada ao  
Departamento de Química do  
Instituto de ciências Exatas da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial  
para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciências - Química.

**Belo Horizonte**

**2012**

M188d  
2012  
T

Magalhães, Elisângela Jaqueline

Desenvolvimento de métodos para quantificação de drogas em matrizes de interesse forense / Elisângela Jaqueline Magalhães. 2012.

xxiii, 126 f. : il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.

Coorientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

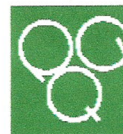
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Cocaína - Teses  
3. Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses  
4. Drogas - Abuso - Teses 5. Toxicologia forense -  
Teses 6. Espectrometria de massa - Teses I. Nascentes,  
Clésia Cristina, Orientadora II. Queiroz, Maria Eliana  
Lopes Ribeiro de, Coorientador. III. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3499-5732  
FAX: 031 - 3499-5700  
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Desenvolvimento de Métodos para Quantificação de Drogas em Matrizes de Interesse Forense"**

**Elisangela Jaqueline Magalhães**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora  
UFMG

Prof. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz - Co-Orientador  
UFV

Prof. Antônio Augusto Neves  
UFV

Prof. Maurício Xavier Coutrim  
UFOP

Prof. Maria José de Sousa Ferreira da Silva  
UFMG

Prof. Zenilda de Lourdes Cardeal  
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2012.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”*

Leonardo Da Vinci

*Aos meus pais Joaquim (in memoriam) e Ana Lúcia,  
Meus irmãos Arnaldo, Elizânia e Elirôse  
Meus avós José Ramos e Odete  
Com amor dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo seu amparo e presença em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe pelas orações e amor incondicional.

Aos meus avós, irmãos, sobrinhos e cunhados pelo incentivo, apoio e presença viva nos momentos de dificuldades.

Ao Carlos Henrique, pelo carinho, companheirismo, paciência e amor dispensado a mim nesses quatros anos de convivência.

À Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação e, sobretudo, pela segurança em momentos de dificuldades apresentados durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodinei Augusti pela receptividade em seu laboratório e pela valiosa contribuição e incentivo durante a execução do trabalho.

À Profa. Dr. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela orientação, amizade, apoio e estímulo.

Aos peritos Mário Guedes, Rogério Lordeiro, Marco Paiva e Marcus Penido, cuja parceria foi essencial para que este trabalho se tornasse possível.

À Leila e Aline pela amizade e alegre convivência nos últimos anos.

Aos colegas de laboratório: Amauri, Ana Karolina, Átila, Bruna, Bulé, Deyse, Frank, Glayson, Helvécio, Henrique, Isabela, Júlio, Júnia, Karla, Luciano, Marcus Canuto, Maria Elisa, Miriani,

Paulo, Reginaldo, Renata França, Renata Pereira, Rita, Rosilene, Silvéria, Vanessa, companheiros de bons momentos da minha vida.

Aos estudantes Leandro e Janaína pela ajuda no desenvolvimento prático do trabalho.

Às secretárias Paulete, Lílian e Kátia pela disponibilidade e atenção.

Ao grupo do Prof. Jose Rodriguez-Gonzalez, Lincoln, Inglaterra, pelo acolhimento e oportunidade na troca de experiências.

Aos amigos: Ítalo, Barbara, Tom, Pamela, Cristina e Maria Ángeles pela convivência em Lincoln.

À Lílian e ao Cláudio por serem os principais incentivadores para que eu me candidatasse à seleção de doutorado na UFMG.

Ao CNPq e à Capes pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos



## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
<i>CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA</i> .....	xxv
1.1 Drogas de abuso .....	2
1.2. Análise de Matrizes Biológicas .....	4
1.3. Preparo de amostras aplicadas a matrizes biológicas .....	6
1.4. Extração sólido-líquido e/ou líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL e/ou ELL-PBT).....	7
1.5. Técnicas cromatográficas para quantificação de drogas e seus constituintes. ....	8
1.6. Espectrometria de Massas .....	9
1.6.1. Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Electrospray.....	10
1.6.2. Analisador de Massas do tipo TOF .....	12
1.7. Acoplamento de técnicas cromatográficas à Espectrometria de Massas.....	13
REFERÊNCIAS .....	15
<i>CAPITULO II – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS EM URINA</i> .....	24
2.1. INTRODUÇÃO.....	23
2.2 OBJETIVOS.....	29
2.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	29
2.3.1 Reagentes e solventes .....	29
2.3.2 Soluções.....	30
2.3.3 Amostragem .....	30
2.3.4 Instrumentação .....	31
2.3.5 Otimização da separação cromatográfica.....	31
2.3.6 Condições de análise no sistema LC-IT-TOF-MS .....	31

2.3.7 Otimização da Técnica de Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa	
Temperatura.....	32
2.3.8 Validação do método .....	33
2.3.9 Aplicação do método .....	34
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
2.4.1 Otimização das condições cromatográficas.....	34
2.4.2 Otimização da Técnica de Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa	
Temperatura.....	38
2.4.3 Validação do Método .....	40
2.4.4. Aplicação do método .....	43
2.5 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS .....	44
<i>CAPÍTULO III - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA</i>	
<i>TEMPERATURA PARA QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA EM MATRIZES BIOLÓGICAS POR</i>	
<i>GC-MS.....</i>	
2	
3.1 INTRODUÇÃO.....	49
3.2 OBJETIVOS.....	52
3.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	52
3.3.1 Reagentes.....	52
3.3.2 Soluções.....	53
3.3.3 Amostras.....	53
3.3.4 Instrumentação e condições cromatográficas.....	54
3.3.5 Otimização da Extração Sólido-Líquido e/ou Líquido-Líquido com Partição em Baixa	
Temperatura.....	55
3.3.5.1. Procedimento Geral .....	55
3.3.5.3. Planejamento Composto Central .....	57
3.3.5.4. Avaliação da quantidade de massa e volume de solução tampão na eficiência da	
<i>extração de cocaína em fígado.....</i>	58
3.3.5.5. Planejamento Composto Central .....	59
3.3.6 Métodos otimizados da ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína .....	60
3.3.7 Validação do Método .....	60

3.3.8	Aplicação dos métodos otimizados e validados a amostras reais.....	63
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
3.4.1	Otimização das condições cromatográficas.....	64
3.4.2	Otimização da ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína em fígado e urina .....	65
3.4.2.1	<i>Triagem de variáveis: Planejamento fatorial 2<sup>4-1</sup></i> .....	65
3.4.2.2	<i>Planejamento Composto Central</i> .....	67
3.4.2.3	<i>Efeito da quantidade de massa e volume de solução aquosa na eficiência da extração de cocaína em fígado</i> .....	72
3.4.3	Otimização da ELL-PBT de cocaína em sangue .....	73
3.4.3.1	<i>Planejamento Composto Central</i> .....	73
3.4.3.2	<i>Efeito da força iônica na eficiência da extração de cocaína em sangue.</i> .....	74
3.4.4	Validação dos Métodos .....	75
3.4.5	Aplicação dos Métodos .....	83
3.5	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS .....	86
	<i>CAPITULO IV – DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA, ADULTERANTES E DILUENTES EM AMOSTRAS APREENDIDAS EM DUAS REGIÕES DO BRASIL</i> .....	91
4.1.	INTRODUÇÃO.....	91
4.2	OBJETIVOS.....	92
4.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	92
4.3.1	Reagentes e solventes .....	92
4.3.2	Soluções.....	93
4.3.3	Amostras.....	93
4.3.4	Instrumentação .....	94
4.3.5	Validação do método de quantificação de compostos orgânicos por CG-MS .....	96
4.3.6	Quantificação de ânions por cromatografia iônica.....	97
4.3.7.	Quantificação de constituintes inorgânicos por ICP-OES.....	98
4.3.7	Análise estatística .....	98
4.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	98
4.4.1.	Análises por GC-MS .....	98
4.4.1.1.	<i>Otimização das condições cromatográficas do GC-MS.</i> .....	98

4.4.1.2. Avaliação de alguns parâmetros de mérito do método de quantificação de compostos orgânicos por CG-MS .....	101
4.4.1.3. Quantificação de cocaína e adulterantes nas amostras de “cocaína de rua”.....	105
4.4.2 Determinação dos constituintes inorgânicos por ICP-OES e IC .....	108
4.4.3 Análise de Cluster.....	117
4.5 CONCLUSÕES .....	119
REFERÊNCIAS .....	120
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
ANEXOS .....	125

## RESUMO

O uso abusivo de drogas tornou-se um problema de abrangência mundial que traz graves conseqüências para os usuários e para a sociedade. Drogas ilícitas como cocaína, maconha, etc. e lícitas como medicamentos de uso controlado estão relacionadas com mortes envolvendo overdoses, intoxicações, acidentes automobilísticos, homicídios e suicídios. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e de baixo custo é de suma importância na avaliação destes casos. No presente trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos empregando a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) e/ou extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e análises por técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. A técnica de ELL-PBT faz uso de um solvente hidrofílico (acetonitrila) que é separado da fase aquosa por abaixamento da temperatura (-20 °C). Por este método é possível a obtenção de extratos limpos, mesmo em matrizes complexas, sem a necessidade de etapa posterior de purificação.

O presente trabalho consta de três partes. Na primeira parte o procedimento de ELL-PBT foi aplicado para a determinação de cinco benzodiazepínicos em amostras de urina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O método foi otimizado obtendo-se recuperações que variaram entre 61,3 e 100,4 %. Os ensaios de validação apresentaram baixos limites de detecção (1 a 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), boa precisão com coeficiente de variação (CV) inferior a 12,5 % e exatidão entre 72,9 a 116,6%. O método foi aplicado a duas amostras reais de usuários de diazepam, sendo possível a determinação não apenas deste princípio ativo, como também do seu metabólito, o oxazepam.

Na segunda parte, o procedimento de ELL-PBT e ESL-PBT foi otimizado para determinação de cocaína em matrizes biológicas, tais como fígado, urina e sangue por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os métodos foram validados apresentando baixos limites de detecção e quantificação, e precisão inferior a 13,4 %. Os ensaios de adição e recuperação avaliados na exatidão do método variaram de 69,2 a 81,9 % na matriz de sangue; 92,6 a 95,7 % em urina e de 95,1 a 100,4 % no fígado. Os métodos validados foram aplicados com sucesso à amostras de matrizes biológicas de periciados *post-mortem*. Tais amostras consistiram de 8 amostras de fígado, 5 amostras de urina e 5 amostras de sangue obtidas em parceria com o Instituto Médico Legal de Minas Gerais.

Na última parte, uma avaliação dos constituintes orgânicos e inorgânicos foi feita em amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais e Amazonas. Compostos orgânicos tais como cocaína, cafeína, lidocaína e benzocaína foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Constituintes inorgânicos como Ca, Mg, Na, K, P, Al, Fe, Mn, Co, Cu, Cr, Mo, Ni, Pb e Zn foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) enquanto os ânions nitrato, cloreto, nitrito, brometo, fluoreto e sulfato foram determinados por cromatografia iônica. A pureza da cocaína nas amostras apreendidas em Minas Gerais variou de 6,4 a 75,3%. Essas amostras apresentaram um grau de adulteração maior do que amostras apreendidas no estado do Amazonas. A cafeína foi o adulterante mais comum das amostras apreendidas em Minas Gerais, sendo encontrado em 76% das mesmas, seguido pela lidocaína (66,7%). Correlações de Pearson foram obtidas com o objetivo de relacionar os constituintes orgânicos e inorgânicos com os processos de adulteração e diluição das amostras de cocaína de rua.

**Palavras Chave:** Benzodiazepínicos, cocaína, drogas de abuso, extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura, matrizes biológicas, GC-MS, LC-MS.

## ABSTRACT

Drug abuse has become a worldwide problem which has serious consequences for users and society. Illicit drugs such as cocaine, cannabis, etc, and the licit ones such as prescription drugs, are related to overdoses, poisonings, car accidents, homicides, and suicides. In this context, the development of sensitive and low cost analytical methods is important in evaluating these cases. In this study, analytical methods employing solid-liquid extraction with partition at low temperature (SLE-LTP) and liquid-liquid extraction with partition at low temperature (LLE-LTP) and analysis by chromatographic techniques coupled with mass spectrometry have been developed. The LLE-LTP technique uses a hydrophilic solvent (acetonitrile) which is separated from the aqueous phase by lowering the temperature (-20 °C). By using this method, it is possible to obtain clean extracts, even in complex matrices without clean-up step.

The work consists of three parts. In the first part, the LLE-LTP procedure was applied to determine five benzodiazepine compounds in urine samples by using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Recoveries ranging between 61.3 and 100.4% were obtained. In the validation tests, low detection limits (1-5 mg L<sup>-1</sup>), good precision with coefficients of variation (CV) less than 12.5% and accuracy from 72.9 to 116.6% was obtained. The method was applied to two samples of users of diazepam. It was possible to find out not only the active ingredient, but also its metabolite oxazepam.

In the second part, the LLE-LTP procedure was optimized to detect cocaine in biological matrices such as liver, blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. The methods were validated and presented low limits of detection and quantification. The variation coefficient obtained in the precision assays was less than 13.4%. The addition and recovery tests assessing the accuracy of the method ranged from 69.2 to 81.9% in the matrix of blood, from 92.6 to 95.7% in urine and 95.1 to 100.4% in the liver. The validated method was successfully applied to real samples of biological matrices of post-mortem examined individuals. These samples consisted of 8 liver samples, 5 urine samples and 5 blood samples.

In the last part, an evaluation of organic and inorganic constituents was made on samples of "street cocaine" seized in the states of Minas Gerais and Amazonas. Organic compounds such as cocaine, caffeine, lidocaine, and benzocaine were quantified by gas chromatography-mass spectrometry. Inorganic constituents such as Ca, Mg, Na, K, P, Al, Fe, Mn, Co, Cu, Cr, Mo, Ni,

Pb and Zn were determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). Anions nitrate, chloride, nitrite, bromide, fluoride, and sulfate were determined by ion chromatography. The purity of cocaine seized in the Minas Gerais samples ranged from 6.4 to 75.3%. These samples are more adulterated than samples seized in the state of Amazonas. Caffeine was the most common adulterant in seized samples of Minas Gerais, being found in 76% of them, followed by lidocaine (66.7%). Pearson correlations were obtained to try to relate the organic and inorganic constituents with the processes of adulteration and dilution of street samples of cocaine.

**Keywords:** Benzodiazepines, cocaine, drug abuse, liquid-liquid extraction with partition at low temperature, biological matrices, GC-MS, LC-MS



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação esquemática da técnica ESI (Fonte: Kebarle & Peschke, 2000).....	11
Figura 1.2	Representação esquemática do funcionamento do espectrômetro de massas <i>ion-trap – time-of-flight</i> (Fonte: Shimadzu, 2007).....	13
Figura 2.1	Estrutura química geral das três subclasses de benzodiazepínicos.....	23
Figura 2.2	Estrutura geral dos benzodiazepínicos clássicos.....	24
Figura 2.3	Estrutura química dos benzodiazepínicos investigados (a) diazepam, (b) clonazepam, (c) lorazepam, (d) oxazepam, (e) clordiazepóxido (padrão interno) e (f) bromazepam.....	25
Figura 2.4	Processos de biotransformação do diazepam (Drummer, 2002).....	28
Figura 2.5	Cromatograma de uma mistura de benzodiazepínicos (1 mg L <sup>-1</sup> ) obtido por HPLC-PDA. Picos: 1 clordiazepóxido; 2 bromazepam; 3 oxazepam; 4 lorazepam; 5 clonazepam e 6 diazepam.....	36
Figura 2.6	Cromatograma de ions extraídos do cromatograma de íons totais para os benzodiazepínicos: a) diazepam, (b) clonazepam, (c) lorazepam, (d) oxazepam, (e) chlordiazepóxido (PI), (f) bromazepam.....	37
Figura 2.7	Influência do tipo de congelamento e do aumento da força iônica na extração simultânea de diazepam, clonazepam lorazepam, oxazepam e bromazepam.....	39

Figura 3.1	Cocaína e metabólitos: cocaetilenó (COE), norcocaína (NOR), benzoilecgonina (BZE), ecgonina (ECG) e ecgonina metil éster (EME) (Fonte: Janicka <i>et al.</i> , 2010).....	50
Figura 3.2	Cromatograma de uma solução padrão de cocaína na concentração de 600 µg L <sup>-1</sup> .....	64
Figura 3.3	Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fracionário 2 <sup>4-1</sup> para otimização da extração de cocaína na matriz de fígado.....	66
Figura 3.4	Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fracionário 2 <sup>4-1</sup> para otimização da extração de cocaína na matriz de urina.....	67
Figura 3.5	Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento composto central para otimização da extração de cocaína da matriz de fígado.....	68
Figura 3.6	Gráfico de superfície de resposta obtida do planejamento composto central em amostra de fígado.....	69
Figura 3.7	Gráfico de Pareto contendo a análise dos efeitos avaliados no planejamento composto central da matriz de urina.....	70
Figura 3.8	Gráfico de superfície de resposta obtida do planejamento composto central em amostra de urina.....	71
Figura 3.9	Gráfico de Pareto obtido do planejamento composto central da ELL-PBT da COC em sangue.....	73
Figura 3.10	Gráfico de superfície de resposta obtida do planejamento composto central em amostra de sangue.....	74

Figura 3.11	Cromatogramas do extrato do branco da matriz de fígado (a) e do extrato da matriz previamente fortificada com 25 ng g <sup>-1</sup> de cocaína (b)...	76
Figura 3.12	Cromatogramas do extrato do branco da matriz de urina (a) e do extrato da matriz previamente fortificada com 10 µg L <sup>-1</sup> de cocaína (b).....	76
Figura 3.13	Cromatogramas do extrato do branco da matriz de sangue (a) e do extrato da matriz previamente fortificada com 10 µg L <sup>-1</sup> de cocaína (b).....	77
Figura 3.14	Curvas analíticas de cocaína preparadas em solvente puro e em extrato de fígado.....	78
Figura 3.15	Curvas analíticas de cocaína preparadas em solvente puro e em extrato de urina.....	78
Figura 3.16	Curvas analíticas de cocaína preparadas em solvente puro e em extrato de sangue.....	79
Figura 3.17	Curvas analíticas de cocaína preparadas em extrato de fígado bovino e em extrato de fígado humano.....	81
Figura 4.1	Cromatograma de íons totais obtido da análise do extrato de uma mistura de padrões de cocaína e os principais adulterantes na concentração de 1,0 µg mL <sup>-1</sup> no sistema GC/MS (modo <i>full scan</i> ).....	99
Figura 4.2	(A) Cromatogramas de íons extraídos do cromatograma de íons totais referentes à benzocaína, cafeína, lidocaína, cocaína e femproporex (padrão interno). (B) Espectros de massas característicos do pico de cada composto.....	100

Figura 4.3	Curvas por ajuste de matriz para cocaína e principais adulterantes (benzocaína, cafeína e lidocaína) na faixa linear de 0,0 – 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ...	102
Figura 4.4	Curvas analíticas obtidas pela análise de soluções padrão simples, por ajuste de matriz e por adição do analito na matriz para benzocaína, cafeína, lidocaína e cocaína.....	104
Figura 4.5	Dendograma das amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM).....	118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Doses comumente prescritas e meia vida de alguns benzodiazepínicos (Drummer, 2002; Smink, 2008*).....	27
Tabela 2.2	Planejamento fatorial $2^3$ empregado na otimização do procedimento de ELL-PBT para determinação de benzodiazepínicos em urina.....	33
Tabela 2.3	Avaliação da composição da fase móvel (FM) e do fluxo adequados para a separação dos benzodiazepínicos no sistema cromatográfico LC-Survayor.....	35
Tabela 2.4	Parâmetros espectrométricos e cromatográficos relacionados a cada benzodiazepínico estudado.....	37
Tabela 2.5	Recuperação dos cinco benzodiazepínicos obtidas na condição ótima do planejamento fatorial $2^2$ ( $n = 3$ ).....	40
Tabela 2.6	Faixa linear, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e limite de quantificação dos benzodiazepínicos estudados pelo método proposto.....	41
Tabela 2.7	Precisão e exatidão (recuperação) de cada analito obtidas do <i>pool</i> de urina fortificado em três níveis de concentração: 30, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ ...	42
Tabela 3.1	Planejamento Fracionário $2^{4-1}$ para otimização da ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína em fígado e urina.....	57
Tabela 3.2	Planejamento composto central aplicado à matriz de fígado e urina.....	58

Tabela 3.3	Matriz de planejamento composto central aplicado a sangue.....	59
Tabela 3.4	Recuperações obtidas nos ensaios de variação do volume de água adicionado a 2 g de fígado.....	72
Tabela 3.5	Porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo (DPR) obtidos nos ensaios de força iônica na matriz de sangue.....	75
Tabela 3.6	Valores de F e t obtidos na comparação de médias dos coeficientes angulares das curvas analíticas em solvente puro e em extrato do branco das matrizes fígado, urina e sangue .....	79
Tabela 3.7	Parâmetros das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos métodos propostos.....	82
Tabela 3.8	Precisão e recuperação obtidas pelos métodos propostos após extração de cocaína em três níveis de concentração nas diferentes matrizes.....	83
Tabela 3.9	Concentrações de cocaína (expressa em $\text{ng g}^{-1} \pm s$ ) obtidas das análises de 8 amostras de fígado de periciados <i>post-morte</i> ( $n = 3$ ).....	84
Tabela 3.10	Concentrações de cocaína (expressa em $\text{ng mL}^{-1} \pm s$ ) obtidas das análises de 5 amostras de urina e 5 amostras de sangue de periciados <i>post-mortem</i> ( $n = 3$ ).....	84
Tabela 4.1	Condições operacionais do ICP-OES empregadas para a determinação de alguns constituintes inorgânicos em amostras de “cocaína de rua”.....	95
Tabela 4.2	Parâmetros das curvas por ajuste de matriz da cocaína e principais adulterantes (benzocaína, cafeína e lidocaína) na faixa linear de 0,0 – 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	102

Tabela 4.3	Limites de detecção e quantificação de cocaína, benzocaína, cafeína e lidocaína para o método proposto.....	103
Tabela 4.4	Inclinações ( $\pm$ desvio padrão) para as diferentes curvas analíticas obtidas no estudo do efeito de matriz.....	105
Tabela 4.5	Concentrações de cocaína, benzocaína, cafeína e lidocaína nas amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas e Gerais (MG) e do Amazonas (AM).....	107
Tabela 4.6	Parâmetros da curva analítica para os constituintes inorgânicos determinados por ICP-OES.....	108
Tabela 4.7	Limites de detecção e quantificação obtidos para a análise de constituintes inorgânicos por ICP-OES.....	109
Tabela 4.8	Concentrações dos principais constituintes em amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM), Brasil.....	110
Tabela 4.9	Concentração dos principais constituintes inorgânicos em amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM).....	111
Tabela 4.10	Parâmetros da curva analítica para os constituintes inorgânicos determinados por Cromatografia de Íons.....	112
Tabela 4.11	Concentrações de cloreto, fluoreto, nitrato e sulfato em amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM).....	113

Tabela 4.12	Correlações de Pearson obtidas para os constituintes identificados nas amostras de “cocaina de rua” .....	116
-------------	---	-----



## LISTA DE ABREVIATURAS

AM - Amazonas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

APTDSI – Ionização Superficial por Termodesorção a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmosphere Pressure Thermodesorption Surface Ionization*

BZD - Benzodiazepínicos

BZE - Benzoilecgonina

CDTN - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

COC - Cocaína

COE - Cocaetileno

CV - Coeficiente de Variação

ECG - Ecgonina

ELL-PBT - Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

EME - Ecgonina Metil Éster

ESI – Ionização por *Electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*

ESL-PBT - Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

FM - Fase móvel

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-EI/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com fonte de ionização por impacto de elétrons

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

GC/qMS - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo

HPLC – Comatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de ultravioleta

IC – Cromatografia iônica, do inglês *Ion Chromatography*

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês *Inductively Coupled Plasma-optical Emission Spectrometry*

IT – analisador de massas do tipo aprisionador de íons, do inglês *Ion Trap*

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de Massas

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LSD – Ácido lisérgico de dietilamida, do inglês *Lysergic Acid Diethylamide*

MALDI – Ionização da Matriz Assistida por Desorção a Laser, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

MG - Minas Gerais

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NOR - Norcocaína

PDA – Detector de arranjo de fotodiodos, do inglês *Photodiode Array Detector*

PSA - *Primary Secondary Amine*

SIM – Monitoramento Seletivo de íons, do inglês *Selective Ion Monitoring*

SNC - Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

TOF – Analisador de massas do tipo tempo de voo, do inglês *Time-of-Flight*

UNODC - Relatório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime, do inglês *United Nations Office on Drug and Crime*.

***CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA***

---

## 1.1 Drogas de abuso

As substâncias psicoativas são utilizadas por diferentes civilizações desde a Antiguidade. No passado, essa utilização estava relacionada com rituais, dentro de um contexto religioso, o que favorecia um controle mais adequado e seguro (Goldstein *et al.*, 2009). Atualmente, o uso abusivo de drogas tornou-se um problema de abrangência mundial. A utilização de drogas lícitas e ilícitas pela população em geral, em especial, entre os jovens, é cada vez maior. Além disso, a relação entre o uso dessas drogas e casos de mortes envolvendo overdose, acidentes automobilísticos, homicídios e suicídios é significativa (Tardiff *et al.*, 2002; Carson, 2008; Abrams *et al.*, 2011). Drogas lícitas como o álcool e o tabaco, e ilícitas, como a maconha, a cocaína, a heroína, as anfetaminas e o LSD são utilizadas por milhões de pessoas em todo o mundo, geralmente com graves consequências para o usuário e a sociedade. Além destas, existem ainda drogas farmacêuticas utilizadas como depressores do sistema nervoso central, comercializadas sob prescrição médica, que atuam sobre a ansiedade e a tensão. No entanto, o uso dessas drogas pode causar dependência possuindo, desta forma, potencial para o uso abusivo (Pirnay *et al.*, 2002).

No Brasil, as informações a respeito da magnitude do problema têm indicado que o uso abusivo de drogas vem alcançando níveis preocupantes. As condições socioculturais existentes, a vasta extensão territorial e a localização próxima a países produtores de drogas são fatores que contribuem para essa situação (Yonamine, 2004). Na sociedade em geral, segundo estimativa do relatório das nações unidas sobre drogas e crimes, que traz dados de 2009, 2,6% da população brasileira com faixa etária entre 15 e 64 anos usam regularmente maconha, 0,7% cocaína e 0,7% anfetaminas (UNODC, 2011).

### *Cocaína*

A cocaína foi classificada como a droga dos anos 80 e 90 devido a sua popularidade. Esta é a segunda droga ilícita mais comumente usada e é responsável pela maioria das mortes relacionadas ao uso de drogas. Os usuários mais comuns são grupos de jovens com faixa etária entre 18 e 25 anos (Egred & Davis, 2005), embora estudo posterior no Reino Unido tenha revelado um público mais jovem com faixa etária entre 13 e 16 anos (McCrystal & Percy 2009).

A cocaína, ou benzoilmetilecgonina é um alcalóide extraído das folhas da *Erythroxylum coca* que contém de 0,5 a 2% do princípio ativo. Esta planta é nativa da América do Sul

ocorrendo em alguns países andinos, principalmente, Peru, Bolívia e Colômbia (Farias, 2007). Para extrair a cocaína da planta, as folhas são maceradas com um solvente apropriado, obtendo-se uma substância pastosa (a pasta de coca bruta) que contém de 40 a 80% de cocaína na forma básica. Quando a pasta é tratada com ácido clorídrico obtém-se um pó branco, geralmente na forma de cloridrato de cocaína que é misturado com vários adulterantes, constituindo-se assim a “cocaína de rua”. O cloridrato de cocaína é hidrossolúvel e é bem absorvido pela mucosa nasal e por injeção intravenosa. A quantidade de cocaína, geralmente aspirada pelos usuários, contém aproximadamente 50 - 100 mg do princípio ativo. Já a base livre refere-se à cocaína que não foi neutralizada por um ácido para produzir o sal cloridrato. Por não ser solúvel em água, esta substância é geralmente fumada (Goldstein *et al.*, 2009).

Devido aos grosseiros processos clandestinos, muitas impurezas podem estar presentes no produto final. Além disso, uma série de compostos pode ser adicionada à cocaína com intuito de simular as propriedades organolépticas da droga (adulterantes) ou aumentar o volume disponível da mesma (diluentes), de forma que raramente se encontra uma cocaína com 100% de pureza (Bernardo *et al.*, 2003). No Brasil, a “cocaína de rua” geralmente é comercializada com pureza de 15 a 36% (UNODC, 2011). Tais impurezas, adulterantes e diluentes, podem causar efeitos diversos à saúde dos usuários da droga.

Atualmente, os laboratórios forenses no Brasil apenas identificam a cocaína em amostras “suspeitas”. No entanto, a presença de outras substâncias químicas em amostras “de rua” pode causar reações adversas aos usuários da droga. Algumas dessas substâncias químicas possuem ação farmacológica (Bernardo *et al.*, 2003), principalmente aquelas usadas como adulterantes. Além disso, a determinação da composição de uma droga ilícita pode ser o único *fingerprint* capaz de ligar o material a uma fonte específica (Gostic *et al.*, 2009). Desta forma, o conhecimento da qualidade (pureza e adulterantes) da cocaína apreendida em diferentes países pode ser útil no controle e prevenção de alguns dos efeitos sobre a saúde humana decorrentes do uso abusivo (Barrio *et al.*, 1997).

Neste contexto, o desenvolvimento de métodos para quantificação do teor de cocaína e identificação de adulterantes e diluentes em amostras apreendidas é de suma importância.

### *Benzodiazepínicos*

Os benzodiazepínicos são drogas farmacêuticas largamente utilizadas como ansiolíticos, hipnóticos, indutores do sono, e no tratamento de doenças psiconeurológicas. Quando usados cronicamente podem causar dependência possuindo, desta forma, potencial para o uso abusivo (Gil Tejedor *et al.*, 2007). Além do etanol, cocaína, maconha e o ecstasy, os benzodiazepínicos são os compostos mais comumente utilizados nos crimes facilitados pelo uso de droga (Chèze *et al.*, 2004). Muitas vezes estão relacionados a crimes como homicídio, violência sexual e acidentes no trânsito (Smink *et al.*, 2008).

Uma série de intoxicações pode ocorrer em virtude do uso de drogas. Intoxicações acidentais podem ocorrer em indivíduos que, sem intenção, experimentam os efeitos de uma substância com intensidade maior do que o planejado. Isto pode ocorrer através de uma mudança na tolerância do indivíduo para a substância, ou através de uma preparação contendo mais substância ativa do que o esperado. Alternativamente, intoxicações acidentais podem ocorrer quando o indivíduo não tem conhecimento daquilo a que foi exposto, como é o caso da maioria das intoxicações pediátricas (Hadidi *et al.*, 2009). Além disso, as intoxicações podem ocorrer também intencionalmente e, se a consequência de um episódio de intoxicação intencional é a morte, isto configura um suicídio. Com base nas definições acima, a maioria dos casos relacionados ao uso abusivo de substâncias ilícitas que levam à morte se configura como casos de intoxicações acidentais (Hadidi *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de métodos analíticos para detecção (*screening*) e para quantificação de benzodiazepínicos é importante para determinar se esta classe de compostos está envolvida nesses casos. Muitos benzodiazepínicos estão incluídos em análises de rotina de drogas, devido a sua frequente presença em casos clínicos e forenses, exigindo, portanto, métodos de preparo de amostra e quantificação rápidos e eficientes.

### **1.2. Análise de Matrizes Biológicas**

O desenvolvimento de métodos para determinação de drogas em matrizes biológicas é um importante instrumento para profissionais envolvidos no âmbito clínico e forense. No âmbito clínico contribui para o monitoramento de pacientes em uso prolongado do medicamento, no tratamento da toxicodependência e no controle do uso abusivo de drogas. No âmbito forense

contribuiu para o esclarecimento da causa *mortis* e para o diagnóstico de intoxicações acidentais ou intencionais relacionados ao uso abusivo de drogas (Hadidi *et al.*, 2009).

Várias matrizes biológicas são utilizadas em toxicologia clínica e forense para a detecção de drogas. Além de urina e sangue (soro/plasma) como matrizes clássicas, cabelo, suor, fígado, saliva, mecônio, dentre outras se tornaram importantes (Moeller *et al.*, 1998; Drummer, 1998).

A urina é uma das matrizes biológicas mais comumente utilizada para análise de drogas, em especial devido à sua coleta relativamente fácil, e porque é um meio universal de excreção da droga, metabólitos ou ambos. Possui complexidade moderada e, normalmente, contém componentes orgânicos e inorgânicos, bem como um nível relativamente elevado de conteúdo salino (Lord & Pawliszyn, 2000). Tradicionalmente, a urina é a amostra biológica de escolha para *screening* e identificação de drogas desconhecidas. As concentrações desses compostos são relativamente elevadas nesta matriz. Em contrapartida, os metabólitos dessas drogas também são identificados nesta matriz de forma que, algumas vezes, apenas uma pequena quantidade da droga na forma inalterada é detectada (Pizzolato *et al.*, 2007), exceto em casos de overdose.

A análise de amostras de sangue adquiriu um valor consideravelmente maior em relação à urina, nos últimos anos. A vantagem do sangue como matriz é que a droga pode ser detectada após a ingestão, antes que seja metabolizada (Moeller *et al.*, 1998; Pizzolato *et al.*, 2007). Além disso, o sangue oferece uma boa correlação entre as doses administradas e os níveis detectados. A concentração de compostos orgânicos no sangue total apresenta uma avaliação direta da exposição dos tecidos a esses compostos. Tanto soro (Kunicki, 2001) quanto plasma (Abbara *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2009) são rotineiramente utilizados para a análise de drogas. Amostras de sangue, plasma e soro, podem muitas vezes ser intercaladas na maioria dos métodos (Drummer, 1998), ou seja, um método desenvolvido para o sangue pode normalmente ser aplicado sem modificação ao soro ou plasma.

Tecidos *post-mortem*, tais como rim e fígado, têm sido muito utilizados em aplicações forenses especialmente naqueles casos onde o sangue não está disponível. Como a maioria dos medicamentos é metabolizada no fígado, tanto a substância precursora quanto seus metabólitos podem estar presentes neste tecido em altas concentrações. O rim também assume um papel importante em análises toxicológicas, uma vez que drogas e metabólitos devem passar por este tecido antes de serem excretados na urina. O processo de interpretação dos resultados leva em

consideração todos os aspectos envolvidos na causa da investigação de morte, incluindo a análise múltipla de amostras (Margalho *et al.*, 2011).

### 1.3. Preparo de amostras aplicadas a matrizes biológicas

Matrizes biológicas são caracterizadas por apresentar uma composição complexa, concentração muito baixa dos analitos, alta possibilidade de interferentes e acesso extremamente limitado a materiais de referência (Janicka *et al.*, 2010). Interferentes co-extraídos da matriz podem causar problemas analíticos resultando em supressão ou aumento do sinal, que levam a resultados falso-negativos ou falso-positivos, respectivamente (Mullett, 2007). Tais problemas podem ser superados pela seleção apropriada do procedimento de preparo de amostra.

O preparo da amostra afeta quase todas as etapas do ensaio e é, portanto, fundamental para a identificação inequívoca, confirmação e quantificação dos analitos. O objetivo principal desse processo é separar e pré-concentrar o composto alvo e, se possível purificar o extrato (Janicka *et al.*, 2010). A etapa de preparo da amostra normalmente leva 80% do tempo total da análise (Nováková & Vlcková, 2009).

Um método analítico deve incluir as seguintes etapas: amostragem (amostra deve ser representativa do objeto de inquérito), preservação da amostra (amostra deve se manter estável até a análise ser concluída), preparo da amostra, análise da amostra e tratamento dos dados (Hernandez-Borges *et al.*, 2007). Em qualquer protocolo para análise de compostos orgânicos, o preparo de amostras é crucial para assegurar resultados exatos e confiáveis.

A escolha e otimização de um adequado pré-tratamento de amostra não são fáceis, especialmente com matrizes muito complexas como as biológicas (plasma, soro, sangue, urina, fígado, etc.) (Hernandez-Borges *et al.*, 2007). Materiais biológicos geralmente não são compatíveis com análises por técnicas cromatográficas, devido à complexidade dessas matrizes, que pode causar uma série de problemas analíticos como perda de eficiência da coluna. Por este motivo o preparo da amostra torna-se necessário.

Os métodos convencionais, empregados rotineiramente no tratamento de amostras biológicas, têm sido extração líquido-líquido (Langel *et al.*, 2011; Salomone *et al.*, 2011), extração em fase sólida (Choi *et al.*, 2010; Joya *et al.*, 2010) e micro-extração em fase sólida (Moller *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2011).



A extração líquido-líquido (ELL) apresenta alguns inconvenientes, tais como, consumo de solventes orgânicos de alta pureza e em grandes quantidades, exposição do analista a compostos tóxicos, várias etapas para sua execução e, em alguns casos, formação de emulsão entre as fases, o que resulta na perda do analito (Queiroz & Lanças, 2005).

A extração em fase sólida (SPE) apresenta uma grande variedade de sorventes extratores, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos, favorecendo, desta forma, a seletividade analítica; possibilita a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Entretanto, tem apresentado algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz, variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para sua execução (Queiroz & Lanças, 2005).

A microextração em fase sólida (SPME), desenvolvida por Arthur & Pawliszyn em 1990, é mais simples e mais rápida do que ELL e SPE. Em geral extratos mais limpos são obtidos, e não usa solventes para a eluição. Por outro lado, o analito necessita ser volátil e termicamente estável o que limita o método para apenas alguns tipos de analitos, normalmente determinados por cromatografia gasosa (Queiroz *et al.*, 2001).

#### **1.4. Extração sólido-líquido e/ou líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL e/ou ELL-PBT)**

Como a acetonitrila é um solvente hidrofílico que é separado da fase aquosa a -20 °C, Goulart e colaboradores em 2004 desenvolveram um método de extração e determinação de compostos orgânicos em leite baseado neste princípio (Goulart, 2004). O método foi denominado Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ELL-PBT) e vem sendo aprimorado para compostos orgânicos em diferentes matrizes como água (Vieira *et al.*, 2007; Goulart *et al.*, 2010) e alimentos (Rübensam *et al.*, 2011; Goulart *et al.*, 2008; Pinho *et al.*, 2009; Pinho *et al.*, 2010).

O método consiste em preparar uma mistura extratora que seja miscível com a amostra. A mistura, em fase única, é armazenada a -20 °C. A fase extratora, ainda na fase líquida é separada da fase aquosa que é congelada. Sem a necessidade de qualquer outro método de partição o extrato orgânico é separado e analisado por técnicas cromatográficas. Extratos limpos são obtidos

por este método, mesmo em matrizes complexas, não sendo necessária nenhuma etapa posterior de purificação (Goulart *et al.*, 2008).

A técnica de ELL-PBT têm sido utilizada para extração de diferentes compostos em matrizes complexas. No entanto, nenhum trabalho na literatura relata a extração de drogas a partir de fluídos biológicos por esta técnica. Por este motivo estudos envolvendo esta técnica de extração para determinação de drogas em matrizes biológicas torna-se importantes.

### **1.5. Técnicas cromatográficas para quantificação de drogas e seus constituintes.**

Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a quantificação de drogas em matrizes biológicas. Os métodos mais comuns são baseados em técnicas cromatográficas tais como a cromatografia gasosa (CG) (Joya *et al.*; 2010; Kim *et al.*, 2010; Viette *et al.*, 2011) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Felli *et al.*, 2011; Salomone *et al.*, 2011).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo: a fase móvel e a fase estacionária (Collins *et al.*, 2009).

Na cromatografia gasosa as substâncias volatilizáveis são separadas com base na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (Collins *et al.*, 2009).

Na cromatografia líquida os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre a fase estacionária e a fase móvel líquida. A CLAE (ou HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser uma das técnicas analíticas mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e à possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (Tonhi *et al.*, 2002).

Embora a cromatografia de troca iônica não seja aplicada à análise de rotina em laboratórios forenses, esta será utilizada neste trabalho para identificação de íons. Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é altamente carregada e solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos na fase estacionária. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com mesmo tipo de carga, porém

com maior força de interação com a fase estacionária. Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem esse tipo de cromatografia (Collins, 2009).

## 1.6. Espectrometria de Massas

A Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry - MS*) é uma técnica analítica através da qual os íons na fase gasosa são selecionados pela sua razão massa/carga. Assim, o ponto crucial da espectrometria de massas é a geração de íons dos analitos na fase gasosa. Isso geralmente requer dois passos: vaporização e ionização, que podem ocorrer sequencialmente ou simultaneamente. Ambos os processos exigem o fornecimento de energia. Em alguns casos, como na análise elementar, esta fonte de energia é tão alta que todas as ligações químicas são quebradas, resultando na formação de íons atômicos. Em análise de compostos orgânicos por espectrometria de massas, a informação desejada é a massa das moléculas (analitos) de uma amostra e não a sua composição atômica. Para obter informações sobre a massa molecular existe a necessidade de gerar íons gasosos a partir da estrutura intacta da molécula, ou seja, a energia da fonte deve ser suficientemente baixa para não causar rupturas intramoleculares (Dulcks & Juraschek, 1999). Por outro lado, algumas informações estruturais podem ser obtidas através da ruptura de ligações intramoleculares (ou fragmentação). Assim, a partir da massa e abundância do fragmento iônico, a estrutura da molécula do analito pode ser deduzida (Dulcks & Juraschek, 1999).

Um método clássico de ionização de compostos orgânicos em MS é o impacto de elétrons (EI). Neste método, as moléculas da amostra são vaporizadas e sofrem impacto com feixe de elétrons de cerca de 70 eV de energia. Os íons gerados são carregados positivamente (devido ao processo  $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$ ), e a energia consumida é suficientemente alta para gerar uma fragmentação significativa. O método é limitado a moléculas que podem ser aquecidas sem degradação térmica. Substâncias menos voláteis, geralmente aquelas com alta massa molecular, como a maioria das moléculas bioquímicas de interesse (peptídeos, carboidratos), não são quantificadas adequadamente por esta técnica (Dulcks & Juraschek, 1999). Para suprir as deficiências desta técnica, outros modos de ionização foram propostos e entre eles a ionização por “electrospray”.

### 1.6.1. Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Electrospray

A fonte de ionização electrospray (ESI) foi proposta pela primeira vez por Dole e colaboradores em 1968 (Dole, 1968; Yamashita & Fenn, 1984). No entanto, seus experimentos não foram convincentes uma vez que visava a análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não são ionizados em solução. Foi somente em 1984 que Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade da fonte de “electrospray” como um método de ionização branda para a espectrometria de massas (Yamashita & Fenn, 1984). Desde então, a ESI tornou-se uma das técnicas suaves de ionização mais comumente utilizadas devido à sua versatilidade, facilidade de utilização e eficácia em carregar as grandes biomoléculas (Maxwell & Chen, 2008).

Esta fonte de ionização envolve a aplicação de um elevado potencial elétrico sobre uma amostra líquida que flui através de um capilar. O campo elétrico na ponta do capilar age sobre os íons em solução, criando uma separação de cargas entre ânions e cátions (Figura 1.1). No modo positivo, íons positivos migram em direção à ponta do capilar, onde é formada uma gota enriquecida de íons positivos. Este tipo de separação de carga é chamado de processo eletroforético. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando a deformação da gota. Forças eletrostáticas agindo sobre os íons positivos levam à formação do cone de Taylor. Quando a força eletrostática excede a tensão superficial, um jato de gotículas com alta densidade de carga é ejetado da ponta do cone para o contra eletrodo (Maxwell & Chen, 2008). A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução (Moraes & Lago 2003).

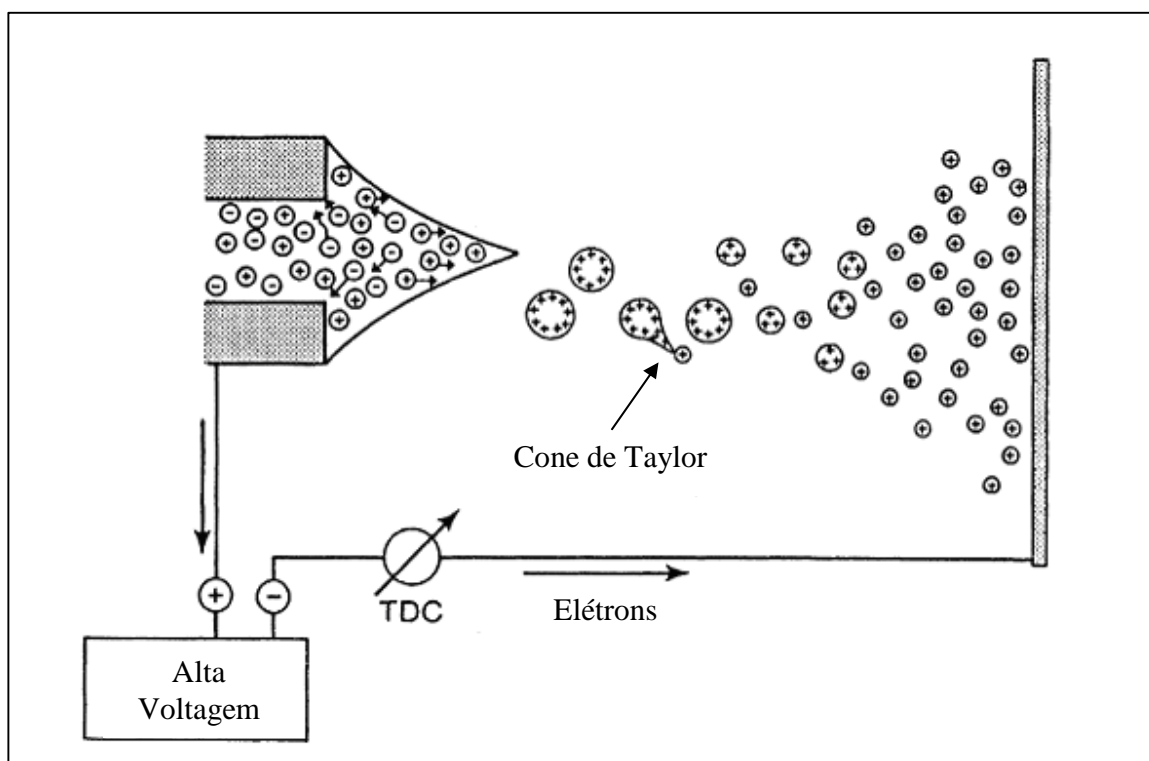


Figura 1.1. Representação esquemática da técnica ESI (Fonte: Kebarle & Peschke, 2000).

Depois da liberação das gotas com alta densidade de carga do cone de Taylor, estas passam pela região entre a ponta do capilar e o contra eletrodo e vão sofrendo dessolvatação. A evaporação do solvente é favorecida pela energia térmica do ambiente e pelo auxílio de um gás secante, normalmente nitrogênio. Conforme a gota perde solvente, a densidade de carga aumenta até um ponto em que as forças de repulsão vencem a tensão superficial e gotículas são liberadas pela fissão da gota inicial (Moraes & Lago 2003). Fissões e evaporação subsequente das gotículas carregadas resultam na formação de íons dessolvatados para a fase gasosa. Esses íons são transmitidos à abertura do espectrômetro de massas para separação baseada na sua razão massa/carga, seguido por detecção (Maxwell & Chen, 2008).

É importante que as forças que atuam sobre o cone de Taylor, incluindo a tensão superficial, densidade de carga, campo elétrico e razão de fluxo, sejam otimizadas a fim de se obter condições estáveis de ejeção de gotículas finas. Condições operacionais otimizadas de

forma inadequada irão desestabilizar o cone de Taylor, conduzindo a um desempenho inferior em termos de tamanho da gotícula, estabilidade de fluxo do íon e/ou direcionamento do spray.

### 1.6.2. Analisador de Massas do tipo TOF

A filosofia de trabalho de um sistema tipo TOF, do inglês *time-of-flight*, consiste na análise e identificação de íons pela medida do intervalo de tempo gasto para esses íons percorrerem a distância do ponto de sua geração até um detector (Cardoso *et al.*, 2001). Em um sistema tipo TOF, os íons formados na fonte de ionização são extraídos e acelerados em alta velocidade por um campo elétrico em um tubo longo, após o qual atingem o detector. A velocidade alcançada pelo íon acelerado é proporcional à raiz quadrada da sua razão  $m/z$ ; por simplicidade assume-se inversamente proporcional à massa. De forma análoga, o tempo necessário para o íon atravessar o tubo será inversamente proporcional à raiz quadrada de sua razão  $m/z$ ; por simplicidade é comum assumir que o mesmo é proporcional à massa, uma vez que a distância entre a formação do íon e o detector é fixa (Lanças, 2009).

O princípio de operação do TOF baseia-se na medida do “tempo de voo” de um íon dentro do espectrômetro de massas. Uma vez que as dimensões do tubo e a energia cinética dos íons são bem conhecidas, o cálculo da razão  $m/z$  torna-se mais simples (Vieira, 2011). A Figura 1.2 mostra a representação esquemática do funcionamento de um espectrômetro de massas com analisador do tipo TOF. Esta representação faz parte do sistema usado neste trabalho e consiste em um analisador do tipo tandem *ion-trap* – *time-of-flight*. Este sistema contém uma fonte de ionização electrospray e dois analisadores de massa: *ion-trap* (aprisionador de íons) e TOF. O acoplamento da ionização a pressão atmosférica com os analisadores de massa sequenciais *ion trap* (IT) e tempo de voo (TOF) permitem a obtenção de alta exatidão de massa e alta resolução (10.000 a 1000  $m/z$ ). O equipamento disponibiliza ainda a capacidade de fragmentações sequenciais do tipo  $MS^n$  ( $MS/MS$ ,  $MS/MS/MS$ , etc.) utilizando o método de dissociação por colisão induzida por argônio no *ion-trap* e também a capacidade de realizar medições de massa de alta resolução e alta precisão no TOF, propiciando uma grande seletividade e especificidade dos íons (Silva, 2010).

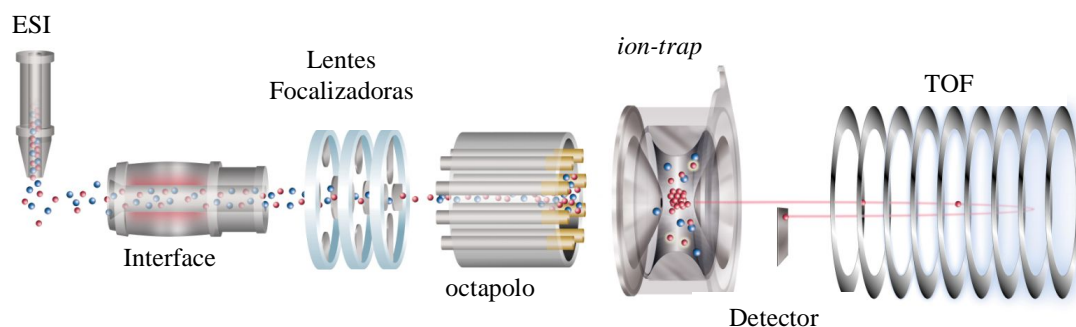


Figura 1.2 – Representação esquemática do funcionamento do espectrômetro de massas *ion-trap* – *time-of-flight* (fonte: Shimadzu, 2007)

### 1.7. Acoplamento de técnicas cromatográficas à Espectrometria de Massas

Os métodos analíticos devem fornecer alta confiabilidade e precisão. A combinação da espectrometria de massas com a cromatografia é a técnica escolhida para análises clínicas e forenses por ser muito sensível, precisa, específica, rápida e universal (Maurer, 1998). Desde 1980 que o acoplamento da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas tornou-se o método padrão para identificação e quantificação de drogas voláteis (Maurer, 2007).

Nos últimos anos o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas tem se tornado um procedimento útil e alternativo ao GC-MS para a análise de compostos orgânicos polares e termicamente instáveis, reduzindo a manipulação excessiva da amostra. Nos primeiros anos da década de 90 vários grupos de trabalho começaram a aplicar esta técnica em toxicologia analítica. Alguns deles começaram com a transferência de procedimentos existentes (HPLC-UV e GC-MS), sendo que o progresso prático e científico foi limitado, particularmente quando se consideram as limitações desta nova técnica assim como reprodutibilidade de ionização inadequada e susceptibilidade para efeito de matriz (supressão iônica ou enriquecimento). Atualmente, os equipamentos têm sido aperfeiçoados e os principais problemas relacionados à técnica, contornados (Maurer, 2007).

Enquanto a cromatografia gasosa pode ser facilmente acoplada à espectrometria de massas, a cromatografia líquida pode ser acoplada à espectrometria de massas somente com o uso de interfaces sofisticadas. Desde 1970, diferentes tipos de interfaces para LC-MS foram

desenvolvidas a fim de remover a fase móvel e ionizar o analito, como borbardeamento de átomos rápidos, ionização da matriz assistida por desorção a laser (MALDI), ionização superficial por termodessorção a pressão atmosférica (APTDSI), *electrospray* (ESI), ou ionização química à pressão atmosférica (APCI) (Maurer, 1998; Marchi *et al.*, 2009). Atualmente, dois tipos de interface, relativamente robustas tornaram-se padrão para as análises por LC-MS. Estas interfaces consistem em fontes de ionização à pressão atmosférica, tais como ESI e APCI.

Um pré-requisito na técnica de ionização *electrospray* é que o analito deve ser ionizado em solução, e que a fase móvel da cromatografia líquida frequentemente contenha uma pequena quantidade de um ácido ou de uma base volátil. Se esses aditivos prejudicarem a separação, eles podem ser adicionados após a separação e antes do eluente entrar na interface do espectrômetro de massas (Maurer, 1998).



## REFERÊNCIAS

- Abbara, C.; Bardot, I.; Cailleux, A.; Lallement, G.; Le Bouil, A.; Turcant, A.; Clair, P.; Diquet, B. (2008). "High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma." Journal of Chromatography B **874**(1-2): 42-50.
- Abrams, R. C.; Leon, A. C.; Tardiff, K.; Marzuk, P. M.; de los Santos, R. (2011). "Suicidal overdoses of psychotropic drugs by elderly in New York City: Comparison with younger adults". Psychiatry Research **188**: 459–461
- Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. (1990) "Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers". Analytical Chemistry **62**: 2145-2148.
- Barrio, G.; Saavedra, 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, N. P.; Siqueira, M. E. P. B.; de 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.
- Cardoso, A. S.; Pontes, F. C.; Souza, G. G. B.; Mundim, M. S. (2001) "Um espectrômetro de massas de tempo-de-vôo para o estudo da ionização de amostras gasosas por elétrons rápidos (0,5 – 1,0 KEV)" Química Nova **24**(3): 315-319.
- Carson, H. J. (2008). "Classes of drugs and their prevalence in multiple drug intoxication in suicides and accidents". Legal Medicine **10**: 92–95
- Chèze, M., Villain, M.; Pépin, G. (2004). "Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes." Forensic Science International **145**(2-3): 123-130.
- Choi, H., Baeck, S.; Jang, M.; Lee, S.; Choi, H.; Chung, H. (2011) "Simultaneous analysis of psychotropic phenylalkylamines in oral fluid by GC–MS with automated SPE and its application to legal cases." Forensic Science International **215**(1): 81-87.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. (2009) "Fundamentos de Cromatografia". Editora Unicamp. Campinas, SP: 453p.

- Dole, M. (1968). "Molecular Beams of Macroions." J. Chem. Phys. **49**(5): 2240.
- Drummer, O. H. (1998). "Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **713**(1): 201-225.
- Dulcks, T.; Juraschek, R. (1999). "Electrospray as an ionisation method for mass spectrometry." Journal of Aerosol Science **30**(7): 927-943.
- Egred, M.; Davis, G. K. (2005). "Cocaine and the heart." Postgraduate Medical Journal **81**(959): 568-571.
- Farias, R. F. (2007) "Introdução à Química Forense". Editora Átomo. Campinas, SP.
- Felli, M.; Martello, S.; Chiarotti, M. (2011). "LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests." Forensic Science International **204**(1-3): 67-73.
- Gil Tejedor, A. M.; Fernández Hernando, P.; Durand Alegría, J. S. (2007). "A rapid fluorimetric screening method for the 1,4-benzodiazepines: Determination of their metabolite oxazepam in urine." Analytica Chimica Acta **591**(1): 112-115.
- Goldstein, R. A., DesLauriers, C.; Burda, A. M. (2009). "Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review." Seminars in Diagnostic Pathology **26**(1): 10-17.
- Gostic, T.; Klemenc, S.; Stefane, B. (2009) "A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions". Forensic Science International **187**: 19-28.
- Goulart, S. M. (2004) "Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa" Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais- Brasil.
- Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H. (2008). "Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection." Talanta **75**(5): 1320-1323.
- Goulart, S. M.; Alves, R. D.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H.; Assis, T. C.; Queiroz, M. E. L. R. (2010). "Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water." Analytica Chimica Acta **671**(1-2): 41-47.

- Hadidi, M. S., Ibrahim, M. I.; Abdallat, I. M.; Hadidi, K. A. (2009). "Current trends in drug abuse associated fatalities – Jordan, 2000–2004." Forensic Science International **186**(1-3): 44-47.
- Hernandez-Borges, J.; Borges-Miquel, T. M.;Rodriguez-Delgado, M. A.; Cifuentes, A. (2007). "Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry." Journal of Chromatography A, 1153: 214–226.
- Ishida, T.; Kudo, K.; Hayashida, M.; Ikeda, N (2009). "Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column." Journal of Chromatography B **877**(25): 2652-2657.
- Janicka, M.; Kot-Wasik, A.; Namiesnik, J. (2010). "Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples." Trac-Trends in Analytical Chemistry **29**(3): 209-224.
- Joya, X., Pujadas, M.; Falcon, M.; Civit, E.; Garcia-Algar, O.; Vall, O.; Pichini, S.; Luna, A.; de la Torre, R. (2010). "Gas chromatography–mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation." Forensic Science International **196**(1-3): 38-42.
- Kebarle, P.; Peschke, M. (2000) "On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions" Analytica Chimica Acta **406**: 11–35
- Kim, J. Y.; Shin, S. H.; Lee, J. I.; In, M. K. (2010). "Rapid and simple determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography–mass spectrometry using micro-pulverized extraction." Forensic Science International **196**(1-3): 43-50.
- Kunicki, P. K. (2001). "Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of 1,5-benzodiazepine clobazam and its active metabolite N-desmethylclobazam in human serum and urine with application to 1,4-benzodiazepines analysis." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **750**(1): 41-49.
- Lanças, F. M. (2009) "A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente compatíveis?" Scientia Chromatographica **1**: 2

- Langel, K., Gunnar, T.; Ariniemi, K.; Rajamaki, O.; Lillsunde, P. (2011). "A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography–mass spectrometry." Journal of Chromatography B **879**(13-14): 859-870.
- Lord, H.; Pawliszyn, J. (2000). "Microextraction of drugs." Journal of Chromatography A **902**(1): 17-63.
- Marchi, I.; Schappler, J.; Veuthey, J. L.; Rudaz, S. (2009). "Development and validation of a liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization–mass spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their main metabolites in haemolysed blood." Journal of Chromatography B **877**(23): 2275-2283.
- Margalho, C.; Franco, J.; Corte-Real, F.; Vieira, D. N. (2011). "Illicit drugs in alternative biological specimens: A case report." Journal of Forensic and Legal Medicine **18**(3): 132-135.
- Maurer, H. H. (1998) "Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology" Journal of Chromatography B **713**: 3–25.
- Maurer, H. H. (2007). "Current role of liquid chromatography–mass spectrometry in clinical and forensic toxicology." Analytical and Bioanalytical Chemistry **388**(7): 1315-1325.
- Maxwell, E. J.; Chen, D. D. Y. (2008). "Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **627**(1): 25-33.
- McCrystal, P.; Percy, A. (2009). "A profile of adolescent cocaine use in Northern Ireland." International Journal of Drug Policy **20**(4): 357-364.
- Moeller, M. R.; Steinmeyer, S.; Kraemer, T. (1998). "Determination of drugs of abuse in blood." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **713**(1): 91-109.
- Moller, M., Aleksa, K.; Walasek, P.; Karaskov, T.;Koren, G (2010). "Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography–mass spectrometry." Forensic Science International **196**(1-3): 64-69.
- Moraes, M. C. B.; Lago, C. L. (2003). "Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas." Química Nova **26**: 556-563.

- Mullett, W. M. (2007) Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70: 263–273
- Nováková, L.; Vlčková, H. (2009). "A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation." Analytica Chimica Acta 656(1-2): 8-35.
- Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. (2009). "Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa." Química Nova 32: 987-995.
- Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. (2010). "Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography." Food Control 21(10): 1307-1311.
- Pirnay, S.; Ricordel, I.; Libong, D.; Bouchonnet, S. (2002) "Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry" Journal of Chromatography A 954: 235–245.
- Pizzolato, T. M.; de Alda, M. J. L.; Barceló, D. (2007). "LC-based analysis of drugs of abuse and their metabolites in urine." TrAC Trends in Analytical Chemistry 26(6): 609-624.
- Queiroz, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. (2001). "Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica." Química Nova 24: 68-76.
- Queiroz, M. E. C.; Lanças, F. M. (2005). "Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência." Química Nova 28: 880-886.
- Rübensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Kist, T. L.; Pizzolato, T. M. (2011) "A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection." Analytica Chimica Acta 705: 24-29.
- Salomone, A.; Gerace, E.; Brizio, P.; Gennaro, M. C.; Vicenti, M. (2011). "A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 56(3): 582-591.

- Smink, B. E.; Lusthof, K. J.; de Gier, J. J.; Uges, D. R. A.; Egberts, A. C. G. (2008). "The relation between the blood benzodiazepine concentration and performance in suspected impaired drivers." Journal of Forensic and Legal Medicine **15**(8): 483-488.
- Silva, J. C. C. (2010) "Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de microcistina-lr e agrotóxicos em águas superficiais, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massas". Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil.
- Souza, D. Z.; Boehl, P. O.; Comiran, E.; Mariotti, K. C.; Pechansky, F.; Duarte, P. C.; De Boni, R.; Froehlich, P. E.; Linberger, R. P. (2011). "Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **696**(1-2): 67-76.
- Tardiff, K.; Marzuk, P. M.; Lowell, K.; Portera, L.; Leon, A. C. (2002) "A study of drug abuse and other causes of homicide in New York" Journal of Criminal Justice **30**: 317– 325.
- Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. (2002). "Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados." Química Nova **25**: 616-623.
- UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. WORLD DRUG REPORT 2011. United Nations, 2011, 267p.
- Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. (2007). "Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG." Química Nova **30**: 535-540.
- Vieira, K. M. (2011) "Aplicação dos processos oxidativos, redutivos e (foto)eletroquímicos aplicados na degradação de fármacos em meio aquoso". Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- Viette, V.; Guillarme, D.; Mylonas, R.; Mauron, Y.; Fathi, M.; Rudaz, S.; Hochstrasser, D.; Veuthey, J. L. (2011). "A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography–hybrid tandem mass spectrometry (Part I)." Clinical Biochemistry **44**(1): 32-44.
- Yamashita, M.; Fenn, J. B. (1984). "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme." The Journal of Physical Chemistry **88**(20): 4451-4459.

Yonamine, M (2004). "A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais" Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

***CAPITULO II – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS EM URINA***

---

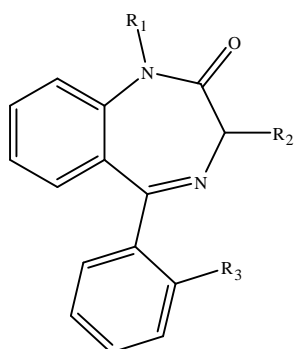


## 1. INTRODUÇÃO

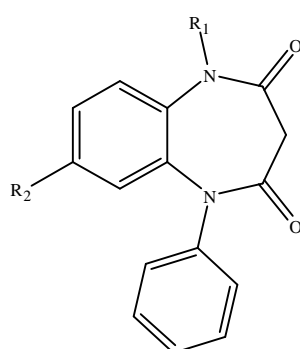
Os benzodiazepínicos (BZD) são drogas com atividade ansiolítica, anticonvulsivante, hipnótica e relaxante muscular (Jinno *et al.*, 1998). Estes compostos constituem uma grande classe de fármacos, dos quais mais de 50 são conhecidos em todo o mundo. Apresentam-se como sólidos cristalinos com coloração amarela esbranquiçada, e pontos de fusão entre 80 e 240 °C (Passagli, 2008).

Os benzodiazepínicos podem ser agrupados em três subclasses (Figura 2.1):

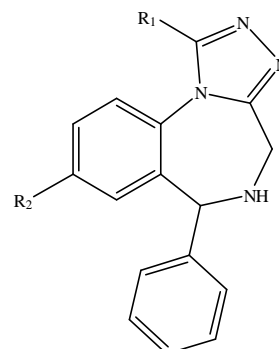
- derivados da 1,4 benzodiazepina;
- derivados da 1,5 benzodiazepina;
- derivados da triazolo-1,4-benzodiazepina.



1,4-benzodiazepina



1,5-benzodiazepina



Triazolo-1,4-benzodiazepina

Figura 2.1: Estrutura química geral das três subclasses de benzodiazepínicos.

Os benzodiazepínicos clássicos são caracterizados pela presença de um anel benzênico ligado a um anel de 7 membros contendo dois átomos de nitrogênio (1,4-diazepina). Alguns compostos contêm um radical fenil localizado na posição 5, sendo que, em muitos casos este anel sofre substituição adicional dos halogênios F, Cl ou Br na posição  $R_H$  (Figura 2.2) (Borges *et al.*, 2009).

Na Figura 2.3 estão representadas as estruturas dos benzodiazepínicos selecionados para este trabalho. Estes compostos foram escolhidos por serem considerados “benzodiazepínicos clássicos”, ou seja, os primeiros a serem sintetizados em laboratório. Além disso, constituem-se nos principais compostos desta classe prescritos no Brasil.

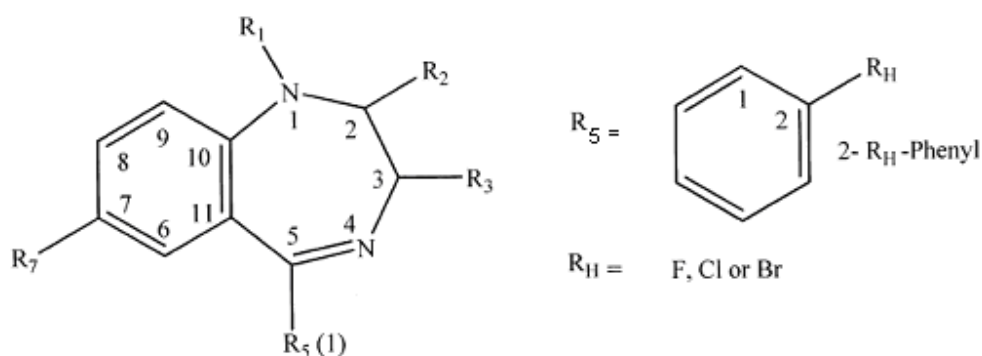


Figura 2.2: Estrutura geral dos benzodiazepínicos clássicos.

Os benzodiazepínicos apresentam uma grande variedade de aplicações na área médica e, conseqüentemente, podem ser relacionados com o uso abusivo. Estes estão entre as drogas mais frequentemente prescritas no tratamento da ansiedade, distúrbio do sono e estado epiléptico. Além disso, são utilizados no tratamento da abstinência alcoólica, para aliviar a tensão no período pré-operatório e para induzir amnésia em procedimentos cirúrgicos (Borges *et al.*, 2009). Os compostos de ação curta, como oxazepam, são utilizados no tratamento da insônia. Já os análogos de ação mais longa, como diazepam, são usados para tratar várias formas de ansiedade. Ambos compostos são também empregados no tratamento de abstinência alcoólica com finalidade de redução da ansiedade e sintomas da abstinência. Já o clonazepam é indicado em casos de stress pós-traumático, transtornos obsessivo-compulsivos e pânico associado a fobias, além de possuir utilizações no tratamento da epilepsia. Como os benzodiazepínicos são drogas sedativas, eles são utilizados como agentes de indução da anestesia geral em cirurgia e endoscopia. O lorazepam é usado nesta situação, além de também ser utilizado para o tratamento de indivíduos com comportamento agitado, violento ou psicótico (Drummer, 2002). Assim como a maioria dos

benzodiazepínicos, o bromazepam é usado para tratar queixas somáticas ou psicóticas associadas à ansiedade.

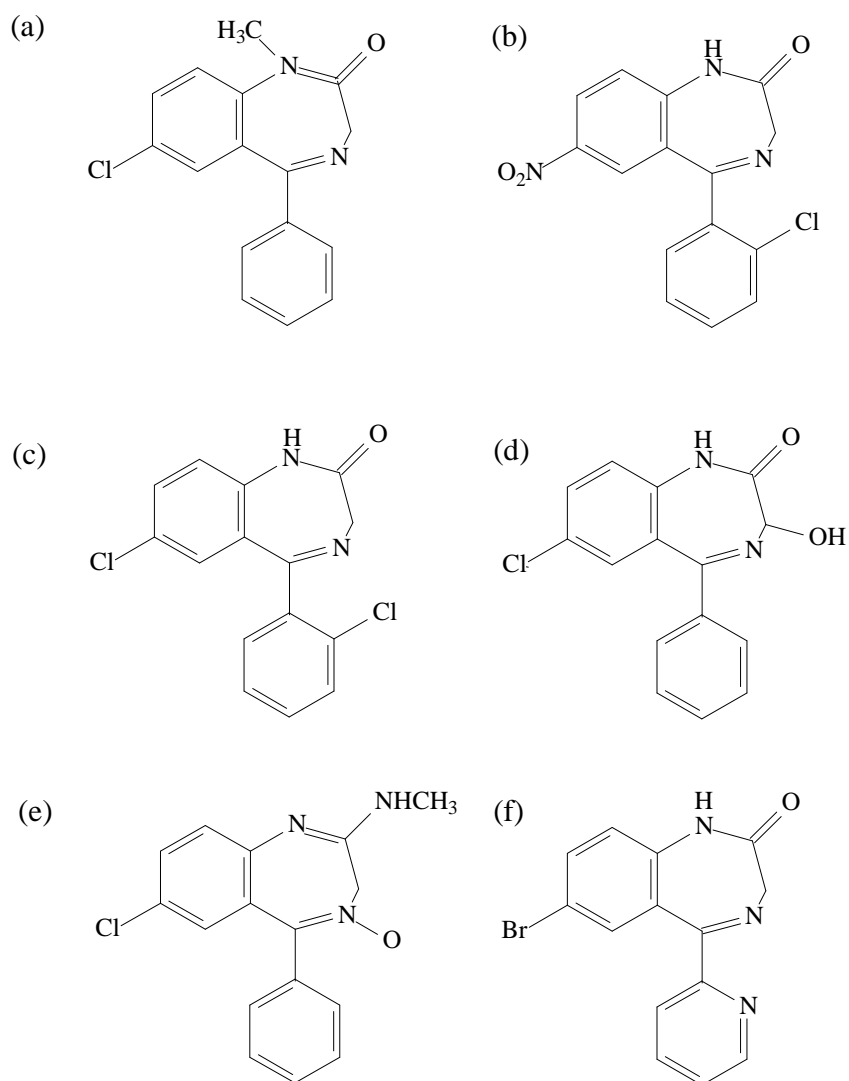


Figura 2.3: Estrutura química dos benzodiazepínicos investigados (a) diazepam, (b) clonazepam, (c) lorazepam, (d) oxazepam, (e) clordiazepóxido (padrão interno) e (f) bromazepam.

Os benzodiazepínicos estão associados à casos de intoxicações. Várias mortes são relatadas com benzodiazepínicos, especialmente em pessoas com função cardiorrespiratória comprometida (principalmente os idosos) (Drummer, 2004).

O número de crimes facilitados pelo uso de benzodiazepínicos tem aumentado durante os últimos anos. Suas propriedades sedativas e amnésicas são amplamente utilizadas para este propósito (Chezè *et al.*, 2004). O uso de drogas desta classe tem sido atribuído a vários crimes assim como homicídio, violência sexual e acidentes de trânsito. Além disso, os benzodiazepínicos também têm sido associados com casos de overdose (Miyaguchi *et al.*, 2006; Tejedor *et al.*, 2007). As propriedades dos benzodiazepínicos de alteração do humor combinadas com sua habilidade para evitar os efeitos da abstinência de outras drogas têm incentivado a sua disponibilidade no mercado de drogas ilícitas. Nas festas “raves” são conhecidos como “downers” porque reduzem os efeitos do LSD, anfetaminas e ecstasy (McClellan *et al.*, 1999). Casos onde essas drogas são introduzidas em bebidas, com a finalidade de deixar a pessoa que ingeriu incapacitada são muito comuns, principalmente em casos de estupro. O clonazepam e bromazepam são comumente utilizados com tal finalidade (Drummer, 2002; Shbair & Lhermitte, 2010).

Compostos de ação curta, utilizados como hipnóticos, possuem tempo de eliminação, ou meia-vida, relativamente curto (abaixo de 24 h). Já os benzodiazepínicos de ação longa, geralmente utilizados como sedativos e tranquilizantes, possuem maiores tempos de eliminação (Drummer, 2002). A Tabela 2.1 mostra uma síntese das doses mais comumente prescritas de alguns compostos desta classe, as concentrações plasmáticas após estas doses, e os seus respectivos tempos de eliminação (meia-vida).

Os benzodiazepínicos são amplamente metabolizados, sendo alguns metabólitos prescritos como medicamentos. O oxazepam, por exemplo, é um metabólito do diazepam utilizado como princípio ativo (Ming & Heathcote, 2011). A figura 2.4 mostra o processo de biotransformação do diazepam (Drummer, 2002). Os principais metabólitos do diazepam são: nordiazepam que é ativo e tem meia vida de eliminação de até 50 horas; e o oxazepam, conjugado a nível hepático é excretado pela bile sofrendo hidrólise no intestino com liberação do composto ativo que é reabsorvido (Gehlen, 2003).

Os principais processos de biotransformação dos benzodiazepínicos pelos sistemas enzimáticos microsossomais no fígado são N-desmetilação e hidroxilação. Os compostos

hidroxilados são excretados sob a forma conjugada como glucoronídeos, enquanto os produtos N-desmetilados são excretados conjugados e não conjugados (Gehlen, 2003).

Tabela 2.1: Doses comumente prescritas e meia vida de alguns benzodiazepínicos (Drummer, 2002; Smink, *et al.*, 2008\*).

Benzodiazepínicos	Dose diária (mg)	Concentração terapêutica no sangue (ng mL <sup>-1</sup> )	Meia-vida (h)
Alprazolam	0,5 – 4	20 - 60	6 -22
<b>Clonazepam<sup>c</sup></b>	1 – 8	100 – 400	20 – 80
Clorazepate	3,75 – 15	100 – 1000 <sup>a</sup>	30 – 100 <sup>a</sup>
<b>Diazepam<sup>c</sup></b>	5 – 40	100 – 1000	40 – 100 <sup>a</sup>
Estazolam	1 – 2	40 – 150	10 – 24
Flunitrazepam	0,5 – 2	5 – 20	11 – 25
Flurazepam	15 – 30	2 – 30	40 – 200 <sup>b</sup>
<b>Lorazepam<sup>c</sup></b>	1 – 10	20 – 250	8 – 25
Midazolam	5 – 15	5 – 200	1,5 – 2,5
<b>Oxazepam<sup>c</sup></b>	15 – 60	100 – 1000	4 – 15
Pinazepam	5 – 20	100 – 1000 <sup>a</sup>	40 – 100 <sup>a</sup>
Prazepam	20 – 60	100 – 1000 <sup>a</sup>	30 – 200 <sup>a</sup>
Quazepam	7,5 – 15	50 – 150	20 – 502
Temazepam	10 – 30	100 – 1000	5 - 15
<b>Bromazepam<sup>c</sup></b>	–	80–170*	–
<b>Chlordiazepóxido<sup>c</sup></b>	–	400–4000*	–

a Como nordazepam

b Inclui contribuição de metabólitos ativos

c Compostos estudados no presente trabalho

A hidrólise ácida e enzimática de amostras de urina é usada para converter esses analitos à sua forma livre com objetivo de melhorar a quantificação desses compostos (Hayashida *et al.*, 2009; Adamowicz & Kała, 2010; Kinani *et al.*, 2007). No entanto, esses procedimentos apresentam alguns inconvenientes. A hidrólise ácida utilizada para separar benzodiazepínicos conjugados durante os testes de drogas em urina podem decompor alguns benzodiazepínicos transformando-os em benzofenonas (Maurer & Pflieger, 1987; Elsohly *et al.*, 1997). Recentemente, a literatura tem registrado que métodos de hidrólise empregando  $\beta$ -glucuronidase podem levar a formação de produtos indesejados (Fu *et al.*, 2010). Além disso, esses procedimentos consomem tempo que podem variar de 1 a 18 horas (Fu *et al.*, 2011).

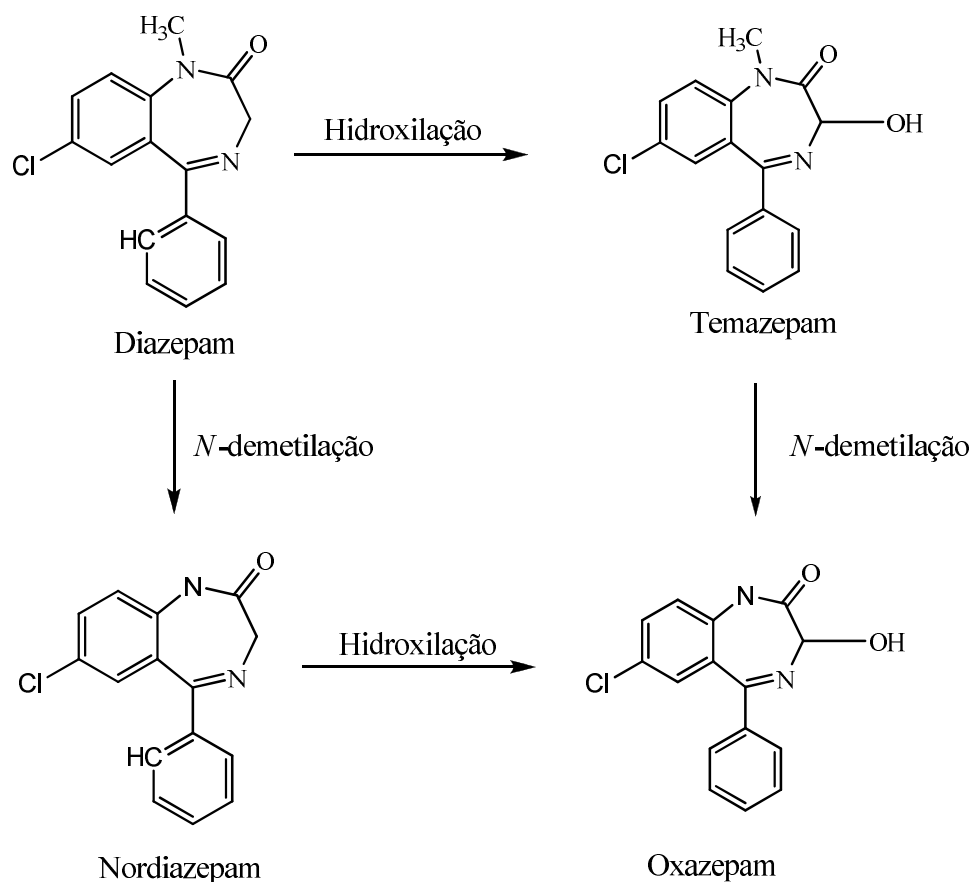


Figura 2.4. Processos de biotransformação do diazepam (Drummer, 2002).

Laboratórios de análises clínicas e toxicológicas frequentemente recebem amostras para determinação de benzodiazepínicos em matrizes biológicas tais como sangue, soro, plasma, urina e fluido estomacal. No entanto, a análise desses compostos em fluidos biológicos é complicada devido à diversidade dessas drogas disponíveis comercialmente e o fato de cada composto ter uma toxicidade particular (Borges *et al.*, 2009).

Qualquer que seja a técnica de determinação, as amostras biológicas precisam passar por pré-tratamentos que visam à remoção de interferentes da matriz e a extração e/ou concentração dos analitos de interesse. Determinar benzodiazepínicos e seus metabólitos em fluidos humanos é muito importante tanto em termos farmacêuticos quanto toxicológicos e forenses (Jinno *et al.*, 1998). A detecção e quantificação desses compostos nos baixos níveis encontrados em fluidos biológicos requerem métodos sensíveis e seguros. (Kinani *et al.*, 2007). Diferentes procedimentos

são usados para extrair drogas de fluidos biológicos. Uma série de técnicas de extração tem sido empregada com esta finalidade, incluindo ELL (extração líquido-líquido) (Borges *et al.*, 2009), SPE (extração em fase sólida) (Adamowicz & Kała, 2010; Nielsen *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2006), e SPME (micro-extração em fase sólida) (Marchi *et al.*, 2009). Todas estas técnicas apresentam limitações no que se refere ao volume de solvente, exposição do analista a reagentes tóxicos, custo de cartuchos e fibras e limitação da análise a um determinado tipo de técnica analítica. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas de extração simples e de baixo custo é de suma importância.

A combinação da espectrometria de massas com a cromatografia é a técnica escolhida para análises clínicas e forenses por ser muito sensível, precisa, específica, rápida e universal (Maurer, 1998). O acoplamento de um cromatógrafo líquido de alta eficiência com um espectrômetro de massas com fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador por tempo de voo (TOF/MS) permite análises com alto desempenho. Estes instrumentos (LC-ESI/TOF/MS) têm se mostrado extremamente eficazes na análise de drogas de abuso, incluindo benzodiazepínicos, em uma série de amostras biológicas (Borrey *et al.*, 2001).

## **2.2 OBJETIVOS**

No presente trabalho o objetivo principal foi desenvolver um método para determinação de benzodiazepínicos comuns tais como diazepam, clonazepam, lorazepam, oxazepam, e bromazepam em amostras de urina. O procedimento de ELL-PBT foi otimizado e a técnica LC-ESI/IT/TOF/MS foi utilizada para a quantificação. O método foi validado e aplicado para análise de amostras de urina de usuários de benzodiazepínicos.

## **2.3 PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.3.1 Reagentes e solventes**

Os benzodiazepínicos diazepam, clonazepam, lorazepam, oxazepam bromazepam e clordiazepóxido (padrão interno) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Ácido fórmico 85% PA (Synth, Diadema, SP, Brasil) e Hidróxido de amônio 25% m v<sup>-1</sup> (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram usados no preparo de solução tampão. Cloreto de sódio (Merck,

Darmstadt, Alemanha) e acetato de etila grau HPLC (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) foram empregados na otimização do procedimento de ELL-PBT. Acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usada como solvente extrator do procedimento de ELL-PBT e também como fase móvel. Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usado no preparo de soluções. Água deionizada obtida de um sistema Milli Q (Millipore DirectQ 3, França) foi usada para preparar solução tampão empregada como fase móvel para o sistema cromatográfico.

### **2.3.2 Soluções**

Soluções estoque ( $1,0 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas dissolvendo-se 0,01000 g de cada analito em 10,00 mL de metanol e armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Soluções de trabalho desses analitos foram preparadas por diluições sucessivas com acetonitrila. A partir da diluição das soluções estoque, foi preparada uma solução de trabalho contendo os cinco benzodiazepínicos na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Soluções de calibração contendo todos os analitos foram obtidas pela diluição da solução de trabalho, obtendo-se concentrações finais que variaram de 0 a  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Uma solução tampão de ácido fórmico/amônia (pH = 3) na concentração de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  foi obtida por diluição de 0,105 mL de amônia 25% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e 0,158 mL de ácido fórmico completando-se o volume para 1000 mL com água Milli Q.

### **2.3.3 Amostragem**

Para estudos de otimização e validação do método, utilizou-se uma mistura de quantidades iguais de urina de não usuários das drogas sob avaliação (amostras brancas). As amostras de urina foram coletadas de 30 voluntários (15 masculinos e 15 femininos) em frascos descartáveis, translúcidos, e armazenados sob refrigeração a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Todos os voluntários (18 a 57 anos de idade) responderam a um questionário com perguntas sobre características e hábitos pessoais, assim como ingestão de fármacos na semana antes da amostragem. Os voluntários foram informados quanto ao objetivo do trabalho e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Anexo I). Para avaliar a aplicabilidade do método, foram analisadas amostras de urina de dois usuários de benzodiazepínicos seguindo o mesmo procedimento descrito para amostras brancas. Essas



amostras foram mantidas a 4 °C imediatamente após o recebimento. Os procedimentos de extração e análise cromatográfica foram realizados em até três dias após a coleta.

#### **2.3.4 Instrumentação**

A separação cromatográfica foi otimizada em um sistema cromatográfico LC Surveyor (Thermo Scientific) equipado com uma bomba quaternária (Surveyor), um autoamostrador (Surveyor) e um detector PDA (Surveyor). Os comprimentos de onda 232, 254 e 310 nm foram empregados para quantificação dos analitos. Este estudo foi realizado no Laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. As análises das amostras da otimização da ELL-PBT foram realizadas em um sistema cromatográfico Shimadzu, equipado com uma bomba binária de alta pressão (LC-20AD), um autoamostrador (SIL 20AC) e acoplado a um espectrômetro de massas IT/TOF/MS (Shimadzu Corp.). O espectrômetro de massas consiste de uma fonte de ionização por electrospray e analisadores de massas do tipo ion trap e TOF. Essas análises foram feitas no Laboratório de Caracterização Molecular - Espectrometria de Massas da Universidade Federal de Ouro Preto.

#### **2.3.5 Otimização da separação cromatográfica**

Para otimização da separação cromatográfica uma mistura de solventes constituída de A (acetonitrila), B (tampão formiato de amônio 2 mmol L<sup>-1</sup>) e C (metanol) foi empregada como fase móvel. Variações na proporção entre os constituintes da fase móvel e gradientes de fluxo foram avaliadas. Esta etapa do trabalho foi realizada usando uma coluna Ascentis C18 (150 mm x 2,1 mm, 3 µm) mantida a temperatura ambiente. Para isto 5 µL de uma solução contendo 1000 µg L<sup>-1</sup> de cada benzodiazepínico foi introduzida no sistema cromatográfico.

#### **2.3.6 Condições de análise no sistema LC-ESI/IT/TOF/MS**

Um volume 5 µL do extrato foi injetado no sistema LC-ESI/IT/TOF/MS e a separação cromatográfica conduzida em uma coluna Ascentis C18 (150 mm x 2,1 mm, 3 µm) mantida a temperatura ambiente. Um fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup> foi empregado e a fase móvel composta de misturas em proporções distintas de uma solução aquosa de formiato de amônio 2 mmol L<sup>-1</sup> (A) e

acetonitrila (B). A separação cromatográfica ocorreu usando um gradiente de acordo com a seguinte programação: 30% da fase B até 50% B em 7,5 min; manutenção a 50% B por 1,5 min; 50% B até 100% B em 4 min; e redução a 30% B em 0,5 min mantendo-se essa proporção por 4,5 min. O tempo total de análise foi de 18 min. O espectrômetro de massas trabalhou com alta resolução e massa exata ( $< 5$  ppm) sob as seguintes condições: voltagem e modo de ionização da fonte ESI +4,5 kV, fluxo do gás de nebulização  $1,5 \text{ L min}^{-1}$ ; interface a  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  e pressão do gás de secagem 100 kPa. O tempo de acumulação do íon no octapolo foi de 100 ms e o espectro de massas foi adquirido na faixa de  $m/z$  de 100 a 1000 com um tempo de scan de 0,2 s. A resolução de 10,000 FWHM (*Full Width at Half Maximum*) a  $m/z$  500 foi empregada.

### **2.3.7 Otimização da Técnica de Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura**

Após a otimização das condições cromatográficas para separação dos benzodiazepínicos iniciou-se a otimização do procedimento de ELL-PBT e análise por LC-ESI/IT/TOF/MS. Um planejamento fatorial  $2^3$  foi empregado para avaliar o efeito dos fatores: tipo de congelamento (1 hora no freezer a aproximadamente  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  ou 8 segundos no nitrogênio líquido), força iônica (sem adição de NaCl ou adição de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl) e proporção urina/acetonitrila (proporção amostra/extrator de 1:1 ou de 2:1). Como o planejamento envolvia três fatores com dois níveis cada um ( $2^3$ ), a execução do mesmo foi feita com oito ensaios em duplicada (Tabela 2.2). Em frascos de vidro de 2,0 mL de capacidade foram adicionados 0,50 ou 1,00 mL de urina fortificada com  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de cada benzodiazepínico e  $150 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de clordiazepóxido (PI). A força iônica da urina foi alterada pela adição de 20 ou 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de NaCl  $5,0 \text{ mol L}^{-1}$  de acordo com o planejamento fatorial descrito na Tabela 2.2. A seguir 0,50 mL de acetonitrila foram acrescentados como solvente extrator. A mistura foi agitada em vórtex durante 30 segundos e posteriormente resfriada, de acordo com o planejamento previamente descrito. Após separação das fases, 0,20 mL de extrato (fase líquida) contendo os analitos foi transferido para outro frasco com o auxílio de micropipeta. Um volume de  $5,0 \text{ } \mu\text{L}$  do extrato foi injetado no sistema LC-ESI/IT/TOF/MS.

Tabela 2.2. Planejamento fatorial  $2^3$  empregado na otimização do procedimento de ELL-PBT para determinação de benzodiazepínicos em urina.

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F1	F2	F3	(F1) Tipo de	(F2) NaCl ( $\text{mol L}^{-1}$ )	(F3) Proporção
1	-1	-1	-1	Freezer	0,0	1/1
2	+1	-1	-1	Nitrogênio	0,0	1/1
3	-1	+1	-1	Freezer	0,2	1/1
4	+1	+1	-1	Nitrogênio	0,2	1/1
5	-1	-1	+1	Freezer	0,0	2/1
6	+1	-1	+1	Nitrogênio	0,0	2/1
7	-1	+1	+1	Freezer	0,2	2/1
8	+1	+1	+1	Nitrogênio	0,2	2/1

### 2.3.8 Validação do método

A validação do método foi conduzida pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

#### *Seletividade*

A seletividade foi avaliada a partir da análise do extrato obtido do *pool* de urina sem fortificação (branco da matriz). O cromatograma obtido da análise do extrato do branco da matriz foi comparado com o cromatograma obtido da análise do extrato do *pool* de urina fortificado com benzodiazepínicos na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### *Linearidade*

Curvas analíticas foram construídas usando o extrato obtido do branco de amostra. Para isso alíquotas de amostras de urina (branco) foram submetidas ao procedimento ELL-PBT. Os extratos foram fortificados com  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  de clordiazepóxido (PI) e com diferentes volumes da solução de trabalho dos benzodiazepínicos para gerar concentrações finais de 5, 10, 30, 50, 100, 150 e  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito. As análises em cada nível de concentração foram realizadas em triplicata, e as curvas analíticas foram construídas plotando-se a razão entre a área do pico cromatográfico do analito e área do padrão interno versus a concentração nominal do analito. O método dos mínimos quadrados foi empregado para avaliação da linearidade.

#### *Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)*

Os limites de detecção para o método proposto foram determinados considerando o sinal dos analitos de interesse três vezes maior do que o ruído da linha de base. Os limites de quantificação foram estimados pelo sinal dos analitos dez vezes maior do que o ruído da linha de base. Para isto o extrato do branco (*pool* de urina) fortificado com os benzodiazepínicos em concentrações cada vez menores foi analisado até a obtenção das razões sinal-ruído de 3 para LD e de 10 para o LQ.

#### *Precisão e Exatidão*

A precisão e exatidão foram avaliadas com amostras brancas de urina humana (*pool*) fortificadas com os compostos benzodiazepínicos nas seguintes concentrações: 30, 100 e 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 5$ ). As amostras de urina (*pool*) fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração otimizado e os extratos analisados no sistema LC-ESI/IT/TOF/MS. Os resultados obtidos para precisão e exatidão foram expressos como coeficiente de variação (CV,%) e porcentagem de recuperação, respectivamente.

### **2.3.9 Aplicação do método**

Após a validação, o método foi aplicado à amostras de urina obtidas de dois voluntários que se declararam usuários de benzodiazepínicos. As condições otimizadas obtidas para o procedimento ELL-PBT e análise por LC-ESI/IT/TOF/MS foram empregadas.

## **2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.4.1 Otimização das condições cromatográficas**

Os aspectos mais importantes no desenvolvimento de um método cromatográfico são a separação, a obtenção de resolução satisfatória e um tempo de análise razoável. Buscando atender a esses requisitos iniciou-se o processo de otimização da separação cromatográfica introduzindo-se uma solução padrão contendo 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada benzodiazepínico estudado em um sistema LC-PDA-ESI/MS. Por se tratar de compostos com caráter básico contendo aminas secundárias em suas estruturas (clordiazepóxido apresenta amina terciária) (Figura 2.3), alguns testes foram

realizados buscando favorecer a ionização na fonte de ESI. Testes preliminares mostraram que a produção de íons positivos na fonte de ESI é favorecida em soluções ácidas como ácido fórmico, ácido acético e solução tampão formiato de amônio (pH 3). Dentre as soluções testadas, o tampão formiato de amônio 2 mmol L<sup>-1</sup> foi escolhido por apresentar alta produção de íons moleculares protonados [M+H]<sup>+</sup> e baixo ruído da linha de base. Soluções ácidas como ácido fórmico (Ishida *et al.*, 2009) ou ácido acético (Grujic *et al.*, 2009) ou soluções tampão (Abbara *et al.*, 2008; Steentoft & Linnet, 2009) são largamente empregadas na separação de benzodiazepínicos por LC/ESI/MS. A influência da composição da fase móvel na separação dos benzodiazepínicos foi investigada de acordo com o tempo de retenção e simetria dos picos. A força da fase móvel foi investigada pela variação na composição entre os seus constituintes (acetonitrila, solução tampão formiato de amônio (2 mol L<sup>-1</sup>) pH 3 e metanol). Essa variação está representada na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Avaliação da composição da fase móvel (FM) e do fluxo adequados para a separação dos benzodiazepínicos no sistema cromatográfico LC-Surveyor.

Composição da	Tempos de retenção						Fluxo	
	A/T/M*	Clordiaz.	Oxaz.	Bromaz.	Loraz.	Clonaz.		Diaz
55/25/20	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	2,35	3,45	200
35/40/25	2,92	3,4	nd	3,4	3,40	7,38		200
35/60/5	2,88	7,21	4,38	8,29	8,29	20,0		200
35/60/5	2,87	7,29	4,41	8,40	8,40	18,86		200(10min) 250
35/60/5	2,87	7,12	4,40	8,18	8,18	17,83		200(4min) 250
35/50/15	3,02	5,80	3,84	5,80	5,80	13,24		200
35/50/15	3,40	6,18	4,25	6,18	6,18	13,71		170
35/55/10	2,95	6,82	4,24	7,55	7,55	nd		200
35/65 (A/T)	2,83	8,12	7,65	9,34	10,19	nd		200
70/30(T/M)	3,91	14,44	6,76	17,28	18,05	nd		200
70/30 (T/M)	3,15	11,67	5,44	14,29	14,81	nd		250
65/35 (T/M)	11,54	nd	nd	nd	nd	nd		250
60/35/5	2,81	7,37	4,46	8,24	8,58	18,40		200
Ótimo	2,65	7,39	4,44	8,18	8,70	17,28		Gradiente de fluxo

\* A/T/M: acetonitrila/solução tampão/metanol

nd: Composto não detectado

Os melhores resultados obtidos para separação e quantificação simultânea dos seis benzodiazepínicos estudados envolveram uma composição da fase móvel constante consistindo de 35% de acetonitrila, 60% de tampão formiato de amônio  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  e 5% de metanol. No entanto, um gradiente de fluxo foi empregado com o objetivo de reduzir o tempo de retenção do diazepam. O fluxo da fase móvel iniciou com  $0,200 \text{ mL min}^{-1}$  durante 7 min seguido de acréscimo para  $0,250 \text{ mL min}^{-1}$  até 10 min e permanecendo neste fluxo até 20 min. A figura 2.5 mostra o cromatograma obtido nas condições ótimas.

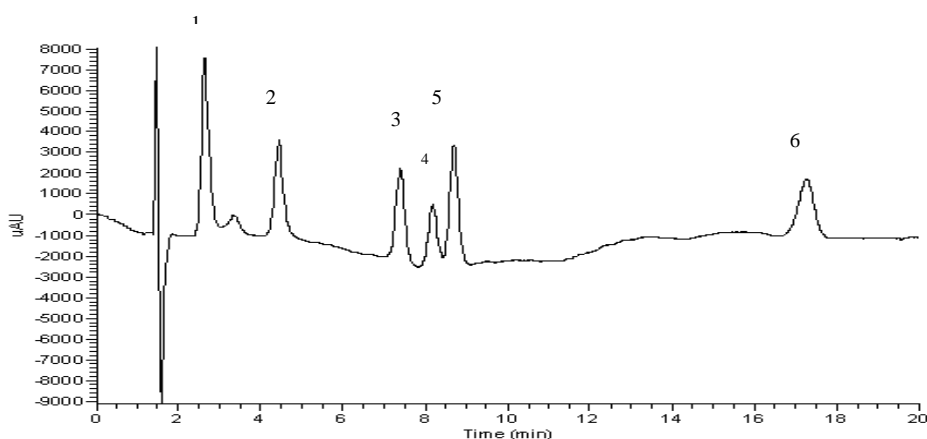


Figura 2.5: Cromatograma de uma mistura de benzodiazepínicos ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) obtido por HPLC-PDA. Picos: 1 clordiazepóxido; 2 bromazepam; 3 oxazepam; 4 lorazepam; 5 clonazepam e 6 diazepam.

#### *Análise por LC-ESI/IT/TOF/MS.*

O método de separação previamente otimizado no LC suryavor foi ajustado às condições do LC-ESI/IT/TOF/MS. Este equipamento é composto por uma bomba binária. Por este motivo, um gradiente contendo apenas acetonitrila e solução tampão de formiato de amônio foi selecionado para testar a eficiência do método otimizado. A Tabela 2.4 mostra os parâmetros espectrométricos e cromatográficos relacionados à quantificação dos benzodiazepínicos estudados. Observa-se por estes resultados que a modificação na composição da fase móvel reduziu o tempo de retenção do diazepam quando comparado com o método previamente otimizado usando solução tampão, acetonitrila e metanol como fase móvel.

Tabela 2.4. Parâmetros espectrométricos e cromatográficos relacionados a cada benzodiazepínico estudado.

Analito	Tempo de retenção (min)	[M + H] <sup>+</sup>	Fórmula molecular
Diazepam	13,07	285,0789	C <sub>16</sub> ClON <sub>2</sub> H <sub>13</sub>
Clonazepam	9,29	316,0483	C <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>11</sub> H <sub>10</sub>
Lorazepam	8,98	321,0192	C <sub>15</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> H <sub>10</sub>
Oxazepam	8,54	287,0582	C <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ClH <sub>11</sub>
Clordiazepóxido	6,22	300,0898	C <sub>16</sub> ClON <sub>3</sub> H <sub>14</sub>
Bromazepam	6,61	316,0080	C <sub>14</sub> N <sub>3</sub> OBrH <sub>10</sub>

A Figura 2.6 mostra o cromatograma de íons extraído do cromatograma de íons totais para todos os analitos.

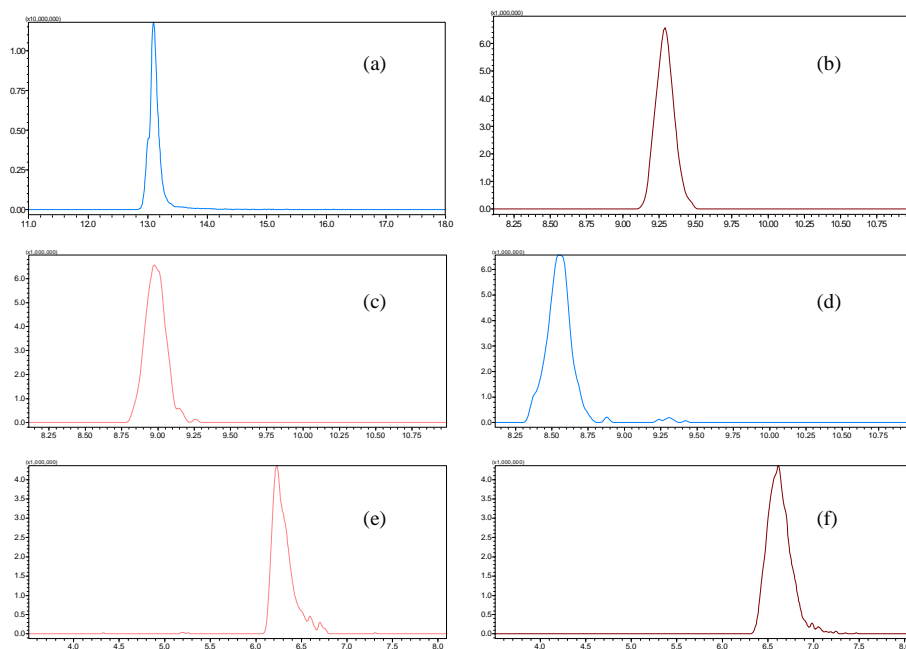


Figura 2.6. Cromatograma de íons extraídos do cromatograma de íons totais para os benzodiazepínicos: a) diazepam, (b) clonazepam, (c) lorazepam, (d) oxazepam, (e) chlordiazepóxido (PI), (f) bromazepam.

A determinação inequívoca de todos os analitos foi facilitada pelo uso do analisador de massas do tipo TOF com capacidade de alta resolução. Este analisador de massas possui habilidade para determinar a razão  $m/z$  dos benzodiazepínicos protonados com cinco partes por milhão, ou seja, obtenção de massa com quatro casas decimais permitindo a atribuição de uma única fórmula elementar para cada composto com base na massa dos átomos constituintes.

#### **2.4.2 Otimização da Técnica de Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura**

O procedimento de ELL-PBT foi otimizado buscando maximizar as taxas de recuperação de todos os benzodiazepínicos estudados. Nos experimentos realizados, quando a proporção 2:1 entre urina e acetonitrila (1,00 mL de urina para 0,50 mL de acetonitrila) foi utilizada, a separação de fases não ocorreu. Neste caso, a proporção 1:1 foi selecionada como melhor condição para esta variável.

A influência das outras duas variáveis, tais como (1) tipo de congelamento e (2) força iônica foi avaliada na forma de um planejamento fatorial  $2^2$ . A Figura 2.7 mostra o gráfico de Pareto obtido para esta avaliação. Este gráfico foi construído com a resposta múltipla obtida pela somatória das respostas de todos os cinco benzodiazepínicos. Pode-se observar que a variável 1 apresentou efeito significativo e negativo. Portanto, o uso de freezer promoveu melhores recuperações para os benzodiazepínicos do que o uso de nitrogênio líquido. O tempo de congelamento é uma variável importante que permite a transferência do analito da fase aquosa para a fase orgânica. O tempo de congelamento quando as amostras são submetidas ao nitrogênio líquido é muito rápido e o pode-se inferir que este tempo não é suficiente para uma transferência quantitativa do analito para a fase orgânica. Já a variável 2 (força iônica) apresentou efeito significativo e positivo. Apesar de conter altas concentrações de sais dissolvidos, o aumento da força iônica da urina com  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl favoreceu a porcentagem de recuperação de todos os benzodiazepínicos estudados. De modo geral, pode-se considerar que a adição de um eletrólito, como o NaCl, é capaz de provocar a redução do número de moléculas de água disponíveis para a solvatação de um dado soluto. Deste modo, o soluto tem sua solubilidade diminuída com um conseqüente aumento da sua transferência para a fase extratora, que no caso presente, é a acetonitrila (Mori & Cassella, 2009).



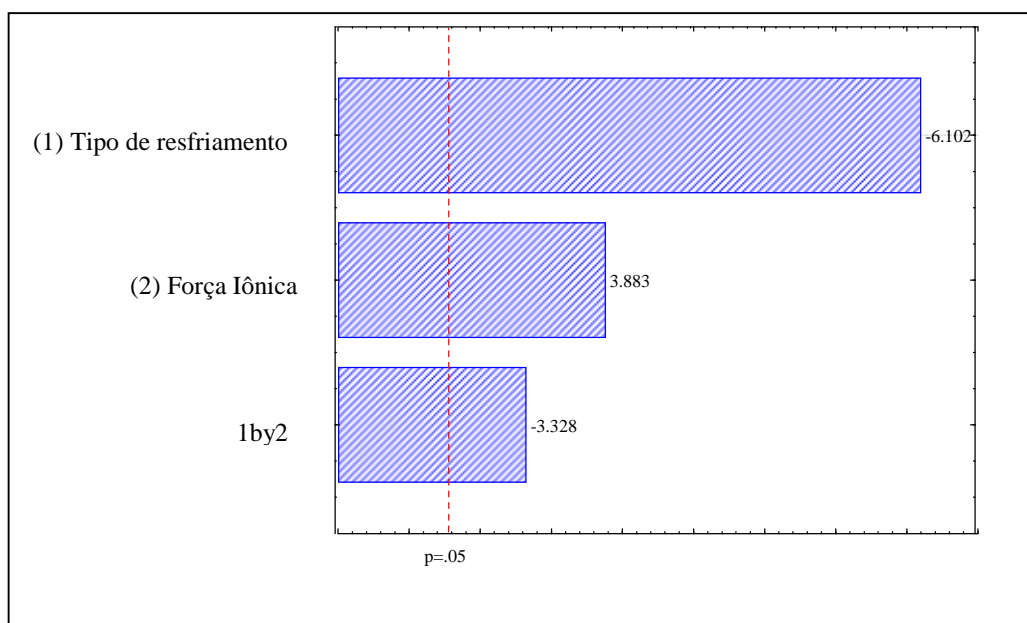


Figura 2.7. Influência do tipo de congelamento e do aumento da força iônica na extração simultânea de diazepam, clonazepam, lorazepam, oxazepam e bromazepam.

Embora o planejamento tenha sido utilizado visando uma triagem das variáveis, recuperações entre 61,3 e 100,4% foram obtidas empregando o método proposto (Tabela 2.5). Desta forma, foi possível estabelecer a condição ótima que consistiu de: proporção 1/1 entre urina/acetonitrila, 1 hora de resfriamento em freezer e adição de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl. Vale ressaltar que os valores de recuperação obtidos pelo método proposto são comparáveis às recuperações apresentadas por outros autores na análise de benzodiazepínicos semelhantes em urina empregando extração líquido-líquido e análise por LC-MS/MS (Salomone *et al.*, 2011).

O método otimizado foi então validado, e aplicado para análise de urina de usuários de medicamentos a base de benzodiazepínicos. Vale ressaltar que o extrato obtido pelo emprego do método proposto apresentou-se limpo, demonstrando que o método não necessita de etapas adicionais de purificação.

Tabela 2.5. Recuperação dos cinco benzodiazepínicos obtidas na condição ótima do planejamento fatorial  $2^2$  (n = 3).

Analitos	Fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação $\pm$ SD (%)
Diazepam	100,0	100,4 $\pm$ 1,9
Clonazepam	100,0	72,4 $\pm$ 6,2
Lorazepam	100,0	96,2 $\pm$ 2,5
Oxazepam	100,0	61,3 $\pm$ 2,9
Bromazepam	100,0	87,2 $\pm$ 2,3

### 2.4.3 Validação do Método

Para validar o método, os seguintes parâmetros foram avaliados:

#### *Seletividade*

O método mostrou-se seletivo, uma vez que não foram detectados picos no tempo de retenção dos analitos após a injeção do extrato do branco da matriz de urina (*pool*). Além disso, o uso de um analisador de massas de alta resolução (TOF) possibilita a quantificação dos compostos, ainda que apareçam outras substâncias com massas ligeiramente distintas durante a análise. Isto permitiu o desenvolvimento de um método com alta seletividade, baixa interferência de fundo e efeito da matriz pouco significativo (Figura 2.6).

#### *Linearidade, limites de detecção e quantificação*

A linearidade foi avaliada na faixa de 1 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o diazepam e de 5 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para os demais benzodiazepínicos. A Tabela 2.6 mostra os coeficientes de correlação (R), e as equações lineares obtidas para as curvas analíticas feitas na matriz para todos os analitos na faixa de concentração avaliada. Os coeficientes de correlação foram satisfatórios para todos os compostos, variando de 0,9940 para o bromazepam e 0,9998 para o clonazepam.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando-se o método baseado na relação sinal/ruído. Essa relação sinal-ruído geralmente aceita para LD e LQ são de 3:1 e 10:1 respectivamente. Para isto obtém-se a razão entre a intensidade do sinal obtido pelo analito em

uma concentração conhecida e o ruído gerado no mesmo tempo de retenção do analito quando este não está presente (branco) (Ribani *et al.*, 2004). Os limites de detecção variaram entre 1 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto os limites de quantificação variaram entre 3,3 e 16,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Faixa linear, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e limite de quantificação dos benzodiazepínicos estudados pelo método proposto.

Analito	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Equação Linear	Coeficiente de correlação (R)	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Diazepam	1 - 200	$y = 0,0648x + 1,8923$	0,9957	1,0	3,3
Clonazepam	5 - 200	$y = 0,0063x - 0,0239$	0,9998	5,0	16,7
Lorazepam	5 - 200	$y = 0,0041x - 0,0248$	0,9996	5,0	16,7
Oxazepam	5 - 200	$y = 0,0076x - 0,0380$	0,9996	5,0	16,7
Bromazepam	5 - 200	$Y = 0,0054x - 0,0598$	0,9940	5,0	16,7

Os limites de detecção e quantificação de diazepam, lorazepam, oxazepam clonazepam e bromazepam obtidos por este método foram inferiores aos relatados em alguns trabalhos da literatura (Adamowicz & Kała, 2010; Salomone, *et al.*, 2011). Finalmente, deve-se ressaltar que o método proposto é adequado para ser aplicado a casos de intoxicação uma vez que as concentrações de benzodiazepínicos na urina normalmente são muito superiores aos valores de LQ obtidos neste estudo.

#### Precisão e exatidão

A precisão do método variou de 6,3-12,5% para a menor concentração avaliada (30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); 4,1-8,6% para a concentração média (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); e de 2,6 a 8,0% para a maior concentração (150  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Estes resultados são mostrados na Tabela 2.7. De acordo com Peters e Maurer (2002), os valores de precisão aceitáveis para um determinado método aplicado a fluidos biológicos devem ser inferiores a 15%. Estes resultados indicaram que o método atual tem precisão satisfatória. A exatidão para os diferentes benzodiazepínicos em urina variou de 72,9 a 116,6%, excluindo oxazepam, cuja recuperação variou entre 57,7-90,9%. Como o oxazepam é

um composto mais hidrofílico que os demais, sua menor afinidade pela acetonitrila pode reduzir a eficiência de extração.

Tabela 2.7. Precisão e exatidão (recuperação) de cada analito obtidas do *pool* de urina fortificado em três níveis de concentração: 30, 100 e 150  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Analito	Precisão (CV / %)			Recuperação (% $\pm$ s)		
	30	100	150	30	100	150
Diazepam	6,3	4,2	2,6	95,8 $\pm$ 6,1	105,7 $\pm$ 4,5	116,6 $\pm$ 3,0
Clonazepam	12,5	8,6	8,0	74,1 $\pm$ 9,2	72,9 $\pm$ 6,3	101,2 $\pm$ 8,1
Lorazepam	6,6	8,6	6,9	98,6 $\pm$ 6,5	93,7 $\pm$ 8,1	114,9 $\pm$ 7,9
Oxazepam	9,7	4,4	5,4	65,0 $\pm$ 6,3	57,7 $\pm$ 2,5	90,9 $\pm$ 5,4
Bromazepam	6,4	4,1	4,6	79,6 $\pm$ 5,1	83,0 $\pm$ 3,4	104,9 $\pm$ 4,8

A exatidão obtida neste trabalho foi melhor do que a obtida por métodos anteriormente desenvolvidos para a detecção simultânea de benzodiazepínicos por SPE e análise por GC-EI/MS (Adamowicz & Kała, 2010), bem como oxazepam e lorazepam empregando método enzimático e análise por LC-MS (Eichhorst *et al.*, 2009). A hidrólise ácida ou enzimática das amostras de urina é usada para converter os analitos em suas formas livres e melhorar a detecção (Ming & Heathcote, 2011). Entretanto, esses procedimentos apresentam uma série de inconvenientes, como a formação de produtos indesejados e grande consumo de tempo (Maurer & Pflieger, 1987; Fu *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011). Além disso, existem atualmente técnicas analíticas que apresentam uma alta sensibilidade e permitem a quantificação de diversos compostos em baixas concentrações. Diante disto, neste trabalho, não se utilizou nenhuma reação de hidrólise, dando ao método proposto características adequadas para aplicações clínicas e forenses envolvendo o uso de benzodiazepínicos, onde a concentração do composto na forma inalterada é apropriada. Para confirmar esta possibilidade, o método proposto foi empregado para analisar amostras de urina de usuários de medicamentos à base de benzodiazepínicos.

#### **2.4.4. Aplicação do método**

O método otimizado foi aplicado à análise de amostras de urina cedidas por dois usuários de diazepam. As coletas das amostras foram obtidas da primeira urina do dia. Para o primeiro usuário, a concentração de diazepam e seu metabólito oxazepam (Figura 2.4) foi de  $41 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1265 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Na urina do segundo usuário o diazepam foi detectado na concentração de  $105 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nesta amostra, o metabólito oxazepam não foi detectado. Verifica-se que mesmo quando doses terapêuticas foram consumidas, foi possível quantificar os compostos na forma inalterada, pelo método proposto. Vale ressaltar que o extrato do branco do *pool* de urina foi usado para diluir a amostra cuja concentração de oxazepam extrapolou a faixa linear da curva analítica.

## **2.5 CONCLUSÕES**

A técnica de extração, ELL-PBT, que já vem sendo utilizada para análises de pesticidas em alimentos e matrizes ambientais, foi aplicada pela primeira vez para determinação de drogas em fluidos biológicos. O método para determinação de benzodiazepínicos em urina empregando a ELL-PBT, seguido de quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução foi otimizado e validado. O emprego de planejamentos fatoriais permitiu avaliar o efeito dos fatores estudados e a obtenção das condições ótimas de extração, a partir de um pequeno número de experimentos.

O procedimento de extração empregado neste trabalho apresenta vantagens que merecem destaque: i) baixo consumo de reagentes, sendo que apenas  $500 \mu\text{L}$  de acetonitrila foram empregados para cada extração; ii) rapidez e simplicidade. Como não é realizada a etapa de hidrólise, o método pode ser feito em batelada. Um analista experiente pode processar cerca de 50 amostras/hora; (iii) baixo custo, pois não demanda dispositivos especiais.

O método proposto mostrou-se adequado para quantificação de diazepam, clonazepam, lorazepam, oxazepam e bromazepam em urina, uma vez que os parâmetros de desempenho avaliados foram satisfatórios. Para avaliar a aplicabilidade do método, diazepam e oxazepam foram quantificados em amostras de urina de usuários de benzodiazepínicos. Os resultados demonstraram que o método proposto é simples, rápido e sensível o suficiente para ser aplicado em procedimentos de rotina para determinação de benzodiazepínicos em urina.

## **REFERÊNCIAS**

- Abbara, C.; Bardot, I.; Cailleux, A.; Lallement, G.; Le Bouil, A.; Turcant, A.; Clair, P.; Diquet, B. (2008) “High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma” Journal of Chromatography B **874**: 42–50.
- Adamowicz, P.; Kała, M. (2010) “Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography–electron ionization-mass spectrometry” Forensic Science International **198**: 39-45.
- Borges, K. B.; Freire, E. F.; Martins, I.; Siqueira, M. E. P. B. (2009) “Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid–liquid and solid-phase extractions in human plasma” Talanta **78**: 233–241.
- Borrey, D.; Meyer, E.; Lambert, W.; Van Peteghem, C.; De Leenheer, A.P. (2001) “Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry” Journal of Chromatography B **765**: 187-197.
- Cheng, W.; Yau, T.; Wong, M.; Chan, L.; Mok, V.K. (2006) “A high-throughput urinalysis of abused drugs based on a SPE-LC–MS/MS method coupled with an in-house developed post-analysis data treatment system” Forensic Science International **162**: 95-107.
- Chèze, M.; Villain, M.; Pépin, G. (2004) ‘Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes” Forensic Science International **145**: 123-130.
- Drummer, O.H. (2002) “Benzodiazepines — Effects on human performance and behaviour. Review” Forensic Science **14**:1
- Drummer, O. H. (2004) “Postmortem toxicology of drugs of abuse” Forensic Science International **142**: 101–113
- Eichhorst, J.C.; Etter, M.L.; Rousseaux, N.; Lehotay, D.C. (2009) “Drugs of abuse testing by tandem mass spectrometry: A rapid, simple method to replace immunoassays” Clinical Biochemistry **42**: 1531-1542.

- Elsohly, M.A.; Feng, S.; Salamone, S.J.; Wu, R. (1997) “Sensitive GC-MS procedure for the analysis of flunitrazepam and its metabolites in urine” Journal of Analytical Toxicology **21**: 335-340.
- Fu, S.; Lewis, J.; Wang, H.; Keegan, J.; Dawson, M. (2010) “A novel reductive transformation of oxazepam to nordiazepam observed during enzymatic hydrolysis” Journal of Analytical Toxicology **34**: 243-251.
- Fu, S.; Molnar, A.; Bowron, P.; Lewis, J.; Wang, H. (2011) “Reduction of temazepam to diazepam and lorazepam to delorazepam during enzymatic hydrolysis” Analytical and Bioanalytical Chemistry. **400**: 153-164.
- Gehlen, K. A. (2003) “Avaliação toxicológica dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam sob o desenvolvimento pré-natal de ratos wistar”. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Grujic, S.; Vasiljevic, T.; Lausevic, M. (2009) “Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry” Journal of Chromatography A **1216**: 4989–5000.
- Hayashida, M.; Takino, M.; Terada, M.; Kurisaki, E.; Kudo, K.; Ohno, Y. (2009) “Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) exact mass database for benzodiazepine screening” Legal Medicine **11**: S423- S425.
- Ishida, T.; Kudo, K.; Hayashida, M.; Ikeda, N. (2009) “Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column” Journal of Chromatography B
- Jinno, K.; Taniguchi, M.; Hayashida, M. (1998) “Solid phase micro extraction coupled with semi-microcolumn high performance liquid chromatography for the analysis of benzodiazepines in human urine” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **17**: 1081–1091.
- Kinani, S.; Bouchonnet, S.; Milan, N.; Ricordel, I. (2007) “A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography–tandem mass spectrometry” Journal of Chromatography A **1141**: 131–137.
- Marchi, I.; Schappler, J.; Veuthey, J.; Rudaz, S. (2009) “Development and validation of a liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry method for the

- quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their main metabolites in haemolysed blood” Journal of Chromatography B **877**: 2275-2283.
- Maurer, H.; Pflieger, K. (1987) “Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas-chromatography mass-spectrometry” Journal of Chromatography A **422**: 85-101.
- Maurer, H. H. (1998) "Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology" Journal of Chromatography B **713**: 3–25.
- McClellan, S.; O’Kane, E.; Hillis, J.; Smyth, W. F. (1999) “Determination of 1,4 benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry” Journal of Chromatography A **838**: 273–291
- Ming, D. S.; Heathcote, J. (2011) “Rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine” Journal of Chromatography B **879**: 421-428.
- Miyaguchi, H.; Kuwayama, K.; Tsujikawa, K.; Kanamori, T.; Iwata, Y. T.; Inoue, H.; Kishi, T. (2006) “A method for screening for various sedative-hypnotics in serum by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry” Forensic Science International **157**: 57–70
- Mori, M.; Cassella, R. J. (2009) “Estudo da sorção do corante catiônico violeta cristal por espuma de poliuretano em meio aquoso contendo dodecilsulfato de sódio” Química Nova **32**: (8).
- Nielsen, M.K.K.; Johansen, S.S.; Dalsgaard, P.W.; Linnet, K. (2010) “Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOF-MS” Forensic Science International **196**: 85-92.
- Passagli, M. (2008) “Toxicologia Forense: Teoria e Prática” Editora Millennium. Campinas, SP: 336p.
- Peters, F. T.; Maurer, H. H. (2002). "Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review”.Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement **7**(11): 441-449.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. (2004) “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos” Química Nova **27**: 771.



- Salomone, A.; Gerace, E.; Brizio, P.; Gennaro, M. C.; Vincenti, M. (2011) “A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest”. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **56**: 582– 591.
- Shbair, M.K.S.; Lhermitte, M. (2010) “Drug-facilitated crimes: Definitions, prevalence, difficulties and recommendations. A review” Annales Pharmaceutiques Francaises **68**: 136—147.
- Silva, J. C. C. (2010) “Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de microcistina-lr e agrotóxicos em águas superficiais, utilizando as técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massas”. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.
- Smink, B.E.; Lusthof, K.J.; De Gier, J.J.; Uges, D.R.A.; Egberts A.C.G. (2008) “The relation between the blood benzodiazepine concentration and performance in suspected impaired drivers” Journal of Forensic and Legal Medicine **15**: 483–488.
- Steenoft, A.; Linnet, K. (2009) “Blood concentrations of clonazepam and 7-aminoclonazepam in forensic cases in Denmark for the period 2002–2007” Forensic Science International **184**: 74–79.
- Tejedor, A.M.G.; Hernando, P.F.; Alegria, J.S.D. (2007) “A rapid fluorimetric screening method for the 1,4-benzodiazepines: Determination of their metabolite oxazepam in urine” Analytica Chimica Acta **591**: 112–115.
- Villagrasa, M.; Guillamon, M.; Eljarrat, E.; Barcelo, D. (2007) “Matrix effect in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry analysis of benzoxazinoid derivatives in plant material” Journal of Chromatography A **1157**: 108–114

***CAPÍTULO III - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM  
PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA EM MATRIZES  
BIOLÓGICAS POR GC-MS***

---

### 3.1 INTRODUÇÃO

A cocaína (COC) é um alcalóide derivado da planta *Erythroxylum coca*, usado nas antigas civilizações em cerimônias religiosas. Depois da conquista espanhola na América do Sul, folhas de coca eram usadas como um estimulante pelos trabalhadores nativos nas minas de prata. Em 1855 um jovem químico alemão, Friedrich Gaedcke, isolou o princípio ativo que passou a ser usado como anestésico. Posteriormente, a COC passou a ser usada de forma abusiva devido aos seus efeitos neurológicos, sendo amplamente cultivada na América do Sul (Goldstein *et al.*, 2009).

Nos dias atuais a COC tornou-se uma das drogas mais largamente consumida no mundo e seu uso abusivo transcende todas as classes sociais, raciais e econômicas (Drummer, 2004; Jagerdeo & Abdel-Rehim, 2009; Janicka *et al.*, 2010). O mais recente relatório do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) estima que a prevalência anual do uso de COC na América do Sul está entre 0,9 e 1 % da população com idade entre 15-64 anos. Esse índice é comparável ao uso de cocaína observado na Europa, embora muito menor do que na América do Norte.

A COC pode ser administrada por diferentes vias no organismo e encontra-se disponível sob duas formas: cloridrato de cocaína e o *crack*. O cloridrato de COC, um pó branco cristalino, pode ser inalado, engolido ou injetado. O *crack* é geralmente fumado (Lewis *et al.*, 2004). Qualquer que seja a via de introdução, a COC é extensivamente metabolizada por processos enzimáticos e não enzimáticos gerando compostos menos tóxicos. Os metabólitos primários de cocaína incluem ecgonina metil éster (EME), obtida por ação de esterases hepáticas e colinesterase plasmática; e benzoilecgonina (BZE) obtida por hidrólise (Musshoff & Madea, 2010). A ecgonina (ECG) é um produto de hidrólise não-enzimática da EME e/ou hidrólise enzimática da BZE. A via oxidativa leva a N-desmetilação da COC, onde o principal produto é norcocaína (NOR). Um análogo biologicamente ativo da norcocaína é o cocaetileno (COE) obtido por transesterificação e encontrado em quantidades significativas nos tecidos de pessoas que consomem etanol concomitantemente com COC (Drummer, 2004). Um esquema dos principais metabólitos observados no metabolismo da COC é representado na Figura 3.1. A meia-vida de eliminação terminal de COC varia de cerca de 40 min a 4 h, dependendo da dose.

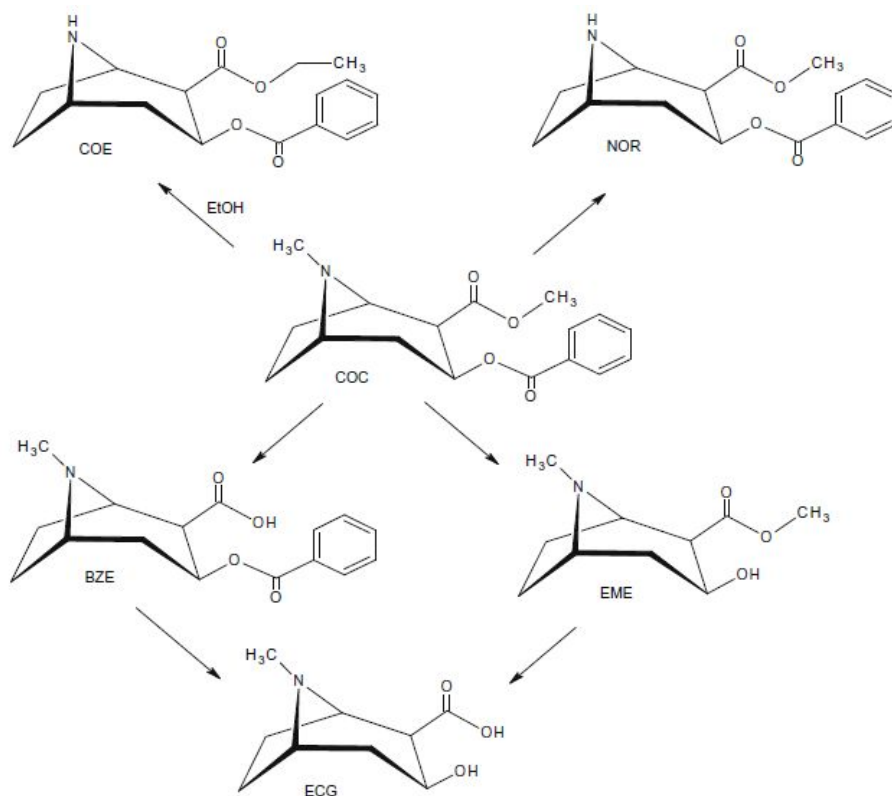


Figura 3.1. Cocaína e metabólitos: cocaetileno (COE), norcocaína (NOR), benzoilecgonina (BZE), ecgonina (ECG) e ecgonina metil éster (EME) (Fonte: Janicka *et al.*, 2010).

A COC é um potente estimulante do sistema nervoso central (SNC) que acelera a atividade do cérebro podendo causar euforia e aumentar a autoconfiança. Isso faz com que o usuário seja encorajado a assumir riscos. Muitas vezes, o uso abusivo de COC está relacionado a situações criminais, quer por sua baixa dose letal (pode levar a situações de overdose com relativa facilidade), quer pelos efeitos desencadeados no usuário, que se torna mais agressivo e violento (Costa, 2008). A dose comumente administrada pelos usuários varia de 10 a 100 mg. Porém a tolerância é atingida rapidamente levando a uma intensificação nas doses que podem chegar a até mais de 1 g por dia (Drummer, 2004). A COC administrada por via intranasal resulta em euforia mais lenta do que quando fumada ou injetada. O uso de *crack* produz um estado de euforia muito mais acentuado e rápido do que outros métodos de administração da COC (Lewis *et al.*, 2004).

Para identificação e quantificação de drogas, a ciência forense requer métodos de análise caracterizados por alta seletividade. O desenvolvimento de métodos rápidos e de baixo custo torna-se importante, uma vez que os tribunais dependem dos resultados de análises toxicológicas para decidir se um indivíduo estava sob a influência de drogas durante um determinado evento (estupro, roubo, acidentes de trânsito e de trabalho) (Janicka *et al.*, 2010) ou para determinar a causa *mortis*.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é considerada a técnica analítica de referência para análise de matrizes complexas e, conseqüentemente para análise de drogas em matrizes biológicas, devido à sua seletividade e sensibilidade (Jagerdeo & Abdel-Rehim, 2009). Entretanto, a determinação de analitos nas matrizes biológicas normalmente não pode ser realizada sem a etapa de preparo de amostra, devido sua complexidade (Nováková & Vlcková, 2009). Estas amostras contêm proteínas, sais, ácidos, bases e vários compostos orgânicos que podem ser semelhantes ao analito de interesse. Devido à natureza complexa das matrizes biológicas, a etapa de preparo da amostra é considerada a parte mais importante de um método bioanalítico. Esta normalmente leva 80% do tempo total de análise (Kataoka & Saito, 2011) e tem sido convencionalmente realizada utilizando precipitação de proteínas (PPT), extração líquido-líquido (LLE), ou extração em fase sólida (SPE) (Nováková & Vlcková, 2009). Neste trabalho a extração sólido-líquido e líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT e ELL-PBT, respectivamente) é empregada como um método alternativo para determinação de cocaína em amostras biológicas. A técnica de extração é baseada na partição do analito entre a matriz sólida ou líquida e uma fase orgânica miscível em água, à temperatura ambiente (25 °C). Diminuindo a temperatura a -20 °C, a fase aquosa é congelada, deixando o sobrenadante líquido, que consiste de um solvente orgânico contendo o analito. A vantagem desta técnica é que, em uma única etapa, é possível obter extratos relativamente puros que podem ser diretamente analisados por cromatografia gasosa, sem a necessidade de etapas adicionais de purificação (Pinho *et al.*, 2010).

Existe uma série de matrizes biológicas, a partir das quais a COC pode ser determinada, como por exemplo, meconio (Pichini *et al.*, 2003), líquido amniótico e/ou placenta (Joya *et al.*, 2010), leite materno (Marchei *et al.*, 2011) dentes (Pellegrini *et al.*, 2006), suor (Follador *et al.*, 2004) urina (Adamowicz & Kala, 2010), saliva (Langel *et al.*, 2011), cabelo (Míguez-Framil *et al.*, 2010), sangue e plasma (Mercolini *et al.*, 2010), dentre outros. Urina, cabelo e saliva são

geralmente utilizados para testes de *screening*. A grande maioria dessas matrizes é utilizada em casos clínicos, sendo o tipo de amostra um dos fatores que se deve levar em conta na escolha de uma técnica analítica (Janicka *et al.*, 2010).

A detecção de drogas de abuso em casos de necropsia pode fornecer alguma dificuldade em comparação com espécimes usadas em casos clínicos. A interpretação dos dados toxicológicos em casos de mortes relacionadas à overdose de drogas não é uma questão simples. Toxicologistas forenses tem usado diferentes tipos de vísceras tais como fígado e rim como amostras para análise toxicológica, embora fluidos biológicos sejam preferidos, por serem mais fáceis de manusear e apresentam menos inconvenientes analíticos do que órgãos sólidos (Contreras *et al.*, 2006). Os tecidos como fígado e rim (Lewis *et al.*, 2004) são frequentemente utilizados em exames toxicológicos *pós-mortem*, especialmente nos casos em que o sangue não está disponível. Estas amostras contêm altas concentrações de lipídios, que pode interferir no desempenho de procedimentos analíticos. Por esse motivo existem poucos métodos descritos na literatura para a determinação de COC em vísceras. Como a maioria dos medicamentos são metabolizados nesse órgão, a substância precursora e seus metabólitos estão presentes neste tecido em altas concentrações (Margalho *et al.*, 2011).

## 3.2 OBJETIVOS

Desenvolver métodos simples de preparo de amostras empregando a Extração Sólido-Líquido e/ou Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura para a determinação de COC em fígado, urina e sangue, seguido de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

## 3.3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.3.1 Reagentes

A cocaína usada neste trabalho foi obtida de uma amostra purificada de acordo com procedimentos internos do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais (97 % de

pureza). A pureza desta substância foi avaliada usando um padrão de cocaína obtida da Cerilliant (Round Rock, TX, EUA) em solução metanólica com concentração de 1 mg/mL.

Cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e acetato de etila grau HPLC (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) foram empregados na otimização da ELL-PBT e/ou ESL-PBT. Hidróxido de sódio, ácido cítrico, di-idrogenofosfato de potássio, ácido bórico e ácido dietil-barbitúrico foram usados no preparo de soluções tampão. Acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usada como solvente extrator dos procedimentos ELL-PBT e/ou ESL-PBT e também como solvente para o preparo de soluções, assim como metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Sulfato de sódio anidro (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) foi empregado como agente secante para eliminar a água dos extratos.

### 3.3.2 Soluções

Soluções estoque foram preparadas dissolvendo 0,01000 g de cocaína em 10,00 mL de metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Uma solução de trabalho ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) desse analito foi preparada por diluição da solução estoque com acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha). Soluções de calibração foram obtidas pela diluição da solução de trabalho em solvente puro (acetonitrila) e em extrato da matriz, obtendo-se concentrações finais que variaram na faixa entre 0 e  $400 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  na matriz de fígado e entre 0 e  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  nas matrizes de urina e sangue.

Uma mistura tampão universal foi utilizada para otimização dos métodos de extração. Essa solução cobre a faixa de pH entre 2,6 e 12,0 ( $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e é obtida dissolvendo-se 6,008 g de ácido cítrico, 3,893 g de di-idrogenofosfato de potássio, 1,769 g de ácido bórico e 5,226 g de ácido dietil-barbitúrico em 1000,0 mL de água Milli Q (Millipore DirectQ 3, França). As soluções tampão com diferentes valores de pH foram obtidas pela mistura de 100,0 mL dessa solução com diferentes volumes de uma solução  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio, como descrito em Mendham *et al.*, 2002.

### 3.3.3 Amostras

Para estudos de otimização e validação analítica da ESL-PBT em fígado utilizaram-se amostras de fígado bovino obtidas no comércio local de Belo Horizonte. Essas amostras foram

trituradas usando um Mix (Mallory modelo Robot 330), fortificadas com solução padrão de cocaína e submetidas ao procedimento de extração proposto.

Um “pool” (mistura de quantidades iguais) de urina e outro de sangue de não usuários de cocaína (amostras brancas) foram empregados para as etapas de otimização e validação. As amostras de urina foram coletadas de 30 voluntários (15 masculinos e 15 femininos) em frascos apropriados e armazenados sob refrigeração a 4 °C. As amostras de sangue foram coletadas de 10 voluntários (5 masculinos e 5 femininos) usando seringas de 20 mL de capacidade, sem o uso de anticoagulante. O método de ELL-PBT foi realizado em sangue hemolisado, obtido pelo congelamento de cada amostra logo após a coleta. Após descongelamento as amostras foram então misturadas em quantidades iguais para a obtenção do *pool*. Todos os voluntários responderam a um questionário com perguntas sobre características e hábitos pessoais, assim como ingestão de drogas e fármacos na semana que antecedeu a coleta. Os voluntários foram informados quanto ao objetivo do trabalho e assinaram o termo de consentimento de participação aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

Para avaliar a aplicabilidade dos métodos propostos, amostras de fígado, urina e sangue de periciados *post-mortem* suspeitos de serem usuários de cocaína foram analisadas pelos métodos otimizados e validados. Tais amostras foram processadas no laboratório de Toxicologia do Instituto Médico Legal/Polícia Civil de Minas Gerais e os extratos foram encaminhados para análise no Departamento de Química da UFMG.

### 3.3.4 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu QP2010 GC (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) acoplado com um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo (GC-QMS) do Laboratório de Química Inorgânica da Universidade Federal de Minas Gerais. O GC-MS operou com linha de transferência e fonte à 230 °C. A separação cromatográfica foi conduzida em uma coluna Restek RTx-5MS (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). Hélio foi empregado como gás carreador a um fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Um autoamostrador (AOC 20, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) foi usado para injetar 1 µL dos extratos no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas. O injetor do cromatógrafo operou a



240 °C no modo *splitless*. A programação da coluna foi estabelecida como se segue: 100 °C por 2 min seguido de aquecimento a uma taxa de 30 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C (5 min), e finalmente aquecimento a 70 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C com isoterma de 2 min, resultando em um tempo total de análise de 17,3 minutos.

O efluente da coluna foi direcionado para a fonte de íons onde as moléculas foram ionizadas por impacto de elétrons (energia 70 eV). Para análises qualitativas os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de razão m/z 50 e 500. O modo de aquisição por monitoramento de íon selecionado (SIM) foi aplicado. Para isto o método foi segmentado como se segue: entre 3 e 10,5 min aplicou-se o modo de aquisição *full scan*, entre 10,5 e 11,5 min o modo SIM onde os íons de razão m/z 182, 82 e 303 foram estabelecidos para obtenção dos picos cromatográficos referentes à cocaína. Finalmente, entre 11,5 e 17,3 min o modo *full scan* foi novamente aplicado.

### 3.3.5 Otimização da Extração Sólido-Líquido e/ou Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

#### 3.3.5.1. Procedimento Geral

##### Fígado

A Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura (ESL-PBT) consistiu em pesar cerca de 3,0000 g de fígado, previamente triturado e fortificado com 1 µg g<sup>-1</sup> de cocaína em um tubo de vidro transparente de 30,0 mL de capacidade. A essa matriz foi acrescentado 1,00 mL de água e certo volume de solvente extrator. A seguir a mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e resfriada a -20 °C *overnight*. Após esse período foi obtido um sistema bifásico que consistiu de uma fase sólida (formada pelo congelamento da fase aquosa e da matriz de fígado) e uma fase líquida (constituída de acetonitrila contendo cocaína extraída da matriz). Após separação das fases por congelamento, o sobrenadante foi passado em um papel de filtro contendo 2,00 g de sulfato de sódio anidro a fim de remover resíduos aquosos que pudessem permanecer na interface. O volume de extrato obtido foi aferido em balão volumétrico de 10,00 mL, transferido para frasco apropriado e armazenado em freezer até o momento da análise por GC-MS.

### Urina

Um volume de 4,00 mL do *pool* de urina, previamente fortificado com  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cocaína foi transferido para frasco de vidro transparente (30 mL) seguido de certo volume de solvente extrator. A mistura foi submetida ao procedimento subsequente, como descrito para fígado.

### Sangue

Para otimização da ELL-PBT de cocaína em sangue, 1,00 mL do *pool* dessa matriz previamente fortificado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de cocaína foi acrescido de 1,00 mL de solução tampão. Essa mistura foi transferida para frascos de vidro transparentes de 15 mL de capacidade e acrescida de certo volume de solvente extrator. O procedimento subsequente foi semelhante ao descrito para amostras de fígado.

### 3.3.5.2. Planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$

#### Fígado e urina

Alguns fatores podem influenciar a eficiência da ESL-PBT e/ou ELL-PBT de cocaína em matrizes biológicas. Com a finalidade de otimizar esses fatores e obter máxima eficiência do método de extração, foram empregados delineamentos experimentais de triagem (planejamento fatorial). A partir de estudos preliminares foram selecionados quatro fatores que foram avaliados em um planejamento fracionário, como descrito na Tabela 3.1.

O planejamento fatorial fracionário foi utilizado, pois num planejamento completo para quatro fatores e dois níveis obtém-se um total de 16 experimentos e isso demandaria muito tempo de análise. No planejamento fatorial fracionário com 8 experimentos é possível avaliar o efeito de todos os fatores selecionados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para fígado e urina os níveis estudados foram os mesmos e por isso são reportados na mesma tabela.

Tabela 3.1: Planejamento Fracionário  $2^{4-1}$  para otimização da ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína em fígado e urina.

Ensaio (n = 3)	Fatores codificados				Fatores Originais			
	F (1)	F (2)	F (3)	F (4)	pH	Volume de extrator (mL)	Composição extrator	Uso de PSA
1	-1	-1	-1	-1	Fisiológico	4	Acetonitrila	Sem PSA
2	+1	-1	-1	+1	10	4	Acetonitrila	50 mg de PSA
3	-1	+1	-1	+1	Fisiológico	8	Acetonitrila	50 mg de PSA
4	+1	+1	-1	-1	10	8	Acetonitrila	Sem PSA
5	-1	-1	+1	+1	Fisiológico	4	Acetonitrila + acetato (*)	50 mg de PSA
6	+1	-1	+1	-1	10	4	Acetonitrila + acetato (*)	Sem PSA
7	-1	+1	+1	-1	Fisiológico	8	Acetonitrila + acetato (*)	Sem PSA
8	+1	+1	+1	+1	10	8	Acetonitrila + acetato (*)	50 mg de PSA

(\*) - A mistura extratora continha 12,5% de acetato de etila

PSA - *Primary Secondary Amine* - adsorvente

### 3.3.5.3. Planejamento Composto Central

#### Fígado e urina

Buscando melhorar a porcentagem de recuperação da cocaína em fígado e urina um planejamento composto central foi empregado. Três fatores (variáveis) foram selecionados. Esses fatores envolveram: volume de acetonitrila, pH e força iônica e estão codificados de acordo com a Tabela 3.2. Cada linha da matriz de planejamento corresponde a uma corrida experimental, que foi realizada com as variáveis assumindo o valor correspondente à sua coluna.

Tabela 3.2: Planejamento composto central aplicado à matriz de fígado e urina.

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> : Acetonitrila (mL)	X <sub>2</sub> : pH	X <sub>3</sub> : NaCl (mol L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	7	5	0,15
2	1	-1	-1	9	5	0,15
3	-1	1	-1	7	9	0,15
4	1	1	-1	9	9	0,15
5	-1	-1	1	7	5	0,45
6	1	-1	1	9	5	0,45
7	-1	1	1	7	9	0,45
8	1	1	1	9	9	0,45
9	-1,682	0	0	6,32	7	0,3
10	1,682	0	0	9,68	7	0,3
11	0	-1,682	0	8	3,64	0,3
12	0	1,682	0	8	10,4	0,3
13	0	0	-1,682	8	7	0,05
14	0	0	1,682	8	7	0,55
15	0	0	0	8	7	0,3
16	0	0	0	8	7	0,3
17	0	0	0	8	7	0,3

#### 3.3.5.4. Avaliação da quantidade de massa e volume de solução aquosa na eficiência da extração de cocaína em fígado

A presença de solução aquosa na mistura é importante por promover uma melhor separação entre a fase sólida (fígado + água congelada) e a fase líquida (acetonitrila). Esta permite que a matriz sólida fique presa à fase aquosa no congelamento. Neste estudo, a quantidade de massa de fígado foi alterada para  $2,0000 \pm 0,0050$  g e o volume de solução aquosa foi avaliado (2,00 e 4,00 mL), seguido de 8,00 mL de acetonitrila.

### 3.3.5.5. Planejamento Composto Central aplicado à matriz de sangue

Os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário da extração de cocaína em urina e fígado foram coincidentes. Com base nesses resultados um planejamento composto central foi empregado para a matriz de sangue. Os fatores avaliados no planejamento composto central da ELL-PBT de cocaína em sangue foram: volume de acetonitrila e pH. Esses fatores estão descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Matriz de planejamento composto central aplicado a sangue.

Ensaio	Fatores codificados		Fatores originais	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Acetonitrila (mL)	pH
1	-1	-1	3,0	5,0
2	1	-1	5,0	5,0
3	-1	1	3,0	9,0
4	1	1	5,0	9,0
5	-1,41	0	2,6	7,0
6	1,41	0	5,4	7,0
7	0	-1,41	4,0	4,2
8	0	1,41	4,0	9,8
9	0	0	4,0	7,0
10	0	0	4,0	7,0
11	0	0	4,0	7,0

### 3.3.5.6. Avaliação da força iônica na recuperação de cocaína na matriz de sangue.

Para avaliar o efeito da força iônica na eficiência da recuperação da cocaína, 1,00 mL de sangue contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de cocaína foi acrescido de 1,00 mL de solução tampão pH 9,82. A força iônica foi então ajustada para 0,1; 0,5 ou 1,0 mol L<sup>-1</sup> de NaCl pela adição de 20,0; 100,0 e 200,0 µL de uma solução na concentração de 0,5 mol L<sup>-1</sup> deste sal, seguido da adição de 4,00 mL de acetonitrila. A mistura foi então submetida ao procedimento de ELL-PBT.

### 3.3.6 Métodos otimizados da ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína

#### Fígado

Em amostras de fígado ( $2,0000 \pm 0,0050$  g) previamente processadas foram adicionados 10,00 mL da mistura extratora (2,00 mL de água milli Q e 8,00 mL de acetonitrila). A mistura foi agitada por 30 s em vórtex e resfriada *overnight* à aproximadamente  $-20$  °C. O solvente orgânico (fase líquida) foi passado em papel de filtro contendo aproximadamente 2 g de sulfato de sódio anidro. O extrato orgânico foi coletado e avolumado com acetonitrila em balão volumétrico de 10,00 mL e transferido para vials apropriados para armazenamento em freezer até o momento da análise. As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.4.

#### Urina

Um volume de 4,00 mL de urina foi acrescido de 8,00 mL de acetonitrila. A mistura foi agitada em vortex durante 30 segundos e resfriada a  $-20$  °C *overnight*. A fase orgânica foi filtrada em papel de filtro contendo aproximadamente 2 g de sulfato de sódio anidro. O extrato orgânico foi coletado e avolumado em balão volumétrico de 10,00 mL e transferido para vials apropriados para armazenamento em freezer até o momento da análise.

#### Sangue

Um volume de 1,00 mL de sangue foi acrescido de 1,00 mL de solução tampão pH 9,82. A força iônica foi então ajustada com 200  $\mu$ L de uma solução de NaCl  $5,0$  mol  $L^{-1}$  seguido da adição de 4,00 mL de acetonitrila. A mistura foi submetida ao procedimento subsequente, como descrito para fígado e sangue.

### 3.3.7 Validação do Método

Os métodos previamente otimizados foram validados de acordo com as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão (Peters & Maurer, 2002; Cassiano *et al.*, 2009; Rozet *et al.*, 2011).

### *Seletividade*

Qualquer método bioanalítico pode estar sujeito a interferências. A seletividade é, portanto, "a capacidade do método bioanalítico de medir e diferenciar de forma inequívoca o(s) analito(s) na presença de componentes, que possam estar presentes" (Rozet *et al.*, 2011). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) recomenda que sejam realizados testes em amostras brancas da matriz biológica (sangue, plasma, soro, urina, etc) obtidas de 6 indivíduos (Cassiano *et al.*, 2009). Neste trabalho a seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos obtidos após a extração ESL e/ou ELL-PBT dos componentes da matriz isenta de cocaína (amostra branca) com os cromatogramas dos extratos das matrizes fortificadas com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cocaína (exceto fígado que foi fortificado com  $25 \text{ ng g}^{-1}$ ). Nesta avaliação foi empregada amostra de fígado bovino e *pools* de urina e sangue usados na otimização do método. Todos os extratos foram analisados conforme procedimento previamente otimizado.

### *Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação de cocaína em fígado, urina e sangue.*

O efeito de matriz (efeito dos constituintes da matriz na resposta cromatográfica) foi avaliado. Para avaliar este fenômeno foram preparadas duas séries de soluções padrão contendo cocaína nas concentrações de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e  $400 \mu\text{g L}^{-1}$ . A primeira série foi preparada pela diluição da solução de trabalho ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) contendo cocaína em acetonitrila pura. A segunda série dos padrões foi preparada pela diluição da solução de trabalho em um extrato da matriz sem adição do analito (matriz branca). O extrato foi obtido submetendo amostras brancas de fígado, urina e sangue ao procedimento de ESL-PBT e/ou ELL-PBT. Os extratos dos brancos de cada matriz foram misturados e usados como solvente para o preparo da segunda série de soluções.

O efeito de matriz foi avaliado comparando-se a curva analítica obtida pela análise dos padrões em acetonitrila com as curvas obtidas para cada uma das matrizes em estudo. Para isto as inclinações médias e os respectivos desvios padrão foram calculados e os testes F e t de *Student* ao nível de 95% de confiança foram aplicados para verificar se houve ou não efeito de matriz.

### Linearidade

A curva analítica corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito (Rozet *et al.*, 2011). Para construção da curva analítica o método da padronização externa com ajuste de matriz foi empregado. Ao ser aplicado para análises de amostras desconhecidas, esse método compara a área do pico do analito a ser quantificado com as áreas obtidas a partir dos padrões de calibração (através do gráfico de concentração *versus* resposta ou pela equação da reta da curva resultante).

A linearidade do método foi avaliada pela análise dos extratos obtidos da ESL e ELL/PBT de amostras brancas de fígado, urina e sangue fortificadas com cocaína. Na matriz de fígado a linearidade foi verificada na faixa de 0 a 2000 ng g<sup>-1</sup> e em urina e sangue na faixa de 5 a 1000 µg L<sup>-1</sup> de cocaína.

As amostras brancas de fígado (2,0000 ± 0,0005 g) foram fortificadas com 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1250 e 2000 ng g<sup>-1</sup> de cocaína e submetidas ao procedimento de ESL-PBT descrito no item 3.3.6. As amostras brancas foram fortificadas com tais valores de concentração porque após o procedimento de extração há um fator de diluição de cinco vezes nos extratos. Desta forma, tais valores corresponderiam (em µg L<sup>-1</sup>) aos valores de concentração usados na construção da curva analítica da otimização do método. O procedimento para cada nível de concentração foi realizado em triplicata. A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

### Limite de detecção e quantificação

Os termos limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito (Cassiano *et al.*, 2009). Neste trabalho o LD e LQ foi avaliado empregado as equações 3.1 e 3.2, respectivamente.

$$LD = 3 \frac{\sigma}{S} \quad (3.1)$$

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (3.2)$$

Onde  $\sigma$  é o desvio padrão das áreas no tempo de retenção do analito, obtida de 10 leituras de brancos independentes e S a inclinação da reta da curva analítica.



#### *Precisão e Exatidão*

A precisão expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medições. Essas medições devem ser obtidas de amostragem múltiplas de uma mesma amostra nas condições prescritas. A precisão geralmente é avaliada em três níveis de concentração e envolve ensaios de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Peters & Maurer, 2002). As precisões dos métodos de ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína em fígado, urina e sangue, seguidos de análise por cromatografia gasosa foram realizadas em termos de repetitividade. Para isto amostras brancas foram fortificadas com três níveis de concentração. Amostras de fígado foram fortificadas com 100, 500 e 1000 ng g<sup>-1</sup>, amostras de urina com 60, 250 e 625 µg L<sup>-1</sup> e amostras de sangue com 200, 800 e 1000 µg L<sup>-1</sup> de cocaína. Cada nível de concentração foi processado em 7 replicatas de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.6. Após análise dos extratos determinou-se o coeficiente de variação (CV/%) para cada nível de concentração.

A exatidão de um método analítico é geralmente determinada pelo estudo de materiais de referência ou por estudos de adição e recuperação.

Nos ensaios de recuperação amostras de fígado, urina e sangue foram fortificadas com três níveis de concentração de cocaína. Esses níveis correspondem aos mesmos níveis estabelecidos nos ensaios de precisão. Cada nível de concentração foi realizado em 3 replicatas e os resultados expressos como porcentagem de recuperação e desvio padrão (% ± s).

#### **3.3.8 Aplicação dos métodos otimizados e validados a amostras reais**

Os métodos otimizados e validados foram aplicados a amostras reais de periciados *post-mortem*. Todas as causas *mortis* estavam relacionadas à overdose ou outra, em que a vítima estava sob efeito de cocaína. Para avaliar o desempenho do método foram analisadas em triplicatas 8 amostras de fígado, 5 amostras de urina e 5 amostras de sangue. Para que a concentração de cocaína nos extratos obtida após ESL-PBT e/ou ELL-PBT fosse quantificada dentro da faixa de trabalho estudada, alguns extratos foram diluídos 5 ou 10 vezes com acetonitrila.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Otimização das condições cromatográficas

Na Figura 3.2 está representado o cromatograma obtido de uma solução de cocaína em acetonitrila na concentração de  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ . O tempo total da análise foi de 17,3 minutos de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.3.4. Por se tratar de matrizes complexas tais como fígado, sangue e urina, este tempo de análise foi requerido por permitir a limpeza total da coluna cromatográfica. A quantificação ocorreu no modo *full scan*. No entanto, uma pequena faixa correspondente ao tempo de retenção da cocaína foi obtida no modo SIM. Este procedimento foi feito para tornar a análise mais seletiva para este composto. No presente cromatograma (Figura 3.2) está representado apenas a faixa de tempo de retenção obtida no modo SIM. Por esta figura pode-se observar a presença de picos bem definidos para todos os íons selecionados na identificação da cocaína. Vale ressaltar que para a quantificação o íon de razão  $m/z$  182 foi empregado.

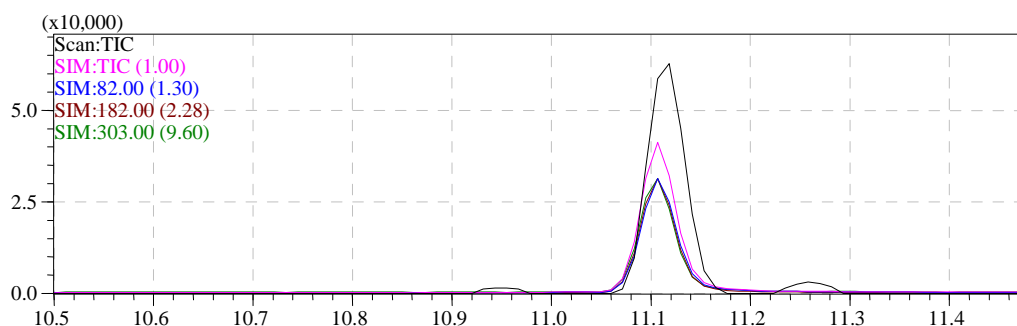


Figura 3.2. Cromatograma de solução padrão de cocaína na concentração de  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.4.2 Otimização da ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína em fígado e urina

#### 3.4.2.1 Triagem de variáveis: Planejamento fatorial $2^{4-1}$

A técnica de extração sólido-líquido e líquido-líquido com partição em baixa temperatura tem sido aplicada para análise de compostos orgânicos em diferentes tipos de matrizes tais como água (Vieira *et al.*, 2007; Goulart *et al.*, 2010) e alimentos diversos (Rübensam *et al.*, 2011; Goulart *et al.*, 2008; Pinho *et al.*, 2010). Este é o primeiro trabalho que emprega esta estratégia de extração para fins forenses e, portanto a otimização das condições de extração é importante. Existe uma série de fatores que alteram a eficiência da extração de compostos orgânicos pelo uso desta técnica. Baseando-se nos ótimos resultados obtidos pelos autores anteriormente citados, alguns fatores foram selecionados para a otimização da ESL-PBT e ELL-PBT de cocaína em fígado e urina. Os fatores selecionados envolveram pH, volume de solvente extrator, composição do solvente extrator e uso de um material adsorvente para o purificação dos extratos. Para isto um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  foi empregado como descrito na Tabela 3.1 do item 3.3.5.2.

A escolha do pH como um dos fatores avaliados foi feita considerando o pKa da cocaína que é 8,6 (20 °C). Como o pH fisiológico está em torno de 7,36 e 7,44 e o pH da urina em torno de 5,6 optou-se por avaliar a eficiência da recuperação em pH fisiológico e em valores de pH mais altos (pH = 10). Nesse último valor de pH a molécula de cocaína estaria desprotonada, tendo maior afinidade pela fase orgânica. No entanto, como pode se observar no gráfico de Pareto (Figura 3.3) a porcentagem de recuperação de COC em fígado foi melhor em valores de pH baixos, uma vez que essa variável apresentou efeito significativo e negativo. Esta resposta pode ter ocorrido devido ao fato de que em valores de pH muito altos (pH = 10) as proteínas dessa matriz tenham precipitado junto com a molécula de cocaína. Para urina o efeito foi negativo, mas não significativo, indicando que este fator não tem grande influência na extração de cocaína das amostras de urina (Figura 3.4).

Considerando que o efeito do volume de solvente extrator foi significativo e positivo, maiores volumes de acetonitrila promovem melhores recuperações de cocaína em fígado e em urina (Figuras 3.3 e 3.4). O uso de 8,00 mL de solvente extrator aumentou a extração em 12,2 % na matriz de fígado e em 10,9 % em urina, se comparado às extrações com 4,00 mL de solvente. O aumento na eficiência da extração com o aumento do solvente extrator também foi observado por Goulart e colaboradores (2010) na determinação de pesticidas em amostras de água.

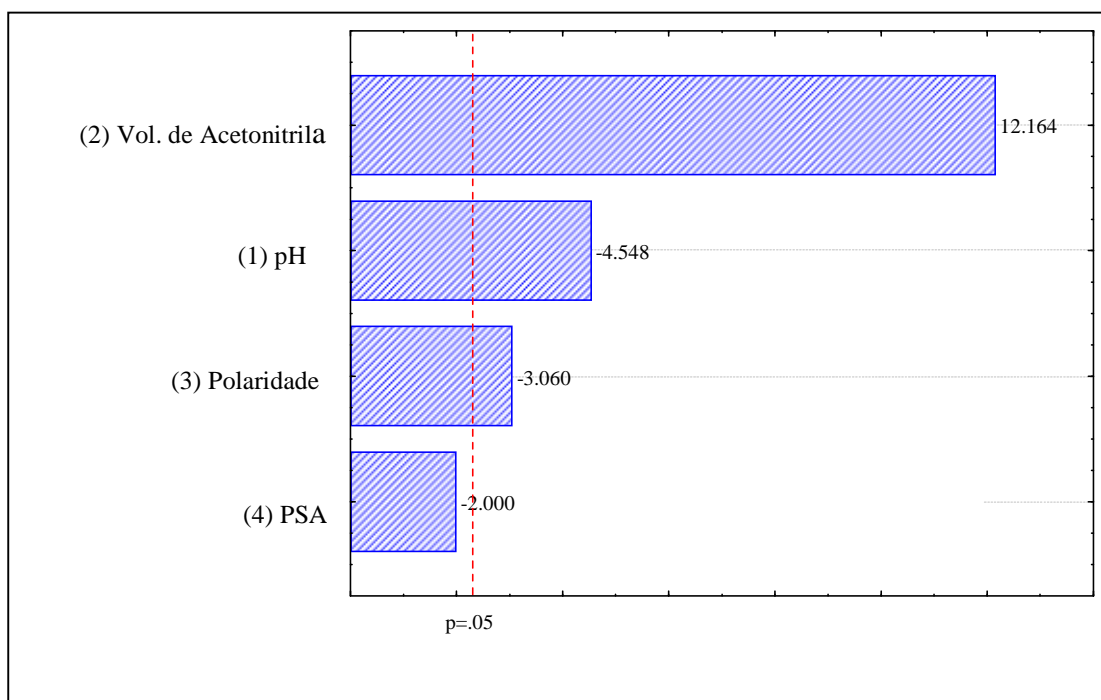


Figura 3.3. Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fracionário  $2^{4-1}$  para otimização da extração de cocaína na matriz de fígado.

Pequenas mudanças na polaridade do solvente extrator podem ser obtidas pela adição de um segundo solvente, como o acetato de etila que é menos polar que a acetonitrila. Entretanto, a quantidade do segundo solvente adicionada não deve quebrar a fase única formada entre água e acetonitrila a temperatura ambiente (25 °C). Em experimentos preliminares foi estabelecida a quantidade de acetato de etila (12,5 %) sem que houvesse quebra da fase única. Esta variável foi avaliada porque a estrutura da cocaína é caracterizada pela presença de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Assim, a adição de acetato de etila à mistura extratora poderia melhorar a eficiência das extrações. No entanto, este fator foi estatisticamente significativo e negativo ao nível de 95 % de probabilidade, indicando que a acetonitrila pura promove melhores recuperações em urina e fígado (Figuras 3.3 e 3.4).

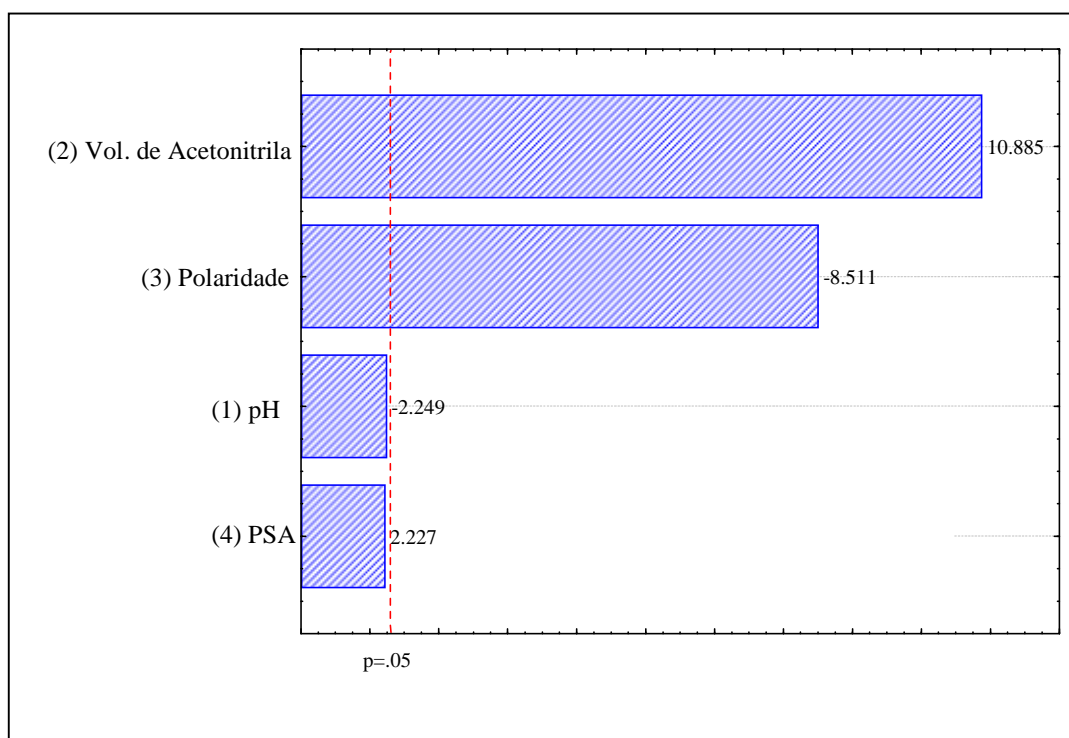


Figura 3.4. Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fracionário  $2^{4-1}$  para otimização da extração de cocaína na matriz de urina.

Já o uso de um material adsorvente como o PSA (*primary secondary amine*) foi avaliado na tentativa de se promover a purificação dos extratos, uma vez que os extratos de amostras de fígado apresentaram-se amareladas após extração. O mesmo não ocorreu com amostras de urina. Os resultados mostram que, nos níveis estudados, o uso de PSA não foi significativo, indicando que os extratos obtidos da ESL e/ou ELL-PBT são limpos o suficiente para serem analisados por GC-MS.

#### 3.4.2.2 Planejamento Composto Central

A elaboração do planejamento composto central para matriz de fígado e urina permitiu o estudo de três variáveis em 5 níveis diferentes como descrito no item 3.3.5.3. Os valores codificados e os valores reais para cada nível foram descritos na Tabela 3.2, na qual os valores 1

e -1 são referentes aos níveis máximos e mínimos, respectivamente. Os valores 1,682 e -1,682 refere-se aos pontos axiais e o 0 (zero) corresponde ao ponto central do planejamento. A figura 3.5 mostra o gráfico de Pareto contendo os efeitos avaliados para extração de COC na matriz de fígado. Por esta figura pode-se observar que houve efeito significativo do volume de acetonitrila (fator 1) e do pH (fator 2), sendo concordantes com os resultados obtidos no planejamento fracionário  $2^{4-1}$ . Já o efeito da força iônica foi positivo, mas não foi significativo ao nível de 95% de confiança. Pode-se sugerir que a força iônica presente nesta matriz seja superior aos níveis estudados e, por isso a adição de sal não altera a recuperação de COC. Para esta matriz não foram observados efeitos de interação significativos entre os fatores, ao nível de 95% de confiança.

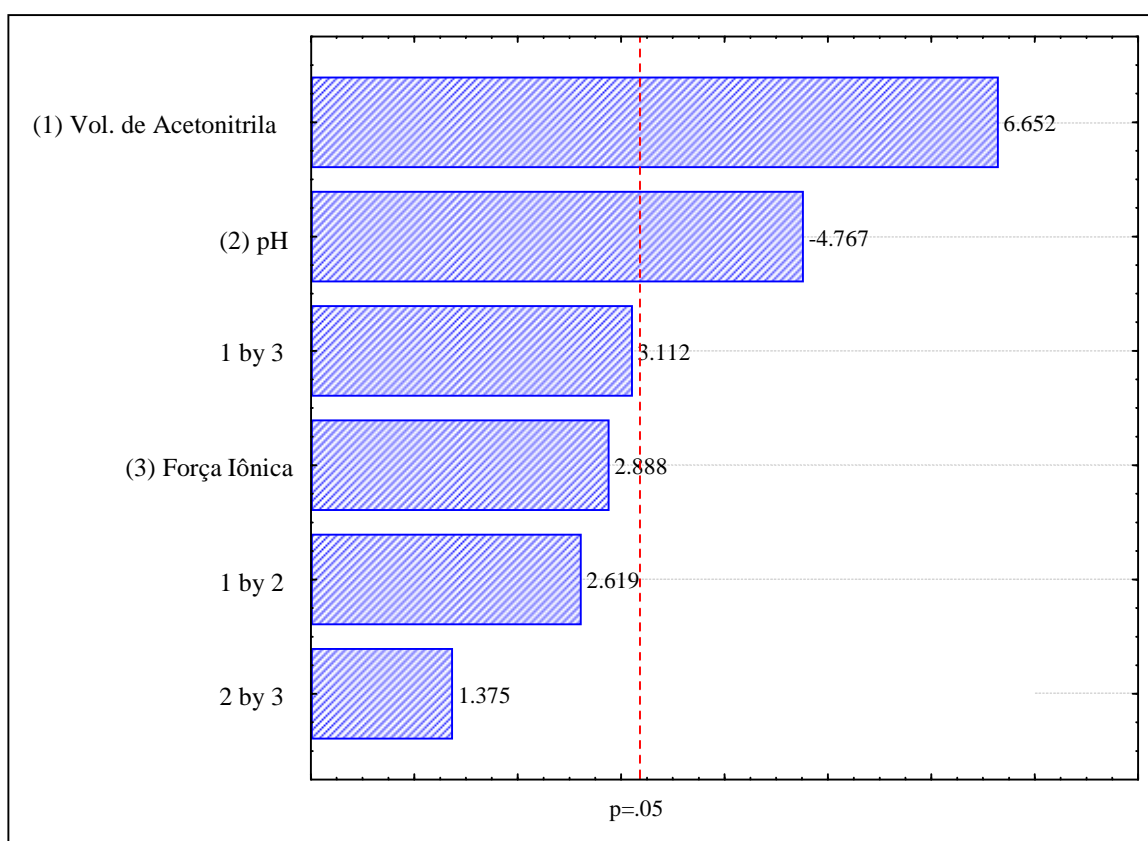


Figura 3.5: Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento composto central para otimização da extração de cocaína da matriz de fígado

A metodologia de superfície de resposta fornece uma condição ótima em toda a região experimental (Figura 3.6). A análise da superfície de resposta plotada para a matriz de fígado mostra um efeito positivo no volume da acetonitrila e efeito negativo no pH. Este comportamento, como mencionado anteriormente, pode estar relacionado à precipitação das proteínas em altos valores de pH. Ao precipitarem as proteínas podem reter a molécula de COC, impossibilitando a mesma de ser extraída pela fase orgânica. Como condição ótima desse planejamento foram selecionados pH fisiológico e 8,00 mL de acetonitrila como solvente extrator.

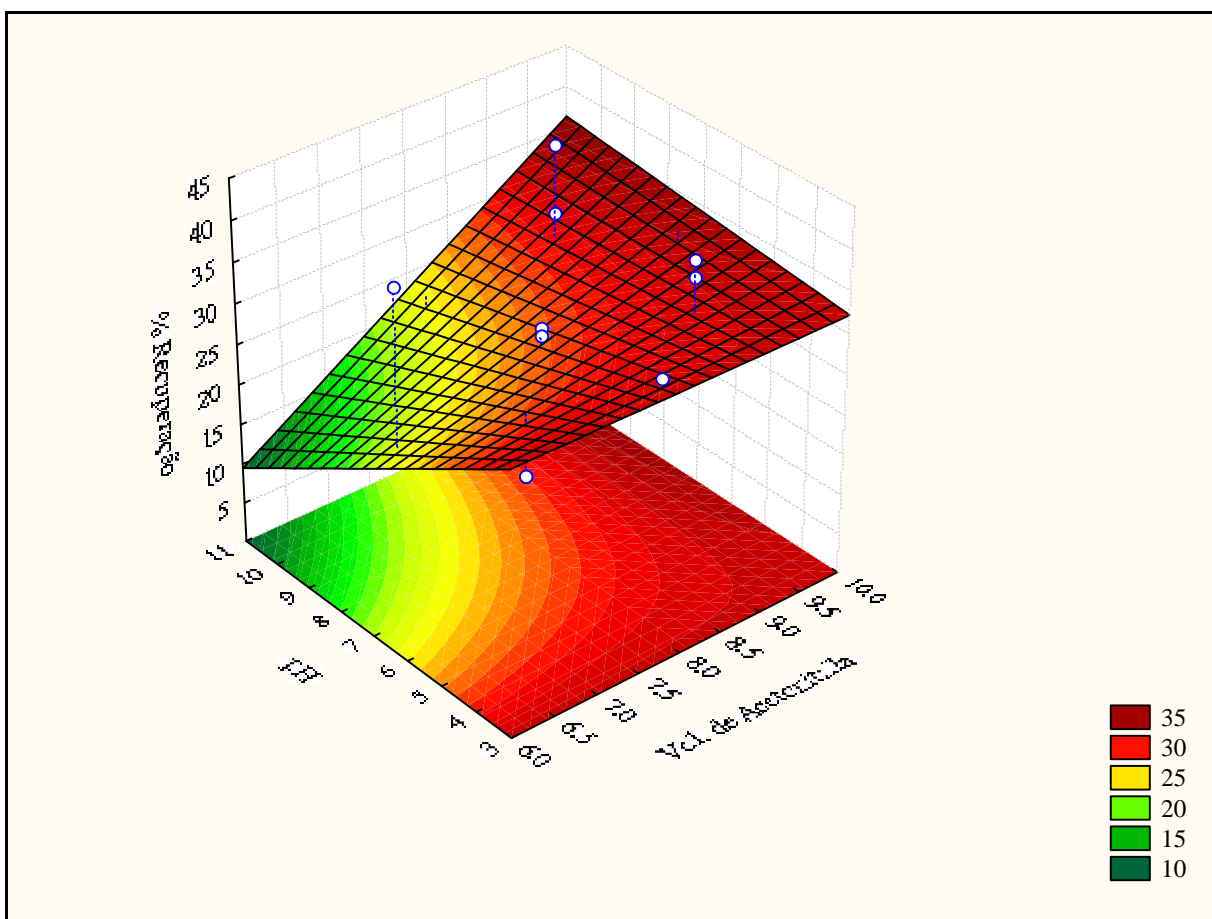


Figura 3.6. Gráfico de superfície de resposta obtida do planejamento composto central em amostra de fígado.

Os fatores 2 (pH) e 3 (força iônica) apresentaram efeito significativo sobre a extração de cocaína a partir da urina (Figura 3.7). No entanto, esses efeitos são negativos indicando que o aumento do pH e a adição de NaCl à matriz de urina não melhoram a eficiência de extração. Como a matriz de urina geralmente contém um alto teor de sais, a quantidade adicionada nos níveis avaliados pelo planejamento composto central não promoveu melhora significativa nas taxas de recuperação. Embora o volume de acetonitrila (fator 1) não tenha apresentado efeito significativo sobre a recuperação de cocaína, este apresenta efeito de interação com o pH. Este comportamento mostra que a recuperação de COC é favorecida nos níveis baixos de pH e de volumes de acetonitrila.

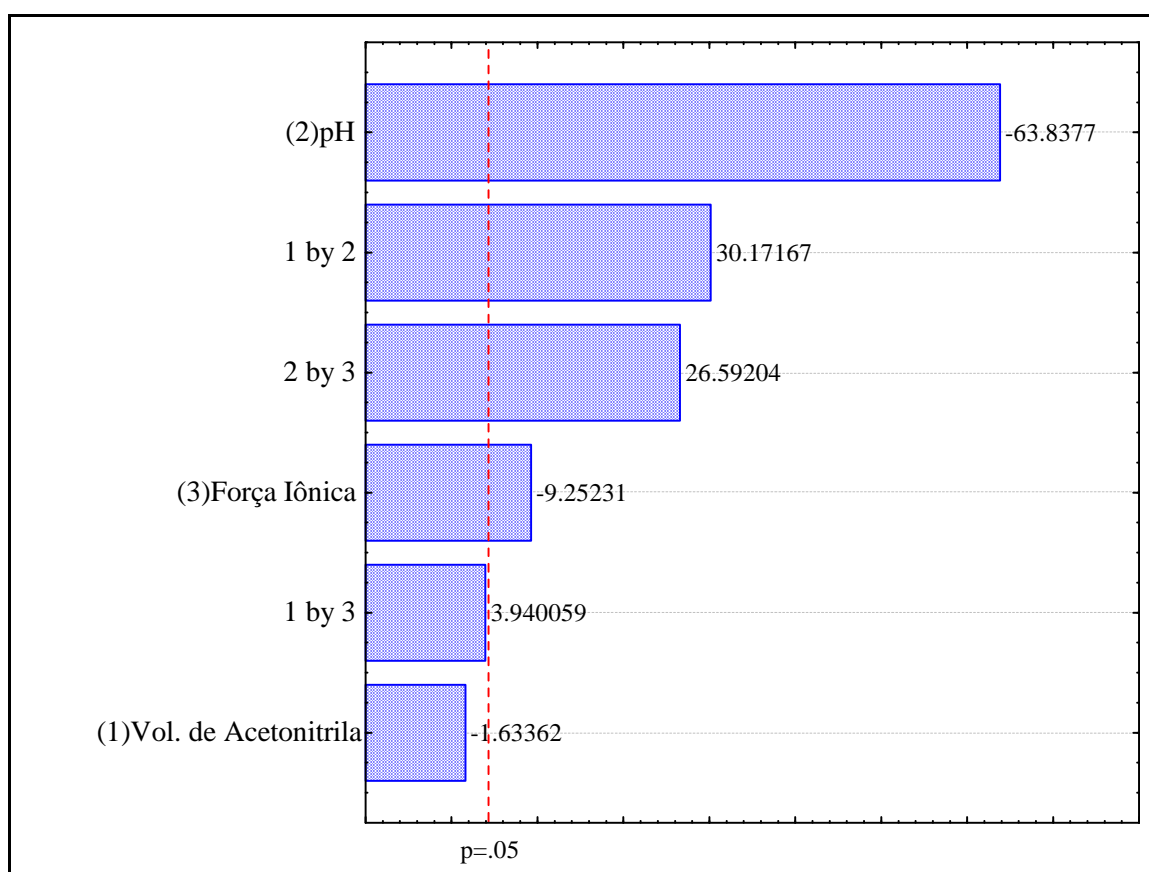


Figura 3.7: Gráfico de Pareto contendo a análise dos efeitos avaliados no planejamento composto central da matriz de urina.



A Figura 3.8 mostra o gráfico da superfície de resposta da extração de COC em urina. À medida que pH e a força iônica diminuem, a extração da COC é favorecida nesta matriz. Pela análise do gráfico de superfície de resposta desta matriz (Figura 3.8) foi possível estimar o ponto ótimo fixado em pH = 5, que é próximo do pH natural do *pool* de urina (5,6), e força iônica natural da urina. Desta forma as condições ótimas da ELL-PBT de COC em urina puderam ser estabelecidas por este *design* experimental, uma vez que as recuperações obtidas ficaram próximas de 100 %.

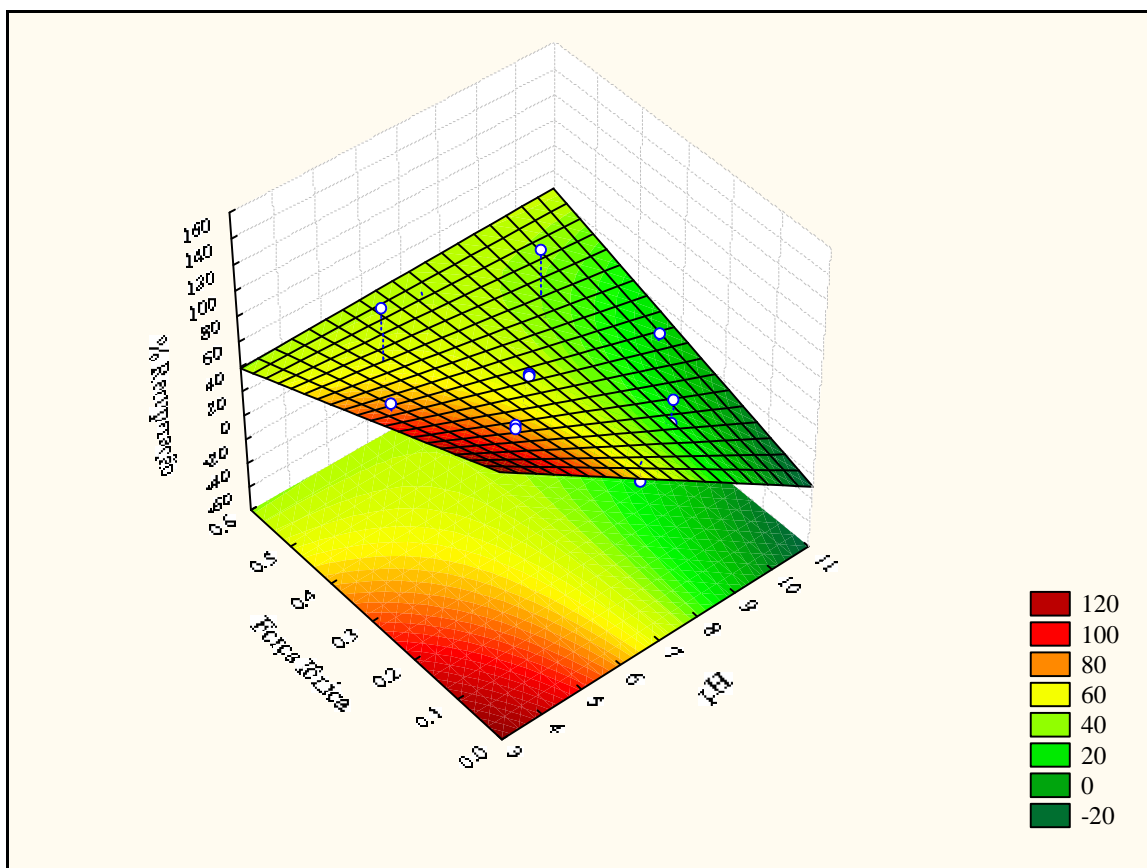


Figura 3.8. Gráfico de superfície de resposta obtida do planejamento composto central em amostra de urina.

Foi necessário realizar novos testes na matriz de fígado devido à baixa eficiência de recuperação (40 %) apresentados pelos *designs* experimentais realizados para extração de cocaína nesta matriz.

### 3.4.2.3 Efeito da quantidade de massa e volume de solução aquosa na eficiência da extração de cocaína em fígado

As recuperações obtidas nos *designs* experimentais realizados para matriz de fígado não apresentaram altas porcentagens de recuperação de COC. Buscando melhorar a eficiência de extração de COC nesta matriz, foi realizada uma variação na quantidade de massa da amostra e também do volume de água usado para proporcionar uma mistura adequada para a separação das fases na etapa de congelamento. A massa de  $3,0000 \pm 0,0005$  g de fígado foi então modificada para  $2,0000 \pm 0,0005$  g acrescidos de 2 ou 4 mL de água. As porcentagens de recuperação obtidas nestes ensaios são apresentadas na Tabela 3.4. Pode-se verificar que a adição de 2,00 mL de água à massa de fígado promoveu uma melhora na recuperação da cocaína para 50 %.

Tabela 3.4. Recuperações obtidas nos ensaios de variação do volume de água adicionado a 2 g de fígado.

Ensaio	Recuperação Média (%)
2 mL de água	50,0
4 mL de água	35,7

Como condição ótima obtida na otimização da ESL-PBT de cocaína em fígado foi estabelecido: 2,0000 g de amostra previamente triturada e acrescida de 2,0 mL de água e 8,0 mL de acetonitrila. A baixa recuperação de COC deve-se à alta complexidade deste tipo de matriz.

### 3.4.3 Otimização da ELL-PBT de cocaína em sangue

#### 3.4.3.1 – Planejamento Composto Central

Para a matriz de sangue foi realizado um planejamento composto central que permitiu o estudo de duas variáveis em 5 níveis diferentes como descrito no item 3.3.5.5. Tais variáveis envolveram o estudo do efeito do volume de acetonitrila e do pH sobre a eficiência de extração de cocaína nesta matriz. A Figura 3.9 mostra o gráfico de Pareto contendo os efeitos das variáveis avaliadas.

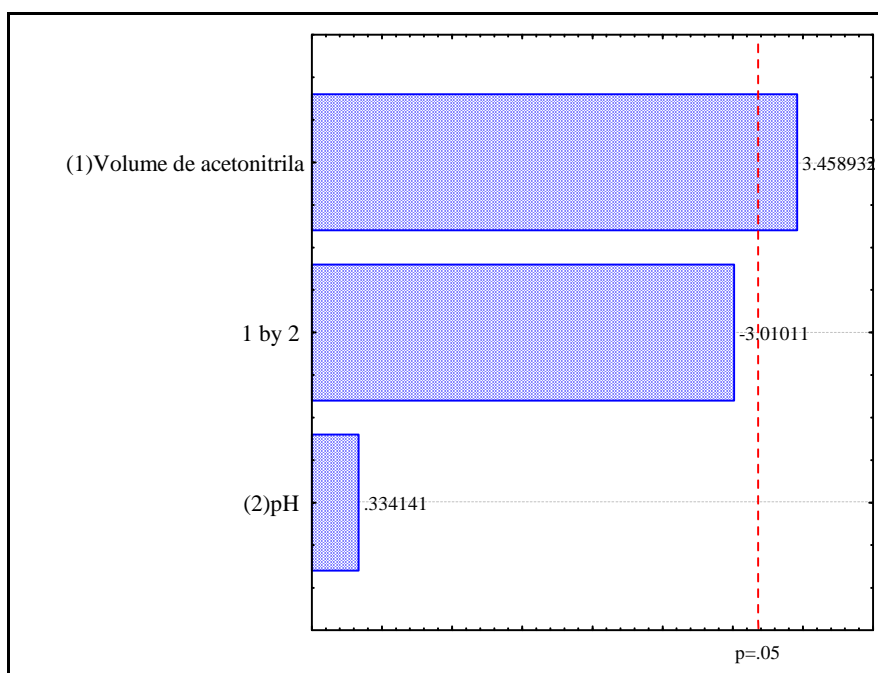


Figura 3.9. Gráfico de Pareto obtido do planejamento composto central da ELL-PBT da COC em sangue.

Houve efeito significativo e positivo para o fator 1, ou seja, o aumento no volume de acetonitrila promove melhores recuperações de cocaína nesta matriz. Resultado semelhante foi apresentado para a matriz de fígado e urina na análise deste mesmo efeito. Já o efeito do pH sobre a resposta da extração de cocaína em sangue não foi significativo. Ainda assim, a superfície de resposta que relaciona os efeitos principais sobre a porcentagem de recuperação de COC foi

construída (Figura 3.10). Por esta figura verifica-se que o aumento do volume de acetonitrila leva melhores recuperações de cocaína. As taxas de recuperação obtidas nos ensaios do planejamento composto central variaram de 43,9 a 76,2 %. Embora tais resultados tenham se mostrado promissores na ELL-PBT de cocaína em sangue, novos testes foram realizados necessários para melhorar a eficiência da recuperação.

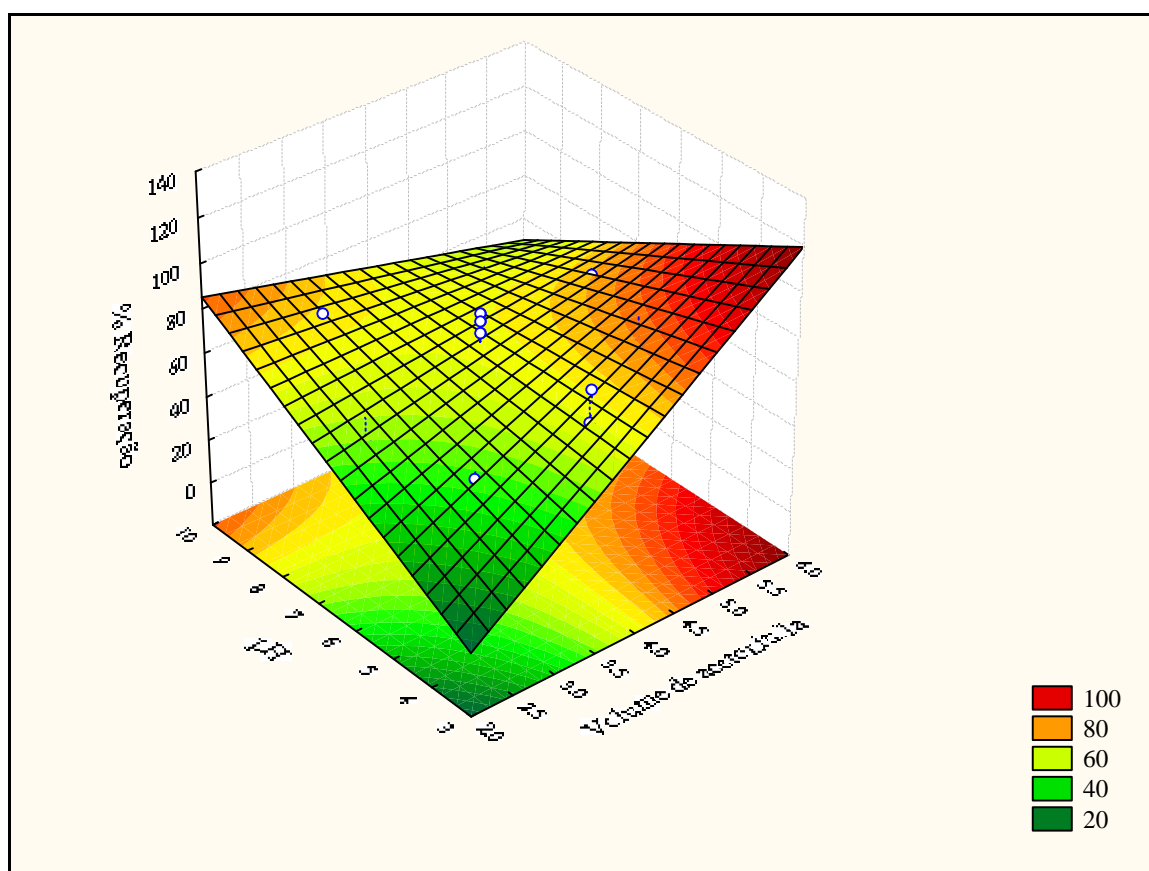


Figura 3.10. Gráfico de superfície de resposta obtida do planejamento composto central em amostra de sangue.

#### 3.4.3.2 Efeito da força iônica na eficiência da extração de cocaína em sangue.

O efeito da força iônica na eficiência da recuperação de cocaína em sangue foi avaliado. Esta variável não foi avaliada junto com o planejamento composto central, desenvolvido inicialmente, porque não apresentou efeito significativo ou positivo nas matrizes de urina e

fígado. No entanto, buscando melhorar a eficiência da recuperação de COC na matriz de sangue, optou-se por avaliar este efeito. A força iônica da amostra foi alterada com uma solução estoque de NaCl na concentração de 5,0 mol L<sup>-1</sup>. As concentrações de NaCl avaliadas foram 0,1; 0,5 e 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.5. Com o uso da força iônica a porcentagem de recuperação da cocaína em sangue melhorou significativamente para 88,6 %.

Tabela 3.5. Porcentagem de recuperação e coeficientes de variação (CV) obtidos nos ensaios de força iônica na matriz de sangue.

Concentração de NaCl (mol L <sup>-1</sup> )	Recuperação ± s (%)	CV (%)
0,1	73,0 ± 7,2	9,8
0,5	83,0 ± 7,6	9,1
1,0	88,6 ± 1,8	2,0

### 3.4.4 Validação dos Métodos

Após otimização dos métodos de ESL e/ou ELL-PBT para análise de cocaína em fígado, urina e sangue, os mesmos foram validados. As figuras de mérito avaliadas na validação do método envolveram seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação e ensaios de precisão e exatidão, e são apresentadas a seguir.

#### *Seletividade*

Nas figuras 3.11, 3.12 e 3.13 são apresentadas as regiões do cromatograma onde a COC é eluída. Para avaliar a seletividade do método as matrizes foram previamente fortificadas com concentrações próximas e superiores ao LQ. Os cromatogramas (a) referem-se aos extratos dos brancos de cada matriz, obtidos da ESL e/ou ELL-PBT e os cromatogramas (b) aos extratos dos brancos de cada matriz fortificados com 10 µg L<sup>-1</sup> de COC após o procedimento de extração. Fígado foi fortificado com 25 ng g<sup>-1</sup> antes da ESL-PBT. Observa-se por estes resultados a ausência de interferentes no tempo de retenção do analito de interesse. Vale ressaltar que a análise de todos os brancos refere-se ao *pool* obtido de amostras de diferentes procedências. Por

este motivo podem-se considerar os métodos otimizados como sendo seletivos. O uso do modo SIM na aquisição dos dados também favorece boa seletividade dos métodos previamente otimizados.

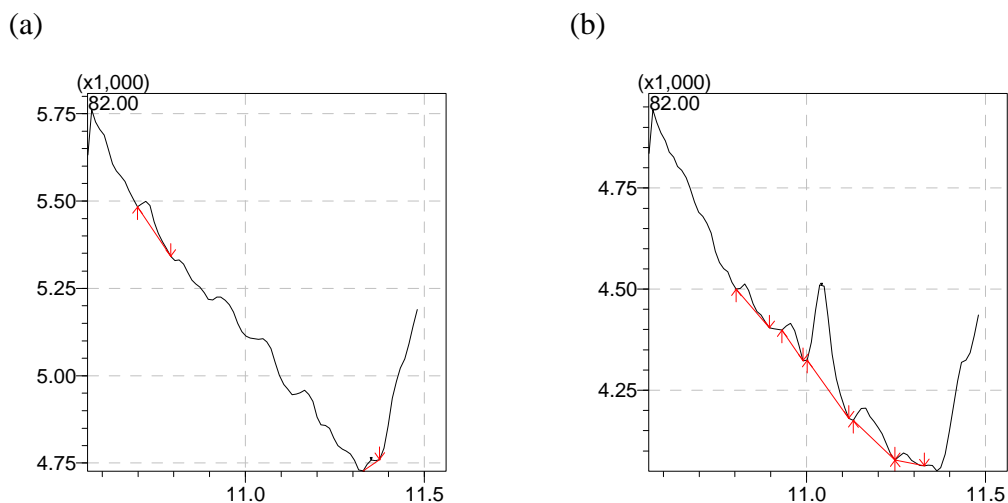


Figura 3.11. Cromatogramas do extrato do branco da matriz de fígado (a) e do extrato da matriz previamente fortificada com  $25 \text{ ng g}^{-1}$  de cocaína (b).

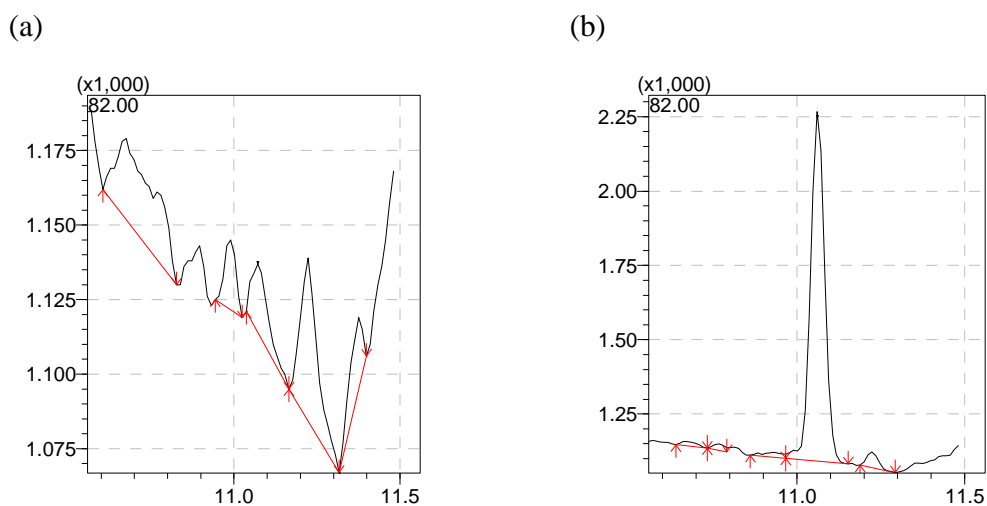


Figura 3.12. Cromatogramas do extrato do branco da matriz de urina (a) e do extrato da matriz previamente fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cocaína (b).

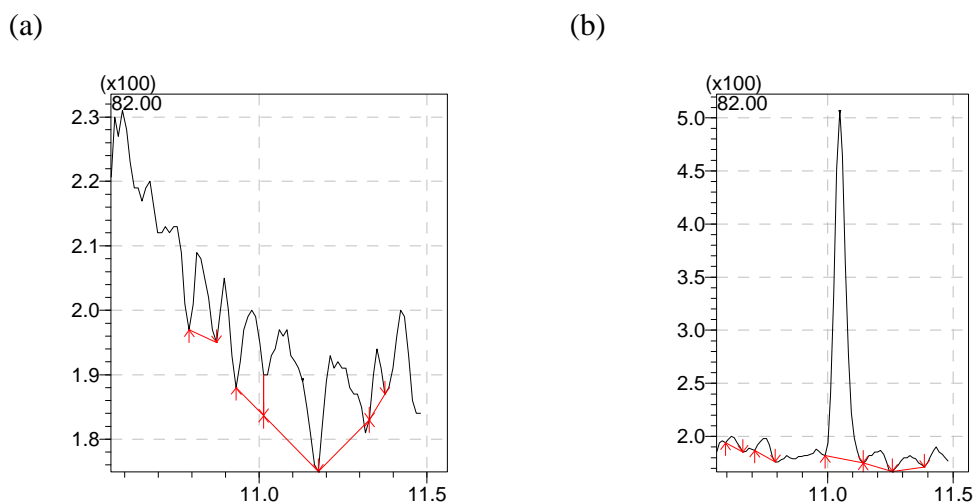


Figura 3.13. Cromatogramas do extrato do branco da matriz de sangue (a) e do extrato da matriz previamente fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cocaína (b).

*Avaliação do efeito de matriz na porcentagem de recuperação de cocaína em fígado, urina e sangue.*

O efeito de matriz pode ser descrito como a alteração da resposta cromatográfica dos analitos de interesse causado por coextrativos, que podem saturar os sítios ativos do injetor, da coluna ou do detector (Pinho *et al.*, 2009). O mesmo pode ser avaliado pela comparação entre curvas analíticas construídas a partir de soluções de cocaína preparadas em solvente puro e em extratos orgânicos obtidos da ESL e/ou ELL-PBT de amostras brancas (Figuras 3.14, 3.15 e 3.16). Neste trabalho, curvas analíticas preparadas por diluição da solução de trabalho em acetonitrila pura e em extrato das matrizes de fígado, urina e sangue foram comparadas. O efeito de matriz foi avaliado por meio da comparação das inclinações obtidas por estas curvas construídas em triplicatas ( $n = 3$ ).

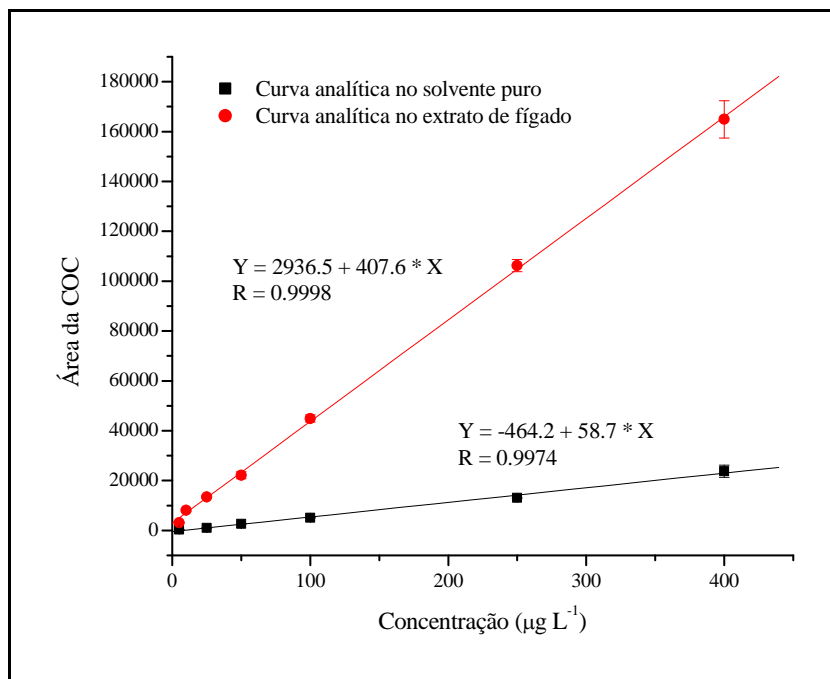


Figura 3.14. Curvas analíticas de cocaína preparadas em solvente puro e em extrato de fígado.

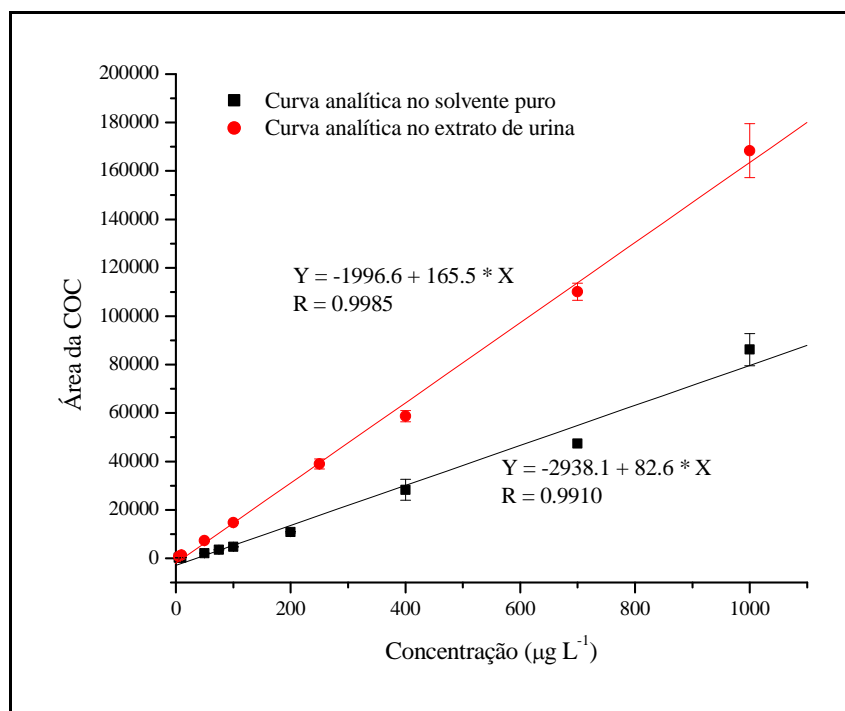


Figura 3.15. Curvas analíticas de cocaína preparadas em solvente puro e em extrato de urina.



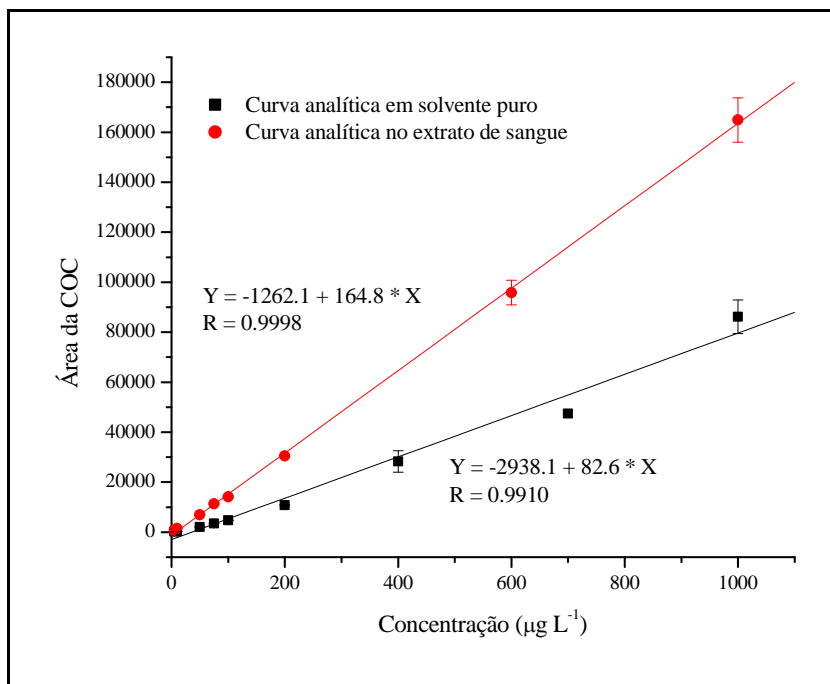


Figura 3.16. Curvas analíticas de cocaína preparadas em solvente puro e em extrato de sangue.

Para avaliar o efeito de matriz as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente puro e no extrato da matriz foram comparadas. Para isto os testes estatísticos F e t de *student* foram aplicados. Os valores de t e F calculados (Tabela 3.6) mostram que há diferença significativa entre as inclinações das curvas analíticas, ao nível de 95% de confiança.

Tabela 3.6. Valores de F e t obtidos na comparação de médias dos coeficientes angulares das curvas analíticas em solvente puro e em extrato do branco das matrizes de fígado, urina e sangue.

Matriz	F <sub>calculado</sub>	t <sub>calculado</sub>
Fígado	6,8	51,4
Urina	0,9	19,9
Sangue	1,6	25,8

Por estes resultados foi constatado que há efeito de matriz em todas as matrizes avaliadas sugerindo que as curvas analíticas devam ser preparadas no extrato do branco de cada uma delas. Este efeito de matriz acentuado já era esperado, uma vez que matrizes biológicas são complexas. De acordo com Pinho (2009), quando o coeficiente angular varia, os componentes da matriz contribuem para introduzir um erro sistemático proporcional nos resultados. Isto significa que quanto maior a concentração do composto orgânico, maior é a diferença entre a área deste em solvente puro e em extrato da matriz. Já quando apenas o coeficiente linear varia, significa que há um erro sistemático constante onde a diferença entre a área do composto orgânico em solvente puro e em extrato da matriz tende a assumir um valor único e as curvas analíticas são paralelas.

Para identificar o tipo de erro proporcionado pelos componentes das matrizes, foi calculada a razão entre os coeficientes angulares e lineares entre as curvas analíticas construídas no extrato da matriz e em solvente puro (Figuras 3.14, 3.15 e 3.16). A razão (matriz/solvente) entre os coeficientes angulares e lineares das curvas analíticas na matriz de fígado foram 6.9 e 6.3, respectivamente. Isto significa que há um aumento acentuado na resposta cromatográfica de 590 e 530%. Desta forma, o efeito de matriz tem um erro sistemático proporcional e também um erro sistemático constante sob a resposta cromatográfica da cocaína na matriz de fígado. Resposta semelhante foi apresentada pela matriz de urina, onde a razão (matriz/solvente) entre os coeficientes angulares e lineares das curvas analíticas foram 2.1 e 0.6, respectivamente. O aumento da resposta cromatográfica devido ao efeito de matriz é de 110% devido ao coeficiente angular e de 20% devido ao coeficiente linear. Já a matriz de sangue apresentou 2.05 e 0.28.

Comparou-se também as curvas analíticas obtidas com extrato de fígado bovino (utilizado na otimização e validação) com o extrato de fígado humano. Os resultados podem ser observados na Figura 3.17. Comparando-se as inclinações das duas curvas pelos testes F e t, verificou-se que há diferença estatisticamente significativa entre elas. Desta forma, conclui-se que o efeito de matriz é minimizado quando se utiliza extrato de fígado bovino para a construção da curva analítica, mas não é completamente eliminado, indicando a necessidade de preparar a curva analítica em um extrato branco de fígado humano. Após este estudo, as quantificações de todas as análises cromatográficas foram feitas em curvas analíticas preparadas no extrato das matrizes estudadas. No caso do fígado, como a quantidade de amostra branca de fígado humano disponível era pequena, realizou-se uma estimativa dos outros parâmetros de validação com o extrato de

fígado bovino e para a quantificação das amostras construiu-se uma curva analítica em extrato de fígado humano.

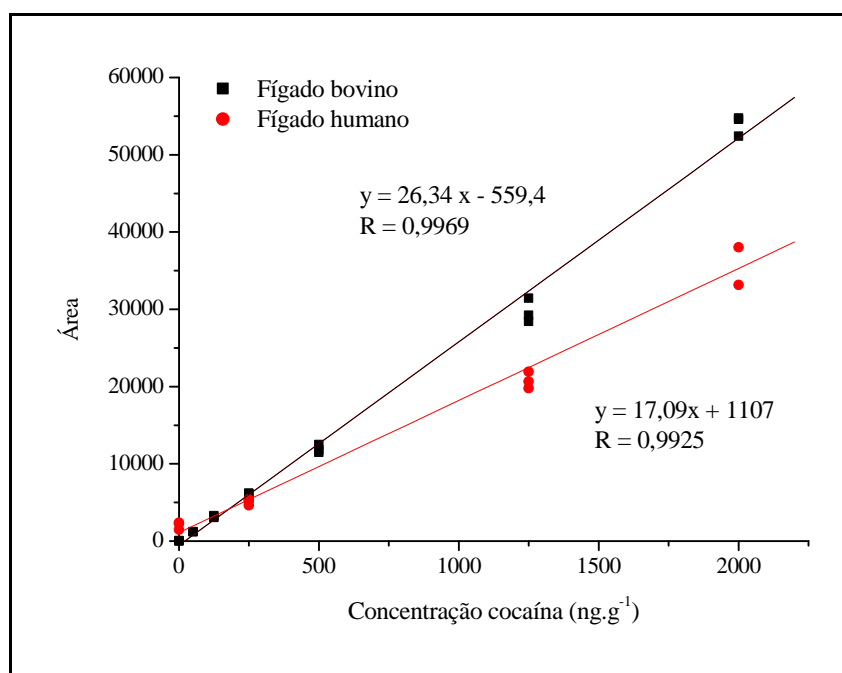


Figura 3.17. Curvas analíticas de cocaína preparadas em extrato de fígado bovino e em extrato de fígado humano.

#### *Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.*

A linearidade foi avaliada analisando-se os extratos obtidos da ELL e/ou ESL-PBT de amostras brancas fortificados com cocaína em diferentes concentrações. A Tabela 3.7 mostra a faixa linear de cada matriz, a equação da reta e os coeficientes de correlação (R) para as curvas analíticas. Observa-se por esta tabela que os valores de R foram superiores a 0,9994 indicando que as respostas do detector são proporcionais à concentração na faixa linear estudada.

O limite de detecção (LD) para os métodos propostos foram determinados considerando 3 vezes a razão entre o desvio padrão obtido da análise de 10 brancos de cada matriz e o coeficiente angular da curva analítica. Os limites de quantificação (LQ) foram determinados considerando 10 vezes esta razão. Os valores de LD e LQ de COC nas matrizes de urina e sangue foram inferiores

a 1,1 e 3,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 3.7). Já a matriz de fígado apresentou LD e LQ igual 20,9 e 69,5  $\text{ng g}^{-1}$ . Embora esses valores se mostrem superiores às matrizes de urina e sangue, deve-se considerar a alta complexidade da matriz de fígado. Além disso, as concentrações de cocaína determinadas em amostras de fígado, em caso de overdoses, são relativamente altas de forma que os limites determinados por esse método podem ser considerados adequados.

Tabela 3.7. Parâmetros das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos métodos propostos.

Matriz	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Equação da reta	R	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Fígado	0 -2000*	$Y = 26,868X - 214,271$	0,9994	20,9*	69,5*
Urina	5 -1000	$Y = 162,0029X - 865,4262$	0,9994	1,0	3,5
Sangue	5 -1000	$Y = 164,57 X - 1061,048$	0,9998	1,1	3,7

\* Concentrações em  $\text{ng g}^{-1}$

#### Precisão e Exatidão

A precisão do método foi determinada em termos do coeficiente de variação obtido da análise de sete extrações idênticas realizadas em três níveis de concentração para cada matriz. Os resultados obtidos estão representados na tabela 3.8 e os coeficientes de variação obtidos foram todos inferiores a 13,4 %. A exatidão, determinada pela recuperação, foi avaliada em três níveis de concentração (triplicata) sendo estes correspondentes aos mesmos níveis empregados na avaliação da precisão. Os valores de recuperação, obtidos pelos métodos propostos variaram de 95,1 a 100,4 % na matriz de fígado, 92,6 a 95,7 % na matriz de urina e 69,2 a 81,9 % na matriz de sangue.

Os resultados apresentados nos ensaios de adição e recuperação de cocaína, avaliados pelos métodos propostos, mostraram-se superiores aos obtidos por pesquisadores em matriz de sangue empregando um sistema automatizado de SPE e análise por GC-MS (Lewis *et al.*, 2004) e fígado empregando extração líquido-líquido e análise por HPLC-UV (Roberts *et al.*, 1992). Embora a literatura recente mostre aplicações de métodos à análise de cocaína em fígado (Lewis

*et al.*, 2004; Margalho *et al.*, 2011;), discussões detalhadas a respeito da validação dos mesmos são escassos, reforçando a necessidade do desenvolvimento e validação de novos métodos.

Tabela 3.8. Precisão e recuperação obtidas pelos métodos propostos após extração de cocaína em três níveis de concentração nas diferentes matrizes.

Matriz	Níveis de Concentração	Precisão (CV / %)	Recuperação (% ± s)
Fígado	100 ng g <sup>-1</sup>	13,4	95,1 ± 4,6
	500 ng g <sup>-1</sup>	6,8	97,6 ± 0,7
	1000 ng g <sup>-1</sup>	7,9	100,4 ± 3,3
Urina	60 µg L <sup>-1</sup>	3,1	94,9 ± 2,9
	250 µg L <sup>-1</sup>	3,6	95,7 ± 3,4
	625 µg L <sup>-1</sup>	7,5	92,6 ± 7,0
Sangue	200 µg L <sup>-1</sup>	7,7	81,9 ± 1,9
	800 µg L <sup>-1</sup>	6,1	69,2 ± 1,5
	1000 µg L <sup>-1</sup>	6,2	69,7 ± 3,0

### 3.4.5 Aplicação dos Métodos

Os métodos validados foram aplicados às amostras de periciados *postmortem* relacionadas à overdose de cocaína, ou outro tipo de morte onde a vítima estava sob o efeito deste composto. Os métodos previamente otimizados e validados foram aplicados a 8 amostras de fígado, 5 amostras de urina e 5 amostras de sangue. Antes das análises dos extratos diluições de 5 e/ou 10 vezes foram feitas nas amostras de fígado para que a concentração a ser determinada caísse dentro da faixa de trabalho da curva analítica. Os resultados são apresentados na Tabela 3.9 e 3.10.

Todas as amostras apresentavam laudos positivos para COC, identificados pelos métodos internos do IML. As concentrações determinadas nas matrizes estudadas variaram de 333,5 a 5969 ng g<sup>-1</sup> para fígado, 547,1 a 3109 µg L<sup>-1</sup> para urina e 84,70 a 1256 µg L<sup>-1</sup> para sangue. Os

coeficientes de variação obtidos em triplicata para todas as amostras analisadas foram inferiores 14,3 %.

Tabela 3.9. Concentrações de cocaína (expressa em  $\text{ng g}^{-1} \pm \text{s}$ ) obtidas das análises de 8 amostras de fígado de periciados *post-mortem* (n=3).

Amostras	Concentração ( $\text{ng g}^{-1} \pm \text{s}$ )	CV (%)
1	2693 $\pm$ 348	12,9
2	333,5 $\pm$ 41,5	12,4
3	5969 $\pm$ 286	4,6
4	383,7 $\pm$ 35,9	9,4
5	1116 $\pm$ 138	12,4
6	5244 $\pm$ 749	14,3
7	3725 $\pm$ 531	14,2
8	5184 $\pm$ 294	5,7

Tabela 3.10. Concentrações de cocaína (expressa em  $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{s}$ ) obtidas das análises de 5 amostras de urina e 5 amostras de sangue de periciados *post-mortem* (n=3).

Matriz	Amostra	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{s}$ )	CV (%)
Urina	1	2565 $\pm$ 34	1,3
	2	547,1 $\pm$ 31,6	5,8
	3	3109 $\pm$ 222	7,1
	4	896,0 $\pm$ 36,3	4,0
	5	2474 $\pm$ 183	7,4
Sangue	1	1106 $\pm$ 61	5,5
	2	311,7 $\pm$ 17,1	5,5
	3	1256 $\pm$ 136	10,8
	4	1227 $\pm$ 137	11,2
	5	84,7 $\pm$ 5,3	6,3

### **3.5 CONCLUSÕES**

Métodos de extração simples e de baixo custo foram desenvolvidos para identificação e quantificação de cocaína em fluidos (urina e sangue) e tecidos (fígado) *post-mortem*. As figuras de mérito avaliadas nos ensaios de validação mostraram que os tais métodos são sensíveis, precisos e exatos. Os valores de LD e LQ obtidos foram menores ou iguais aos publicados na literatura para métodos com matrizes biológicas semelhantes. Os métodos empregando a ESL e/ou ELL-PBT foram aplicados pela primeira vez à análise de amostras reais obtidas de casos onde a causa morte foi overdose ou outra em que o suspeito estava sob efeito de cocaína. A vantagem deste método sobre os já estabelecidos na literatura é a simplicidade associada ao pequeno volume de amostra, baixo consumo de solvente e obtenção de extratos limpos que possam ser analisados por cromatografia gasosa.

## REFERÊNCIAS

- Adamowicz, P.; Kala, M. (2010). "Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry." Forensic Science International **198**(1-3): 39-45.
- Cassiano, N. M.; Barreiro, J. C.; Martins, L. R. R.; Oliveira, R. V.; Cass, Q. B. (2009). "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas." Química Nova **32**: 1021-1030.
- Contreras, M. T.; Hernández, A. F.; González, M.; González, S.; Ventura, R.; Pla, A.; Valverde, J. L.; Segura, J.; de la Torre, R (2006). "Application of pericardial fluid to the analysis of morphine (heroin) and cocaine in forensic toxicology." Forensic Science International **164**(2-3): 168-171.
- Costa, J. L. (2008). Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense. Instituto de Química. São Paulo, Universidade de São Paulo. **Doutorado**: 170.
- Drummer, O. H. (2004). "Postmortem toxicology of drugs of abuse." Forensic Science International **142**(2-3): 101-113.
- Follador, M. J. D.; Yonamine, M.; Moreau, R. L. M.; Silva, O. A. (2004). "Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry." Journal of Chromatography B **811**(1): 37-40.
- Goldstein, R. A., DesLauriers, C.; Burda, A. M. (2009). "Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review." Seminars in Diagnostic Pathology **26**(1): 10-17.
- Goulart, S. M.; Alves, R. D.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H.; Assis, T. C.; Queiroz, M. E. L. R. (2010). "Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water." Analytica Chimica Acta **671**(1-2): 41-47.
- Goulart, S. M., Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H. (2008). "Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection." Talanta **75**(5): 1320-1323.
- Jagerdeo, E.; Abdel-Rehim, M. (2009). "Screening of Cocaine and Its Metabolites in Human Urine Samples by Direct Analysis in Real-Time Source Coupled to Time-of-Flight Mass



- Spectrometry After Online Preconcentration Utilizing Microextraction by Packed Sorbent." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **20**(5): 891-899.
- Janicka, M.; Kot-Wasik, A.; Namieśnik, J. (2010). "Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples." Trac-Trends in Analytical Chemistry **29**(3): 209-224.
- Joya, X.; Pujadas, M.; Falcón, M.; Civit, E.; Garcia-Algar, O.; Vall, O.; Pichini, S.; Luna, A.; de la Torre, R. (2010). "Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation." Forensic Science International **196**(1-3): 38-42.
- Kataoka, H.; Saito, K. (2011). "Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **54**(5): 926-950.
- Langel, K., Gunnar, T.; Ariniemi, K.; Rajamäki, O.; Lillsunde, P. (2011). "A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Chromatography B **879**(13-14): 859-870.
- Lewis, R. J.; Johnson, R. D.; Angier, M.K.; Ritter, R.M. (2004). "Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Chromatography B **806**(2): 141-150.
- Marchei, E.; Escuder, D.; Pallas, C. R.; Garcia-Algar, O.; Gómez, A.; Friguls, B.; Pellegrini, M.; Pichini, S. (2011). "Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **55**(2): 309-316.
- Margalho, C.; Franco, J.; Franco, J.; Corte-Real, F.; Vieira, D. N. (2011). "Illicit drugs in alternative biological specimens: A case report." Journal of Forensic and Legal Medicine **18**(3): 132-135.
- Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J. D.; Thomas, M.J.K. (2002) "Vogel: Análise Química Quantitativa". 6ª ed. Livros Técnicos e Científicos editora S.A. RJ, 462 p.
- Mercolini, L., Mandrioli, R.; Gerra, G.; Raggi, M. A. (2010). "Analysis of cocaine and two metabolites in dried blood spots by liquid chromatography with fluorescence detection: A

- novel test for cocaine and alcohol intake." Journal of Chromatography A **1217**(46): 7242-7248.
- Míguez-Framil, M.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, P.; Álvarez-Freire, I.; Taberero, M. J.; Bermejo, A. M. (2010). "Matrix solid-phase dispersion on column clean-up/pre-concentration as a novel approach for fast isolation of abuse drugs from human hair." Journal of Chromatography A **1217**(41): 6342-6349.
- Musshoff, F.; Madea, B. (2010). "Cocaine and benzoylecgonine concentrations in fluorinated plasma samples of drivers under suspicion of driving under influence." Forensic Science International **200**(1-3): 67-72.
- Nováková, L.; Vlčková, H. (2009). "A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation." Analytica Chimica Acta **656**(1-2): 8-35.
- Pellegrini, M.; Casá, A.; Marchei, E.; Pacifici, R.; Mayné, R.; Barbero, V.; Garcia-Algar, O.; Pichini, S. (2006). "Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for opiates and cocaine in human teeth." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **40**(3): 662-668.
- Peters, F. T.; Maurer, H. H. (2002). "Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review." Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement **7**(11): 441-449.
- Pichini, S.; Pacifici, R.; Marchei, E.; Pérez-Alarcón, E.; Puig, C.; Vall, O.; García-Algar, O. (2003). "Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium." Journal of Chromatography B **794**(2): 281-292.
- Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. (2009). "Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa." Química Nova **32**: 987-995.
- Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. (2010). "Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography." Food Chemistry **121**(1): 251-256.
- Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. (2010). "Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for

- pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography." Food Control **21**(10): 1307-1311.
- Roberts, S. M.; Munson, J. W.; James, R. C.; Harbison, R. D. (1992) "An Assay for Cocaethylene and Other Cocaine Metabolites in Liver Using High-Performance Liquid Chromatography" Analytical Biochemistry **202**: 256-261.
- Rozet, E.; Marini, R. D.; Ziemons, E.; Boulanger, B.; Hubert, Ph. (2011). "Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **55**(4): 848-858.
- Rübensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Kist, T. L.; Pizzolato, T. M. (2011) "A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection." Analytica Chimica Acta **705**: 24- 29.
- Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. (2007). "Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG." Química Nova **30**: 535-540.

***CAPITULO IV – DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA,  
ADULTERANTES E DILUENTES EM AMOSTRAS  
APREENDIDAS EM DUAS REGIÕES DO BRASIL***

---

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A cocaína é uma droga ilícita consumida por 0,7% da população brasileira com idade entre 12 e 65 anos e é amplamente utilizada em todo o mundo (UNODC, 2011). A “cocaína de rua” é normalmente comercializada no mercado ilegal como um pó branco, contendo cloridrato de cocaína, base livre e várias outras substâncias, tais como contaminantes, adulterantes e diluentes. Uma amostra de “cocaína de rua” raramente é encontrada com 100% de pureza, sendo comum encontrar contaminantes derivados do processo de produção e/ou adulteração (Bernardo *et al.*, 2003).

Algumas impurezas podem ser geradas a partir de compostos que estão presentes nas folhas de coca (cis e trans-cinnamoilcocaína, tropocaína, hidroxí-cocaína e truxilina) (Chiarotti & Fucci 1999) e a partir de resíduos dos produtos químicos utilizados no refino (sulfato, permanganato, carbonato, etc). Diluentes são compostos adicionados à droga para aumentar o volume disponível da mesma e diluir o ingrediente ativo (Weiner *et al.*, 1998; Behrman, 2008). Alguns diluentes tais como glicose e carbonato de sódio são adicionados à droga para aumentar a quantidade disponível a ser comercializada (Coomber, 2008; Carvalho & Mídio, 2003). Já os adulterantes são drogas psicoativas que são muito mais baratos do que o ingrediente ativo e que apresentam efeito semelhante ou complementar, quando misturados com o princípio ativo, e, portanto, ajudam a esconder o fato da substância ter sido diluída ou adulterada (Coomber, 2008).

O conhecimento da qualidade (pureza e concentração de outros constituintes) da “cocaína de rua” e suas variações podem ser úteis sob vários aspectos. Estas informações poderiam ajudar a: (i) formular hipóteses sobre a estrutura do mercado ilegal desta droga (diluição em diferentes graus na cadeia de distribuição, pontos de abastecimento, etc) (Montagne, 1991), (ii) determinar as tendências de disponibilidade da cocaína no mercado ilícito quando usados em conjunto com o preço (razão preço/pureza), (iii) explicar o estabelecimento ou disseminação de determinados padrões de consumo de cocaína e (iv) explicar a ocorrência de reações agudas ou "overdoses" desta droga (Barrio *et al.*, 1997). Trabalhos anteriores relatam a identificação da cafeína, lidocaína, benzocaína, diltiazem, procaína e fenacetina como adulterantes em amostras de cocaína (McKinney *et al.*, 1992; Fucci & De Giovanni, 1998). Adulterantes podem influenciar a percepção de qualidade por usuários de cocaína, uma vez que têm efeitos que podem imitar a cocaína (por exemplo, efeito anestésico) ou alterar o efeito farmacológico de cocaína (Evrard *et*

*al.*, 2010). Diluentes diversos são descritos na literatura, como o amido, açúcar, carbonato de sódio, silicatos, sulfatos, calcários, etc (Silva *et al.*, 2008; Schneider & Meys, 2011). Ambos, adulterantes e diluentes, podem ser perigosos e causar danos diversos à saúde, além do dano causado pelo próprio princípio ativo.

Para determinar a composição de “cocaína de rua”, algumas técnicas analíticas são necessárias. A determinação dos princípios ativos, adulterantes, diluentes e impurezas em amostras de “droga de rua” tem sido realizada em diferentes contextos e com procedimentos variados, incluindo os testes colorimétricos simples (Dujourdy & Besacier, 2008), cromatografia em camada delgada (Bernardo *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008), cromatografia gasosa (Casale & Klein, 1993) e cromatografia líquida (Schneider & Meys, 2011). Poucos trabalhos descreveram o uso da espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e da cromatografia iônica para análise de “drogas de rua”. No entanto, estas técnicas podem fornecer informações importantes sobre os constituintes inorgânicos encontrados nestas amostras.

## 4.2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi determinar alguns constituintes orgânicos e inorgânicos em amostras de “cocaína de rua” apreendidas em dois estados do Brasil: Minas Gerais e Amazonas

## 4.3 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.3.1 Reagentes e solventes

Os padrões de cafeína e femproporex (padrão interno) foram obtidos da Synth (Diadema, Brasil); benzocaína e lidocaína da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Um padrão de cocaína obtida da Cerilliat (Round Rock, TX, EUA) foi usado para padronizar uma amostra de cocaína purificada de acordo com procedimentos internos do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais. Esta amostra apresentou 97 % de pureza e foi empregada como padrão secundário para a calibração do GC-MS e quantificação do teor de cocaína nas “amostras de rua”. Metanol grau HPLC obtido da Burdick & Jackson® (Muskegon, MI, EUA) foi utilizado para

dissolução dos padrões e das amostras apreendidas. Ácido nítrico (65 % m/v) e soluções de referência na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, P, Zn,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

#### **4.3.2 Soluções**

Soluções estoque foram preparadas dissolvendo 10,0 mg de cocaína, cafeína, lidocaína e benzocaína em 10,00 mL de metanol e armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uma solução de trabalho intermediária foi preparada a partir da solução estoque na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Soluções de calibração contendo esses quatro compostos foram obtidas pela diluição da solução de trabalho obtendo-se concentrações finais na faixa de 10 a  $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ . A solução padrão de femproporex foi preparada independentemente, segundo o mesmo procedimento empregado para os demais padrões e foi utilizado como padrão interno na concentração de  $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  em cada solução analisada.

A mistura contendo ânions inorgânicos foi preparada diluindo-se padrões comerciais contendo  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cloreto, fluoreto, nitrito, nitrato, brometo e sulfato. Soluções de trabalho na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada ânion foram obtidas por diluição da solução estoque e preparadas diariamente. Para calibração do sistema foram preparadas, a partir de diluições sucessivas da solução de trabalho, soluções de calibração na faixa de 0,250 a  $20,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas estas soluções foram filtradas em uma membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  antes da análise.

Para calibração do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, foram preparadas, a partir de diluições sucessivas da solução de referência, soluções de calibração na faixa de 0 a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para Ca, Mg e Na; de 0 a  $130 \mu\text{g mL}^{-1}$  para K e P; de 0 a  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  para Al, Fe e Mn e de 0 a  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para Co, Cu, Cr, Mo, Ni, Pb e Zn. Todas as soluções foram diluídas com  $\text{HNO}_3$  1% v v<sup>-1</sup>.

#### **4.3.3 Amostras**

Trinta e uma amostras de “cocaína de rua” foram analisadas, sendo 21 apreendidas no estado de Minas Gerais e 10 amostras apreendidas no estado do Amazonas. Essas amostras

apresentavam aspecto sólido branco ou amarelado. A massa dessas amostras variou de 0,25 a 5244,00 g. Uma massa de aproximadamente 1,5 g de cada amostra foi estocada para análise.

#### *Preparo de amostras*

Para a determinação dos constituintes orgânicos, a massa de 10,0 mg de cada amostra foi medida e solubilizada em 10,00 mL de metanol. A mistura foi sonicada por 5 minutos e os compostos insolúveis foram removidos por centrifugação, quando necessário. Desta solução foram pipetados 10,0 µL em um balão de 10,00 mL de capacidade contendo 0,75 µg mL<sup>-1</sup> de padrão interno, sendo o volume completado com metanol. Da solução resultante 1,00 µL foi injetado no sistema cromatográfico.

Para a determinação dos constituintes inorgânicos, 100,0 mg de cada amostra foram solubilizados em 10,00 mL de água. Após 5,00 min de sonicação, 5,0 mL foram retirados e encaminhados para a análise por cromatografia iônica, que foi realizada no laboratório de cromatografia do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN). Os 5,0 mL restantes foram acidificados com 1,0 mL de ácido nítrico concentrado e diluídos para 10,00 mL com água Milli Q e encaminhados para a análise por ICP-OES no Laboratório de Ensaio de Combustíveis (LEC).

### **4.3.4 Instrumentação**

#### *GC-MS*

A determinação dos compostos orgânicos foi realizada em um cromatógrafo a gás da Thermo Electron Corporation (San Jose, CA), modelo Focus equipado com um injetor automático Triplus e um espectrômetro de massas modelo DSQ II. O software Xcalibur 2.07 foi usado para controlar o sistema cromatográfico, aquisição e tratamento de dados.

O volume de injeção de 1 µL no modo *splitless* foi usado. A separação simultânea da cafeína, lidocaína, cocaína e benzocaína foi realizada em uma coluna OV-5 MS (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). O gás de arraste foi o hélio a um fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A programação de temperatura do forno foi a seguinte: 100°C por 2 min seguido de aquecimento a uma taxa de 30 °C min<sup>-1</sup> até 230°C (5 min), e finalmente aquecimento a 70 °C min<sup>-1</sup> até 300°C com isoterma de 2 min. A temperatura do injetor



e interface do GC/MS foram ambas, 240 °C. O efluente da coluna foi direcionado para a fonte de íons onde as moléculas foram ionizadas por impacto de elétrons (energia 70 eV). Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo 50 a 500 u.m.a., sendo os íons de razão massa/carga (m/z) 182, 86, 194, 120 e 97 estabelecidos para aquisição de cocaína, lidocaína, cafeína, benzocaína e femproporex (padrão interno), respectivamente.

### ICP-OES

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente e configuração axial (ICP-OES, Optima 3000 DV, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) foi utilizado para determinação de Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mg, Mo, Na, P, Pb e Zn. O sistema de introdução da amostra foi composto de uma câmara Sturman-Masters spray e nebulizador V-groove. As condições operacionais estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Condições operacionais do ICP-OES empregadas para a determinação de alguns constituintes inorgânicos em amostras de “cocaína de rua”.

Condições Operacionais	
Frequência (MHz)	40
Potência (Kim, Shin et al.)	1,2
Fluxo do gás (plasma) (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Fluxo do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5
Fluxo do gás nebulizador (mL min <sup>-1</sup> )	0,7
Tempo de integração (s)	1,0
Tempo do estabilizador (s)	15
Replicatas	3
Comprimentos de onda	Al (I) 396,153; Ca (II) 422,673; Co (I) 228,616; Cr (I) 283,563; Cu (I) 327,393; Fe (II) 259,939; K (I) 766,940; Mn (II) 257,610; Mg (II) 279,077; Mo (II) 202,031; Na (I) 589,592; P (I) 21,617; Pb (II) 220,353 Zn (II) 213,857

### Cromatografia de troca iônica

Essa análise foi realizada com um sistema Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com uma bomba Shimadzu LC10A, uma válvula de injeção Rheodyne 7125 e um detector de condutividade LC10A Shimadzu. As separações foram realizadas usando uma coluna (100 mm × 4,6 mm id) empacotada com uma resina de troca aniônica em um suporte polimetacrilato com tamanho de partícula de 10 µm incorporando uma base de amônio quaternário como grupo funcional. Uma solução de ftalato de potássio na concentração de 250 mmol L<sup>-1</sup>, a pH 3,8, foi passada no sistema a um fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> durante 2 horas antes de iniciar as separações de troca aniônica. As condições utilizadas para análise foram: solução tampão 2,5 mmol L<sup>-1</sup> ácido ftálico/2,4 mmol L<sup>-1</sup> TRIS, pH 4,2 como fase móvel; vazão de fluxo da fase móvel de 1,3 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do forno de 40 °C; volume de injeção de 50 µL e as condições de detecção: ganho de 0,1 µScm<sup>-1</sup>, atenuação de 4, polaridade: positivo. O pH das soluções resultantes foi medido com um pHmetro recém-calibrado modelo 744 Metrohm. Todas as soluções foram filtradas em uma membrana de 0,45 µm antes da análise.

#### **4.3.5 Validação do método de quantificação de compostos orgânicos por CG-MS**

Antes da quantificação avaliaram-se alguns parâmetros, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados.

##### *Seletividade*

Para avaliar se os analitos poderiam ser determinados simultaneamente, sem interferências entre eles e o solvente, soluções padrão na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup> de benzocaína, cafeína, lidocaína, cocaína e femproporex (0,75 µg/mL) foram injetadas no sistema cromatográfico. Neste aspecto, considerou-se o método como seletivo se não houvesse a presença de picos no mesmo tempo de retenção dos compostos estudados.

##### *Linearidade*

O estudo de linearidade foi realizado para cocaína, cafeína, benzocaína e lidocaína com soluções nas concentrações de 0,00; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 µg mL<sup>-1</sup> (curva por ajuste de matriz). Essas concentrações foram escolhidas por corresponder à faixa de 1 a 100% (m/m) de cada composto nas amostras analisadas. Femproporex foi usado como padrão interno na concentração

de  $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  em todos os níveis de concentração. A linearidade foi estimada através do coeficiente de correlação linear (R), obtido do método dos mínimos quadrados.

#### *Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)*

O limite de detecção foi calculado a partir de 10 replicadas do branco analítico. A média das concentrações obtidas nas análises do branco mais 3 vezes o desvio-padrão das medidas foi dado como LD. A média das concentrações dos brancos analíticos mais 10 vezes o desvio padrão das análises do branco foi dado como LQ.

#### *Efeito de matriz*

Para avaliar o efeito da matriz na quantificação dos analitos de interesse foram realizadas três diferentes curvas analíticas sendo todas elas obtidas por diluição da solução de trabalho ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A primeira curva foi feita em solvente (metanol) em 8 níveis de concentração na faixa de  $0,010$  a  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Uma segunda curva analítica foi construída por ajuste de matriz usando um *pool* de amostras apreendidas no período de julho de 2008 a maio de 2009. Para isto,  $10 \mu\text{L}$  de cada solução estoque das amostras apreendidas foram introduzidas em um balão e o volume foi aferido para  $10,00 \text{ mL}$ . Uma alíquota de  $500 \mu\text{L}$  desta solução foi adicionada em balões de  $10 \text{ mL}$  de capacidade. A esses balões foram acrescidos  $0,00$ ;  $0,10$ ;  $0,25$ ;  $0,50$  e  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada composto orgânico na concentração final. A terceira curva analítica foi feita pelo método das adições de padrão usando uma das amostras apreendidas que continha cocaína e os 3 adulterantes estudados. Uma alíquota de  $10,00 \mu\text{L}$  da solução estoque desta amostra foi adicionada em balões de  $10,00 \text{ mL}$  de capacidade. A esses balões foram adicionados  $0,00$ ;  $0,10$ ,  $0,50$  e  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada composto estudado na concentração final.

O efeito de matriz foi avaliado pela comparação estatística entre as inclinações das três curvas analíticas.

#### **4.3.6 Quantificação de ânions por cromatografia iônica**

Soluções de seis ânions (cloreto, fluoreto, nitrito, nitrato, brometo e sulfato) foram usados na construção das curvas analíticas. Soluções padrão dos ânions individuais foram diluídas para obter soluções de cada ânion com concentrações variando de  $0,25$  a  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Curvas

analíticas foram construídas pelas áreas de cada ânion usando o método dos mínimos quadrados. Para essa análise foram determinados a linearidade e os limites de detecção e quantificação, como descrito no item 4.3.5. Outros parâmetros de desempenho não foram avaliados, pois foi utilizado um método já desenvolvido e validado pelo Laboratório de Cromatografia do CDTN.

#### **4.3.7. Quantificação de constituintes inorgânicos por ICP-OES**

Para a determinação dos constituintes inorgânicos por ICP-OES avaliou-se a linearidade nas faixas de concentração descritas no item 4.3.2, para curvas de calibração preparadas em HNO<sub>3</sub> 1% v/v. Os limites de detecção e de quantificação também foram determinados a partir da medida de 10 brancos analíticos independentes, de acordo com o descrito no item 4.3.5. Outros parâmetros de desempenho não foram avaliados, pois foi utilizado um método já desenvolvido e validado para determinação de constituintes inorgânicos em meio ácido.

#### **4.3.7 Análise estatística**

Os dados foram analisados usando o Statistica versão 8.0 para correlação linear (correlação de Pearson) entre todos os analitos determinados. Análise multivariada obtida por Análise Hierárquica de Cluster também foi realizada e geraram dendogramas. Os dados foram previamente centrados na média e auto-escalados pela variância, para assegurar que as variáveis contribuíssem igualmente para o modelo, independente da escala que foram medidas.

### **4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.4.1. Análises por GC-MS**

##### *4.4.1.1. Otimização das condições cromatográficas do GC-MS.*

O método desenvolvido para análise por GC-MS permitiu a identificação dos principais adulterantes encontrados em amostras de “cocaína de rua”. A dissolução das amostras foi baseada na faixa de concentrações esperadas para estes analitos nas amostras e na sensibilidade da cromatografia gasosa. O programa de aquecimento e o fluxo do gás de arraste foi otimizado por meio de uma solução contendo 1,0 µg mL<sup>-1</sup> dos analitos e 0,75 µg mL<sup>-1</sup> do padrão interno. Sob as

melhores condições o tempo total da análise foi de 14,4 minutos. A Figura 4.1 mostra o cromatograma de íons totais. Todos os compostos mostraram-se separados e bem resolvidos à linha de base. O pico da cafeína não se mostrou bem resolvido no cromatograma de íons totais. No entanto, isto não interferiu na quantificação, uma vez que o íon extraído do cromatograma de íons totais foi empregado. A presença de outros picos podem ser contaminações do solvente ou impurezas presentes no injetor ou na coluna. Vale ressaltar que o branco analítico apresentava os mesmos picos.

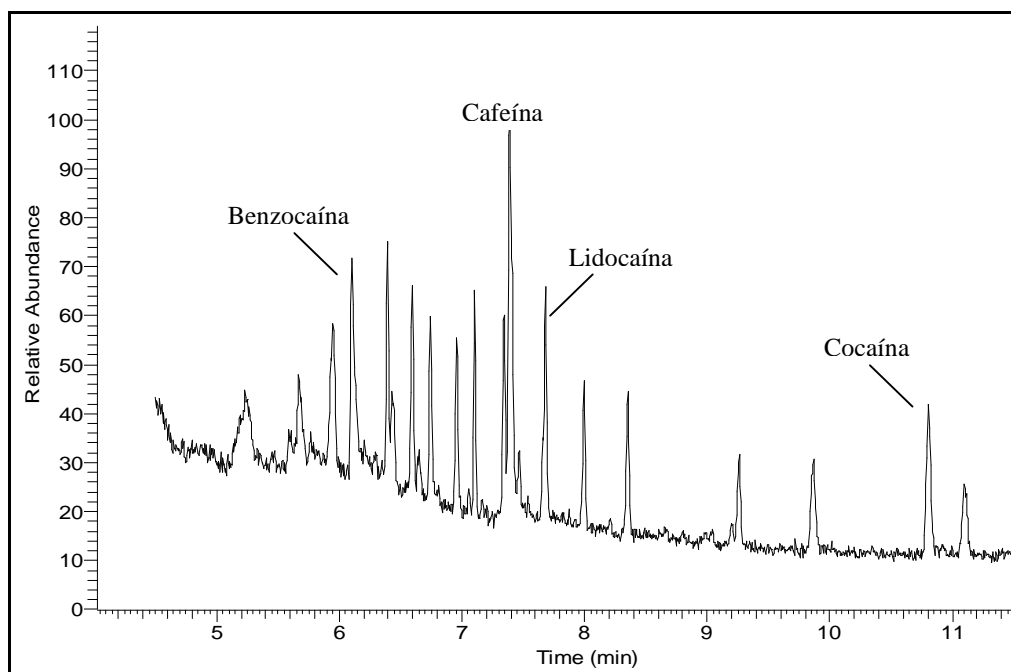


Figura 4.1: Cromatograma de íons totais obtido da análise do extrato de uma mistura de padrões de cocaína e os principais adulterantes na concentração de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  no sistema GC-MS (modo *full scan*).

Como todos os analitos estudados apresentaram espectros de massas muito diferentes entre si foi possível à detecção e quantificação de cada um deles através do íon extraído do cromatograma de íons totais (Figura 4.2). Observa-se que todos os picos ficaram bem resolvidos em relação à linha de base.

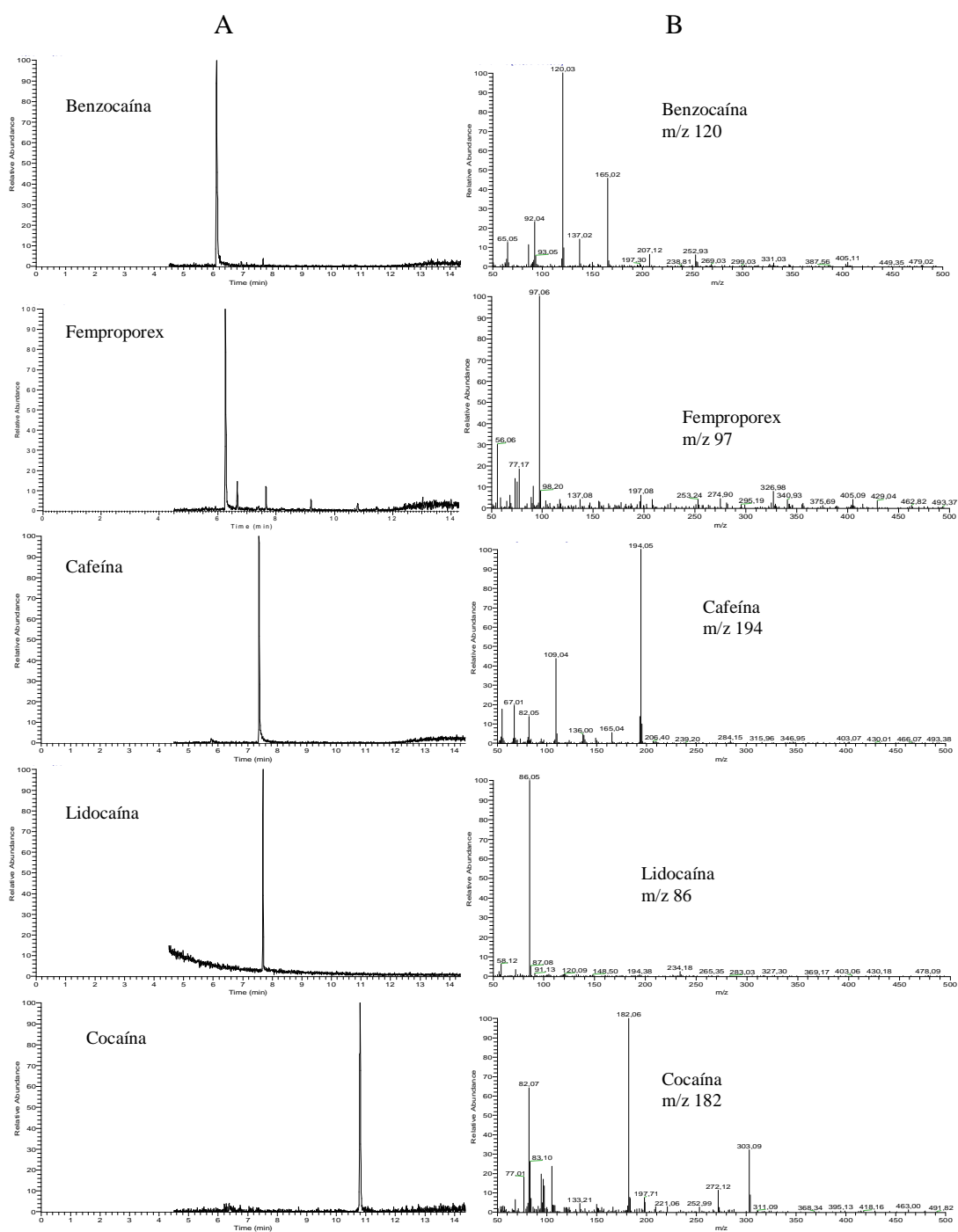


Figura 4.2: (A) Cromatogramas de íons extraídos do cromatograma de íons totais referentes à benzocaína, cafeína, lidocaína, cocaína e femproporex (padrão interno). (B) Espectros de massas característicos do pico de cada composto.

*4.4.1.2. Avaliação de alguns parâmetros de mérito do método de quantificação de compostos orgânicos por CG-MS*

*Seletividade*

Os tempos de retenção obtidos para os compostos estudados foram 6,10; 6,27; 7,41; 7,68 e 10,81 minutos, respectivamente para benzocaína, femproporex, cafeína, lidocaína e cocaína. Pelos tempos de retenção descritos e também pelos cromatogramas das Figuras 4.1 e 4.2, pode-se dizer que em relação ao solvente e aos analitos, o método mostra-se seletivo, sendo todos os analitos separados adequadamente.

*Linearidade*

A linearidade foi avaliada na faixa de 0,10 a 1,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , uma vez que é a faixa que se pretende trabalhar. Optou-se por avaliar a linearidade na curva por ajuste de matriz, uma vez que nessa condição se obteve as maiores inclinações. Para isso quantidades pré-estabelecidas dos padrões dos analitos e do padrão interno foram adicionadas às amostras selecionadas para ajuste de matriz. A partir da injeção dessas soluções obtiveram-se as áreas dos picos gerados, descontou-se o valor do branco (analito presente na amostra) e construíram-se as curvas por ajuste de matriz. As curvas para cada composto foram construídas pela razão entre área do sinal analítico e área do padrão interno em função da concentração (Figura 4.3).

Observa-se que as curvas por ajuste de matriz da cocaína e principais adulterantes apresentaram linearidades satisfatórias na faixa de trabalho escolhida, com coeficiente de correlação linear (R) superior a 0,9900 (Tabela 4.2).

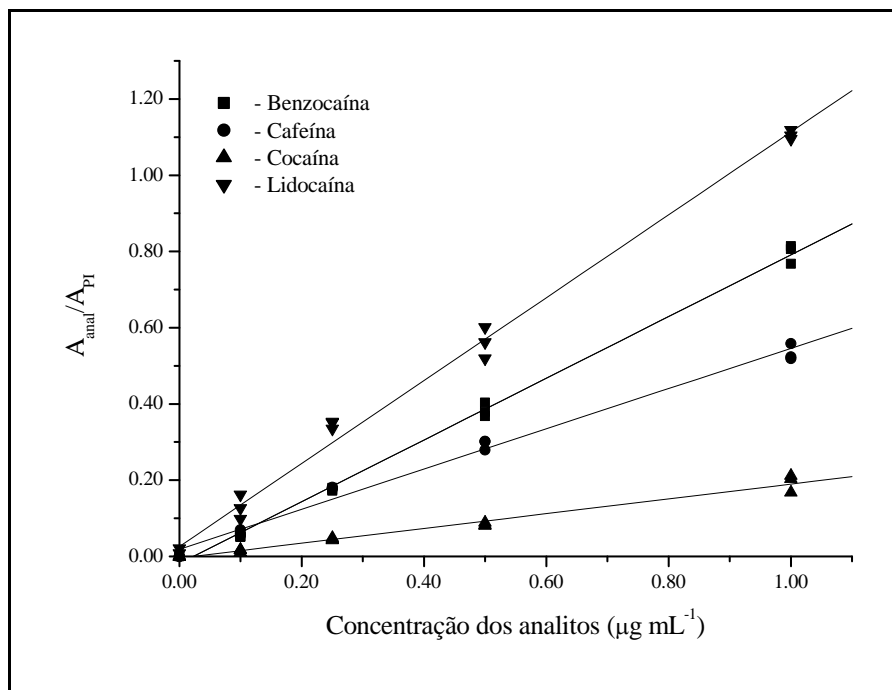


Figura 4.3. Curvas por ajuste de matriz para cocaína e principais adulterantes (benzocaína, cafeína e lidocaína) na faixa linear de 0,0 – 1,00 µg mL<sup>-1</sup>.

Tabela 4.2: Parâmetros das curvas por ajuste de matriz da cocaína e principais adulterantes (benzocaína, cafeína e lidocaína) na faixa linear de 0,0 – 1,0 µg mL<sup>-1</sup>.

	Faixa linear (µg mL <sup>-1</sup> )	Equação	R
Cocaína	0 -1,00	Y = 0,1939X -0,0041	0,9900
Benzocaína	0 -1,00	Y = 0,8092X - 0,0182	0,9986
Cafeína	0 -1,00	Y = 0,5272X + 0,0185	0,9943
Lidocaína	0 -1,00	Y = 1,0871 X + 0,0234	0,9963

#### Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método proposto para cocaína, benzocaína, lidocaína e cafeína em amostras de drogas apreendidas são apresentados na Tabela 4.3. Para o cálculo de LD e LQ utilizou-se a curva por ajuste de matriz do ensaio de linearidade.



Tabela 4.3. Limites de detecção e quantificação de cocaína, benzocaína, cafeína e lidocaína para o método proposto.

Analito	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Cocaína	0,0279	0,0930
Benzocaína	0,0111	0,0370
Cafeína	0,0317	0,1056
Lidocaína	0,0334	0,1114

#### Efeito de matriz

O uso de amostras típicas de uma matriz na construção de curvas analíticas é fundamental para eliminar a possibilidade de efeitos de matriz que diferem em magnitude de uma amostra para outra (Souza, 2007). As amostras de cocaína apreendidas podem apresentar uma grande variabilidade na composição. A utilização de soluções padrão simples (preparadas no solvente) para o preparo da curva analítica, sem a realização prévia dos testes de efeitos de matriz, significa assumir que os efeitos de matriz não existem (Souza, 2007). Para evitar este problema, o efeito de matriz foi avaliado por meio da comparação das inclinações obtidas para curvas analíticas construídas em diferentes condições: curvas preparadas a partir dos padrões dos analitos em solvente (curva analítica), por ajuste de matriz usando um *pool* de várias amostras analisadas neste trabalho (isso foi feito pois não havia amostra branca disponível para o preparo da curva por ajuste de matriz) e uma curva de adição de padrão, para uma amostra aleatória.

De acordo com certas diretrizes, as curvas analíticas e por ajuste de matriz devem ser construídas com níveis de concentração idênticos (INMETRO, 2007) ou abrangendo a mesma faixa de concentração (Thompson *et al.*, 2002). Neste trabalho, a construção da curva analítica por ajuste de matriz foi construída em uma faixa inferior (0 a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) à curva analítica com soluções padrão simples, uma vez que esta abrange a faixa de 0 – 100 % das concentrações esperadas para os analitos estudados nas amostras reais. Não foi possível construir na mesma faixa, visto que o *pool* das amostras continha concentrações desconhecidas dos analitos. A curva de adição também foi construída na faixa de 0 a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os experimentos envolvendo a avaliação do efeito de matriz são importantes, uma vez que não somente os concomitantes

provenientes da matriz são avaliados, mas também todos aqueles provenientes de materiais, reagentes e soluções utilizados no preparo das amostras.

A Figura 4.4 mostra a comparação entre as curvas analítica, por ajuste de matriz e por adição do analito. Para facilitar a comparação, as inclinações e respectivos desvios padrões para cada curva são apresentados na Tabela 4.4.

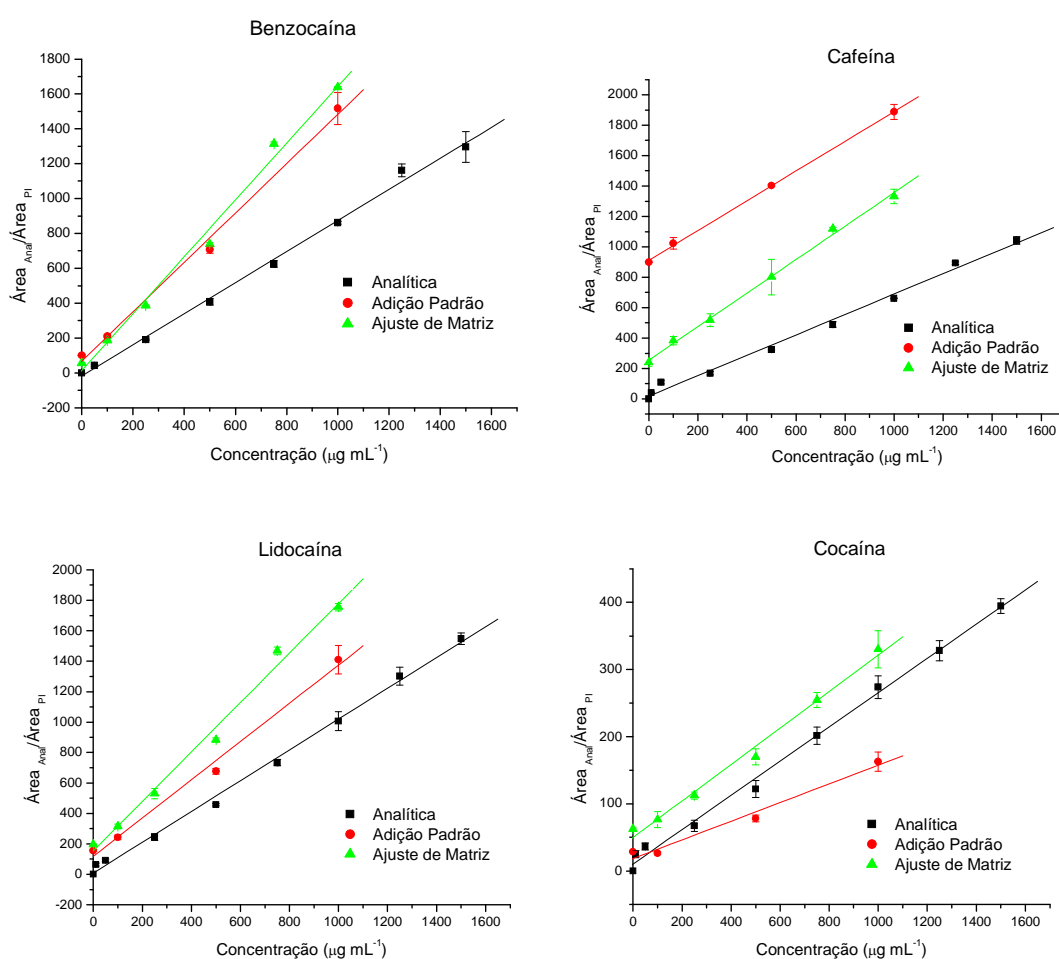


Figura 4.4. Curvas analíticas obtidas pela análise de soluções padrão simples, por ajuste de matriz e por adição do analito na matriz para benzocaina, cafeína, lidocaína e cocaína.

As inclinações obtidas para as 3 curvas mostraram-se diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança (pelo teste F e t de student), com exceção das inclinações obtidas para cocaína nas curvas analítica e por ajuste de matriz. Pode-se observar que na maioria dos casos as curvas por ajuste de matriz e adição de padrão apresentaram inclinações maiores e mais próximas, indicando que parte do efeito de matriz foi corrigido pelo método do ajuste de matriz. Ainda assim, os resultados mostram que o uso da calibração por ajuste de matriz não é suficiente para conseguir resultados confiáveis, pelo menos para a amostra analisada por adição de padrão. Isso se deve à complexidade das amostras de “cocaína de rua” que apresentam uma composição variada e desconhecida. Desta forma, optou-se por analisar as demais amostras empregando-se o método de adição de padrão.

Tabela 4.4. Inclinações ( $\pm$  desvio padrão) para as diferentes curvas analíticas obtidas no estudo do efeito de matriz.

Analito	Analítica	Ajuste de Matriz	Adição de Padrão
Benzocaína	0,8915 $\pm$ 0,0230	1,6304 $\pm$ 0,0760	1,4161 $\pm$ 0,0740
Cafeína	0,6720 $\pm$ 0,0218	1,1028 $\pm$ 0,0300	0,9789 $\pm$ 0,0174
Lidocaína	1,0115 $\pm$ 0,0229	1,6238 $\pm$ 0,0800	1,2554 $\pm$ 0,0777
Cocaína	0,2550 $\pm$ 0,0067	0,2716 $\pm$ 0,0130	0,1391 $\pm$ 0,0147

#### 4.4.1.3. Quantificação de cocaína e adulterantes nas amostras de “cocaína de rua”.

Com o método apresentado anteriormente, foram 21 amostras de cocaína de rua apreendidas no estado de Minas Gerais e 10 amostras apreendidas no estado do Amazonas. A Tabela 4.5 mostra os resultados obtidos para cocaína, benzocaína, cafeína e lidocaína. As amostras apreendidas no Estado do Amazonas não apresentaram qualquer um dos adulterantes estudados, embora a concentração de cocaína tenha variado na faixa 153,3 - 978,2 mg g<sup>-1</sup>. Nas amostras apreendidas no Estado de Minas Gerais, a cafeína foi o adulterante mais comum, encontrado em 76% das amostras na faixa de concentração de 5,5 - 645,3 mg g<sup>-1</sup>. Lidocaína foi encontrada em 66,7% das amostras apreendidas em Minas Gerais na faixa de 16,3 - 576,7 mg g<sup>-1</sup>. De acordo com alguns autores a lidocaína, a despeito de sua alta toxicidade, parece ser o

adulterante mais importante em amostras de cocaína no Brasil e em alguns outros países (Fucci & De Giovanni, 1998; SILVA *et al.*, 2008). Em amostras analisadas no Estado de São Paulo em 1997, a lidocaína foi o adulterante mais comum seguido de procaína e cafeína (SILVA *et al.*, 2008). Benzocaína foi encontrado em apenas uma amostra de Minas Gerais que apresentou 84,8 mg g<sup>-1</sup>. Este princípio ativo também mostra uma menor utilização como adulterante em amostras de “cocaína de rua”.

A pureza da cocaína nas amostras apreendidas em Minas Gerais variou de 6,4 a 75,3%. Geralmente, a pureza da “cocaína de rua” varia de uma região para outra. As amostras apreendidas no estado do Amazonas (AM) apresentaram níveis mais altos de pureza do que as amostras apreendidas no estado de Minas Gerais (MG). Estes resultados podem estar relacionados à facilidade na obtenção de adulterantes e maior número de laboratórios clandestinos no Estado de Minas Gerais. Por estes resultados pode-se inferir que a cocaína comercializada no estado de Minas Gerais é mais manipulada do que aquela comercializada no estado do Amazonas, o que resulta na menor pureza e maior adição de adulterantes e/ou diluentes. O estado do Amazonas está localizado mais próximo à Colômbia, um dos três principais países produtores de cocaína. Por esta razão, a cocaína chega ao estado do Amazonas, com pouca ou nenhuma alteração. Os resultados aqui descritos estão de acordo com os resultados apresentados por Silva e colaboradores, que relataram uma faixa entre 32,0 e 85,5% de pureza em amostras de “cocaína de rua” apreendidas no Brasil (Silva *et al.*, 2008). Situações semelhantes foram observadas em outros países. Em 2005, as análises de amostras apreendidas na França e Itália variaram entre 20 e 30% (Dujourdy & Besacier, 2008) e 80-90% (Fucci, 2007) de pureza, respectivamente.

Tabela 4.5. Concentrações de cocaína, benzocaína, cafeína e lidocaína nas amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas e Gerais (MG) e do Amazonas (AM).

Amostras	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )			
	Cocaína	Benzocaína	Cafeína	Lidocaína
1-MG	129 ± 10	< LD*	198 ± 14	90,9 ± 8,7
2-MG	187 ± 11	< LD	414 ± 4	16,3 ± 2,6
3-MG	740 ± 48	< LD	< LD	< LD
4-MG	146 ± 9	84,8 ± 5,3	645 ± 37	59,1 ± 2,8
5-MG	109 ± 6	< LD	38,7 ± 3,5	123 ± 5
6-MG	143 ± 11	< LD	142 ± 8	113 ± 2
7-MG	159 ± 8	< LD	296 ± 10	355 ± 14
8-MG	137 ± 8	< LD	385 ± 8	175 ± 4
9-MG	98,7 ± 5,3	< LD	42,5 ± 3,2	577 ± 18
10-MG	139 ± 8	< LD	403 ± 1	300 ± 9
11-MG	268 ± 3	< LD	25,0 ± 1,8	< LD
12-MG	131 ± 6	< LD	287 ± 7	89,4 ± 3,9
13-MG	735 ± 29	< LD	< LD	< LD
14-MG	641 ± 20	< LD	< LD	< LD
15-MG	753 ± 24	< LD	< LD	< LD
16-MG	126 ± 5	< LD	< LD	< LD
17-MG	144 ± 5	< LD	274 ± 10	134 ± 7
18-MG	138 ± 4	< LD	400 ± 13	181 ± 6
19-MG	477 ± 12	< LD	5,50 ± 1,40	< LD
20-MG	86,9 ± 3,7	< LD	289 ± 8	279 ± 6
21-MG	63,9 ± 2,3	< LD	297 ± 7	355 ± 10
1-AM	693 ± 17	<LD	<LD	<LD
2-AM	256 ± 8	<LD	<LD	<LD
3-AM	978 ± 25	<LD	<LD	<LD
4-AM	154 ± 6	<LD	<LD	<LD
5-AM	157 ± 5	<LD	<LD	<LD
6-AM	305 ± 11	<LD	<LD	<LD
7-AM	604 ± 18	<LD	<LD	<LD
8-AM	259 ± 9	<LD	<LD	<LD
9-AM	340 ± 7	<LD	<LD	<LD
10-AM	313 ± 10	<LD	< LD	< LD

\* Abaixo do limite de detecção.

#### 4.4.2 Determinação dos constituintes inorgânicos por ICP-OES e IC

A determinação dos constituintes inorgânicos por ICP-OES foi realizada a partir de um método desenvolvido para soluções ácidas. São apresentados a seguir os parâmetros das curvas analíticas (Tabela 4.6) e os limites de detecção e quantificação (Tabela 4.7) para os analitos determinados por essa técnica.

Tabela 4.6 – Parâmetros da curva analítica para os constituintes inorgânicos determinados por ICP-OES

Analito	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da Reta	R
Al	0,0 - 5,0	$y = 56509 x - 711$	0,9999
Ca	0,0 - 50,0	$y = 691425 x + 238079$	0,9993
Co	0,0 - 2,0	$y = 11933 x - 20$	0,9998
Cr	0,0 - 2,0	$y = 26422 x - 714$	0,9984
Cu	0,0 - 2,0	$y = 55934 x - 455$	0,9991
Fe	0,0 - 5,0	$y = 39739 x + 267$	1,0000
K	0,0 - 50,0	$y = 129751 x - 137598$	0,9968
Mg	0,0 - 50,0	$y = 4042 x - 1256$	0,9987
Mn	0,0-2,0	$y = 191604 x - 422$	0,9995
Mo	0,0 - 2,0	$y = 4897 x - 13$	0,9995
Na	0,0 - 50,0	$y = 917355 x - 11267$	0,9982
Pb	0,0 - 2,0	$y = 1875 x - 41$	0,9986
P	0,0 - 100,0	$y = 35,8 x + 25$	0,9937
Zn	0,0 - 2,0	$y = 33780 x + 233$	0,9996

Os parâmetros das curvas analíticas e os limites de detecção e quantificação foram adequados para a determinação dos constituintes inorgânicos nas amostras de “cocaína de rua”, pois todos os coeficientes de correlação foram maiores que 0,9937 e os limites de quantificação foram baixos, com exceção do fósforo que foi um pouco mais elevado.

Tabela 4.7 – Limites de detecção e quantificação obtidos para a análise de constituintes inorgânicos por ICP-OES.

Analito	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LD ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
Al	8,8	1,76	29,3	5,86
Ca	21,6	4,33	72,1	14,4
Co	5,03	1,01	16,8	3,35
Cr	7,04	1,41	23,5	4,69
Cu	2,95	0,590	9,83	1,97
Fe	5,6	1,13	18,8	3,76
K	22,1	4,42	73,7	14,7
Mg	20,8	4,16	69,3	13,9
Mn	0,579	0,116	1,93	0,386
Mo	13,5	2,70	44,9	8,99
Na	2,31	0,462	7,70	1,54
Pb	19,2	3,84	64,0	12,8
P	486	97,2	1620	324
Zn	2,10	0,420	7,00	1,40

Os resultados obtidos para os 14 constituintes inorgânicos determinados por ICP-OES estão apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9.. Grandes variações foram observadas nas concentrações de cátions, principalmente para Ca, Mg, Na, P, Al, Fe, Mn, e Zn. Algumas amostras apreendidas em Minas Gerais, apresentaram concentrações altas de Ca, Mg, Na e P. Das amostras apreendidas no Amazonas, apenas 2 apresentaram um teor um pouco maior de cálcio e uma amostra apresentou concentração de Mg maior que as demais.

Tabela 4.8. Concentrações dos principais constituintes em amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM), Brasil.

Amostras	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )				
	Ca	K	Mg	Na	P
1-MG	0,364 ± 0,006	2,35 ± 0,02	0,165 ± 0,006	0,459 ± 0,006	< LD*
2-MG	0,040 ± 0,005	2,30 ± 0,01	0,119 ± 0,003	0,069 ± 0,001	< LD
3-MG	0,305 ± 0,003	2,19 ± 0,01	0,114 ± 0,003	0,113 ± 0,002	< LD
4-MG	0,290 ± 0,005	2,40 ± 0,01	0,154 ± 0,002	0,092 ± 0,001	< LD
5-MG	38,1 ± 0,4	2,30 ± 0,02	24,1 ± 0,5	0,789 ± 0,017	22,7 ± 0,2
6-MG	1,85 ± 0,03	2,56 ± 0,01	107 ± 1	38,4 ± 0,2	20,3 ± 0,1
7-MG	35,4 ± 1,2	2,49 ± 0,02	0,987 ± 0,005	33,6 ± 0,7	47,1 ± 0,6
8-MG	6,31 ± 0,04	2,81 ± 0,02	5,33 ± 0,08	17,8 ± 0,3	9,90 ± 0,11
9-MG	0,998 ± 0,007	2,33 ± 0,01	0,151 ± 0,003	0,454 ± 0,003	0,134 ± 0,032
10-MG	15,1 ± 0,7	2,59 ± 0,02	0,262 ± 0,005	15,1 ± 0,4	18,8 ± 0,4
11-MG	0,192 ± 0,003	2,33 ± 0,01	0,128 ± 0,004	0,188 ± 0,002	< LD
12-MG	1,05 ± 0,03	2,46 ± 0,01	0,137 ± 0,003	22,4 ± 0,07	0,296 ± 0,031
13-MG	0,259 ± 0,005	2,32 ± 0,01	0,110 ± 0,003	0,033 ± 0,001	< LD
14-MG	0,401 ± 0,006	2,38 ± 0,01	0,117 ± 0,001	0,129 ± 0,001	< LD
15-MG	0,235 ± 0,004	2,10 ± 0,01	0,249 ± 0,036	0,113 ± 0,006	< LD
16-MG	1,01 ± 0,01	2,26 ± 0,01	0,136 ± 0,003	0,069 ± 0,001	< LD
17-MG	26,7 ± 0,9	2,22 ± 0,01	0,866 ± 0,005	0,379 ± 0,009	2,94 ± 0,04
18-MG	0,869 ± 0,014	2,39 ± 0,02	0,469 ± 0,002	2,94 ± 0,06	0,153 ± 0,049
19-MG	0,892 ± 0,005	2,43 ± 0,01	0,159 ± 0,003	0,403 ± 0,001	< LD
20-MG	0,075 ± 0,004	2,48 ± 0,01	0,120 ± 0,002	0,075 ± 0,002	< LD
21-MG	0,901 ± 0,022	2,46 ± 0,01	0,134 ± 0,003	5,23 ± 0,03	30,1 ± 0,4
1-AM	0,325 ± 0,006	2,65 ± 0,01	0,115 ± 0,002	0,333 ± 0,004	< LD
2-AM	0,541 ± 0,008	2,14 ± 0,01	0,124 ± 0,003	0,444 ± 0,006	< LD
3-AM	0,017 ± 0,003	2,61 ± 0,02	0,115 ± 0,003	0,025 ± 0,002	< LD
4-AM	0,397 ± 0,005	2,26 ± 0,01	0,110 ± 0,002	0,042 ± 0,001	< LD
5-AM	0,543 ± 0,008	2,42 ± 0,01	0,115 ± 0,004	0,034 ± 0,001	< LD
6-AM	10,9 ± 0,7	1,92 ± 0,01	5,44 ± 0,03	0,042 ± 0,001	0,124 ± 0,043
7-AM	4,51 ± 0,03	2,13 ± 0,01	0,104 ± 0,003	0,032 ± 0,001	< LD
8-AM	1,24 ± 0,001	2,34 ± 0,01	0,168 ± 0,004	1,09 ± 0,02	< LD
9-AM	0,238 ± 0,004	2,15 ± 0,01	0,102 ± 0,001	0,040 ± 0,002	< LD
10-AM	0,483 ± 0,007	2,22 ± 0,01	0,111 ± 0,003	0,042 ± 0,001	< LD

\* Abaixo do limite de detecção.



Tabela 4.9. Concentração dos principais constituintes inorgânicos em amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM).

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )								
	Al	Cr	Pb	Mo	Fe	Mn	Co	Cu	Zn
1-MG	101 ± 1	8,02 ± 0,31	< LD	6,21 ± 0,37	32,1 ± 0,5	2,67 ± 0,07	6,87 ± 0,45	11,8 ± 0,2	9,16 ± 0,31
2-MG	98,9 ± 1,8	8,33 ± 0,56	< LD	6,07 ± 0,22	14,8 ± 0,3	2,27 ± 0,06	6,44 ± 0,60	11,4 ± 0,2	6,82 ± 0,52
3-MG	90,3 ± 0,8	6,86 ± 0,20	14,6 ± 0,1	17,3 ± 0,7	17,7 ± 0,5	2,17 ± 0,08	< LD	6,86 ± 0,17	2,89 ± 0,18
4-MG	93,4 ± 0,9	8,20 ± 0,43	4,85 ± 0,50	11,8 ± 0,8	12,9 ± 0,3	1,56 ± 0,05	< LD	6,25 ± 0,31	3,13 ± 0,36
5-MG	93,2 ± 0,9	< LD*	< LD	7,42 ± 0,30	23,0 ± 0,2	109 ± 2	6,08 ± 0,21	12,8 ± 0,3	8,68 ± 0,59
6-MG	90,5 ± 1,7	< LD	11,4 ± 1,0	9,33 ± 0,39	316 ± 4	464 ± 5	2,92 ± 0,14	7,02 ± 0,30	53,0 ± 0,3
7-MG	141 ± 2	5,84 ± 0,79	< LD	10,1 ± 1,1	65,8 ± 1,0	7,78 ± 0,04	< LD	7,00 ± 0,28	10,1 ± 0,2
8-MG	90,3 ± 1,4	< LD	7,18 ± 0,97	10,3 ± 0,6	19,1 ± 0,2	27,0 ± 0,2	< LD	7,16 ± 0,14	8,35 ± 0,25
9-MG	103 ± 2	7,18 ± 0,66	< LD	8,34 ± 0,97	18,9 ± 0,7	3,02 ± 0,08	6,81 ± 0,45	11,0 ± 0,3	6,05 ± 0,52
10-MG	93,8 ± 2,2	7,81 ± 0,82	6,92 ± 0,40	9,38 ± 0,68	35,9 ± 0,4	4,30 ± 0,11	< LD	6,64 ± 0,41	11,7 ± 0,2
11-MG	106 ± 2	8,05 ± 0,56	< LD	5,77 ± 0,65	41,8 ± 0,7	3,07 ± 0,04	9,96 ± 0,46	14,2 ± 0,4	3,45 ± 0,20
12-MG	119 ± 1	6,68 ± 0,60	14,0 ± 0,5	12,6 ± 0,8	33,4 ± 0,6	5,50 ± 0,06	< LD	6,68 ± 0,23	22,8 ± 0,8
13-MG	86,5 ± 0,9	6,59 ± 0,37	13,8 ± 1,3	15,0 ± 0,6	15,4 ± 0,1	1,83 ± 0,03	< LD	6,59 ± 0,19	8,8 ± 0,3
14-MG	100 ± 2	7,06 ± 0,67	18,9 ± 1,4	17,7 ± 1,3	25,1 ± 0,8	2,35 ± 0,09	< LD	7,45 ± 0,34	4,31 ± 0,29
15-MG	76,0 ± 1,3	6,42 ± 0,57	8,96 ± 0,34	11,2 ± 1,0	12,2 ± 0,4	3,72 ± 0,26	< LD	6,42 ± 0,28	855 ± 7
16-MG	124 ± 1	6,86 ± 0,58	18,6 ± 1,2	15,5 ± 1,1	43,7 ± 0,5	5,05 ± 0,09	< LD	6,14 ± 0,28	6,14 ± 0,27
17-MG	73,9 ± 1,1	4,01 ± 0,36	< LD	7,92 ± 0,17	29,4 ± 0,4	6,02 ± 0,09	2,64 ± 0,26	8,36 ± 0,14	11,7 ± 0,4
18-MG	85,2 ± 1,2	6,00 ± 0,36	< LD	9,76 ± 0,99	48,0 ± 0,4	2,63 ± 0,07	< LD	6,38 ± 0,15	8,63 ± 0,48
19-MG	126 ± 2	7,03 ± 0,69	10,7 ± 0,3	10,2 ± 0,9	41,8 ± 0,8	9,77 ± 0,06	< LD	7,81 ± 0,17	10,2 ± 0,2
20-MG	91,2 ± 0,8	7,47 ± 0,65	6,40 ± 1,04	8,64 ± 0,58	12,2 ± 0,3	9,82 ± 0,08	< LD	8,64 ± 0,19	6,68 ± 0,17
21-MG	90,9 ± 0,9	7,91 ± 0,34	12,9 ± 1,4	10,9 ± 0,4	21,7 ± 0,6	2,37 ± 0,06	< LD	6,72 ± 0,22	8,30 ± 0,29
1-AM	88,7 ± 1,7	7,39 ± 0,31	10,8 ± 1,8	12,0 ± 0,6	14,0 ± 0,6	1,56 ± 0,02	< LD	7,00 ± 0,30	8,17 ± 0,24
2-AM	94,9 ± 1,2	6,26 ± 0,76	14,5 ± 2,2	17,1 ± 0,9	38,6 ± 0,5	5,93 ± 0,07	< LD	5,93 ± 0,34	9,56 ± 0,43
3-AM	87,9 ± 1,9	7,52 ± 0,52	3,90 ± 0,62	11,5 ± 1,1	12,7 ± 0,4	1,58 ± 0,07	< LD	7,52 ± 0,26	21,8 ± 0,4
4-AM	84,2 ± 1,2	6,31 ± 0,61	12,7 ± 0,3	11,1 ± 0,6	14,8 ± 0,4	1,48 ± 0,03	< LD	8,91 ± 0,14	12,2 ± 0,2
5-AM	89,1 ± 1,2	7,16 ± 0,30	11,0 ± 0,7	11,5 ± 1,1	14,7 ± 0,3	1,59 ± 0,02	< LD	6,36 ± 0,42	5,96 ± 0,50
6-AM	304 ± 3	< LD	9,60 ± 1,94	13,7 ± 0,6	349 ± 3	12,7 ± 2,5	< LD	5,58 ± 0,58	38,1 ± 0,2
7-AM	74,1 ± 1,5	6,77 ± 0,43	6,77 ± 0,56	11,8 ± 1,2	10,5 ± 0,2	1,02 ± 0,05	< LD	6,09 ± 0,32	1,35 ± 0,33
8-AM	91,6 ± 0,6	8,19 ± 0,47	< LD	7,16 ± 0,49	16,0 ± 0,2	2,61 ± 0,13	6,70 ± 0,45	11,2 ± 0,2	4,84 ± 0,18
9-AM	80,8 ± 0,3	6,70 ± 0,33	8,92 ± 1,25	16,2 ± 1,7	12,0 ± 0,4	1,06 ± 0,05	< LD	6,35 ± 0,13	3,17 ± 0,21
10-AM	87,1 ± 1,4	6,62 ± 0,76	7,35 ± 0,70	14,7 ± 1,4	16,9 ± 0,3	1,47 ± 0,10	< LD	6,25 ± 0,41	3,31 ± 0,25

\* Abaixo do limite de detecção

Seis ânions foram determinados por cromatografia iônica no CDTN. Os parâmetros da curva analítica são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Parâmetros da curva analítica para os constituintes inorgânicos determinados por Cromatografia de Íons

Analito	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da Reta	R
Brometo	0,250 – 20,00	Y = 1218,59 X + 1,1173	0,99999
Cloreto	0,250 – 20,00	Y = 3856,70 X - 96,2364	0,99995
Fluoreto	0,250 – 20,00	Y = 4509,39 X - 453,842	0,99990
Nitrato	0,500 – 20,00	Y = 1736,17 X - 71,0857	0,99997
Nitrito	0,250 – 20,00	Y = 1788,20 X + 72,2571	0,99992
Sulfato	0,500 – 20,00	Y = 3110,35 X - 769,285	0,99986

Os resultados obtidos por cromatografia de íons são apresentados na Tabela 4.11. Brometo e nitrito não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas neste estudo.

As concentrações de cloreto e sulfato apresentaram grandes variações. Isto pode estar relacionado aos diluentes empregados em diferentes fontes de fabricação clandestina no Brasil ou aos processos de extração e purificação da cocaína, que usam produtos químicos diferentes. Espera-se que as impurezas e os resíduos dos produtos químicos contribuam com baixas concentrações de constituintes inorgânicos, o que é consistente com os resultados observados para a maioria das amostras de “cocaína de rua” avaliadas neste estudo. No entanto, os constituintes inorgânicos correspondem a faixa de 10 a 25% de algumas amostras (5-MG, 6-MG, 7-MG, 8-MG, 10-MG, 17-MG e 18-MG), o que provavelmente indica o uso de diluentes. De acordo com o trabalho de Carvalho e Midio (2003), em amostras apreendidas na cidade São Paulo em 1997, diluentes inorgânicos (ex. silicatos, sulfatos e carbonatos, etc.) foram mais comuns do que diluentes orgânicos (ex. açúcar, amido e borato).

Tabela 4.11 Concentrações de cloreto, fluoreto, nitrato e sulfato em amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM).

Amostras	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )			
	Cloreto	Fluoreto	Nitrato	Sulfato
1-MG	40,1 ± 2,7	< LD	0,055 ± 0,007	0,286 ± 0,048
2-MG	0,341 ± 0,038	<LD	0,049 ± 0,005	0,208 ± 0,038
3-MG	0,056 ± 0,004	0,054 ± 0,007	0,060 ± 0,005	0,074 ± 0,008
4-MG	14,1 ± 0,9	< LD	< LD	0,254 ± 0,020
5-MG	0,121 ± 0,009	<LD	<LD	113 ± 7
6-MG	4,48 ± 0,35	< LD	< LD	7,80 ± 0,49
7-MG	95,9 ± 5,8	<LD	<LD	10,7 ± 0,52
8-MG	56,1 ± 4,0	<LD	0,537 ± 0,040	20,1 ± 1,0
9-MG	1,66 ± 0,13	< LD	<LD	1,00 ± 0,06
10-MG	81,8 ± 4,5	<LD	0,898 ± 0,059	2,65 ± 0,04
11-MG	0,287 ± 0,038	0,105 ± 0,012	0,067 ± 0,008	0,441 ± 0,038
12-MG	0,073 ± 0,008	0,106 ± 0,009	< LD	0,393 ± 0,049
13-MG	0,178 ± 0,015	<LD	0,293 ± 0,037	0,275 ± 0,037
14-MG	0,049 ± 0,006	< LD	< LD	0,131 ± 0,015
15-MG	< LD*	<LD	0,828 ± 0,006	< LD
16-MG	0,097 ± 0,007	0,070 ± 0,008	< LD	< LD
17-MG	50,8 ± 3,3	< LD	< LD	28,8 ± 1,7
18-MG	90,8 ± 6,0	<LD	0,167 ± 0,015	0,109 ± 0,017
19-MG	0,234 ± 0,020	< LD	0,154 ± 0,016	0,430 ± 0,035
20-MG	72,7 ± 3,9	<LD	1,34 ± 0,09	0,236 ± 0,020
21-MG	8,70 ± 0,59	< LD	0,277 ± 0,016	0,553 ± 0,045
1-AM	236 ± 19	<LD	0,175 ± 0,015	0,331 ± 0,037
2-AM	0,297 ± 0,033	< LD	0,840 ± 0,049	0,774 ± 0,066
3-AM	<LD	<LD	<LD	< LD
4-AM	< LD	< LD	0,223 ± 0,013	< LD
5-AM	0,036 ± 0,004	<LD	0,044 ± 0,003	< LD
6-AM	0,060 ± 0,007	< LD	0,102 ± 0,009	2,95 ± 0,23
7-AM	216 ± 14	<LD	0,376 ± 0,040	13,9 ± 0,8
8-AM	87,9 ± 4,1	<LD	0,108 ± 0,008	2,16 ± 0,19
9-AM	< LD	0,046 ± 0,005	0,104 ± 0,009	< LD
10-AM	<LD	<LD	0,064 ± 0,007	0,085 ± 0,009

\* Abaixo do limite de detecção.

A presença dos íons cloreto e sulfato nas amostras de “cocaína de rua” podem resultar do uso de ácidos, como ácido sulfúrico e ácido clorídrico, no processo de extração da cocaína a partir das folhas de coca (Casale & Klein, 1993). Estes ácidos podem deixar resíduos nas amostras de “cocaína de rua”. No entanto, a presença destes íons não foi encontrada em algumas amostras, tais como 15-MG e 3-AM (Tabela 4.11). Estas amostras apresentaram altas concentrações de cocaína e uma ausência de adulterantes (Tabela 4.5), o que indica uma purificação eficiente após o processo de extração.

Correlações de Pearson (Tabela 4.12) foram obtidas para os componentes determinados nas amostras de “cocaína de rua” com a finalidade de avaliar as relações entre os resultados obtidos e os produtos químicos empregados na produção e/ou diluição clandestina de cocaína. Cocaína apresentou correlação negativa com lidocaína e cafeína, uma vez que as amostras com altas concentrações desses adulterantes exibiram menor concentrações de cocaína. Uma correlação positiva e significativa entre a cafeína e lidocaína foi observada ( $r = 0,434$ ), indicando que estes dois adulterantes são normalmente empregados em conjunto. Cocaína apresentou correlação positiva com Mo ( $r = 0,438$ ). Este fato é curioso, e outros estudos devem ser realizados para confirmar essa correlação e explicar a origem do molibdênio nas amostras de “cocaína de rua”.

As concentrações de cálcio variaram de 0,017 a 38,1 mg g<sup>-1</sup> (Tabela 9). Cinco amostras-MG e duas amostras-AM apresentaram concentrações elevadas de Ca, que foi relacionada com a utilização de “cal” na extração das folhas de coca (Casale & Klein, 1993) ou diluentes tais como gesso, calcário ou pó de mármore. Correlações positivas foram observadas entre Ca e P ( $r = 0,689$ ) e entre Ca e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ( $r = 0,744$ ), indicando o uso de ácido sulfúrico e cal no processo de extração ou de sulfato de cálcio e fosfato como diluentes. As concentrações de Mg variaram entre 0,102 e 107 mg g<sup>-1</sup> sendo que quatro amostras apresentaram concentrações superiores a 5 mg g<sup>-1</sup>. Estas maiores concentrações de Mg podem estar relacionadas ao uso de calcário (amostras 5-MG e 6-AM que também apresentaram altas concentrações de cálcio) ou talco em pó (6-MG e 8-MG).

Correlações de Pearson foram observadas para o Mg e Fe ( $r = 0,636$ ), Mg e Mn ( $r = 0,999$ ) e Mg e Na ( $r = 0,633$ ). Os cátions Fe, Mn e Na podem ser encontrados em pó de talco como contaminantes. A presença de manganês pode estar relacionada ao uso de permanganato de

potássio durante a produção ilícita de pasta base de cocaína (Fucci, 2007). Altas concentrações de sódio ( $> 5 \text{ mg g}^{-1}$ ) foram obtidas em 6 amostras apreendidas em Minas Gerais, mais notavelmente a amostra 6-MG ( $38,4 \text{ mg g}^{-1}$ ). Altas concentrações de Na podem estar relacionados ao uso de bicarbonato de sódio ou de sal. No entanto, nenhuma correlação significativa foi obtida para Na e Cl. Neste estudo não foi possível quantificar carbonato ou bicarbonato.

As concentrações de fósforo variaram abaixo do limite de detecção até  $47,1 \text{ mg g}^{-1}$ . Amostras com altas concentrações de P também apresentaram altas concentrações de Na ( $r = 0,716$ ) e/ou Ca ( $r = 0,689$ ). As concentrações de Fe e Mn variaram de  $10,5 - 349 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  e  $1,02 - 469 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Algumas amostras apresentaram altas concentrações de Fe e Mn ( $r = 0,636$ ). O cátion Fe também teve uma correlação significativa com Al ( $r = 0,702$ ), que apresentaram concentrações variando de  $73,9 - 304 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ . Estes elementos são comumente encontrados como impurezas de produtos químicos e em calcário, talco e gesso.

Tabela 4.12. Correlações de Pearson obtidas para os constituintes identificados nas amostras de “cocaína de rua”.

	Coc	Lid	Caf	Al	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	P	Pb	Zn	Cl <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Coc	1.000																					
Lid	<b>-0.501</b>	1.000																				
Caf	<b>-0.520</b>	<b>0.434</b>	1.000																			
Al	-0.096	-0.097	-0.097	1.000																		
Ca	-0.267	0.319	0.165	0.180	1.000																	
Co	-0.286	0.128	-0.035	-0.056	0.103	1.000																
Cr	0.190	-0.032	0.029	<b>-0.373</b>	<b>-0.478</b>	0.035	1.000															
Cu	-0.247	0.127	-0.041	-0.128	0.168	<b>0.927</b>	0.080	1.000														
Fe	-0.142	-0.029	-0.067	<b>0.702</b>	0.114	-0.007	<b>-0.639</b>	-0.184	1.000													
K	-0.102	0.341	<b>0.417</b>	-0.329	0.041	-0.061	0.007	0.041	-0.173	1.000												
Mg	-0.161	0.041	-0.001	-0.042	0.091	0.141	<b>-0.570</b>	0.011	<b>0.636</b>	0.206	1.000											
Mn	-0.167	0.046	0.000	-0.038	0.095	0.140	<b>-0.573</b>	0.014	<b>0.636</b>	0.210	<b>0.999</b>	1.000										
Mo	<b>0.438</b>	<b>-0.367</b>	<b>-0.370</b>	0.108	-0.270	<b>-0.697</b>	0.026	<b>-0.719</b>	0.014	-0.294	-0.151	-0.154	1.000									
Na	-0.317	<b>0.368</b>	0.336	0.062	<b>0.388</b>	-0.067	<b>-0.445</b>	-0.136	<b>0.423</b>	<b>0.481</b>	<b>0.633</b>	<b>0.637</b>	-0.160	1.000								
P	-0.328	<b>0.545</b>	0.305	0.058	<b>0.668</b>	-0.033	-0.300	-0.017	0.187	0.341	0.342	0.326	-0.213	<b>0.716</b>	1.000							
Pb	0.260	-0.278	-0.331	0.076	<b>-0.379</b>	<b>-0.659</b>	-0.003	<b>-0.646</b>	0.110	-0.080	0.052	0.054	<b>0.810</b>	0.024	-0.171	1.000						
Zn	0.319	-0.120	-0.138	-0.086	-0.077	-0.104	-0.019	-0.133	-0.016	-0.251	0.009	0.009	-0.006	-0.042	-0.076	0.044	1.000					
Cl	0.125	0.087	0.099	-0.127	0.127	-0.129	0.142	-0.029	-0.145	0.255	-0.114	-0.117	-0.185	0.054	0.086	-0.252	-0.105	1.000				
F	-0.050	-0.198	-0.110	0.055	-0.182	0.165	0.168	0.132	-0.062	-0.095	-0.101	-0.099	0.133	0.063	-0.188	0.180	-0.082	-0.235	1.000			
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0.012	0.173	0.129	-0.143	-0.112	-0.292	0.086	-0.171	-0.151	0.170	-0.141	-0.129	0.003	-0.061	-0.024	0.079	0.338	0.204	-0.229	1.000		
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-0.135	0.080	-0.032	-0.052	<b>0.744</b>	0.269	<b>-0.572</b>	<b>0.377</b>	-0.015	0.044	0.225	0.230	-0.273	0.138	<b>0.366</b>	-0.334	-0.056	-0.003	-0.135	-0.121	1.000	

Correlações interessantes foram observadas para Co e Cu ( $r = 0,927$ ) e para Mo e Pb ( $r = 0,810$ ). Cobalto é obtido como um subproduto da extração de cobre nas minas e é naturalmente associado a esse elemento. Da mesma forma, Mo e Pb são constituintes da mineral wulfenita ( $Pb(MoO_4)$ ), que é encontrado na América Latina.

As concentrações de cloreto variaram entre 0,036 e 236  $mg\ g^{-1}$ . Oito amostras MG e 3 amostras AM apresentaram concentrações de cloreto superiores a 10  $mg\ g^{-1}$ . No entanto, nenhuma correlação significativa foi observada entre íon cloreto e outros elementos. As concentrações de sulfato variaram de 0,076 - 113  $mg\ g^{-1}$  sendo que maiores concentrações foram observadas nas amostras de MG.

#### **4.4.3 Análise de Cluster**

Para efetuar uma separação baseada na composição das amostras apreendidas em Minas Gerais e no estado do Amazonas, todo o conjunto de dados experimentais foi utilizado para executar uma análise de cluster. A Figura 4.5 ilustra o dendrograma obtido com as concentrações apresentados nas Tabelas 4.5, 4.8, 4.9 e 4.11 após a normalização. Nesta análise, os grupos de amostras foram formados e ligados de acordo com suas semelhanças.

Dois grupos principais foram obtidos (Figura 4.5). O grupo A contém 7 amostras de MG e 8 amostras de AM. As amostras deste grupo mostraram baixas concentrações ou ausência dos adulterantes analisados. Além disso, essas amostras foram caracterizadas por baixas concentrações de constituintes inorgânicos, exceto para as amostras 1-AM e 7-AM, que teve altas concentrações de cloreto e conteúdo similar de cocaína formando um subgrupo (A.2). Grupo B contém 16 amostras de MG e 2 amostras de AM. Este grupo foi dividido em três subgrupos, B.1, B.2 e B.3. O subgrupo B.1 subgrupo foi composto pelas amostras 6-AM, 5-MG e 6-MG, sendo caracterizado por baixas concentrações de cocaína (<30,5%) e altas concentrações de constituintes inorgânicos, tais como Ca, Fe, Mg, Mn. A amostra 6-AM era uma amostra de “cocaína de rua” preta, e muitos compostos inorgânicos foram usados para mascarar esta amostra. O subgrupo B.2 foi composto pelas amostras 8-AM, 1-MG, 2-MG, 9-MG e 11-MG. A maioria destas amostras exibiu baixas concentrações de cocaína e concentrações variáveis de cafeína e lidocaína. Além disso, as concentrações de Mn, Cu e Co foram semelhantes neste subgrupo. O último grupo, B.3, foi composto de apenas 8 amostras de MG. Estas amostras apresentaram baixas concentrações de cocaína e altas concentrações de cafeína e lidocaína (Tabela 4.5). Além disso, as amostras desse grupo exibiram

concentrações significativas de constituintes inorgânicos, tais como Ca, Na, P, cloreto e sulfato (Tabelas 4.8 e 4.11).

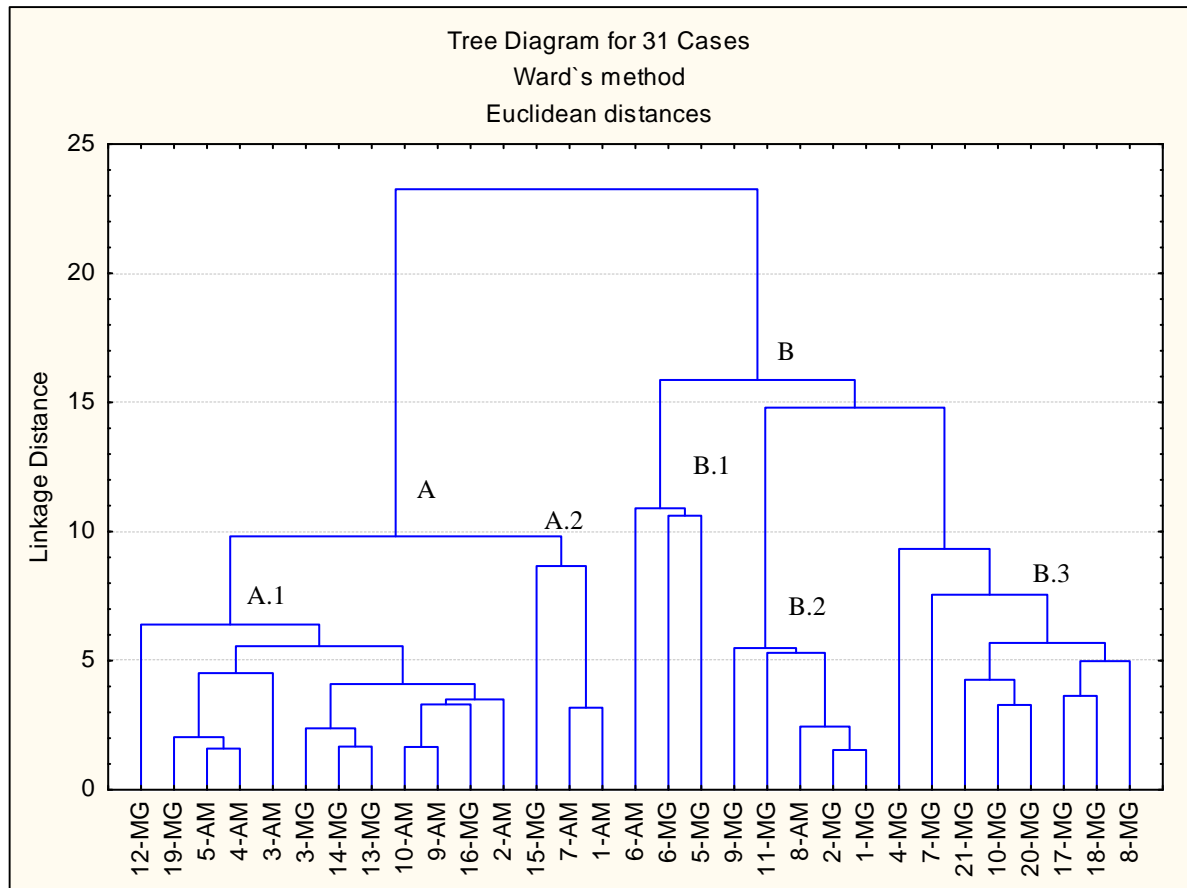


Figura 4.5. Dendrograma das amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais (MG) e do Amazonas (AM).



#### **4.5 CONCLUSÕES**

O método para quantificação simultânea de cocaína, benzocaína, cafeína e lidocaína por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas foi otimizada e avaliado. O método mostrou-se prático e eficiente, atendendo satisfatoriamente os objetivos desse trabalho.

Cocaína, adulterantes e constituintes inorgânicos foram determinados em 31 amostras de “cocaína de rua” apreendidas nos estados de Minas Gerais e do Amazonas. A pureza das amostras de “cocaína de rua” variou 6,4-97,8%. A maioria das amostras de MG (72%) apresentou pureza inferior a 20%. A pureza das amostras do AM foi maior do que nas amostras de MG. Apenas 2 destas amostras apresentaram pureza inferior a 20%. A cafeína foi o adulterante mais comum encontrado em 76% das amostras de MG. O segundo adulterante mais comum foi lidocaína. Benzocaína foi encontrado em apenas uma amostra de MG. As amostras apreendidas no Amazonas não continham qualquer um dos adulterantes estudados, indicando que esta prática não é freqüente nesta região do Brasil. Concentrações mais elevadas de constituintes inorgânicos foram encontradas nas amostras de MG em comparação com as amostras do AM. Correlações de Pearson permitiram algumas associações dos constituintes químicos com produtos empregados na fabricação de cocaína e/ou alguns diluentes, como bicarbonato de sódio, sal, calcário, talco e gesso. O estudo da pureza de amostras de “cocaína de rua” e a presença e concentração de adulterantes e constituintes inorgânicos é importante devido aos efeitos deletérios sobre a saúde. Este tipo de estudo também pode fornecer informações sobre rotas de distribuição e avaliação do perfil destas amostras.

## REFERÊNCIAS

- Barrio, G.; Saavedra, P.; 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**(1): 15-28.
- Behrman, A. D. (2008). "Luck of the draw: common adulterants found in illicit drugs." Journal of Emergency Nursing **34**(1): 80-82.
- Bernardo, N. P.; Siqueira, M. E. P. B.; De Paiva, M. J. N.; Maia, P. P. (2003) "Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil", International Journal Drug Policy **14**: 331–334.
- Carvalho, D. G. D.; Mídio, A. F. (2003). "Quality of cocaine seized in 1997 in the street-drug market of São Paulo city, Brazil." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **39**: 71-75.
- Casale, J.F.; Klein, R.F.X. (1993) "Illicit production of cocaine". Forensic Science Review **5**: 95-107.
- Chiarotti, M.; Fucci, N. (1999). "Comparative analysis of heroin and cocaine seizures." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **733**(1-2): 127-136.
- Coomber, R. (2008) "Vim in the Veins - Fantasy or Fact: The Adulteration of Illicit Drugs." da Silva, M. J., E. V. dos Anjos, et al. "Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis." Analytica Chimica Acta **629**(1-2): 98-103.
- Dujourdy, L.; Besacier, F. (2008). "Headspace profiling of cocaine samples for intelligence purposes." Forensic Science International **179**(2-3): 111-122.
- Evrard, I.; Legleye, S.; Cadet-Tairou, A. (2010). "Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France." International Journal of Drug Policy **21**(5): 399-406.
- Fucci, N.; De Giovanni, N. (1998). "Adulterants encountered in the illicit cocaine market." Forensic Science International **95**(3): 247-252.
- Fucci, N. (2007). "Unusual adulterants in cocaine seized on Italian clandestine market." Forensic Science International **172**.
- Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*; DOQ-CGCRE-008, Revisão: 02 de junho de 2007.

- McKinney, C. D.; Postiglione, K. F.; Herold, D. A. (1992). "Benzocaine-adulterated street cocaine in association with methemoglobinemia." Clinical Chemistry **38**(4): 596-597.
- Montagne, M. (1991) Descriptive epidemiology of international cocaine trafficking. In S. Schober, & Ch. Schade (eds.), *The Epidemiology of Cocaine Use and Abuse*, National Institute on Drug Abuse, Research Monograph 110, DHHS publication number (ADM) 91-1787, Rockville, Maryland, pp. 275–296.
- Schneider, S.; Meys, F. (2011). "Analysis of illicit cocaine and heroin samples seized in Luxembourg from 2005–2010." Forensic Science International **212**(1-3): 242-246.
- Silva, M. J.; Anjos, E. V.; Honorato, R. S.; Pimentel, M. F.; Paim, A. P. S. Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis, Analitycal Chimica Acta **629** (2008) 98–103.
- Souza, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análise de Alimentos, 2007, 296p. Tese de doutorado em Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais.
- Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure and Applied Chemistry **74** (5): 835 - 855.
- United Nations Office on Drugs and Crime. WORLD DRUG REPORT 2011. United Nations, 2011, 267p.
- Weiner, A. L. ; Bayer, M. J.; Mckay Jr, C. A.; Demeo, M. ; Starr, E. (1998) "Anticholinergic poisoning with adulterated intranasal cocaine" The American Journal Emergency Medicine **16** (5): 517-520.

## ***CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS***

---

O presente trabalho teve como foco principal o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e de baixo custo que pudessem ser empregados em laboratórios forenses. O desenvolvimento desses métodos é importante na área forense uma vez que matrizes biológicas são amplamente empregadas na identificação e quantificação de drogas lícitas, como os benzodiazepínicos, e ilícitas, como a cocaína, que podem estar relacionadas com intoxicações acidentais e intencionais.

As técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida são utilizadas em diversos laboratórios forenses no Brasil e no mundo. No entanto, estas técnicas geralmente requerem uma etapa de preparo de amostra, principalmente no que se refere às matrizes biológicas, por serem muito complexas. Neste trabalho, dois capítulos foram destinados ao desenvolvimento de métodos empregando a técnica de extração líquido-líquido e/ou sólido-líquido com partição em baixa temperatura como preparo de amostras. Os métodos desenvolvidos mostraram-se eficientes para a determinação de benzodiazepínicos em urina e também para a determinação de cocaína em urina, fígado e sangue. A técnica de extração empregada é interessante, pois possibilita não apenas a extração do analito de matrizes complexas, como as biológicas, como também permite a purificação dos extratos. A vantagem deste método de extração sobre os já estabelecidos é que este não requer instrumentação sofisticada, faz uso de pequenas quantidades de solvente orgânico e pode ser empregado em laboratórios com poucos recursos. No entanto, esse método apresenta uma limitação com relação ao tempo gasto. O tempo de resfriamento da mistura (matriz e solvente) é uma variável importante, pois influencia a migração do analito da fase aquosa para a fase orgânica e deve ser investigado mais profundamente em estudos futuros. Ainda assim, considera-se o método vantajoso frente aos métodos normalmente utilizados em muitos laboratórios forenses brasileiros.

O presente estudo fez ainda uma avaliação de amostras de “cocaína de rua” apreendidas em dois estados brasileiros, Minas Gerais e Amazonas. Um estudo do efeito de matriz foi desenvolvido mostrando a grande variação na composição e complexidade das amostras. Tais variações na composição das amostras podem ser associadas a adulterações e diluições. Os resultados apresentados mostraram que as amostras do estado de Amazonas possuem pureza maior do que as amostras do Estado de Minas Gerais. Além disso, o principal adulterante encontrado nas amostras do estado de Minas Gerais foi a cafeína, seguido de lidocaína. Estes compostos são usados para simular o efeito da cocaína. Correlações de Pearson permitiram algumas associações de constituintes químicos tais como metais e alguns ânions com produtos empregados na fabricação de cocaína e/ou alguns diluentes, como bicarbonato de sódio, sal, calcário, talco e gesso. A avaliação da composição de amostras de

“cocaína de rua“ apreendidas é importante por formular hipóteses sobre a estrutura do mercado ilegal desta droga e ainda explicar a ocorrência de reações agudas ou "overdoses" provocadas pelo consumo ilegal desta droga.

Diante disso, espera-se que esse trabalho possa contribuir com a área de química forense, que é de extrema importância na elucidação de crimes e que apresenta uma grande demanda por estudos que permitam melhorar a qualidade dos resultados analíticos obtidos e minimizar tempo, esforços e custos das análises realizadas.

***ANEXOS***

---

**Trabalhos apresentados em congressos**

Magalhães, E. J.; Augusti, R.; Queiroz, M. E. L. R.; Cardoso, J. C.; Afonso, R. J. C.; Nascentes, C. C. Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning for determination of Benzodiazepines in Urine by LCESIITTOFMS. 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, **2011**, João Pessoa. (Pôster)

Magalhães, E. J.; Augusti, R.; Queiroz, M. E. L. R.; Pereira, L. A. A.; Nascentes, C. C. A New Method for the Quantification of Cocaine in Urine Using Liquid-Liquid Extration with Partition at Low Temperature and Analysis by GC-MS. 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, **2009**, Campinas. (Pôster)

Magalhães, E. J.; Queiroz, M. E. L. R.; Augusti, R.; Guedes, M. L. O.; Lordeiro, R. A.; Nascentes, C. C. Desenvolvimento e Validação de um Método de GC-MS para Quantificação de Cocaína e Adulterantes em Amostras Apreendidas no Estado de Minas Gerais. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, **2009**, Belo Horizonte. (Pôster)

Magalhães, E. J.; Queiroz, M. E. L. R.; Augusti, R.; Nascentes, C. C. Otimização da ELL-PBT para Determinação de Benzodiazepínicos em Urina por HPLC-ESI/MS. 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, **2009**, Salvador. (Pôster)

**Artigo publicado**

Magalhães, E. J.; Nascentes, C. C.; Augusti, R.; Queiroz, M. E. L. R.; Silva, J. C. C.; Afonso, R. J. C. F. (2012). "Fast Determination of Benzodiazepines in Human Urine via Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and LC-HRMS." American Journal of Analytical Chemistry **3**: 118-124.

**Artigo submetido para publicação**

Magalhães, E. J.; Nascentes, C. C.; Pereira, L. S. A.; Guedes, M. L. O.; Lordeiro, R. A.; Aurer, L.; Augusti, R.; Queiroz, M. E. L. R. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. Submetido à Forensic Science International (10/11/2011).