



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Otimização e Validação de Método Cromatográfico
para Quantificação de Componentes Majoritários em
Amostras de Cocaína**

Saulo dos Santos Goulart Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

Co-Orientador: Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília-DF

2012



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Otimização e Validação de Método Cromatográfico
para Quantificação de Componentes Majoritários em
Amostras de Cocaína**

Saulo dos Santos Goulart Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

Co-Orientador: Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília-DF

2012

Saulo dos Santos Goulart Júnior

Otimização e Validação de Método Cromatográfico para Quantificação de Componentes Majoritários em Amostras de Cocaína

Banca examinadora da
Dissertação para obtenção do grau de mestre

Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida
orientadora/presidente

Dr. Adriano Otávio Maldaner
co-orientador

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga
1º examinador

Profa. Dra. Patrícia Fernandes Lootens Machado
2º examinador

Prof. Dr. Alexandre Fonseca
membro suplente

Brasília, 20 de outubro de 2012.

À Deus, que esteve comigo durante toda minha vida

Aos meus pais Saulo e Neide,
que me deram amor, tranquilidade e educação

Aos meus avós, pela ajuda sentimental e financeira.

Às minhas irmãs Thyara e Thaysa, por estarem sempre presentes.

À minha família, pelo apoio e motivação.

Aos meus amigos,
por ajudas intelectuais e de lazer em momentos críticos.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida, pela grande transmissão de conhecimento, pela dedicação ao meu trabalho e pela paciência nas horas necessárias.

Ao meu co-orientador e grande amigo, PCF Dr. Adriano Otávio Maldaner, pela presença constante, pela cobrança e pela grande experiência passada na aquisição e análise dos dados laboratoriais.

Agradeço ao Departamento de Polícia Federal (DPF), na pessoa do chefe do SEPLAB PCF Adriano Otávio Maldaner, pela disponibilização do espaço físico e de pessoal capacitado para ajudar e também pela confiança em mim depositada por todos os integrantes do laboratório.

Aos peritos Élvio Dias Botelho e Maurício Leite Vieira, pelos ensinamentos e apoio desde o início do projeto.

Aos peritos Jorge Jardim Zacca, João Carlos Laboisiere Ambrósio e Leandro Calzavara, pelo apoio na parte experimental e interpretativa deste trabalho.

À toda equipe do SEPLAB/INC/DITEC/DPF, pela compreensão e paciência para dividir equipamentos e espaço físico.

À todos os colegas do INC, por cada um torcer para um time diferente e podermos ter momentos de descontração a cada rodada de jogos.

Aos colegas de mestrado, Tatiane Grobério e Willian Fraga e à Christiane Campos, pelo auxílio experimental e pela amizade incondicional.

Ao IQ/UnB e todos os professores a ele ligados, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento pessoal.

Ao *Special Testing & Research Laboratory* do *Drug Enforcement Administration* (DEA) nos Estados Unidos, pela disponibilidade dos padrões de cocaína e cinamoilcocaínas.

À banca examinadora, por dispor de tempo para corrigir e me orientar a respeito do trabalho desenvolvido.

À FINEP/MCT (PeQui 01.09.0275-00) CNPq. 555023/ 2010-9, I90/UNODC/DPF, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Uma forma de investigação de entorpecentes que vem sendo muito utilizada por autoridades responsáveis pela repressão ao consumo e ao tráfico dessas substâncias é a elaboração de perfis químicos de drogas. Esse modelo de investigação tem gerado uma série de informações importantes que permitem interligar produtores, traficantes e consumidores da droga, formando as chamadas “rotas de tráfico”. A Polícia Federal do Brasil (PF) tem agido nesse sentido e implantou em 2005 o projeto PeQui (Perfil Químico de Drogas), que tem como principal foco o combate ao tráfico de cocaína através da implementação de um banco de dados, que relaciona origem da cocaína com concentração de substâncias majoritárias e minoritárias. O presente trabalho propõe a otimização do método rotineiramente utilizado na PF para quantificação dos principais alcalóides presentes na droga, dentre eles a própria cocaína, utilizando como técnica a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (*GC-FID*). Além disso, este trabalho visa identificar simultaneamente os principais adulterantes utilizados na fabricação da droga, dentre eles benzocaína, cafeína, fenacetina, lidocaína, hidroxizina, levamisol, diltiazem e procaína. Um procedimento de validação contundente mostrou que além de rápida e simples, a técnica é confiável e robusta o suficiente para ser implantada em laboratórios da PF nos vários estados brasileiros e no Distrito Federal. Foram analisadas 304 amostras apreendidas em nove estados brasileiros e um trabalho estatístico inicial foi feito para tentar encontrar correlações entre essas apreensões. Essas análises fizeram concluir que a cocaína apreendida no Brasil é bem variada, com pureza média próxima a 65%. Outros dados importantes é que em amostras apreendidas da fronteira entre Brasil e países produtores da cocaína, a droga geralmente está menos refinada (formato de base livre, grau de oxidação baixo e sem a presença de adulterantes), já em outros estados a droga está em formato de sal, muito oxidada e com a presença de um ou mais adulterantes.

ABSTRACT

The establishment of chemical profiling programs is a way to investigate narcotics that is being widely used by the authorities responsible for the repression of the consumption and trafficking of drugs. This research model has generated several important information to link producers, dealers and consumers of drugs, revealing the so-called "traffic routes". The Brazilian Federal Police proposed and implemented since 2005 its Chemical Profiling Project (*PeQui* project), that is mainly focused on facing the trafficking of cocaine through the implementation of a database that correlate the origin of cocaine seizures and the concentration of major and minor substances. This work proposes the optimization of the analytical methodology routinely used in Federal Police chemistry labs for quantification of the main alkaloids present in the drug, including cocaine itself, using the gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) as the analytical technique. Furthermore, this study aims to identify simultaneously the main adulterants added during the manufacture of the drug: benzocaine, caffeine, phenacetin, lidocaine, hydroxyzine, levamisole, diltiazem and procaine. The validation procedure showed that the methodology, in addition to relatively fast and simple, is also reliable and robust enough to be implanted in PF laboratories in several Brazilian States and the Federal District. During the study, 304 samples seized in nine Brazilian states were analyzed and an initial statistical work was performed to establish correlations between these seizures. These analyzes did conclude that the cocaine seized in Brazil is quite varied, with average purity around 65%. Other important data is that drug samples seized in the border between Brazil and cocaine producer countries, is usually less refined (free base, low degree of oxidation and without the presence of adulterants), while in other states the drug is mostly in the salt form, with high degree of oxidation and associated with one or more adulterants.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1.	Cocaína.....	4
3.1.1.	Legislação Brasileira	7
3.2.	Cromatografia Gasosa	8
3.3.	Determinação de Cocaína.....	8
3.4.	Determinação de Cis e Trans-Cinamoilcocaínas	9
3.5.	Adulterantes e Diluentes	10
3.6.	Validação	10
3.6.1.	Seletividade	11
3.6.2.	Precisão.....	11
3.6.3.	Exatidão.....	12
3.6.4.	Limite de Detecção (LD)	12
3.6.5.	Limite de Quantificação (LQ)	13
3.6.6.	Linearidade e Faixa de trabalho.....	13
3.6.7.	Robustez.....	13
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1.	Materiais.....	15
4.1.1.	Equipamentos, vidrarias e acessórios	15
4.1.2.	Solvente.....	16
4.1.3.	Reagentes.....	16
4.1.4.	Padrões.....	16
4.1.5.	Amostras de cocaína.....	16
4.2.	Método	17
4.2.1.	Condições cromatográficas.....	18
4.2.2.	Preparação das curvas analíticas	18
4.2.3.	Análise das amostras selecionadas por GC-FID	19
5.	RESULTADOS e DISCUSSÃO	20
5.1.	Otimização	20

5.1.1.	Rotina Laboratorial.....	20
5.1.2.	Preparo da Amostra.....	21
5.1.3.	Otimização dos Parâmetros do Cromatógrafo.....	26
5.2.	Validação do método.....	31
5.2.1.	Linearidade e Faixa de Trabalho.....	33
5.2.2.	Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ).....	36
5.2.3.	Precisão.....	39
5.2.4.	Exatidão.....	41
5.3.	Quantificação de cocaína em amostras reais.....	45
6.	CONCLUSÕES.....	61
7.	PERSPECTIVAS.....	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	APÊNDICE 01.....	69
	APÊNDICE 02.....	77
	APÊNDICE 03.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Acre

AM: Amazonas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Bzc: Benzocaína

Caf: Cafeína

CV: Coeficiente de Variação

DEA: Administração de Controle das Drogas- do inglês, *Drug Enforcement Administration*

DF: Distrito Federal

Dtz: Diltiazem

ECVC: *Erythroxylum coca* var. *coca*

FE: Fase Estacionária

Fen: Fenacetina

FM: Fase Móvel

GC: Cromatografia Gasosa - do inglês, *gas chromatography*

GC-FID: Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama - do inglês, *gas chromatography coupled with flame ionization detector*

GC-MS: Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massa – do inglês, *gas chromatography coupled with mass spectrometry*

HCA – Análise Hierárquica de Agrupamentos - do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*,

HPB: Escritório de Proteção à saúde- do inglês, *Health Protection Branch*

Hzn: Hidroxizina

ICH: Conferência Internacional de Harmonização - do inglês, *International Conference on Harmonisation*

Ldc: Lidocaína

Lms: Levamisol

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

MG: Minas Gerais

MS: Mato Grosso do Sul

MT: Mato Grosso

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCA: Análise dos Componentes Principais - do inglês, *Principal Component Analysis*

PE: Pernambuco

PF: Polícia Federal

PI: Padrão Interno

POP: Procedimento de Operação Padrão

PR: Paraná

Pro: Procaína

PTV: Vaporização com Temperatura Programada - do inglês, *programmed temperature vaporization*

RO: Rondônia

SD: desvio padrão – do inglês, *standard deviation*

SEPLAB/INC/DITEC/DPF: Serviço de Perícias de Laboratório e Balística/Instituto Nacional de Criminalística/Diretoria Técnico-Científica/Departamento de Polícia Federal

SETEC: Setor Técnico Científico

SP: São Paulo

SVS: Secretaria de Vigilância Sanitária, substituída pela ANVISA

TR: Tempo de Retenção

UnB: Universidade de Brasília

USP: Farmacopéia Americana – do inglês, *United States Pharmacopeia*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados pelos principais institutos para validação de métodos analíticos quantitativos.	11
Tabela 2 – Substâncias disponibilizadas pelo laboratório para serem utilizadas como Padrão Interno.....	24
Tabela 3 – Parâmetros do injetor e seus valores otimizados.	29
Tabela 4 – Rampa de aquecimento otimizada	30
Tabela 5 – Parâmetros do detector	30
Tabela 6 – Resultados do teste de precisão e exatidão no ponto do LQ da cocaína	39
Tabela 7 – Resultados do teste de precisão intradias.....	40
Tabela 8 – Resultados dos testes de precisão inter-dias	41
Tabela 9 – Resultados do teste de exatidão	42
Tabela 10 – Tabela mostrando os valores obtidos para cada figura de mérito nos testes de validação.....	44
Tabela 11 – Tabela mostrando os resultados dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) nos testes de validação.....	45
Tabela 12 - Tabela contendo informações do estado de origem, teor de cocaína, forma de apresentação, teor de cinamoilcocaína total, grau de oxidação e adulterantes presentes de todas as amostras analisadas neste trabalho.	78
Tabela 13 -Pontos da curva analítica, suas concentrações e volumes adicionados das soluções estoque e de PIs.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas moleculares da cocaína na forma de base livre e salina.....	4
Figura 2 – Rotas de síntese para a produção da Isopropilcocaína a partir do padrão de cocaína.....	23
Figura 3 – Estrutura molecular da cocaína e dos padrões internos Dipentilftalato, n-Docosano e n-Heneicosano.	25
Figura 4 – Curva de calibração da cocaína com volume de amostra injetado de 2,0 μL	27
Figura 5 – Curva de calibração da cocaína com volume de amostra injetado de 1,0 μL	28
Figura 6 – Cromatograma com o resultado do teste de seletividade.	32
Figura 7 – Gráfico mostrando a curva analítica da amostra de cocaína cedida pelo DEA, seu coeficiente de determinação e a equação da reta.....	34
Figura 8 - Gráfico mostrando a curva analítica das cinamoilcocaínas (cis + trans), seu coeficiente de determinação e a equação da reta.....	35
Figura 9 – Cromatograma de uma amostra com todos os adulterantes contendo teor de 1% na amostra	36
Figura 10 – Cromatograma de uma amostra de cocaína com concentração de 1% (m/m)	37
Figura 11 – Cromatograma representativo de uma amostra com cis e trans-cinamoilcocaína em seus limites de detecção.....	38
Figura 12 – Carta controle das quantificações feitas no ano de 2011	43
Figura 13 – Gráfico de distribuição do número de amostras analisadas de cada estado.....	46
Figura 14 – Número de amostras analisadas de acordo com sua forma de apresentação.....	47
Figura 15 – Quantidade de vezes que cada adulterante foi identificado nas análises	48
Figura 16 – Cromatograma característico das amostras de cloridrato de cocaína....	49
Figura 17 – Cromatograma característico das amostras de cocaína base livre	50

Figura 18 – Cromatograma de uma amostra representativa das apreensões no Paraná.....	51
Figura 19 – Composição química média das amostras do Paraná	52
Figura 20 – Adulterantes encontrados nas amostras do Paraná.....	53
Figura 21 – Cromatograma de uma amostra representativa do Acre.....	54
Figura 22 – Composição química média das amostras do Acre	54
Figura 23 – Adulterantes encontrados nas amostras do Acre.....	55
Figura 24 – Composição das amostras do MS analisadas quanto aos principais alcalóides	56
Figura 25 – Teor médio e desvio padrão da cocaína e cinamoilcocaínas das amostras de AM, RO e MS juntas	58
Figura 26 – Adulterantes encontrados nas amostras de AM, RO e MS juntas.....	58
Figura 27 – Teores de cocaína máximo, médio e mínimo para cada estado com amostras analisadas.....	59
Figura 28 – Gráfico da quantidade de amostras contendo o grau de oxidação alto, médio e baixo por estado	60

1. INTRODUÇÃO

Estudos frequentes têm mostrado que cada vez mais o narcotráfico vem fazendo vítimas em todo território nacional. Sejam elas produtoras, traficantes ou consumidoras, o número de pessoas ligadas ao tráfico de entorpecentes tem atingido patamares assustadores, afetando diretamente a saúde e a segurança dos brasileiros. O principal produto desses criminosos, segundo pesquisas, é a cocaína.

Leis antidrogas vêm sendo discutidas e sancionadas para auxiliar a polícia no combate a esse tipo de crime. A Polícia Federal (PF) também tem trabalhado em projetos para facilitar a identificação e conseqüentemente a prisão dos envolvidos com o tráfico de entorpecentes. Em 2005, foi criado o projeto PeQui, idealizado pela PF, com o objetivo de produzir um banco de dados robusto com informações de locais de produção e consumo de drogas, visando interligar produtores e usuários e, com isso, auxiliar o combate ao tráfico.

Essa dissertação é um dos vários subprojetos do PeQui e tem como principal objetivo aumentar a qualidade, em termos de comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, das análises químicas das amostras de cocaína. Para garantir a qualidade analítica, a metodologia precisa ser implementada, testada e regularmente reavaliada.

A técnica de análise escolhida para o projeto e utilizada neste trabalho foi a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. O método de análise utilizando essa técnica foi adaptado à realidade brasileira, tanto com relação à estrutura dos laboratórios da Polícia Federal como ao tipo de cocaína apreendida no Brasil, visando difundi-lo pelos estados brasileiros e Distrito Federal. Esse método otimizado visa quantificar cocaína e cinamoilcocaínas e, simultaneamente, detectar a existência dos principais adulterantes utilizados nas amostras de cocaína apreendidas no Brasil.

Os objetivos gerais deste trabalho serão mostrados a seguir. Logo após, será apresentada uma revisão da literatura com detalhes sobre a droga a ser estudada, a técnica analítica selecionada, assim como os procedimentos utilizados para atingir o

objetivo final. Em seguida, serão detalhados materiais e métodos utilizados durante o trabalho. Finalmente, os resultados serão apresentados e discutidos e as conclusões e perspectivas futuras serão apresentadas.

2. OBJETIVOS

- Otimizar e validar uma metodologia analítica para a determinação e quantificação dos alcalóides cocaína e cinamoilcocaínas em amostras de cocaína.
- Identificar a presença dos principais adulterantes presentes na amostra.
- Gerar Procedimentos Operacionais Padrão (POP) para possibilitar que as metodologias otimizadas possam ser reproduzidas nos laboratórios dos principais estados em que a Polícia Federal do Brasil atua com perícia laboratorial (AC, AM, MS, MT, PR, RJ e SP).
- Analisar amostras apreendidas pela PF
- Interpretar os dados e procurar características importantes nas amostras
- Iniciar a organização de um banco de dados com informações das origens das drogas apreendidas e analisadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para o desenvolvimento desta dissertação, foram consultados livros e artigos que descrevem aspectos relevantes, que contribuíram para a compreensão e discussão dos dados coletados, visando os objetivos estabelecidos.

3.1. Cocaína

A cocaína (figura 1) é um alcalóide tropânico e seus efeitos estimulantes agem diretamente no sistema nervoso central. Ela se apresenta de duas formas, ambas solúveis em clorofórmio. Na forma de base livre é mais suscetível a hidrólise e, em forma de sal mais estável (ver figura 1). A cocaína é obtida através do cultivo e extração de uma planta denominada *Erythoxylum coca*, principalmente da sua variedade chamada *Erythoxylum coca var. coca*.¹

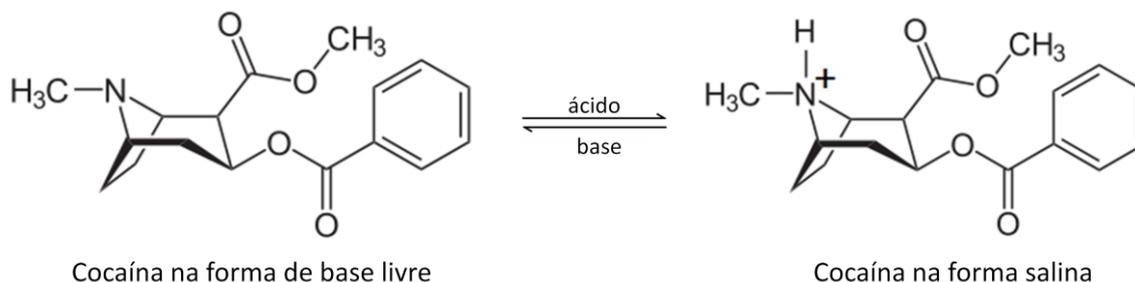


Figura 1 – Estruturas moleculares da cocaína na forma de base livre e salina

Alcalóides são compostos heterocíclicos nitrogenados de ocorrência principalmente vegetal. Entre outros efeitos, os alcalóides têm como características marcantes o forte efeito psicotrópico e poderes medicinais, sendo muito utilizados como drogas tanto medicinais como de abuso. Eles são divididos em diversas classes e uma delas, a dos alcalóides tropânicos, tem efeitos estimulantes e psicotrópicos característicos e, por isso, podem ser utilizados principalmente como antidepressivos e como drogas de abuso.² Esses efeitos também são verificados na planta in natura, já que estudos mostram que os efeitos neurotransmissores da cocaína apresentam um efeito inseticida, agindo no sistema nervoso dos insetos que se aproximam das folhas de coca.³

A cocaína pode ser absorvida pelo ser humano por todas as mucosas e membranas. Aplicada localmente, bloqueia o início da condução do impulso nervoso. O átomo de nitrogênio presente na estrutura molecular, possivelmente na forma de cátion, combina-se com receptores da membrana celular e bloqueia a condução de íons de sódio e potássio, impedindo assim tanto a geração como a condução do impulso nervoso. A redução no apetite do usuário de cocaína também está relacionada à ação anestésica local.⁴

A cocaína também inibe a recaptura de catecolaminas (norepinefedrina e dopamina) nas terminações adrenérgicas, aumentando suas concentrações na sinapse. Esse processo é o principal responsável pela estimulação do sistema cardiovascular e do sistema nervoso central. No início, ocorre uma sensação de bem estar e euforia. Com a ingestão de quantidades relativamente altas podem ocorrer tremores e crises convulsivas. Uma dose de 50 mg de cocaína, por via oral, já provoca alucinações. A estimulação central é rapidamente seguida por depressão. Os centros medulares vitais são deprimidos, podendo resultar em morte por insuficiência respiratória. Em doses elevadas ocorre paranoia, ansiedade, comportamento estereotipado, alucinações visuais, auditivas e táteis. O uso por via endovenosa pode causar morte imediata por insuficiência cardíaca, devido à ação tóxica direta sobre o músculo cardíaco.⁴

Após a absorção, a cocaína é degradada pelas esterases plasmáticas e pequenas quantidades são excretadas inalteradas pela urina. Essa droga é rapidamente metabolizada à metilecgonina, bezoilecgonina, e, se houver a presença de etanol, à cocaetileno. Seu tempo de meia vida é de 30 a 90 minutos, sendo usualmente detectada na urina até 36 horas após seu uso. Por esta razão, os efeitos da cocaína no organismo se dissipam mais rapidamente que os das anfetaminas, por exemplo.⁴

Devido a esses efeitos, a cocaína é utilizada há muito tempo em rituais religiosos e civis como estimulantes e antidepressivos.⁵ Integrantes de culturas nativas da América do Sul têm mascado folhas de coca por milhares de anos em ocasiões religiosas e sociais para inibir a fome, diminuir o cansaço e aumentar a resistência física. Vários artigos foram publicados relatando achados de restos vegetais de plantas de coca no Peru, além de artefatos de cerâmica encontrados na região andina. O mais antigo desses artefatos, que sugere o uso de folhas de coca,

foi encontrado no Equador e acredita-se que data de 2100 a.C.⁶ Em publicações mais recentes foram encontrados vestígios mais diretos: Cartmell et al.⁷ descreveram a detecção de benzoilecgonina (principal metabólito da cocaína) em 114 amostras de cabelo de múmias de populações pré-hispânicas no Chile, sendo as amostras mais antigas datadas entre 250 e 350 a.C. Outro trabalho encontrou em escavações de estruturas habitacionais, uma folha de coca e dois endocarpos identificados como da espécie *Erythroxylum coca var. coca*, datados entre 1300 e 1500 d.C.⁸

Albert Niemann, em 1859, isolou a cocaína das outras substâncias encontradas nas folhas de coca.⁹ A partir dessa descoberta, a cocaína passou a ser empregada em vários produtos, como por exemplo em uma mistura de vinho e folhas de coca chamada de Vin Tonique Mariani, que era produzida em Paris por Angelo Mariani no século XIX. A fórmula da Coca-Cola foi criada em parte como tentativa de competição dos comerciantes americanos com o vinho Mariani importado da Itália. A cocaína fez parte da formulação do refrigerante desde sua invenção até 1903.¹⁰

No fim do século XIX, a cocaína foi popularizada, sendo utilizada no tratamento para a toxicodependência de morfina. Em Viena, Sigmund Freud prescreveu cocaína a seus pacientes. Ela também foi utilizada como anestésico local em 1884 pelo oftalmologista Carl, que aplicava colírios com cocaína nos olhos de pacientes antes de serem operados. Em 1885, a cocaína ganhou espaço com a companhia americana Park Davis que vendia livremente a droga em cigarros, pó ou líquido injetável sob o lema de “substituir a comida; tornar os covardes corajosos, os silenciosos eloquentes e os sofredores insensíveis à dor”.¹¹

Apesar do entusiasmo, os efeitos negativos da cocaína acabaram sendo descobertos. Esse alcalóide passou a ser uma ameaça à saúde e ao bem-estar da população, devido ao seu uso como droga de abuso. Hoje, ela está associada a diversos problemas sócio-econômicos.¹²

Atualmente, o cultivo, o comércio, a mastigação e o consumo de chá de coca são legais na Bolívia, Peru e Noroeste da Argentina. No Brasil, a cocaína é proibida em todas as suas formas de consumo e uma legislação em desenvolvimento busca ajudar a polícia a coibir o tráfico do entorpecente no país.

3.1.1. Legislação Brasileira

No Brasil, o plantio, o consumo e o comércio de cocaína e derivados são proibidos pela Lei nº 11.343/06, de 23 de agosto de 2006, que instituiu o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas. Nela, as drogas são definidas como: “substâncias ou produtos capazes de causar dependência, assim especificados em lei ou relacionados em listas atualizadas periodicamente pelo Poder Executivo da União.” Essa especificação é dada pela Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de Maio de 1998 e inclui a cocaína como entorpecente de uso proscrito no Brasil.^{13,14}

Os adulterantes utilizados no ato de refino e composição da cocaína também tiveram seus usos controlados através da Lei nº 10.357 de 27 de dezembro de 2001,¹⁵ regulamentada pelo decreto nº 4.262 de 10 de junho de 2002¹⁶ que estabelece o controle e a fiscalização sobre produtos químicos que direta ou indiretamente possam ser destinados à elaboração ilícita de substâncias entorpecentes, psicotrópicas ou que determinem dependência física ou psíquica. A lista dos produtos relacionados para o controle está publicada na Portaria nº 1.274, de 25 de agosto de 2003, do Ministério da Justiça, alterada pela Portaria nº 113, de 14 de janeiro de 2004.^{17, 18}

Finalmente, em 2010, através da Resolução RDC nº 21/2010-ANVISA/MS, a ANVISA listou alguns reagentes químicos utilizados para a fabricação e síntese de entorpecentes e/ou psicotrópicos que terão sua comercialização e uso controlados e fiscalizados.¹⁹

Nesse contexto, a Polícia Federal, em colaboração com a Universidade de Brasília, atua no desenvolvimento do Projeto PeQui (Perfil Químico de Drogas), que visa quantificar e “mapear” as drogas ilícitas, com atenção especial para a cocaína, comercializadas no Brasil. Um dos objetivos do projeto PeQui, que será mostrado neste trabalho é, por meio da quantificação dos principais alcalóides presentes na cocaína, estruturar um banco de dados que possa ser utilizado, com auxílio de tratamentos estatísticos, para mapear a origem das drogas apreendidas. Também é meta do PeQui observar os principais adulterantes e reagentes que são utilizados para a fabricação, síntese e refino da droga e com isso manter atualizadas as listas de controle das autoridades.²⁰

Para consolidar tais objetivos, otimizar e validar uma metodologia analítica é crucial para o projeto, na perspectiva de aumentar a confiabilidade dos resultados

químicos e, conseqüentemente, das informações a respeito da origem e componentes da droga. A metodologia escolhida baseia-se na técnica de Cromatografia Gasosa.

3.2. Cromatografia Gasosa

Cromatografia gasosa é uma técnica físico-química de separação de componentes em amostras, cujos analitos orgânicos devem ser voláteis e termicamente estáveis.²¹ Com os requisitos iniciais, a técnica já se mostra apta à análise de cocaína em suas formas base e sal, assim como os demais alcalóides e adulterantes utilizados. Essa técnica é fundamentada na migração diferencial dos componentes, que ocorre devido a diferentes interações, entre o analito e a Fase Estacionária (FE), que é a coluna do equipamento. Um gás inerte é usado para carrear esse analito pela coluna, esse gás é chamado de Fase Móvel (FM). Essa técnica foi utilizada por Chiarotti e Fucci, que mostraram, entre outras vantagens, sua alta resolução na separação de picos cromatográficos.²²

A cromatografia gasosa pode ser acoplada a diversos tipos de detectores. A detecção por ionização em chama é largamente utilizada por ser bastante sensível à ligações carbono-hidrogênio, respondendo assim a praticamente todas as classes de compostos.

Utilizando essa técnica pôde-se nesse trabalho determinar o perfil químico majoritário das amostras de drogas apreendidas no país, esse perfil químico é dado pela quantidade dos alcalóides cocaína, cis-cinamoilcocaína e trans-cinamoilcocaína e pela presença de adulterantes que serão comentados separadamente a seguir.

3.3. Determinação de Cocaína

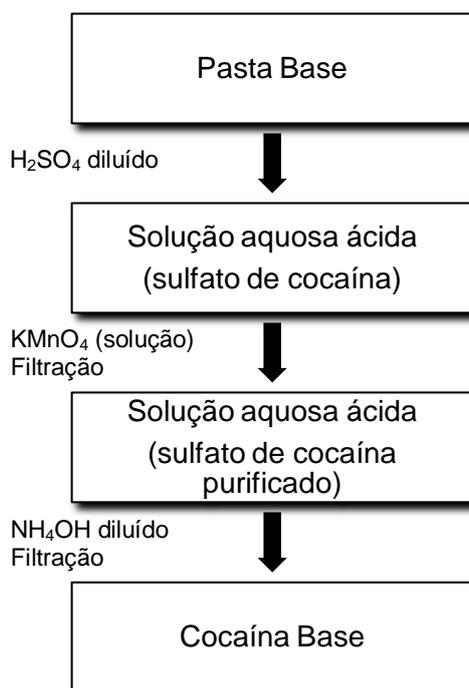
Algumas propriedades da cocaína, tanto na forma de base quanto como cloridrato, tornam a cromatografia gasosa uma técnica adequada para a sua quantificação, visto que as duas formas de apresentação são solúveis em solventes utilizados na técnica (clorofórmio e metanol) e ambas tem ponto de fusão e ebulição considerados adequados para a cromatografia a gás. Mas outras técnicas também são utilizadas para esse tipo de análise.

Campanella et al²³ utilizaram a cromatografia líquida para determinar o teor de cocaína. Já Piñero e Casale²⁴ escolheram a cromatografia gasosa fazendo uso de dois tipos de detecção, a espectrometria de massas e a ionização por chama.

3.4. Determinação de Cis e Trans-Cinamoilcocaínas

Moore²⁵, em 1973, identificou a presença dos alcalóides cis e trans-cinamoilcocaínas como um dos principais alcalóides presentes nas folhas de coca. A partir de então vários trabalhos sobre alcalóides minoritários vem sendo publicados na literatura, até que em 2006 começaram a relacionar o teor de cis e trans-cinamoilcocaínas existente em amostras de cocaína com o grau de oxidação da droga, ou seja, com processos de refino pela qual a droga passou.²⁴

Quando a droga passa pelo processo de oxidação, as cinamoilcocaínas são retiradas da mistura e com isso essa droga fica mais pura. Essa oxidação é um dos principais métodos de refino em que a cocaína é submetida. A oxidação é feita normalmente seguindo o esquema:



O grau de oxidação da droga é dado pela razão do teor de cinamoilcocaína total na amostra (cis+trans) pelo teor de cocaína. Se o resultado obtido for <2%, diz-se que a droga está muito oxidada. Resultados entre 2% e 6% indica que ela está

moderadamente oxidada, enquanto uma razão acima de 6% mostra que a droga foi pouco oxidada.

3.5. Adulterantes e Diluentes

Para aumentar a margem de lucro, os narcotraficantes adicionam diversas substâncias à cocaína, aumentando assim a sua massa. Essas substâncias são os diluentes da droga.

Alguns desses diluentes porém, além do objetivo de aumentar a massa, possuem também efeitos farmacológicos, que podem potencializar ou mimetizar algum dos efeitos da cocaína no usuário. Esses são chamados de adulterantes da droga.

Os adulterantes atualmente mais utilizados por traficantes, e por isso selecionados para este estudo, sendo que alguns já foram alvo de estudos,²⁶ foram Benzocaína, Cafeína, Fenacetina, Lidocaína, Hidroxizina, Levamisol, Diltiazem e Procaína. A quantificação desses adulterantes é um objetivo do PeQui, sendo que este trabalho forneceu alternativas ainda não satisfatoriamente validadas.

3.6. Validação

O principal objetivo da validação é demonstrar a confiabilidade de um método específico para a determinação da concentração de determinado analito numa matriz específica, nesse caso a cocaína. A confiabilidade dos resultados analíticos é uma questão de grande importância na área forense, assim como é, naturalmente, um pré-requisito para a correta interpretação dos resultados. Para a polícia, é ainda mais essencial, pois, resultados não confiáveis podem ser contestados na justiça, bem com também podem levar a condenações equivocadas de réus.²⁷

A validação analítica compreende a determinação de várias figuras de mérito, tais como: exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, intervalo ou faixa dinâmica e robustez²⁸.

Na tabela 1 são descritas, de acordo com laboratórios e órgãos regulamentadores do Brasil e de alguns outros países, quais figuras de mérito

seriam necessárias para a quantificação de alcalóides, como a cocaína, por cromatografia.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados pelos principais institutos para validação de métodos analíticos quantitativos.

Parâmetros	USP ²⁹	EURACHEM ³⁰	ICH ³¹	ANVISA ³²
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim
Precisão(sistema)	Sim	Sim	Sim	Sim
Precisão(método)	Sim	Sim	Sim	Sim
Exatidão	Sim	Sim	Sim	Sim
LD	Não	Sim	Não	Não
LQ	Não	Sim	Sim	Não
Linearidade	Sim	Sim	Sim	Sim
Intervalo	Sim	Sim	Sim	Sim
Robustez	Sim	Sim	*	Sim

[*] Não especificado.

USP (*United States Pharmacopeia*); ICH (*International Conference on Harmonisation*); ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária);

Para cada figura de mérito existem diferentes maneiras para se chegar ao resultado final. O detalhamento de como foram realizados os experimentos para esta etapa do trabalho está descrito no protocolo de validação (Apêndice 1). A seguir, será descrito os exemplos de validação para amostras equivalentes disponíveis na literatura.

3.6.1. Seletividade

Seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Loda et al.³³ quantificaram princípios ativos farmacêuticos por GC-MS e avaliaram a seletividade do seu método fazendo diversas análises e tentando observar visualmente a presença de picos estranhos aos esperados.

3.6.2. Precisão

Precisão é o grau de concordância entre os resultados calculados em termos de concentração da amostra ao fazer várias análises de uma mesma amostra, nas

mesmas condições de preparação e de análise.³⁴ Neste estudo será discutida a precisão em um único dia (repetibilidade do sistema) assim como a precisão em dias consecutivos (reprodutibilidade do sistema).

Hooff et al.³⁵ determinou a precisão analisando, por três vezes, quatro replicatas com as amostras e a curva analítica preparadas no momento da análise (repetitividade), repetindo esse procedimento por três dias consecutivos utilizando a mesma curva do primeiro dia (precisão inter dias) para quantificações em cromatografia líquida. Para determinar em cromatografia gasosa, em outro trabalho³⁶ foram realizados os mesmos testes em três dias consecutivos mas, em cinco níveis de concentração.

3.6.3. Exatidão

Exatidão pode ser definida como o quão próximo o valor obtido nas análises está de um valor considerado como verdadeiro.³⁷

Para a determinação da exatidão Swarts et al.³⁸ realizou dois ensaios: no primeiro, seis amostras foram preparadas de modo idêntico e determinou-se a concentração de cada e as comparou com o valor real para, assim, ser avaliada a exatidão do método completo. No segundo ensaio, apenas uma solução foi preparada e analisada por seis vezes consecutivas. Dessa forma, pôde-se avaliar a exatidão do equipamento.³⁸

Nesse trabalho foi feito um teste semelhante ao segundo ensaio do artigo citado, porém Swarts realizou o teste em apenas um ponto da curva. No presente trabalho, o ensaio foi feito nos três pontos principais da curva: o ponto central e as extremidades

3.6.4. Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção é definido como a menor concentração em que o analito pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. O LD pode ser calculado de diferentes maneiras.³⁹

Soncin et al.⁴⁰ calcularam o LD fazendo diluições sucessivas até que se atingisse uma relação entre o sinal do analito e o maior ruído próximo de 3:1. A

forma utilizada nesse trabalho foi a mesma utilizada por Mol et al.,⁴¹ que fez diluições sucessivas até não se ter a certeza visual de qual era o pico do seu analito.

3.6.5. Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração em que o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão adequados.⁴²

O LQ também pode ser calculado por diluições sucessivas observando a relação sinal-ruído, nesse caso essa relação deve ser 10:1.⁴³

Quando se tem o LD calculado, uma forma mais rápida e igualmente confiável é fazer uma relação em que o LQ é três vezes o valor do LD. Esse foi o procedimento utilizado neste trabalho.

3.6.6. Linearidade e Faixa de trabalho

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.⁴²

Para determinar a linearidade a partir de uma curva analítica, calcula-se o coeficiente de correlação (r) e, elevando esse valor ao quadrado, obtém-se o coeficiente de determinação (R^2) da curva analítica. Quanto mais próximo de 1, melhor será a linearidade.

Dinis-Oliveira et al.,⁴⁴ em um estudo também relacionado à quantificação de cocaína, trabalharam com um intervalo em termos de concentração de 0,25 a 10 ng de cocaína por miligrama de amostra e obtiveram R^2 de 0,999. A realidade das apreensões de cocaína utilizadas para a realização deste trabalho apresenta uma variabilidade muito grande no teor de cocaína das amostras e, portanto, nesse projeto a faixa de trabalho vai de 1 a 100% (m/m) de cocaína na amostra.

3.6.7. Robustez

Robustez é a flutuação dos resultados apresentados pelo método frente a pequenas variações que poderão ocorrer durante a rotina das análises.⁴²

Price et al.⁴⁵ variaram em seus ensaios a temperatura e o fabricante de alguns dos materiais utilizados em seu trabalho, pois esses seriam os parâmetros

que poderiam ser modificados durante a rotina. A vantagem de variar parâmetros durante a validação está no fato de que não se torna necessária uma nova e completa validação a cada mudança laboratorial.

Com a revisão da literatura completa, os materiais e a metodologia utilizados para realizar o trabalho serão descritas para depois apresentar os resultados obtidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Encontram-se descritos, logo abaixo, os equipamentos necessários para a realização deste trabalho, além de amostras, reagentes, padrões, bem como a descrição do método utilizado.

4.1. Materiais

4.1.1. Equipamentos, vidrarias e acessórios

- **GC-FID:** Cromatógrafo Gasoso Agilent Technologies® 6890N, Detector por Ionização em Chama, injetor tipo *split/splitless*, amostrador automático Agilent Technologies 7693. O sistema cromatográfico foi acoplado a um microcomputador e controlado com uso do *software* MSD Chem Station, versão E.02.01.1177. Os dados foram analisados com auxílio do *software* Enhanced Data Analysis, ambos da Agilent Technologies®. Foi utilizada coluna para GC DB1-MS (25 m x 0,20 mm, filme 0,33 µm de Polidimetilsiloxano), Agilent Technologies®;
- Balança analítica XP 205, capacidade máxima 220 g, 0,01 mg, Mettler Toledo®;
- Balões volumétricos em vidro borossilicato de 5, 10, 25, 50 e 1000 mL, Pyrex®;
- Banho de ultra-som Branson 1510, Branson®;
- *Erlenmeyers* em vidro incolor de 25 mL;
- Frascos incolores de vidro com capacidade de 1,8 mL lacráveis, sem inscrições, Wheaton, tampas tipo lacre com septos de teflon/borracha Sun Srⁱ®;
- Pipeta automática Discovery +, com capacidade de 1 a 10 mL, High Tech Lab – PZ HTL®;
- Pipeta automática Discovery +, com capacidade de 1 a 5 mL, High Tech Lab – PZ HTL®;
- Pipeta automática P100, com capacidade de 20 a 100 µL, Pipetman, Gilson®;
- Pipeta automática P1000, com capacidade de 200 a 1000 µL, Pipetman, Gilson®;

- Seringa de vidro com capacidade para 1 mL, Hamilton[®];
- Espátula pequena;
- Seringas de plástico descartáveis com capacidade para 3 mL, Injex[®];

4.1.2. Solvente

- Clorofórmio, grau de pureza adequado à cromatografia líquida, Tedia.

4.1.3. Reagentes

- Dietilamina 99%, Acros Organics.

4.1.4. Padrões

- 2,2,2-trifenilacetofenona 99%, Acros Organics;
- Dipentilftalato 97%, Acros Organics;
- Benzocaína 99,9%, Fluka;
- Cafeína 98,5%, Acros Organics;
- Cloridrato de lidocaína mono-hidratado, Sigma;
- Cloridrato de procaína $\geq 97\%$, Sigma;
- Cloridrato de tetramisol (levamisol), Sigma;
- Cloridrato de diltiazem $> 99\%$, Sigma;
- Dicloridrato de hidroxizina ≥ 98 , Sigma;
- Fenacetina 99,9%, TCI-EP;
- Padrão de cloridrato de cocaína (RTI-DEA), contendo teores de cis e trans-cinamoilcocaína 3,10% (m/m) e 82,13% de cocaína, *Special Testing & Research Laboratory do Drug Enforcement Administration (DEA)*;

4.1.5. Amostras de cocaína

No presente trabalho foram analisadas 304 amostras de cocaína apreendidas no período compreendido entre os anos de 2009 e 2011. Dessas 242

foram provenientes de apreensões realizadas pela Polícia Federal e encaminhadas pelos Setores Técnico-Científicos (SETEC) das Superintendências Regionais da PF nos estados do Acre (34), Amazonas (2), Distrito Federal (31), Mato Grosso (21), Mato Grosso do Sul (5), Minas Gerais (15), Paraná (66), Pernambuco (25), Rondônia (11), São Paulo (23) e mais 9 amostras com procedências não informadas. As outras 62 amostras foram cedidas pela Polícia Civil do estado do Acre (20) e do Distrito Federal (42).

Encontra-se no Apêndice 2 tabela contendo resultados das análises químicas realizadas neste projeto com dados da identidade das amostras, estado de origem da droga, teor de cocaína, oxidação e adulterantes.

Todas as amostras de cocaína foram homogeneizadas antes das análises, com auxílio de almofariz e pistilo de vidro, sendo que para as amostras de cocaína na forma de base livre foi utilizado nitrogênio líquido para aumentar a eficiência do processo uma vez que essa forma de apresentação é muito higroscópica. Sem o auxílio do nitrogênio, a homogeneização estaria comprometida.

4.2. Método

Neste trabalho, as amostras de cocaína sofreram três diferentes tratamentos: 1- a quantificação do principal alcalóide (cocaína), visando apontar a qualidade da droga; 2- a razão entre cis e trans-cinamoilcocaínas totais e a cocaína, o que revela o grau de oxidação da droga e, portanto, quão refinada está a droga; 3- a identificação dos principais adulterantes, fornecendo indícios sobre os processos de refino da droga.

Para realizar essas análises em amostras reais foi utilizada a técnica de Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama (do inglês, GC-FID). Por meio dessa técnica foi possível quantificar os teores dos alcalóides cis e trans-cinamoilcocaína e identificar a presença dos adulterantes benzocaína, cafeína, diltiazem, fenacetina, hidroxizina, lidocaína, levamisol, e procaína.

A característica mais importante que nos levou a escolher esse sistema foi o fato de esse detector ter extrema facilidade de manuseio e pouquíssima manutenção, pois ele é auto-limpante e muito robusto. Para um projeto que visa

instalar vários equipamentos em diferentes lugares do país, inclusive em locais com grande dificuldade de acesso, um equipamento que trabalhe por muito tempo sem necessidade de manutenção pode significar ganho de tempo e, conseqüentemente, economia financeira.

4.2.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas, assim como todo o método analítico, utilizadas previamente a este trabalho pela PF eram idênticas as do DEA (*Drug Enforcement Administration*). Essa metodologia porém era utilizada apenas para determinar qualitativamente e não para quantificar os analitos de interesse. Com as mudanças no preparo da amostra (mudança de solvente e padrões internos), as condições necessitaram ser otimizadas.

A temperatura do forno foi programada inicialmente a 150 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 min, quando teve início a rampa de aquecimento de 40 °C/min até atingir 315 °C e permanecendo nesta temperatura por mais 3,87 min, somando 9,99 minutos de tempo total. Gás Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min. O injetor foi mantido a 280 °C, com injeção de 1,0 µL de amostra com razão de split 50:1. O detector por ionização em chama (FID) foi mantido a uma temperatura de 320 °C, com fluxo de hidrogênio (H₂) de 60 mL/min, fluxo de ar sintético de 350 mL/min e fluxo de nitrogênio (N₂) de 35 mL/min.

4.2.2. Preparação das curvas analíticas

Como o conjunto de amostras analisadas foi grande, necessitou-se de uma faixa de trabalho extensa para incluir todas essas amostras. A faixa de trabalho foi de 1 a 100% de cocaína na amostra e, para que isso acontecesse, as concentrações dos 8 pontos da curva analítica foram de 0,008 mg/mL até 0,805 mg/mL. A descrição detalhada de como foi construída a curva e os equipamentos que foram utilizados estão no procedimento de operação padrão 01 (POP 01) contido no Apêndice 3.

4.2.3. Análise das amostras selecionadas por GC-FID

Após a homogeneização, foram transferidos entre 8 e 9 mg das amostras de cocaína para *erlenmeyers* de 25 mL. Depois, foram adicionados 10 mL de solução de 0,051 mg/mL de 2,2,2-trifenil-acetofenona, 0,4901 mg/mL de dipentil-ftalato, e 3% (v/v) de dietilamina em clorofórmio. Os dois primeiros reagentes são os padrões internos e o último foi adicionado para basificar a solução e garantir a completa dissolução da amostra. Em seguida, procedeu-se leve agitação manual da solução e foi transferido cerca de 1 mL dessa solução para frascos de vidro de 1,8 mL, que foram lacrados e colocados na bandeja do injetor automático do GC-FID. A descrição completa do procedimento de análise assim como o detalhamento do processo de produção da solução de PI encontram-se no Apêndice 2 nos POPs 2 e 3.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os dados apresentados a seguir descrevem as etapas de otimização e validação da metodologia, seguidas pelos resultados quantitativos dos alcaloides investigados em amostras reais.

5.1. Otimização

Antes de iniciar o projeto PeQui, a Polícia Federal do Brasil se preocupava apenas em identificar a presença ou não de produtos proibidos nas amostras apreendidas. A partir do projeto e possuindo a necessidade de fazer avaliações quantitativas, essas análises se tornaram mais complexas e mais sensíveis a pequenas variações e erros cometidos no laboratório.

Por esse motivo, antes mesmo de otimizar o método propriamente dito, foi otimizada a rotina laboratorial. Essa otimização consistiu na melhoria e na padronização das limpezas do equipamento e de suas partes, tais como seringas, assim como nas trocas de consumíveis e soluções.

5.1.1. Rotina Laboratorial

Na rotina anterior a lavagem e troca das seringas cromatográficas eram insatisfatórias. Isso acarretava acúmulo de sujeira, contaminando as amostras com analitos de análises anteriores. Esse contágio produzia picos estranhos no cromatograma e mudava a concentração dos analitos, embora esses erros não fossem importantes para os resultados esperados naquele momento.

Com a nova necessidade analítica, o pico estranho pode dar a falsa impressão da presença de algum adulterante e/ou a quantificação dos alcalóides pode ficar comprometida. Para solucionar esta etapa, um POP foi produzido descrevendo a forma correta de se lavar tanto a seringa como também o local onde ela é armazenada no injetor. Nele também foi instituída uma rotina de trocas periódicas das seringas a cada 200 injeções. O Cromatógrafo Gasoso Agilent Technologies® 6890N controla a quantidade de análises feitas, podendo esse contador ser zerado a cada troca. Além disso, uma ata de cada equipamento foi

disponibilizada no laboratório e nela encontra-se descrita a data de cada troca periódica e a quantidade de análises que foram feitas com aquela seringa desde então.

Essa troca poderá ser feita antes das 200 injeções, se os problemas descritos começarem a aparecer antes da quantidade definida. Isso também deverá ser descrito na ata do equipamento.

A rotina de troca também incluiu dois consumíveis importantes para a qualidade da análise, o septo e o *liner*. O septo tem a função de garantir a entrada da amostra sem prejuízo à pressão e o *liner* tem a função de filtrar a amostra e encaminha-la até a coluna. Ambos podem acumular sujeiras com o uso e podem prover os mesmos erros já descritos para a seringa. Também para esses consumíveis foi definido um número máximo de 200 análises. Na rotina anterior, esses consumíveis, eram trocados apenas quando se percebia picos indesejados no branco da análise. Historicamente, através dos registros da ata essas trocas eram feitas sempre acima de 200 injeções. Por esse motivo, o número 200 foi selecionado como o número máximo de injeções com o mesmo septo e *liner*.

5.1.2. Preparo da Amostra

O método de análise, desde a preparação da amostra até as condições cromatográficas, passando pela escolha do equipamento, foram adaptadas para a necessidade do Brasil a partir do método utilizado pelo DEA.²⁴

A primeira grande mudança está no preparo da amostra, ao escolhermos o padrão interno para quantificação. Padrão Interno (PI) é uma substância usada em procedimentos analíticos para corrigir variações do aparelho ou na amostra que geram erros aleatórios ou sistemáticos.⁴⁶

A resposta do aparelho então é dada pela relação entre a área do analito e a área do padrão interno. Com isso, para cada variação ocorrida durante a análise, o erro será corrigido quando se fizer a relação dos dois. Para que esses dois erros sejam cancelados, tanto o analito quanto o padrão interno precisam “sentir” de forma semelhante essa variação e, para que isso aconteça, é importante que o padrão interno elua em um tempo de retenção próximo ao analito, a fim de que a variação

aconteça ao mesmo tempo nos dois, e que o PI tenha concentração próxima à do analito.

A necessidade de ter as concentrações de analito e PI próximas entre si torna importante o uso de dois padrões internos, pois a concentração da cocaína é sempre muito diferente da concentração dos outros analitos. Com isso, necessita-se de um PI para a cocaína e de outro para os demais analitos, ao contrário do DEA que, por fazer apenas a quantificação da cocaína, precisou de apenas um.

Quanto mais próximas são as estruturas, mais próximas serão suas reações frente a uma determinada variação e, por isso, um bom padrão interno tem a estrutura parecida com a do analito. O DEA utiliza para esse fim a isopropilcocaína, que tem estrutura muito semelhante à da cocaína. Eles a produzem no próprio laboratório, partindo de um padrão puro de cocaína. A estrutura da isopropilcocaína e as rotas de síntese utilizadas para a sua obtenção estão na figura 2.

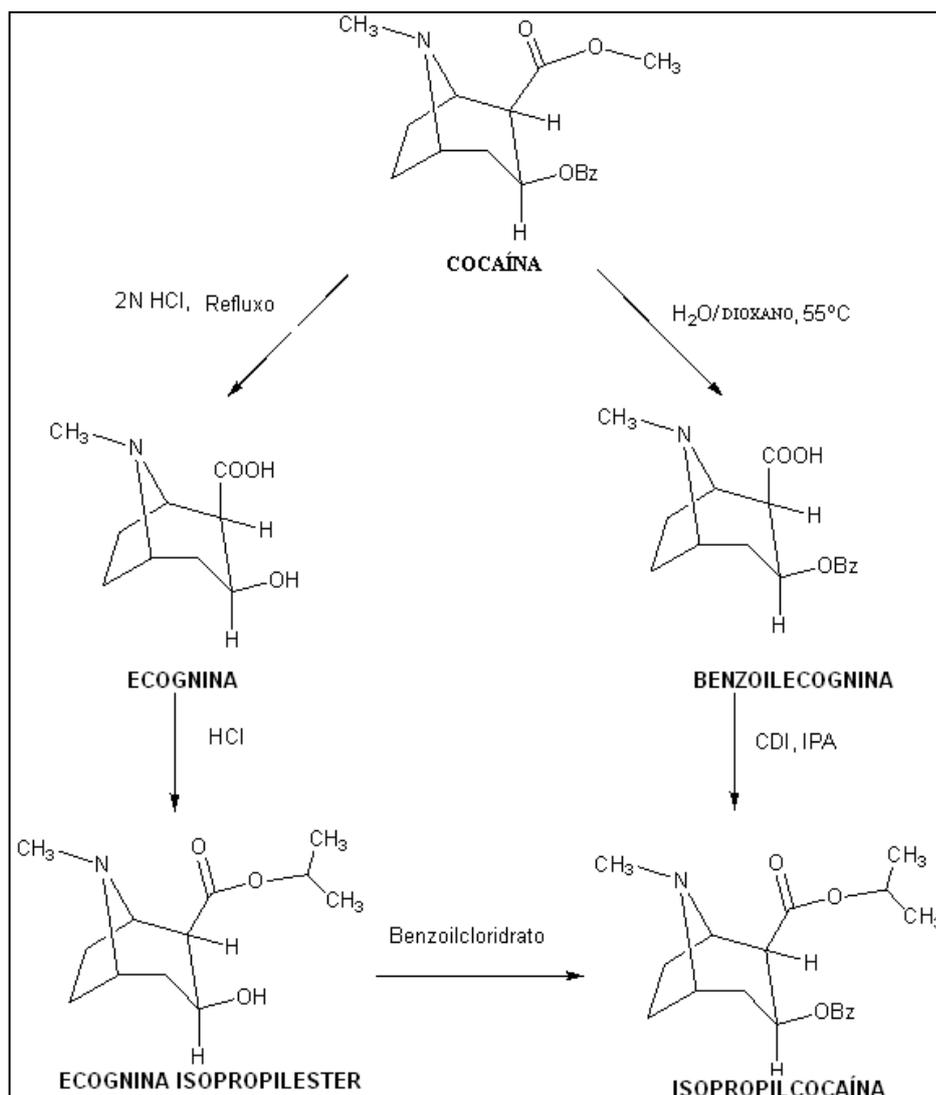


Figura 2 – Rotas de síntese para a produção da Isopropilcocaína a partir do padrão de cocaína.²⁴

No entanto, esse procedimento é inviável para a PF do Brasil devido à dificuldade de se obter padrões puros de cocaína.

No laboratório da PF, estiveram à disposição sete substâncias que poderiam ser utilizadas para esse fim. A escolha foi feita utilizando os dois critérios já comentados (tempo de retenção e estruturas próximas).

A tabela 2 mostra as substâncias que foram disponibilizadas para a escolha do padrão interno e algumas propriedades utilizadas na escolha de cada um dos padrões internos.

Tabela 2 – Substâncias disponibilizadas pelo laboratório para serem utilizadas como Padrão Interno.

Padrão Interno	Tempo de retenção (minutos)	Fórmula Molecular	Estado Físico (25 °C)
n-Heneicosano	6,041	C ₂₁ H ₄₄	Sólido
2,2,2-Trifenilacetofenona	8,007	C ₂₆ H ₂₀ O	Sólido
β-Benzopinacolona	7,998	C ₂₆ H ₂₀ O	Sólido
n-Tridecano	3,256	C ₁₃ H ₂₈	Líquido
n-Docosano	6,279	C ₂₂ H ₄₆	Sólido
Dodecano	2,755	C ₁₂ H ₂₆	Líquido
Dipentilftalato	6,245	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	Líquido

A cocaína elui em um tempo próximo a 6,362 minutos, o que torna necessário o uso de uma substância com tempo de retenção (TR) próximo. De acordo com a tabela 2, as substâncias n-heneicosano, n-docosano e dipentilftalato poderiam ser boas escolhas pelo critério do TR. Para escolher qual dessas três seria utilizada, foi necessário observar o segundo critério, que é a proximidade das estruturas.

Na figura 3 estão mostradas as estruturas moleculares desses três PI citados acima e também a estrutura da cocaína.

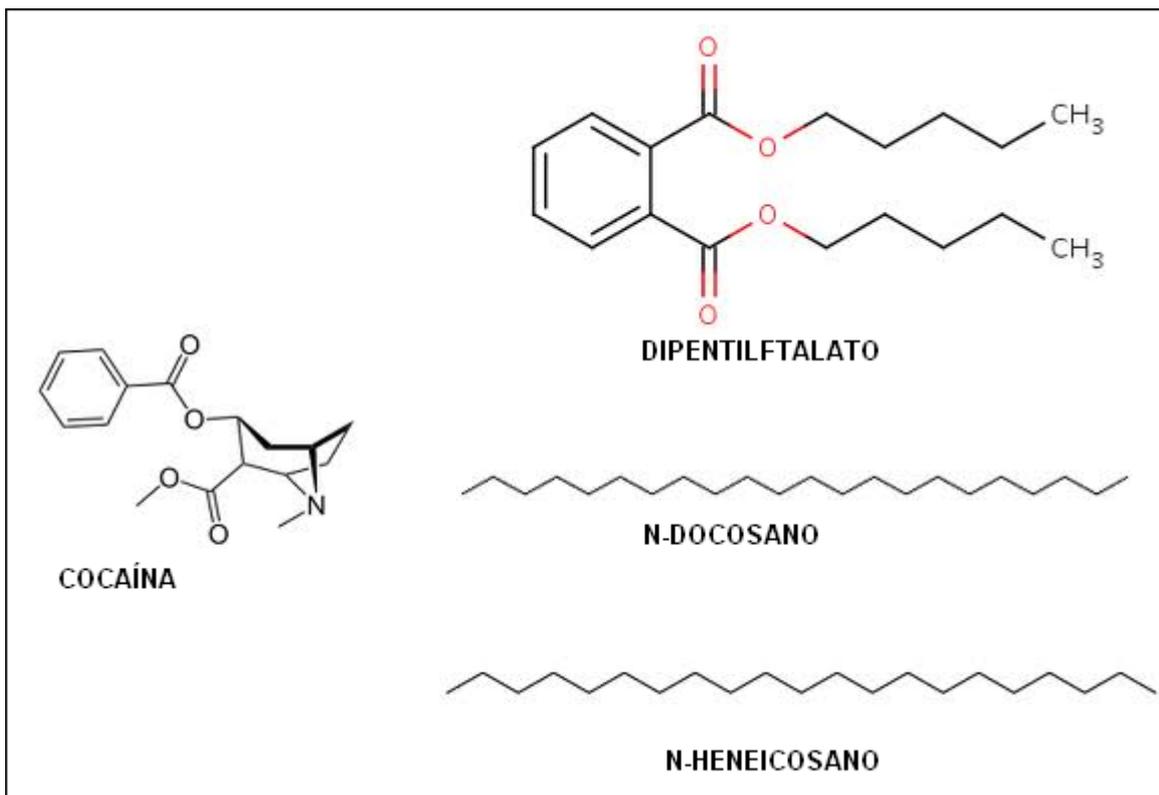


Figura 3 – Estrutura molecular da cocaína e dos padrões internos Dipentilftalato, n-Docosano e n-Heneicosano.

Pode-se observar que nenhuma das estruturas é tão parecida com a cocaína quanto a utilizada no método padrão, porém, entre as três, a melhor escolha é o dipentilftalato.

A estrutura contendo cadeia aromática e a presença de oxigênio é muito importante, pois estas estruturas terão de interagir com as fases móvel e estacionária da coluna. Assim, a estrutura do dipentilftalato interagirá de forma mais semelhante à cocaína do que as outras estruturas e, com isso, sofrerá igualmente as modificações temporais.

A escolha do segundo padrão interno teve critérios diferentes, já que ele serviria para todos os outros analitos. Com isso, tanto os tempos de retenção quanto as estruturas são variadas. Portanto, o critério utilizado foi a praticidade para a análise rotineira.

Na tabela 2 estão descritas outras seis substâncias a serem escolhidas. O primeiro critério utilizado para a escolha do segundo padrão interno foi o estado físico de cada uma e foram, portanto, eliminadas as substâncias líquidas, pois elas

trariam mais dificuldades de reprodutibilidade na hora da pesagem, já que soluções de padrão interno devem ser preparadas sempre com concentrações iguais. Tendo então excluído os padrões líquidos, a escolha foi pela substância 222-trifenilacetofenona por ser a mais abundante no laboratório. Além disso, para uma rotina que inclui várias análises em muitos laboratórios, a quantidade de cada produto utilizado é importante para que o trabalho não seja interrompido por falta de algum desses produtos.

A preparação das soluções a serem analisadas também foi parâmetro otimizado. Os procedimentos completos de preparação da solução de PI e da preparação da amostra estão no apêndice 3.

No método original utilizava-se para a preparação da amostra 18 a 20 mg de cocaína em 20 mL de clorofórmio contendo 50 µL de dietilamina acrescido de 5 mL de solução de PI em concentração 0,9 mg/mL. Com a sua adição da dietilamina, todos os analitos serão eluídos no formato de base livre, método mais comum na literatura, tornando a comparação analítica dos resultados deste trabalho com os da literatura mais simples.

No escopo do Projeto PeQui, ficou estabelecido que, para qualquer apreensão de mais de 5 Kg de cocaína pela PF, uma fração da amostra seria disponibilizada para as análises quantitativas. Considerando a experiência prévia da PF na disponibilização por parte dos estados dessas amostras, e da necessidade de armazenar contra-provas, a massa inicial de 18 a 20 mg de amostra poderia inviabilizar algumas dessas análises. Para resolver esse problema, a quantidade pesada das amostras foi diminuída para 8 a 9 mg. Essa massa deve ser dissolvida em 10 mL de solução já contendo clorofórmio, PI e dietilamina. Por outro lado, a concentração da dietilamina foi aumentada para 3 mL/L, a fim de garantir que possíveis adulterantes na forma de sais também sejam basificados.

5.1.3. Otimização dos Parâmetros do Cromatógrafo

O cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chamas, modelo Agilent Technologies 7693, utilizado neste trabalho, assim como os que serão utilizados nas análises futuras em todos os laboratórios, têm a mesma especificação do utilizado pelo DEA. O software desse equipamento deve ser ajustado para os

parâmetros do injetor, forno de aquecimento e detector, visando a otimização do método analítico.

Um dos principais parâmetros que interfere na sensibilidade do método é o volume de amostra a ser injetado, assim como a taxa de *split*. Inicialmente, a PF estava trabalhando com a injeção de 2,0 microlitros, mas essa quantidade acarretou problemas de saturação de amostra na entrada da coluna e, com isso, a curva analítica da cocaína apresentava uma baixa linearidade, principalmente nas maiores concentrações, como mostrado na figura 4.

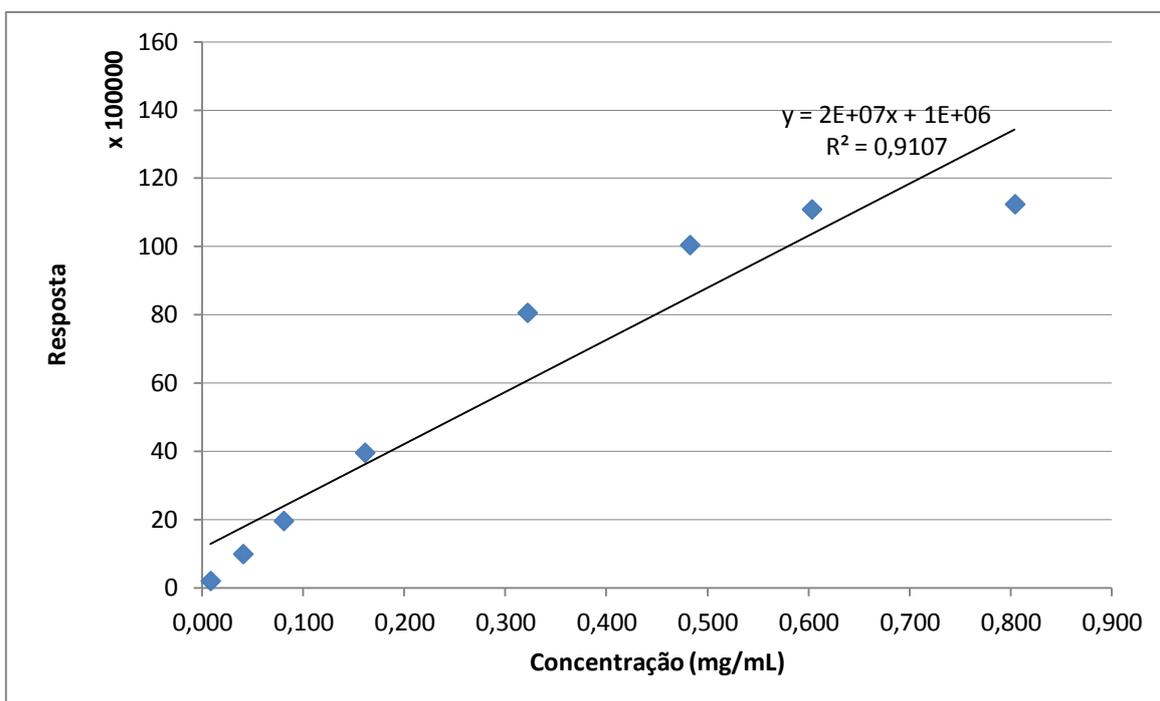


Figura 4 – Curva de calibração da cocaína com volume de amostra injetado de 2,0 µL.

Essa saturação não ocorre nas análises do DEA, pois os padrões injetados contêm apenas os alcaloides da própria cocaína, enquanto nos padrões brasileiros também estão presentes os diluentes e adulterantes. A otimização foi feita diminuindo o volume de injeção para 1,0 µL e observando a linearidade das curvas preparadas com esse volume. A figura 5 representa uma dessas curvas já otimizada e mostra que a mudança surtiu os efeitos esperados. Portanto, esse volume foi mantido.

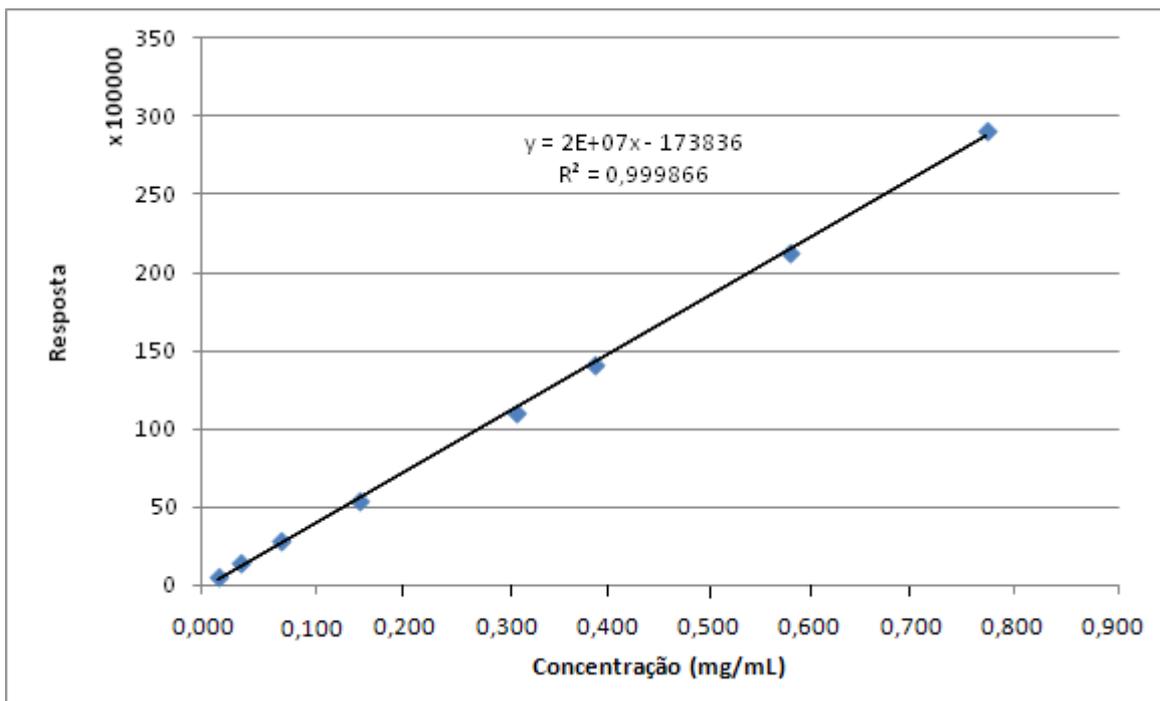


Figura 5 – Curva de calibração da cocaína com volume de amostra injetado de 1,0 μ L.

A diminuição da quantidade de amostra injetada também foi obtida com o aumento do descarte da amostra (taxa de split), de 25:1 para 50:1. Isso significa que anteriormente, a cada injeção de amostra, 24 partes eram descartadas e 1 parte realmente entrava na coluna. Nesse novo cenário, a relação mudou para 49 partes descartadas a cada parte injetada. Esse parâmetro foi modificado com o volume de injeção, de forma a evitar a saturação do injetor e assim obter uma curva como a da figura 5.

O outro parâmetro otimizado foi o número de lavagem da seringa antes e depois da injeção. Este número foi determinado como 5, para garantir uma máxima limpeza da seringa. Como solvente de lavagem da seringa foi mantido o clorofórmio, que demonstrou bons resultados (ausência de picos no branco) após a otimização do número de lavagens.

Ainda com relação à injeção, mas considerando os parâmetros do injetor, na tabela 3 estão descritos os valores otimizados para cada parâmetro.

Tabela 3 – Parâmetros do injetor e seus valores otimizados.

PARÂMETROS	VALOR
Temperatura	280 °C
Pressão	27,93 psi
Fluxo Total	53,7 mL/min
Taxa de Descarte	50:1

A temperatura e a pressão do injetor são importantes, pois devem ser altas o suficiente para vaporizar toda a amostra injetada, mas não tão altas a ponto de decompor termicamente algum analito. Em ambos os casos, se não houver esse controle, a concentração injetada será diferente da esperada e, assim, a quantificação estará comprometida. Os testes de precisão e exatidão foram feitos mantendo-se os valores iniciais de temperatura e pressão e, como não houve comprometimento desses resultados, os valores de 280 °C e 27,93 psi foram mantidos.

O fluxo total do gás de arraste é importante para que a injeção da amostra seja feita de forma rápida e completa. A rapidez é importante para que parte da amostra não chegue antes à coluna e assim elua porções separadas da mesma substância, e deve ser completa para garantir a exatidão da análise. Como já foi dito, os testes de exatidão não apresentaram problemas, portanto o fluxo do gás de arraste também foi mantido.

Com relação ao injetor, a única modificação realizada foi o descarte da amostra (razão de *split*) que teve que ser aumentada de 25:1 para 50:1 e as diferenças já foram mostradas nas figuras 4 e 5.

Os parâmetros do forno de aquecimento da coluna são essenciais para a separação entre os analitos de interesse. No método utilizado pelo DEA, a coluna é mantida a temperatura constante de 250°C durante 7 minutos. Essa isoterma é suficiente, pois apenas dois analitos com estrutura muito parecidas (cocaína e isopropilcocaína) são analisados. No caso das análises brasileiras uma rampa teve de ser utilizada para garantir a completa eluição e separação de cada analito. A rampa otimizada está descrita na tabela 4.

Tabela 4 – Rampa de aquecimento otimizada.

Rampa de aquecimento		Isoterma
Temperatura inicial	150 °C	2,00 minutos
Aquecimento	35 °C/min	
Temperatura final	315 °C	3,87 minutos
Tempo total	9,99 minutos	

Nas condições apresentadas na tabela 4, todos os analitos, inclusive os adulterantes, são eficientemente separados numa corrida cromatográfica de 10 minutos, tempo baixo o suficiente para ser implementada em rotina.

Os parâmetros do detector também foram alterados. No FID, os parâmetros controláveis são a temperatura e o fluxo dos gases (H₂ e ar sintético). A temperatura tem de ser alta o suficiente para queimar a amostra e, com a ajuda dos gases comburente e combustível formar íons e gerar sinais que são coletados por um eletrodo. A corrente gerada é convertida em voltagem, amplificada, captada pelo registrador e enviada para o computador. O fluxo dos gases foram mantidos constantes e a temperatura foi otimizada em 320°C. Os parâmetros com os resultados finais estão na mostrados tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros do detector.

Detector	
Temperatura	320 °C
Fluxo de H ₂ (comburente)	35,0 mL/min
Fluxo de Ar Sintético (combustível)	350 mL/min

No método original a temperatura do detector é fixada em 280 °C, já que a amostra elui da coluna a 250 °C. No caso do método otimizado, a temperatura final da coluna é de 315 °C e, portanto, o detector precisa estar mais quente. O próprio *software* aceita uma temperatura máxima de 350 °C, sendo essa a temperatura inicialmente escolhida e que gerou bons resultados. No entanto, visando não sobrecarregar o equipamento ao trabalhar na temperatura máxima, uma nova tentativa foi feita, mantendo a temperatura a 320 °C. Nos testes de exatidão e precisão essa temperatura se mostrou eficiente e, portanto, foi mantida.

Com o novo método pronto e todos os parâmetros fixados, o trabalho foi continuado através da realização das etapas de validação analítica.

5.2. Validação do método

Para a etapa de validação do novo método, foi produzido um protocolo que está em anexo no apêndice 1. Esse protocolo segue as regras e instruções de órgãos regulamentadores,⁴⁷⁻⁵⁰ informações descritas na literatura^{51,52} e orientações obtidas numa consultoria realizada na PF com este objetivo.⁵³

Para validar o método de quantificação dos principais alcaloides é necessário avaliar todas as figuras de mérito descritas anteriormente. Para validar a determinação qualitativa dos adulterantes são necessários apenas a seletividade e o limite de detecção de acordo com os mesmos órgãos citados.

Para cada parâmetro avaliado, existe um critério de aceitação adequado que também está especificado no protocolo de validação em anexo.

A seguir serão mostrados e comentados de acordo com cada critério de aceitação, os resultados das figuras de mérito separadamente.

Como já foi dito, o parâmetro de seletividade indica se o método consegue separar cada analito de interesse sem haver coeluições entre eles. Para tal, foi produzida em laboratório uma amostra contendo todos os analitos a serem investigados. A determinação foi feita em triplicata e um dos resultados está mostrado na figura 6.

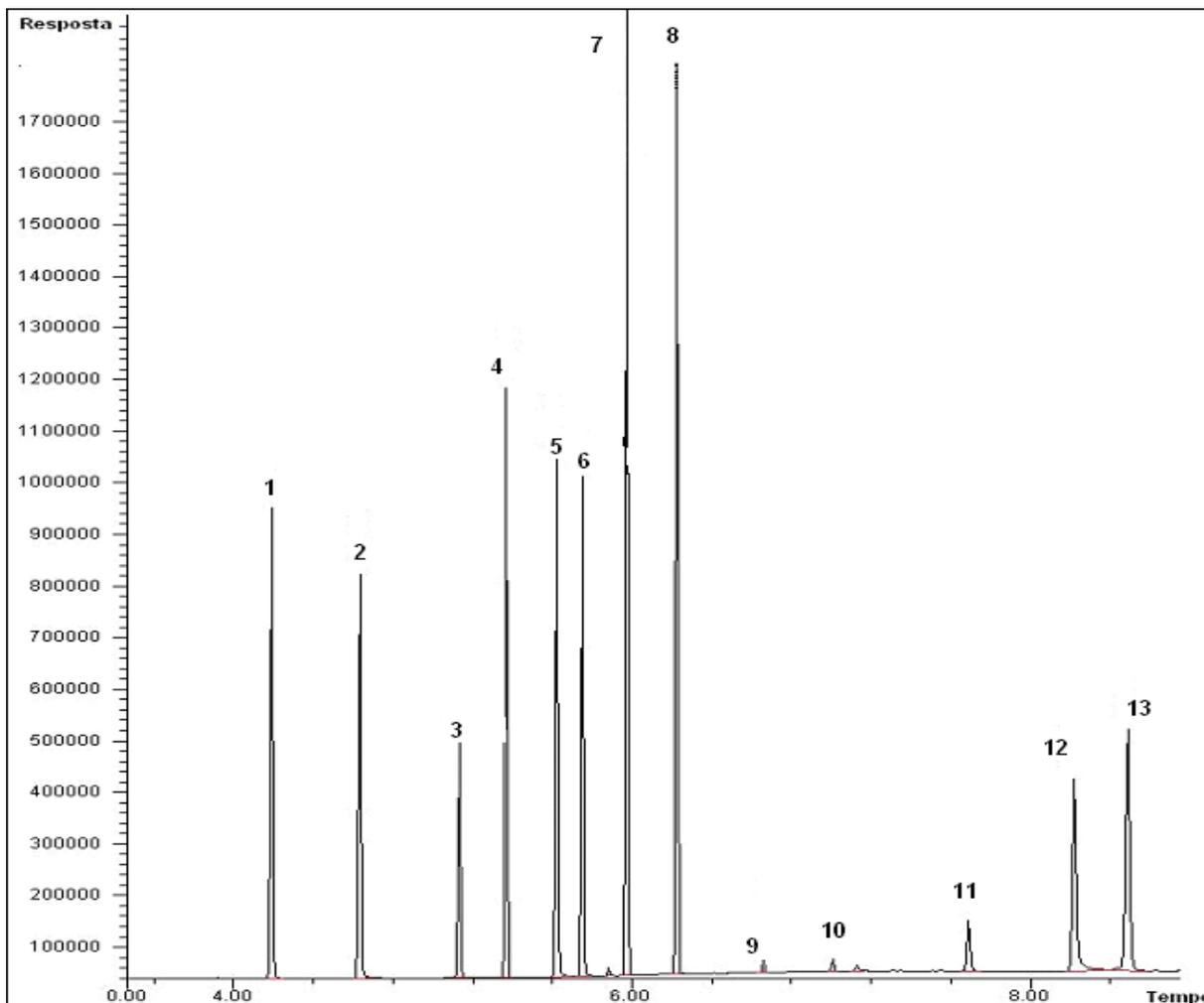


Figura 6 – Cromatograma com o resultado do teste de seletividade.

1-Benzocaína; 2-Fenacetina; 3-Cafeína; 4-Lidocaína; 5-Levamisol; 6-Procaína; 7-Dipentilftalato; 8-Cocaína; 9-Cis-cinamoilcocaína; 10-Trans-cinamoilcocaína; 11-Trifenilacetofenona; 12-Hidroxizina; 13-Diltiazem

Observando o cromatograma acima, percebe-se que é possível distinguir o início e o fim de cada pico antes de começar a eluir o próximo analito. É importante também observar se nas determinações de rotina a separação completa ocorre e, neste trabalho, foi constatada boa seletividade em todas as amostras analisadas.

Para fins de quantificação, a seletividade é uma das principais figuras de mérito, pois se houver coeluições de analitos, a exatidão e a precisão desses analitos estarão comprometidas. Conseqüentemente, a curva analítica não será adequada e os resultados não serão confiáveis.

Com o parâmetro de seletividade otimizado, partiu-se para a construção da curva analítica da cocaína e das cinamoilcocaínas.

5.2.1. Linearidade e Faixa de Trabalho

Antes de construir a curva analítica e, com isso, avaliar a linearidade do método, é necessário que se determine a faixa de trabalho a ser avaliada. Essa faixa de trabalho depende da necessidade do laboratório, observando quais possíveis concentrações poderão ser encontradas nas amostras que virão a ser analisadas.

No caso da quantificação de cocaína no Brasil, é necessário usar uma faixa extensa pela variabilidade das amostras apreendidas. Para este trabalho, foi utilizada uma faixa que vai de 1% a 100% em massa da substância cocaína em amostras de cocaína, para que todas as amostras possam ser analisadas em um único método, característica importante para o PeQui.

Escolhida a faixa de trabalho, preparou-se a curva analítica com oito pontos, como descrito no apêndice 1. Como preparação da amostra, foram diluídas 8 mg de amostra em 10 mL de solvente (clorofórmio), e, para atingir a faixa requerida, a curva foi construída em concentrações que vão de 0,00800 mg/mL até 0,80420 mg/mL. Como padrão de cocaína, foi utilizada uma amostra certificada pelo DEA com teor de cocaína de 82,13%. A figura 7 mostra o resultado da curva analítica e seus parâmetros para avaliação de linearidade.

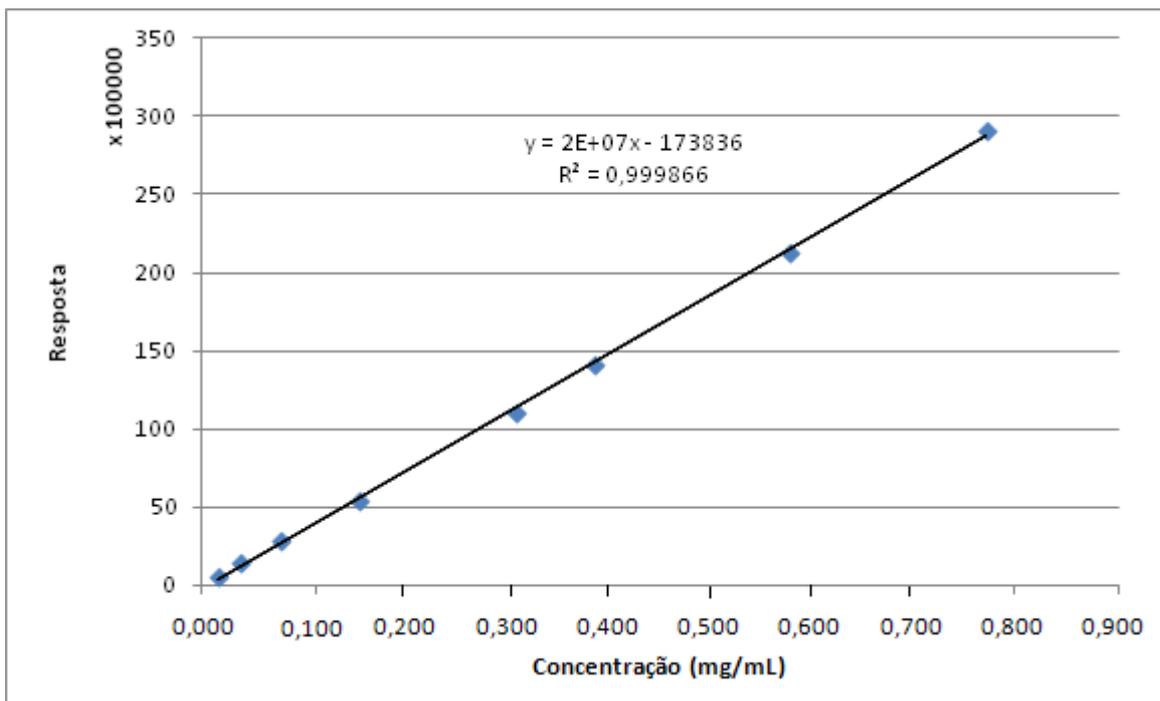


Figura 7 – Gráfico mostrando a curva analítica da amostra de cocaína cedida pelo DEA, seu coeficiente de determinação e a equação da reta.

Como critério de aceitação, a ANVISA⁴⁷ determina um coeficiente de determinação acima de 0,9 e o INMETRO⁵⁰ aceita apenas $R^2 > 0,99$. No protocolo estabelecido preferiu-se seguir o órgão mais rigoroso e também utilizou-se 0,99 como parâmetro. O valor alcançado foi de $R^2 = 0,99987$ o que demonstra que esse método é linear em toda a faixa de trabalho para a cocaína.

Para a quantificação das cinamoilcocaínas, houve uma dificuldade a mais, já que o laboratório não dispunha de um padrão desses analitos. Nesse caso, para construir a curva analítica foi utilizado o mesmo padrão certificado do DEA que, além de quantificar a cocaína, determinou a porcentagem de cinamoilcocaínas relativa à cocaína. Porém o valor de 3,10% fornecido pelo DEA é o valor de cinamoilcocaína total (cis + trans) e, com isso, não é possível saber qual a quantidade de cada uma separadamente. Para contornar tal problema, foi preparada uma única curva analítica para os dois analitos, simultaneamente, somando-se as áreas dos picos. Com isso, de posse da área total e da concentração total, pôde-se construir a curva que está mostrada na figura 8.

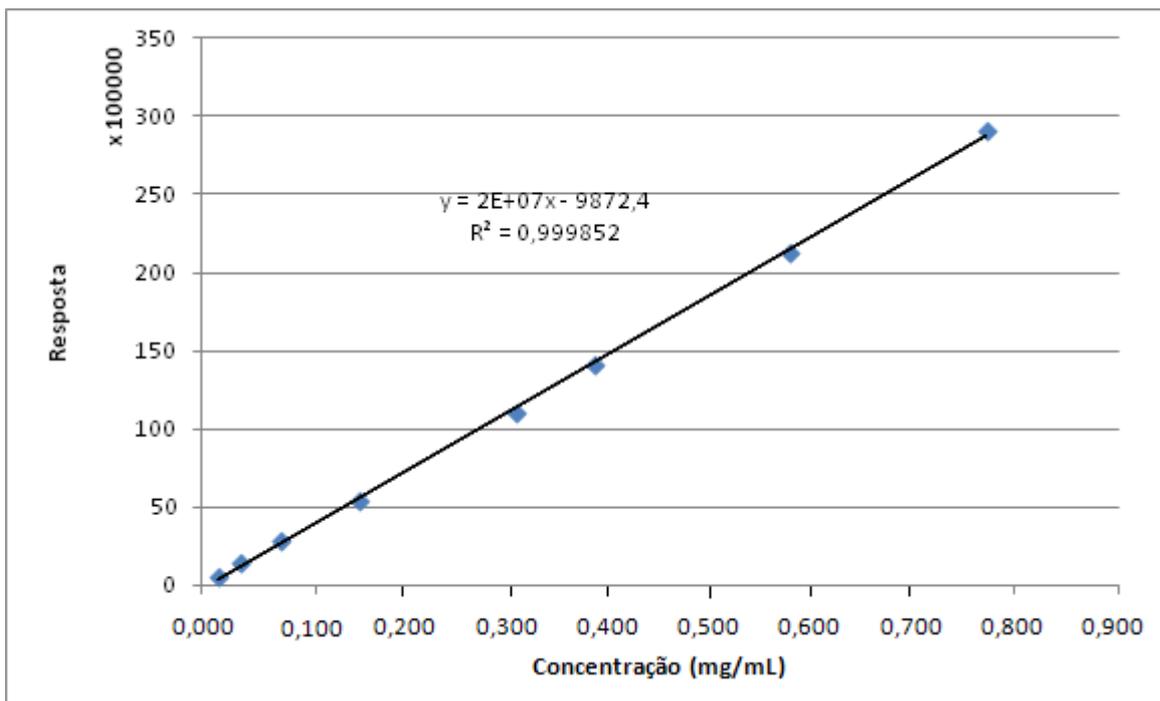


Figura 8 - Gráfico mostrando a curva analítica das cinamoilcocaínas (cis + trans), seu coeficiente de determinação e a equação da reta.

A curva mostrada acima foi feita lançando mão dos mesmos padrões utilizados para a preparação da curva da cocaína. Portanto, como as diluições utilizadas foram as mesmas e a concentração das cinamoilcocaínas são de 3,10% em relação às concentrações da cocaína, a faixa de trabalho utilizada foi de 0,00027 mg/mL à 0,02677 mg/mL. Com a sequência dos testes visando determinar o limite de quantificação (LQ) de cada analito, foram obtidos valores de LQ de 0,00134 mg/mL para a cis-cinamoilcocaína e de 0,00084 mg/mL para a trans-cinamoilcocaína, o que revelou a necessidade de se excluir os dois pontos mais baixos no caso da primeira e um ponto mais baixo no caso da segunda, pois esses estavam abaixo dos respectivos LQ.

Pelos mesmos critérios comentados para a cocaína, ao obter o valor de 0,99985 para o coeficiente de determinação, esse foi avaliado como bom e aceitável para a sequência dos trabalhos.

5.2.2. Limites de Detecção e Quantificação(LD e LQ)

O limite de detecção foi calculado pelo método de diluições sucessivas, onde se dilui o analito até que ele não seja mais detectado. Para o fim ao qual é destinado esse método, concentrações de analitos abaixo de 1% (m/m) não são interessantes, sendo os analitos considerados contaminantes das amostras e, portanto, não são incluídos em laudos periciais. Por esse motivo, se os limites encontrados estiverem abaixo desse patamar, o valor de 1% será considerado o LD do analito.

A figura 9 mostra um cromatograma de uma amostra produzida no laboratório com todos os adulterantes com teores de 1% das amostras.

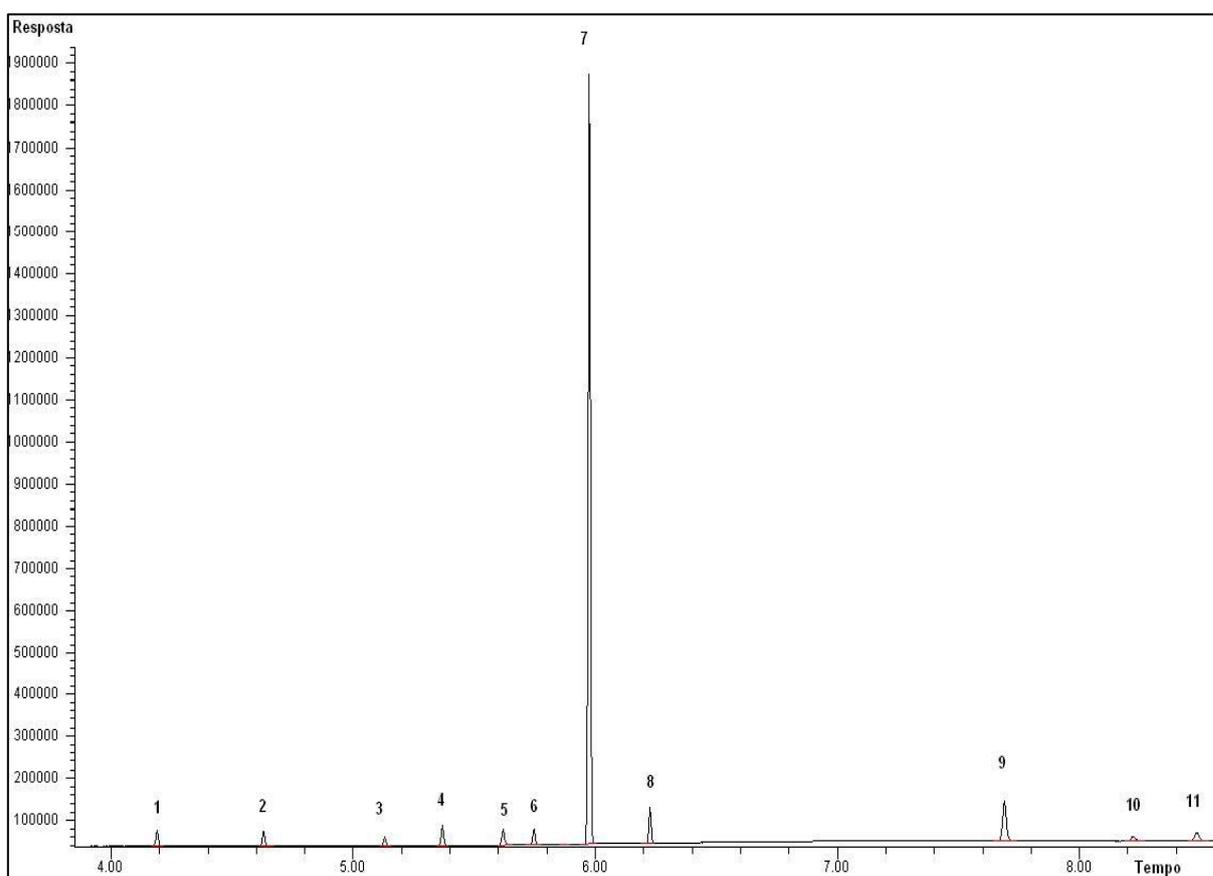


Figura 9 – Cromatograma de uma amostra com todos os adulterantes contendo teor de 1% na amostra.

1-Benzocaína; 2-Fenacetina; 3-Cafeína; 4-Lidocaína; 5-Levamisol; 6-Procaína; 7-Dipentilftalato (PI); 8-Cocaína; 9-Trifenilacetofenona (PI); 10-Hidroxizina; 11-Diltiazem

Pode-se observar da figura 9 que todos os analitos nessa faixa de concentração foram detectados com clareza e, então, fixou-se 1% como LD de todos os analitos.

Para determinar o LD da cocaína, adotou-se o mesmo critério: uma amostra foi produzida com o analito a 1%, o que resultou no cromatograma mostrado na figura 10.

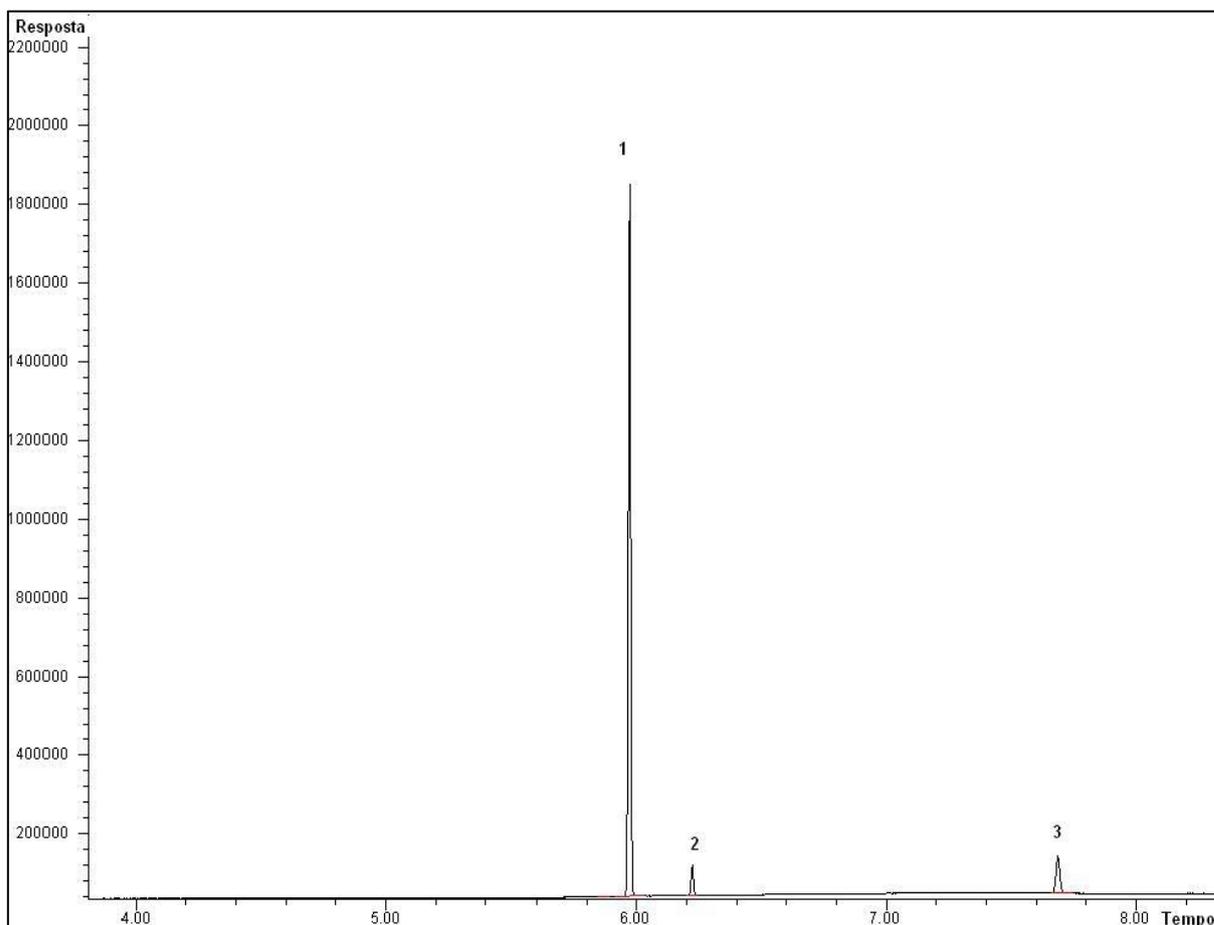


Figura 10 – Cromatograma de uma amostra de cocaína com concentração de 1% (m/m).
1-Dipentilftalato (PI); 2-Cocaína; 3-Trifenilacetofenona (PI)

No caso da determinação do LD da cis e da trans-cinamoilcocaína, 1% não poderia ser o limite inferior, já que a faixa de trabalho desses analitos está abaixo desse valor e, portanto, foram feitas diluições sucessivas até que o método não conseguisse mais detectar cada um desses analitos. Após esses testes, foram obtidos valores de 0,00045 mg/mL para a cis-cinamoilcocaína e de 0,00027 para a trans-cinamoilcocaína, o que em porcentagem na amostra dá 0,05% e 0,03%, respectivamente. Uma amostra foi produzida nessas concentrações e analisada seis vezes para confirmar a detecção desses analitos. Em todos os cromatogramas, os

picos apresentaram intensidades semelhantes e um dos cromatogramas está apresentado na figura 11.

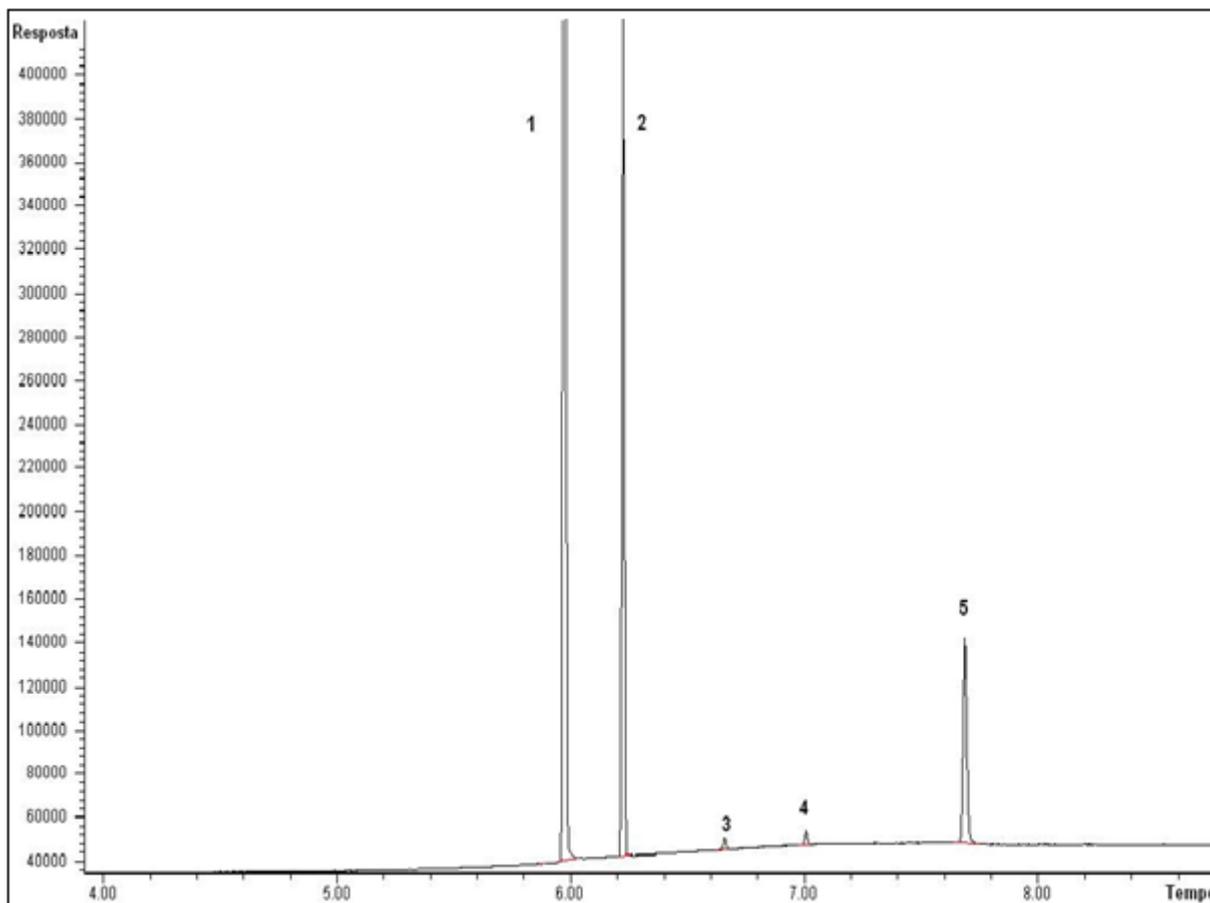


Figura 11 – Cromatograma representativo de uma amostra com cis e trans-cinamoilcocaína em seus limites de detecção.

1-Dipentilftalato (PI); 2-Cocaína; 3-Cis-cinamoilcocaína; 4-Trans-cinamoilcocaína; 5-Trifenilacetofenona (PI)

O limite de quantificação foi calculado apenas para os analitos que seriam quantificados, ou seja, a cocaína e as cinamoilcocaínas. O método utilizado foi o de multiplicar o LD por três. Com isso os valores para cis e trans-cinamoilcocaínas em porcentagem foram 0,16% e 0,10%, respectivamente. Esses resultados foram importantes para evidenciar que a faixa de trabalho que estava sendo utilizada inicialmente estava extrapolando o limite de detecção do analito e, portanto, alguns pontos baixos da curva tiveram que ser retirados.

Os valores de LQ para a cocaína foram mantidos, ou seja, os mesmos 1% ou 0,0080 mg/mL, que é o limite inferior da curva analítica. Para saber se esse limite

realmente pode ser considerado, um estudo de precisão e exatidão nesse ponto foi realizado e os resultados estão na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do teste de precisão e exatidão no ponto do LQ da cocaína.

Valor Referência	Valor Experimental
74,47%	73,02%
74,47%	73,65%
74,47%	72,73%
74,47%	73,63%
74,47%	72,94%
74,47%	73,54%
Média	73,25%
Desvio Padrão	0,40
Coefficiente de Variação	0,55%
Recuperação Analítica	98,36%

Estes resultados de coeficiente de variação e recuperação analítica estão dentro dos critérios de aceitação para o método. Esses critérios serão descritos e melhor discutidos posteriormente.

5.2.3. Precisão

Para a análise da precisão foi utilizada uma amostra certificada com valores conhecidos de cocaína e de cis e trans-cinamoilcocaínas. O critério de aceitação foi definido de acordo com o interesse da PF e baseado num valor numérico que não trouxesse comprometimento para as análises. O valor estabelecido para o coeficiente de variação foi de 1% para a cocaína e 1,5% para cis e trans-cinamoilcocaína. Esse valor está dentro dos padrões de variação pretendidos pelos principais laboratórios que quantificam esse tipo de amostra.

Na tabela 7 são mostrados os valores do desvio padrão (SD) e do coeficiente de variação (CV) calculados nos testes de precisão, evidenciando que todos os

valores estão abaixo do máximo estabelecido. Isso permite concluir que o método foi suficientemente preciso.

Tabela 7 – Resultados do teste de precisão intradias.

AMOSTRA ANALISADA				
Cocaina		74,47%		
Cis-cinamoilcocaina		2,72%		
Trans-cinamoilcocaina		3,10%		
Repetitividade Cocaina	massa (mg)	Resultado %		
Amostra 1	8,08	75,91		
Amostra 2	8,58	75,54		
Amostra 3	8,02	75,49		
Amostra 4	8,09	74,54	Media	75,42
Amostra 5	8,35	75,60	SD	0,46
Amostra 6	8,41	75,45	CV	0,61
Repetitividade Cis	massa (mg)	Resultado %		
Amostra 1	8,08	2,80		
Amostra 2	8,58	2,74		
Amostra 3	8,02	2,75		
Amostra 4	8,09	2,72	Media	2,76
Amostra 5	8,35	2,76	SD	0,02
Amostra 6	8,41	2,76	CV	0,90
Repetitividade Trans	massa (mg)	Resultado %		
Amostra 1	8,08	3,20		
Amostra 2	8,58	3,15		
Amostra 3	8,02	3,14		
Amostra 4	8,09	3,15	Media	3,15
Amostra 5	8,35	3,14	SD	0,02
Amostra 6	8,41	3,16	CV	0,72

No teste da precisão inter dias, foi estabelecida uma meta máxima para o valor de CV em 2% para todos os três analitos. Na tabela 8 estão mostrados os resultados do desvio padrão e do CV para esse teste.

Tabela 8 – Resultados dos testes de precisão inter dias.

AMOSTRA ANALISADA		
Cocaina		74,47%
Cis-cinamoilcocaina		2,72%
Trans-cinamoilcocaina		3,10%
Cocaína		
Media	75,52	
SD	0,50	
CV	0,66	
Cis		
Media	2,74	
SD	0,04	
CV	1,52	
Trans		
Media	3,17	
SD	0,04	
CV	1,28	

O teste foi feito em dois dias consecutivos e pode-se concluir dele, a partir dos dados da tabela 8, que para todos os analitos os coeficientes de variação estão abaixo do limite estabelecido, revelando que a precisão é alta.

5.2.4. Exatidão

Para os testes da exatidão, foram utilizados três pontos da curva analítica: um ponto central e um ponto em cada extremidade, visando avaliar toda a faixa linear da curva analítica e utilizá-la com confiabilidade para a quantificação de amostras com os mais variados teores de cocaína. As análises foram feitas com a mesma amostra certificada utilizada no teste de precisão, que tem 74,47% de cocaína, e os valores são dados em termos da Recuperação Analítica (RA).

Para a definição do nível baixo, foi utilizado o resultado do LQ, que será novamente apresentado para facilitar a conferência na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados do teste de exatidão.

Valor de Referência		
Cocaina		74,47%
Nível Baixo		
Media	73,25	
SD	0,40	
RA	98,36	
Nível Médio		
Media	75,04	
SD	0,23	
RA	100,76	
Nível Alto		
Media	74,71	
SD	0,68	
RA	100,32	

O critério de aceitação estabelecido para esse teste é o RA entre 98-102% e conclui-se, então, que os três ensaios se comportaram dentro do aceitável. No nível mais baixo (0,00854 mg/mL), observou-se uma recuperação um pouco mais distante do 100% (98,36%) que é esperado para concentrações muito baixas. O nível alto (0,80420 mg/mL) apresentou as menores variações frente ao valor esperado, resultando numa recuperação de 100,32%. Na faixa de concentração do meio da curva (0,16193 mg/mL), a exatidão também foi satisfatória, apresentando o valor médio de 100,76% de recuperação. Esses resultados comprovam que a exatidão do método é alta em todos os pontos do intervalo analítico, possibilitando que o método seja utilizado com confiança para toda a variabilidade encontrada no universo de amostras apreendidas.

A partir do método validado e objetivando conhecer sua variabilidade ao longo do tempo, foi confeccionada uma carta controle. A carta controle foi construída utilizando uma amostra controle quantificada quando o método foi validado. A cada nova etapa de quantificações de amostras reais, essa amostra controle foi analisada antes e depois da sequência de análises. O objetivo é avaliar, dentro de um intervalo de confiança, se o método ainda está confiável. Na figura 12, é mostrada a carta

controle construída ao longo desse trabalho e que continua a ser utilizada no laboratório da PF

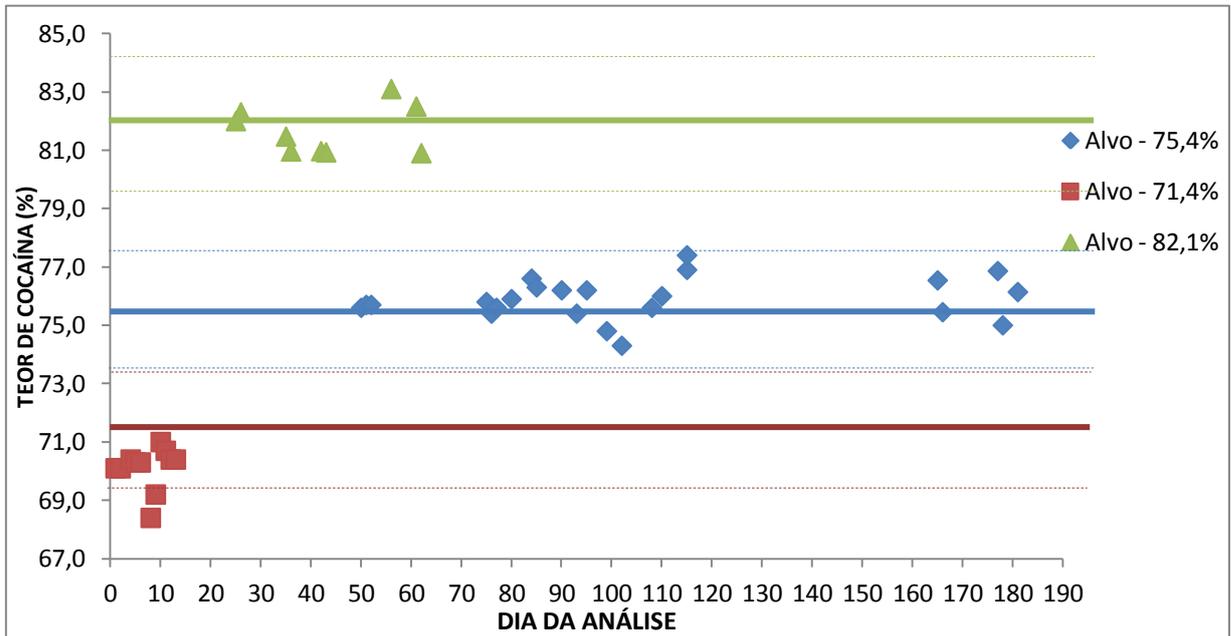


Figura 12 – Carta controle das quantificações feitas no ano de 2011.

No gráfico, as barras contínuas são os valores reais da amostra enquanto as linhas pontilhadas são os limites de confiança escolhidos como confiáveis ($\pm 2\%$), a critério de necessidade do laboratório. O esperado de um método bastante confiável é que as amostras variem aleatoriamente para cima e para baixo do valor real, mas nunca ultrapassando os seus limites de confiança.

Nesse ano em que a carta controle começou a ser feita, dois erros foram cometidos. O primeiro ocorreu porque a amostra escolhida inicialmente para servir como controle (quadrados vermelhos) era uma mistura de base e sal. No entanto, a cocaína no formato de base livre não é muito estável, pois ela se degrada com o tempo e, por isso, amostras de cloridrato de cocaína são melhores para esse fim. Esses resultados mostraram valores sempre abaixo do valor real e por vezes até abaixo do limite de confiança. Ao identificar esse erro, uma nova amostra controle foi selecionada, ilustrada no gráfico por triângulos verdes. Com esta nova amostra controle, surgiu um novo problema: os resultados, como evidenciado no gráfico, estavam sendo gerados satisfatoriamente até que, por falta de planejamento, a amostra controle acabou. Apenas nesse momento foi percebido que a constante

troca de amostra controle dificulta o acompanhamento da variabilidade temporal do método.

Para sanar esse problema, um padrão foi produzido no próprio laboratório em quantidade muito grande (próximo a 1 kg). Esse padrão, representada por losangos azuis, está sendo utilizado desde então como controle e, até o fim deste trabalho, o método se mostrou robusto o suficiente sem necessitar de nova validação analítica.

A seguir serão apresentadas duas tabelas (tabelas 10 e 11) contendo resumidamente os valores obtidos para cada figura de mérito nos testes de validação.

Tabela 10 – Tabela mostrando os valores obtidos para cada figura de mérito nos testes de validação.

PARÂMETRO	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	VALOR OBTIDO
SELETIVIDADE	SEM COELUIÇÕES	ACEITÁVEL
LINEARIDADE	$R^2 \geq 0,99$	Cocaína = 0,99987 Cinamoil = 0,99985
PRECISÃO	Cocaína → CV < 1,0% Cis → CV < 1,5% Trans → CV < 1,5%	CV = 0,61% CV = 0,90% CV = 0,72%
PRECISÃO INTER-DIAS	Cocaína → CV < 2,0% Cis → CV < 2,0% Trans → CV < 2,0%	CV = 0,66% CV = 1,52% CV = 1,28%
EXATIDÃO	98% < RSD < 102%	Nível baixo conc. = 98,36% Nível médio conc. = 100,76% Nível alto conc. = 100,32%

Tabela 11 – Tabela mostrando os resultados dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) nos testes de validação.

ANALITO	LD (%)	LQ (%)
COCAÍNA	1*	1*
CIS	0,05**	0,16***
TRANS	0,03**	0,10***
ADULTERANTES	1*	-

* De acordo com os objetivos da PF

** Calculado pelo método de diluições sucessivas

*** 3xLD

Após a validação do método e definido sua variabilidade, partiu-se para analisar as amostras apreendidas pela PF no Brasil e, com isso, começar a compor o banco de dados.

5.3. Quantificação de cocaína em amostras reais

Após otimizar o método e comprovar sua validade, pôde-se partir para a análise de amostras reais, objetivando a criação do banco de dados do Projeto PeQui. Nesse trabalho, 304 amostras foram analisadas.

Foram escolhidas amostras de vários estados, como mostrado na figura 13, com as duas formas de apresentação (sal e base), além de algumas misturas de sal e base, como mostrado na figura 14.

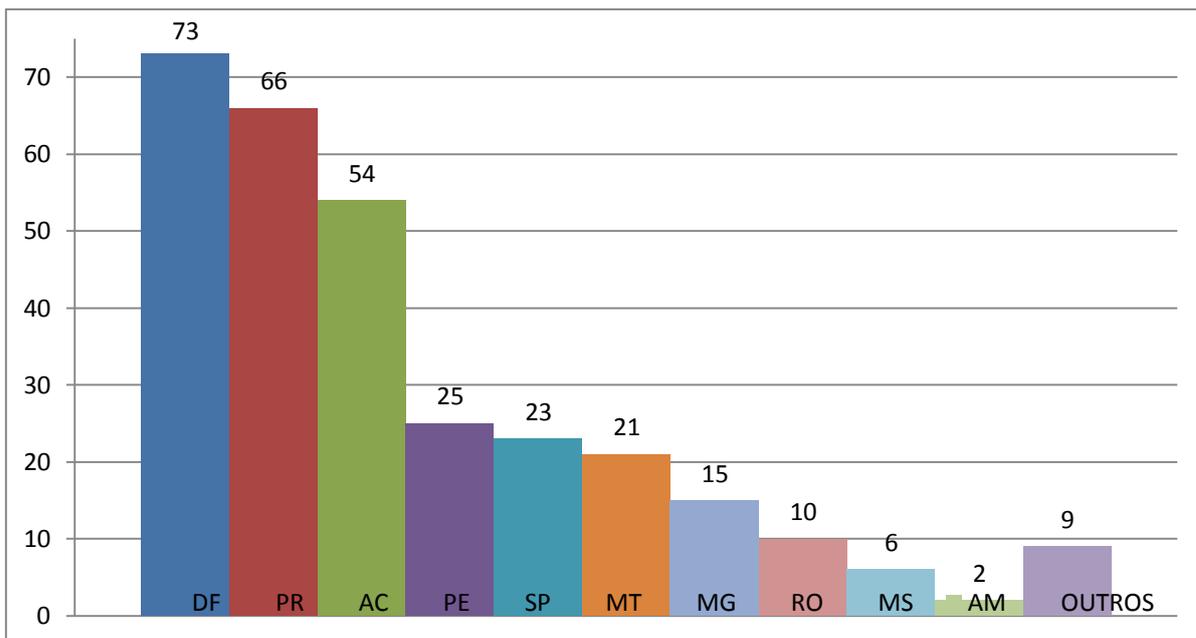


Figura 13 – Gráfico de distribuição do número de amostras analisadas de cada estado.

A seleção dos estados que comporiam inicialmente o banco de dados foi feita levando em consideração dois critérios: 1) os estados de entrada da droga no Brasil, isto é, os estados que fazem fronteira com Bolívia, Colômbia, Venezuela e Paraguai, 2) os estados que não são de fronteira, mas que apresentam um número elevado de apreensões, como é o caso de São Paulo, Minas Gerais e do Distrito Federal. As nove amostras definidas como “outros” são amostras que foram analisadas no trabalho, mas que a Polícia Federal ainda não pôde revelar suas procedências.

Na figura 14 são mostradas a quantidade de amostras analisadas em cada forma de apresentação.

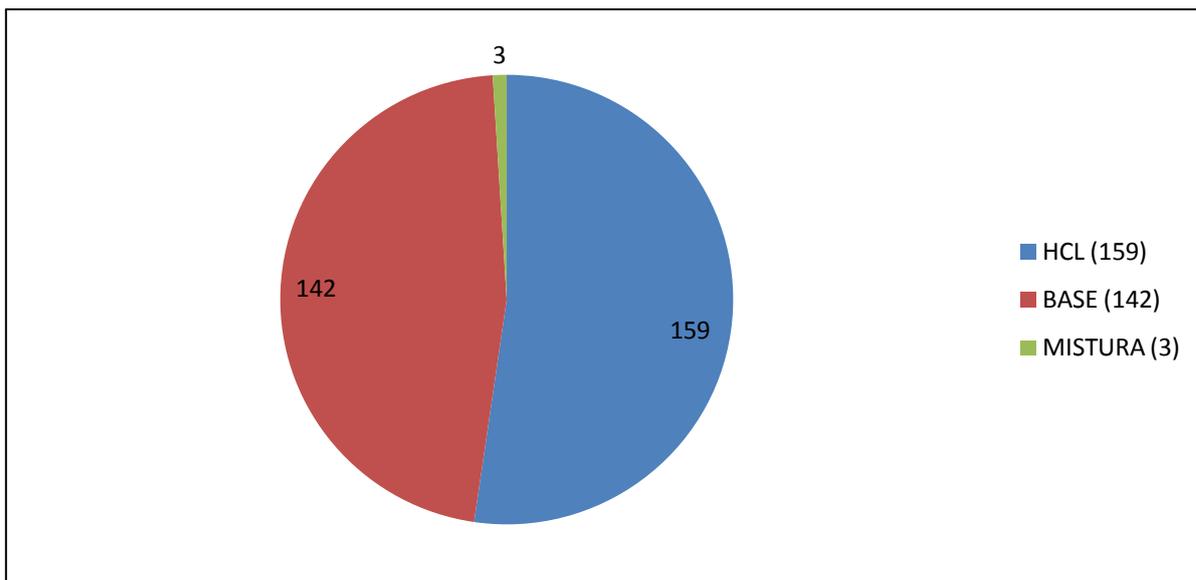


Figura 14 – Número de amostras analisadas de acordo com sua forma de apresentação.

A pesquisa realizada com amostras de variadas fontes tem o objetivo de compor um bando de dados que seja representativo para o cenário nacional.

A diferença entre sal e base geralmente é fácil de fazer visualmente, pois o cloridrato de cocaína tem a aparência de pó e a coloração branca, enquanto a base possui a coloração escura e um formato mais de pedras ou uma pasta, dependendo do grau de refino.

Um cuidado que se deve ter ao analisar tanto sal quanto base em um mesmo método é que, como já foi dito, utiliza-se dietilamina para que se basifique todos os analitos. Porém, as amostras de sal foram pesadas antes dessa etapa e, com isso, ainda existiam moléculas de HCl na amostra, sendo que essas moléculas não serão consideradas no resultado final mostrado pelo computador. Com isso, é necessário fazer uma pequena transformação estequiométrica para se obter o teor real do cloridrato, para que o banco de dados não seja prejudicado. Uma amostra de cloridrato de cocaína que tiver um teor de 100%, quando subtraído o HCl terá o teor medido pelo computador de 89,27%.⁵⁴

Os dados obtidos neste trabalho comprovaram a grande variabilidade das amostras em todos os três conjuntos de dados. O teor de cocaína variou desde 1,43% atingindo até 97,08%, sendo que o teor médio foi de 65% e o desvio padrão acima de 20%. O que demonstra que não se tem uma característica única da droga

do país e que o Projeto PeQui deverá se concentrar em conhecer as características da droga por estado.

O grau de oxidação também variou bastante, tendo amostras com teor abaixo do limite de quantificação, e algumas quase sem processo de refino, às vezes ultrapassando 20%. A média ficou em 5,82%, dentro da faixa de moderadamente oxidada.

Os adulterantes encontrados também variaram bastante. Na figura 15 estão mostrados os adulterantes identificados e com qual frequência cada um deles esteve presente nessas 304 amostras.

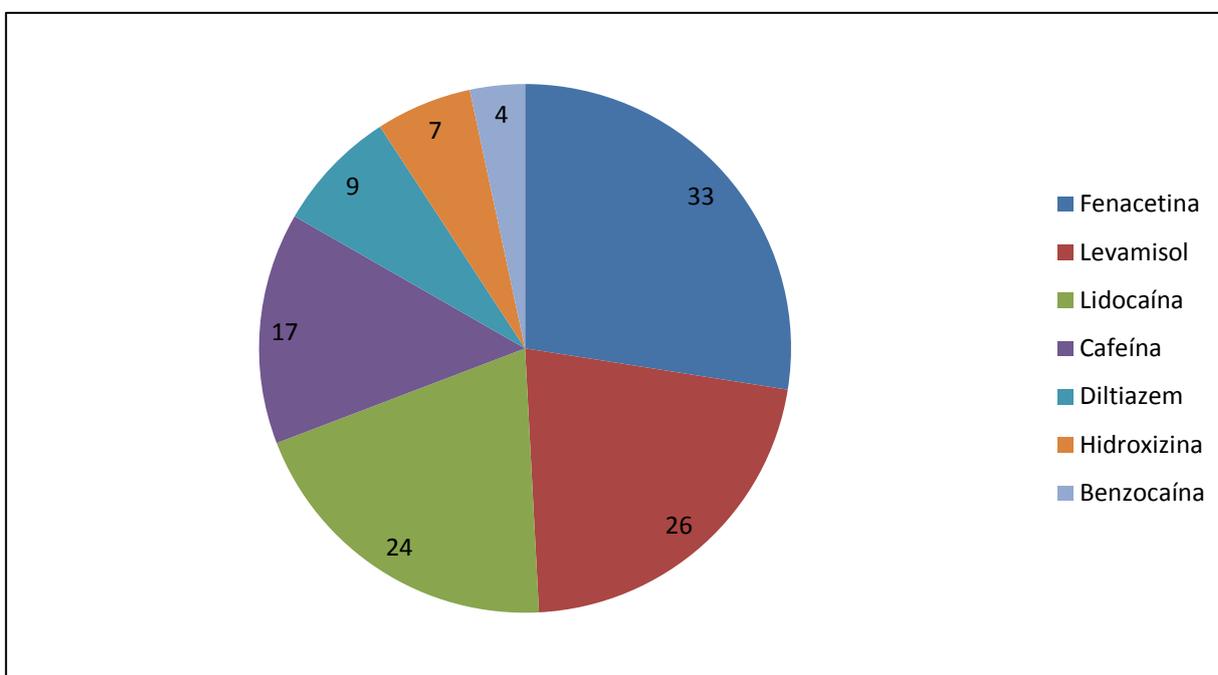


Figura 15 – Quantidade de vezes que cada adulterante foi identificado nas análises.

Esses adulterantes por vezes aparecem sozinhos e por vezes aparecem juntos, o que aumenta ainda mais a variação das amostras. A presença dos adulterantes é um ótimo parâmetro para definir a correlação entre apreensões em diferentes estados, pois a facilidade de se obter cada um dos adulterantes é característica de cada região. Essa característica depende da parte industrial da região e qual desses produtos é mais utilizado nessas indústrias, o que facilita a obtenção ilegal.

Neste trabalho, ainda não foi possível apontar características da cocaína consumida no Brasil, mas se pôde observar algumas tendências. Nas figuras 16 e 17 é possível perceber as características mais encontradas nas amostras em geral.

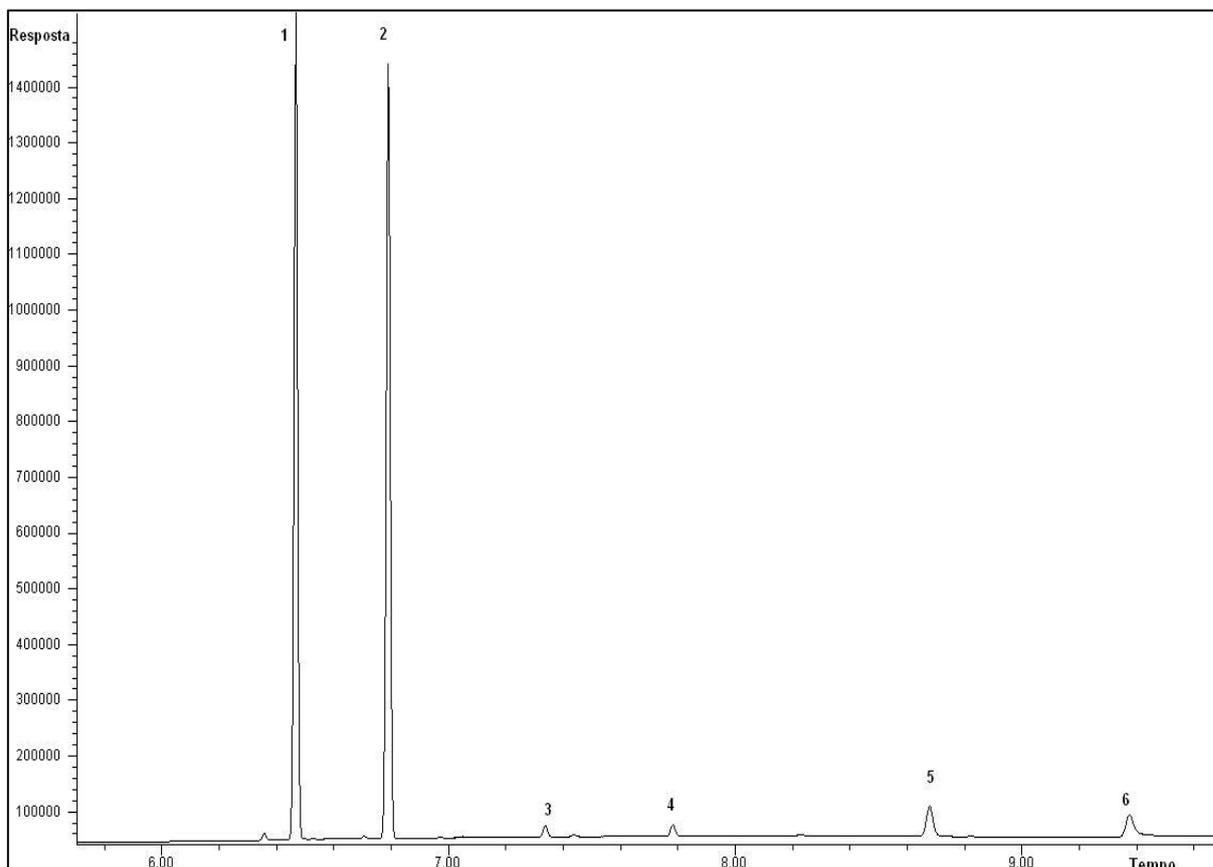


Figura 16 – Cromatograma característico das amostras de cloridrato de cocaína.

1-Dipentilftalato; 2-Cocaína; 3-Cis-cinamoilcocaína; 4-Trans-cinamoilcocaína; 5-Trifenilacetofenona; 6-Diltiazem

As características mais comuns encontradas nas amostras cloridrato são o alto teor de cocaína, o baixo grau de oxidação e a presença de pelo menos um adulterante. Todas essas características são marcantes em amostras que sofreram processos de tratamento e refino, conforme evidenciado no cromatograma característico apresentado na figura 16. Outra característica importante das amostras no formato de sal é a pouca variação nos teores tanto de cocaína quanto de cinamoilcocaínas. A maior variação entre essas amostras está na identidade do adulterante encontrado ou na ausência dele.

Já as amostras de base livre, tanto pasta base como crack e derivados, apresentaram uma variação muito grande entre amostras, mas sempre com

características de pouco tratamento químico. Como evidenciado no cromatograma da figura 17, a cocaína base livre apresenta baixos teores de cocaína e baixo grau de oxidação, o que significa grande quantidade de cinamoilcocaínas. Nessas amostras, quase não se detecta adulterantes.

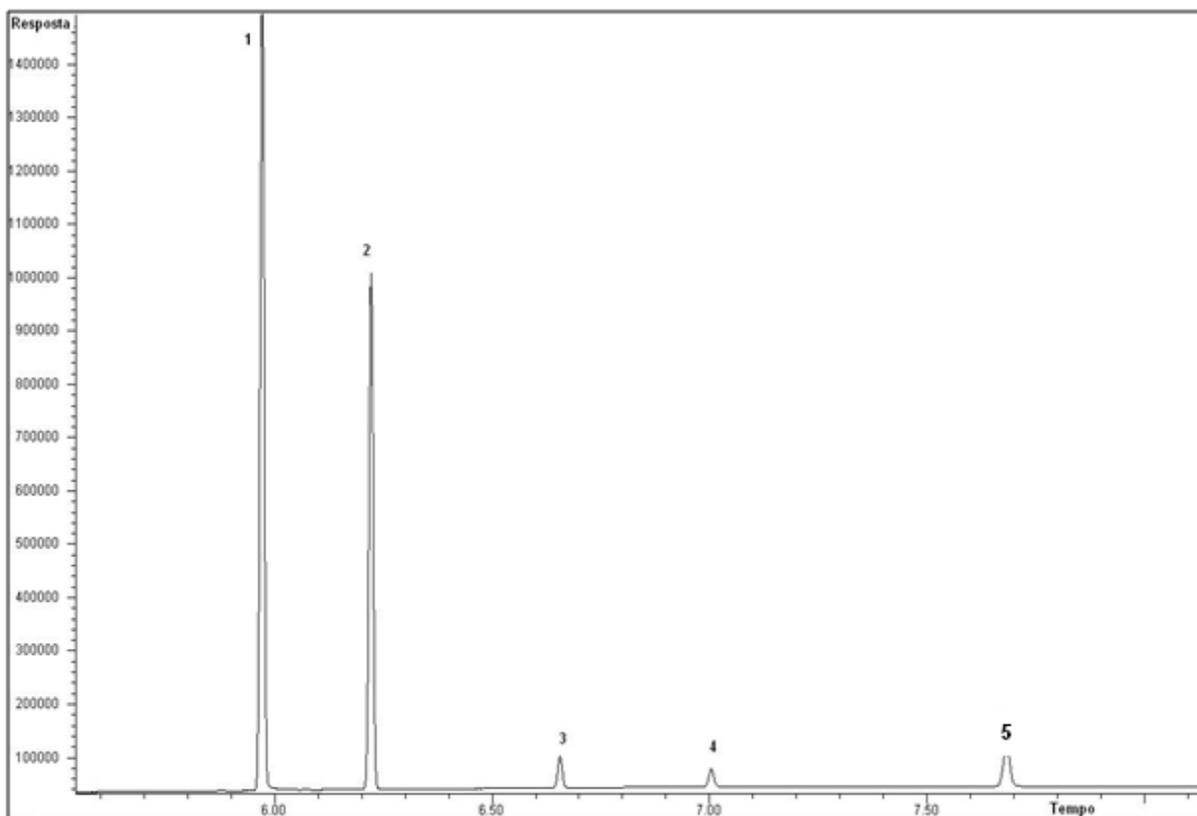


Figura 17 – Cromatograma característico das amostras de cocaína base livre.

1-Dipentilftalato; 2-Cocaína; 3-Cis-cinamoilcocaína; 4-Trans-cinamoilcocaína; 5-Trifenilacetofenona

Como não se pode então obter características gerais, o projeto PeQui busca, portanto, características típicas por estados para que essas possam servir de exemplos para a comparação de apreensões em outras unidades da federação. Para isso, as particularidades de cada estado, principalmente os que integram as fronteiras de entrada da droga, são especialmente importantes para o projeto. Com a criação do banco de dados com as características dos estados de fronteira, quando alguma apreensão for feita em outro estado, a amostra será confrontada com os perfis obtidos e, dessa forma, teias serão construídas visando compreender rotas e destinos de tráfico. Com o auxílio de dados gerados em outros subprojetos do PeQui, características sobre o país produtor também serão confrontadas e tentar-se-

á criar toda a rota do tráfico (país de origem, estado de entrada e estado de consumo). Espera-se mapear várias dessas rotas de entrada e distribuição da cocaína.

Nesse contexto, há dois estados de entrada muito importantes, que são o Paraná e o Acre. É pelas fronteiras desses dois estados que grande parte da cocaína entra no Brasil e, por isso, o trabalho priorizou esses dois entre os estados de entrada.

Das amostras apreendidas no Paraná, foram escolhidas aleatoriamente, de 15 diferentes apreensões, 66 amostras. Essas amostras provavelmente têm o Paraguai como país de origem.

A primeira tendência para esse estado já havia sido constatada antes da realização das análises. Observou-se que todas as amostras estavam no formato de sal, o que já constitui uma característica do estado. Isso significa que as amostras provavelmente apresentam um grau mais elevado de refino.

Na figura 18, é mostrado um cromatograma típico das amostras desse estado, enquanto na figura 19 a composição química média encontrada nessas 66 análises é apresentada.

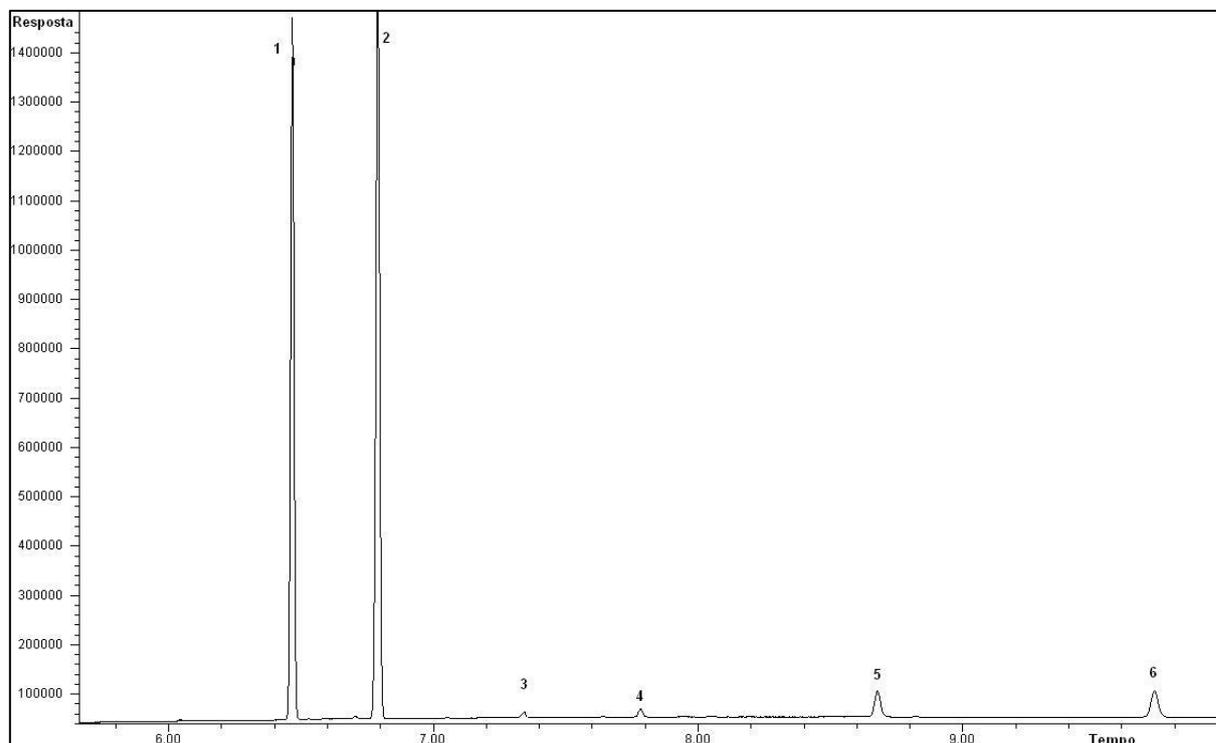


Figura 18 – Cromatograma de uma amostra representativa das apreensões no Paraná.

1-Dipentilftalato; 2-Cocaína; 3-Cis-cinamoilcocaína; 4-Trans-cinamoilcocaína; 5-Trifenilacetofenona; 6-Hidroxizina

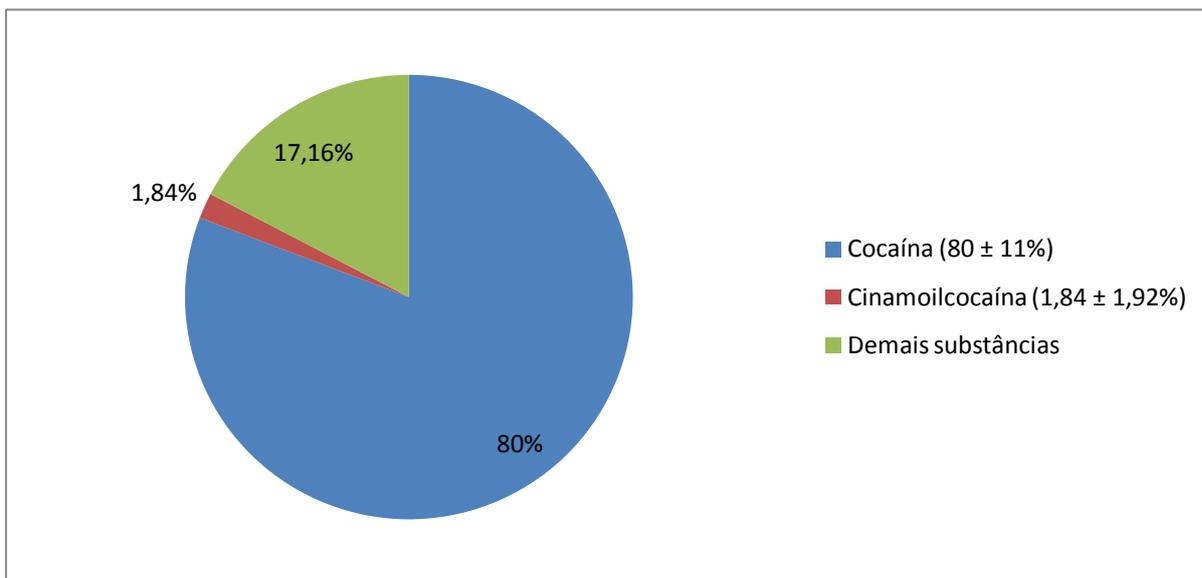


Figura 19 – Composição química média das amostras do Paraná.

No cromatograma, é mostrado como são as amostras do Paraná: concentração alta de cocaína, baixa de cinamoilcocaínas e, na maioria das vezes, com a presença de um adulterante, o que corrobora a tese de que a cocaína já chega muito refinada e pronta para o consumo. Ao fazer a composição química média, pôde-se observar ainda mais esses processos de refino, principalmente pela quantidade de cinamoilcocaína total abaixo de 2%, que é considerado altamente oxidada. Com essas características, uma conclusão a que se pode chegar é que o Paraná pode ser considerado ponto final da rota, pois essa cocaína apreendida dificilmente passará por mais algum processo de “melhora” ou de agregação de valores para que seja vendida para outros lugares.

Na figura 19 também é mostrada uma parte denominada demais substâncias, que é a porcentagem que falta para completar os 100% da amostra. Essa fração de 17,14% é composta pela quantidade do adulterante utilizado que não foi quantificado, assim como por vários diluentes e soluções inorgânicas que são adicionadas em pequenas quantidades e que não são cromatografadas pelo método.

Sobre os adulterantes encontrados nessas amostras e que foram inicialmente incluídos como demais substâncias, pôde-se destacar características marcantes mesmo sem quantificá-los. A presença na maioria das amostras, sempre em baixa

quantidade, e a grande variedade de adulterantes encontrados são algumas dessas características. Na figura 20 está descrito o número de vezes que cada adulterante foi encontrado nas amostras analisadas do Paraná.

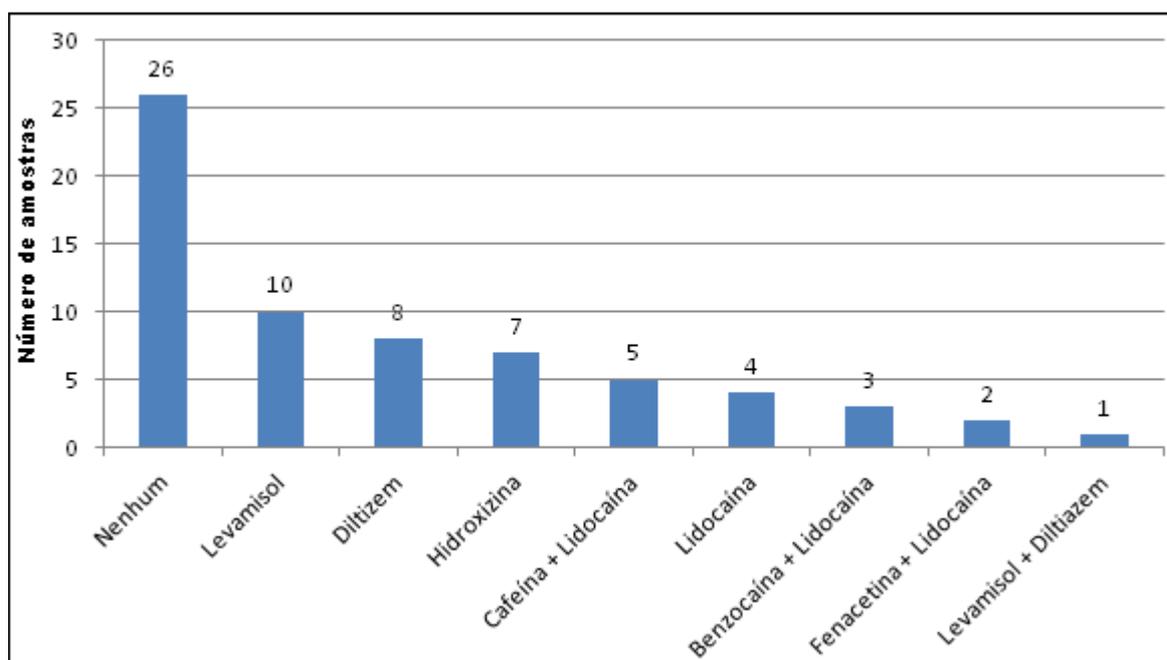


Figura 20 – Adulterantes encontrados nas amostras do Paraná.

Como pode ser observado nos dados da figura acima, a variação de como e qual adulterante é utilizado foi grande e, com isso, a quantificação deles poderá trazer mais benefícios para relacionar umas às outras.

Para caracterizar o estado do Acre, foram analisadas 54 amostras entre apreensões da Polícia Civil e da Polícia Federal. Inicialmente, a análise seria feita separadamente, pois as amostras da PC seriam de “Oxi – a nova droga” e não se sabia ao certo do que se tratava. Até que Silva Júnior *et al.*⁵⁵ mostraram que se tratava de cocaína no formato base livre que já era consumida no Brasil.

Como ocorrido nas amostras do Paraná, à primeira vista já se pôde concluir uma tendência. Todas as 54 amostras estavam no formato de base livre. Essa característica é típica de Acre por fazer divisa com Peru e Bolívia, dois países produtores da droga. Devido à proximidade da fronteira, os traficantes já buscam direto na produção e trazem a droga para o Brasil. Aqui eles a refinam, agregam valores e a vendem aos demais estados.

Nas figuras 21 e 22 estão retratados um cromatograma e um gráfico que mostram a tendência encontrada nas amostras do Acre analisadas.

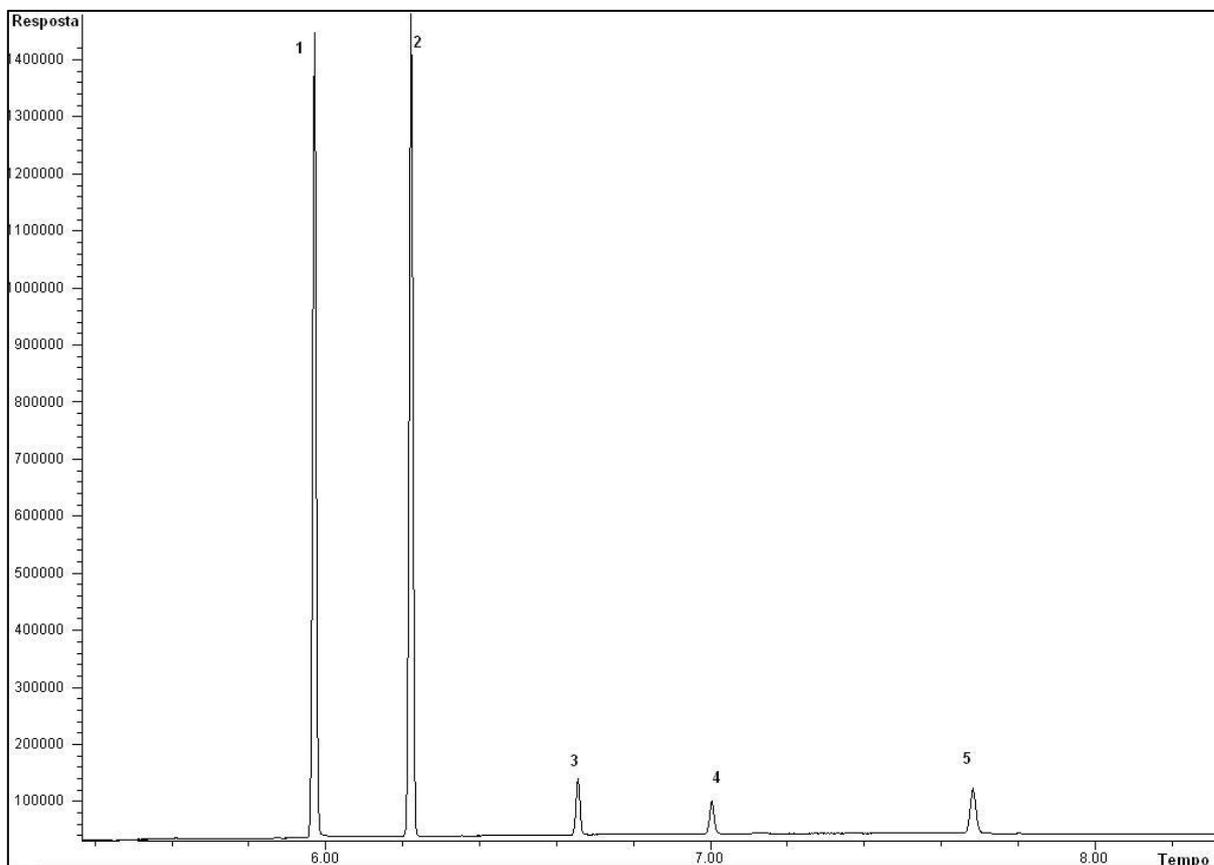


Figura 21 – Cromatograma de uma amostra representativa do Acre.

1-Dipentilftalato; 2-Cocaína; 3-Cis-cinamoilcocaína; 4-Trans-cinamoilcocaína; 5-Trifenilacetofenona

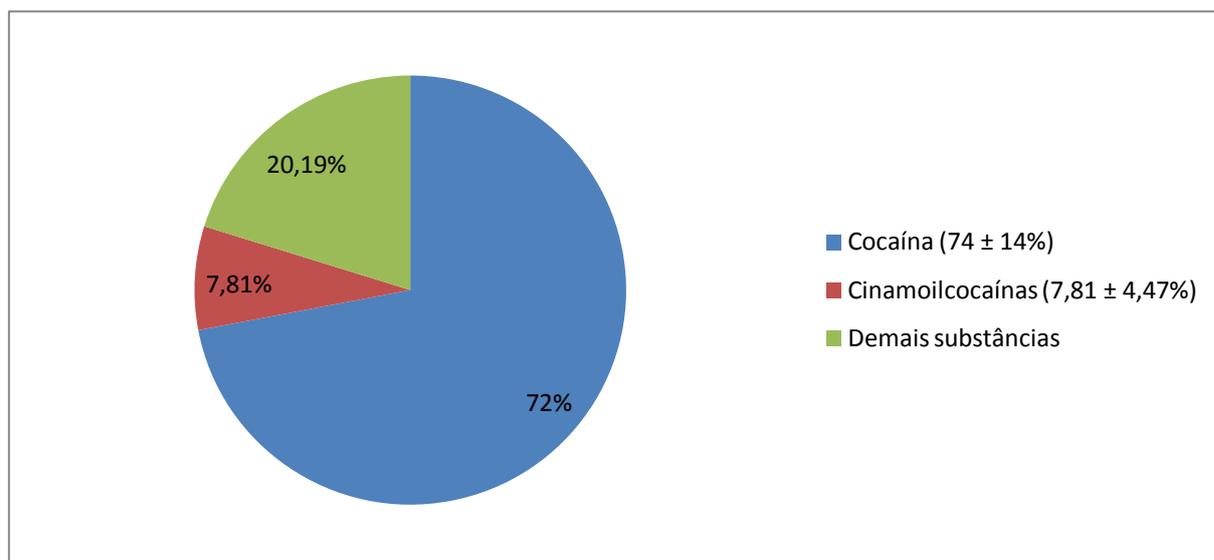


Figura 22 – Composição química média das amostras do Acre.

O cromatograma mostra que as amostras do Acre também têm teor de cocaína alto, assim como a quantidade de cinamoilcocaínas, e pouca presença de adulterantes.

Com a ajuda da figura 22, pode-se então constatar que realmente o teor de cocaína médio está acima da média nacional e que o teor de cinamoilcocaína total está acima de 6%, o que revela a baixa oxidação da amostra. Esses dados mostram que a droga ainda não passou pelos processos de refino e, provavelmente, o estado seja apenas o meio da rota. Isso quer dizer que essa droga ainda será tratada e terá como destino outros estados.

Sobre a presença e identidade dos adulterantes, apresentados na figura 23, pôde-se tirar mais algumas conclusões importantes.

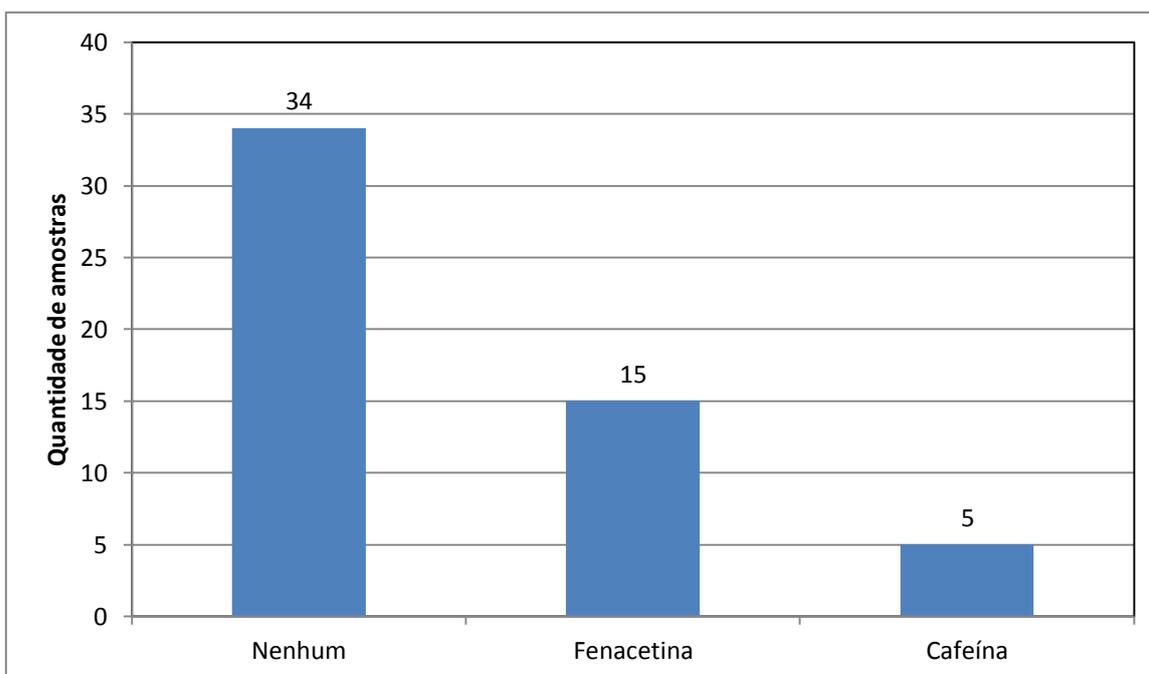


Figura 23 – Adulterantes encontrados nas amostras do Acre.

A primeira informação importante a se tirar do gráfico é que a maioria das amostras não contém nenhum tipo de adulterante. Esse é mais um dado que mostra o não tratamento das amostras apreendidas, o que leva ao indício de que o estado não é o ponto final dessa droga. Outro fator importante nesse gráfico é mostrar que, das amostras que contém adulterantes, 75% utilizam a fenacetina. Isso é muito importante para a Polícia, pois pode ser um indício de facilidade da obtenção desse

produto. Com esse dado, as autoridades podem investigar se alguma empresa está comprando esse produto na região em escala acima da necessidade de produção e, assim, facilitar a chegada ao traficante.

Também é relevante comentar os dados encontrados no Mato Grosso, devido a duas características importantes. A primeira é o fato de fazer divisa com a Bolívia, que é um país produtor de cocaína, o que faz do estado uma rota de entrada da droga em cidades de fronteira como Corumbá. Outra característica é a também fronteira com o Paraguai e a maior proximidade da capital Campo Grande com esse país, o que pode revelar duas rotas diferentes para o tráfico.

Do Mato Grosso do Sul do foram analisadas 20 amostras, dessas 11 foram apreendidas na fronteira Brasil-Bolívia e 9 foram apreendidas em Campo Grande. O gráfico mostrado na figura 24 traz os teores de cocaína e cinamoilcocaínas para as amostras da fronteira e da capital separadamente.

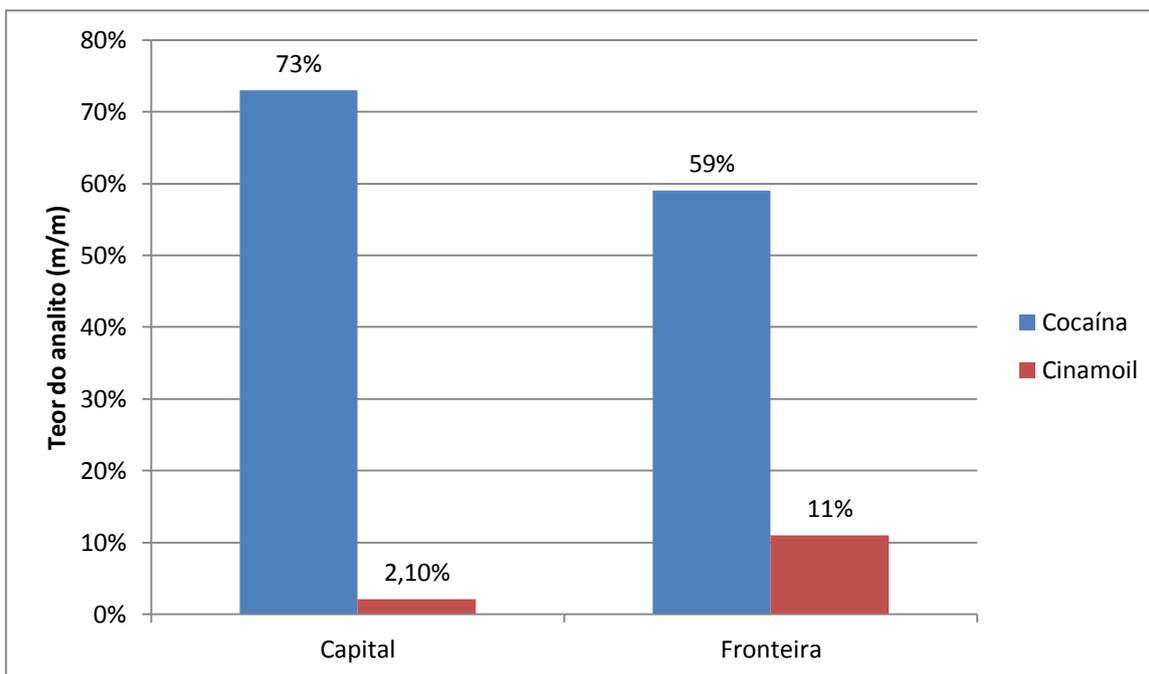


Figura 24 – Composição das amostras do MS analisadas quanto aos principais alcaloides.

Do gráfico acima, pode-se observar que o grau de pureza das amostras apreendidas em Campo Grande é alto e o grau de oxidação é baixo. Outros dados coletados pelas análises é que todas as amostras eram no formato de cloridrato de cocaína e tinham a presença de levamisol como adulterante. Essas informações são

importantes para determinar a região central do estado como rota final da cocaína, pois a droga apreendida lá já está com processos de refino altos e provavelmente com o preço já final para venda.

As amostras da fronteira têm as características típicas de entrada, ou seja, são pouco oxidadas, como se pode perceber pela figura 24, com pureza abaixo da média e sem a presença de adulterantes em todas as amostras analisadas. Então é possível esperar que esses lugares onde as amostras foram encontradas são apenas parte da rota. Uma rota possível ao analisar somente essas amostras seria Bolívia-Corumbá-Campo Grande.

As demais amostras analisadas são dos estados de Rondônia, Amazonas e Mato Grosso do Sul, que juntas somam 18. Separadamente, as amostras analisadas --dez, seis e duas, respectivamente-- não podem apontar uma tendência, mas em conjunto podem trazer informações relevantes, já que possuem características semelhantes por serem estados de fronteira.

Das 18 amostras, apenas uma consistia de sal e possuía características muito diferentes das outras 17. Essa amostra, portanto, foi considerada um *outlier*, não sendo incluída na busca de tendências.

Os Gráficos mostrados nas figuras 25 e 26 trazem alguns dos resultados obtidos.

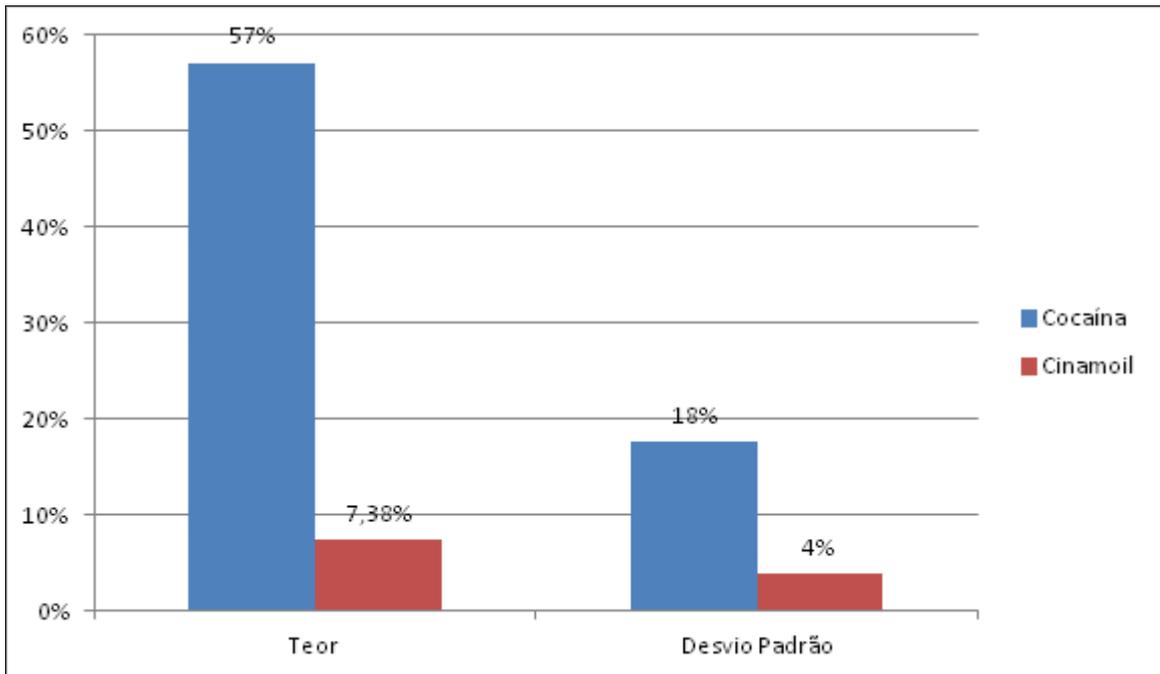


Figura 25 – Teor médio e desvio padrão da cocaína e cinamoilcocaínas das amostras de AM, RO e MS juntas.

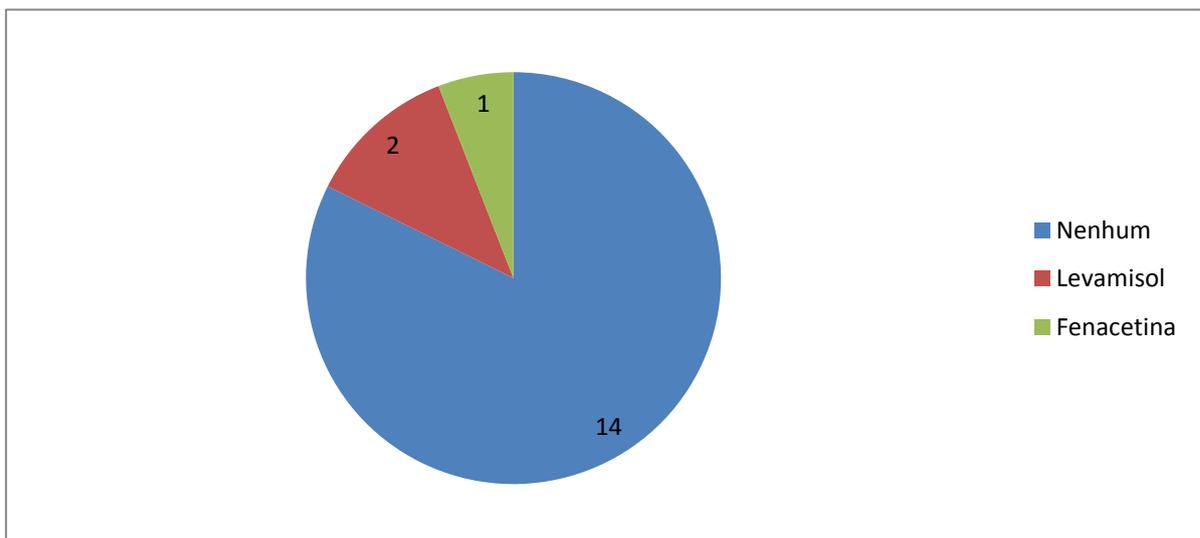


Figura 26 – Adulterantes encontrados nas amostras de AM, RO e MS juntas.

Pelos dois gráficos acima, foi percebido uma característica semelhante ao das amostras apreendidas nas demais cidades de fronteira. Essas características consistem em um teor de cocaína abaixo da média nacional, um grau de oxidação baixo e um desvio padrão alto para a quantidade de amostras analisadas. A predominância de amostras sem a presença de adulterantes também é típico de

amostras encontradas em estados de entrada da droga e, possivelmente, esses estados estão no meio de alguma rota.

Foram apresentados acima os dados por regiões. Uma visão geral das amostras de todo o Brasil será apresentado nas figuras 27 e 28.

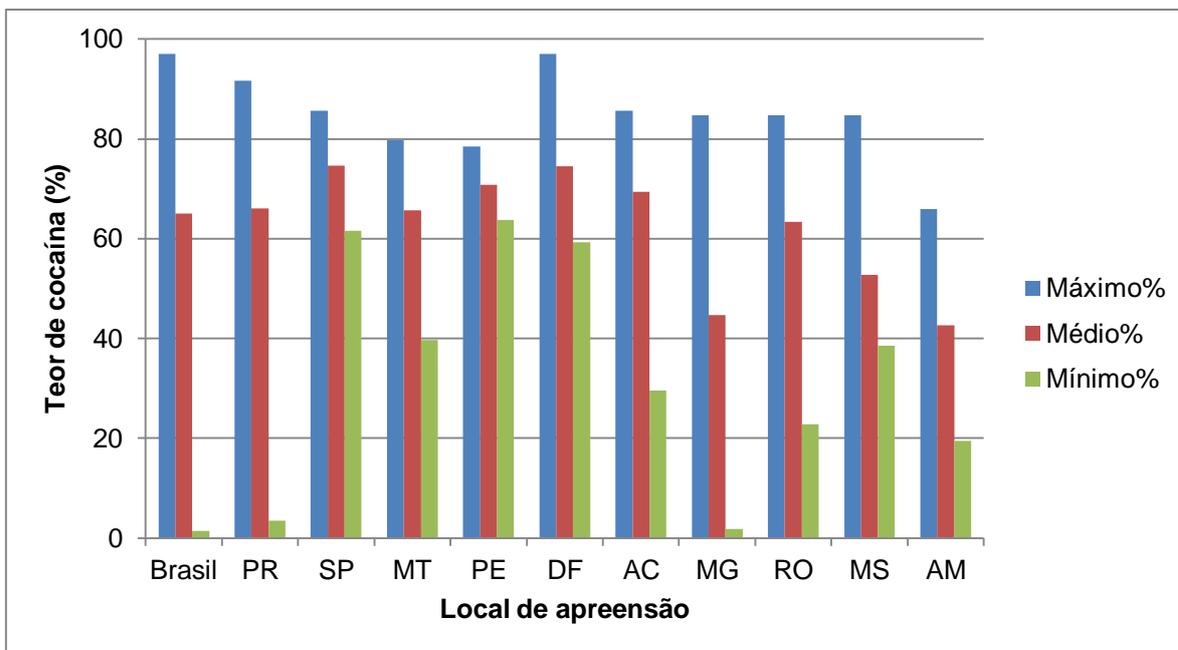


Figura 27 – Teores de cocaína máximo, médio e mínimo para cada estado com amostras analisadas.

Com os teores apresentados na figura 27, é possível observar que os teores de cocaína são na média altos (acima de 60%) para quase todos os estados, esse dado ajuda na hora da construção da curva em que para aumentar ainda mais a confiabilidade, mais pontos serão inseridos na extremidade superior da curva.

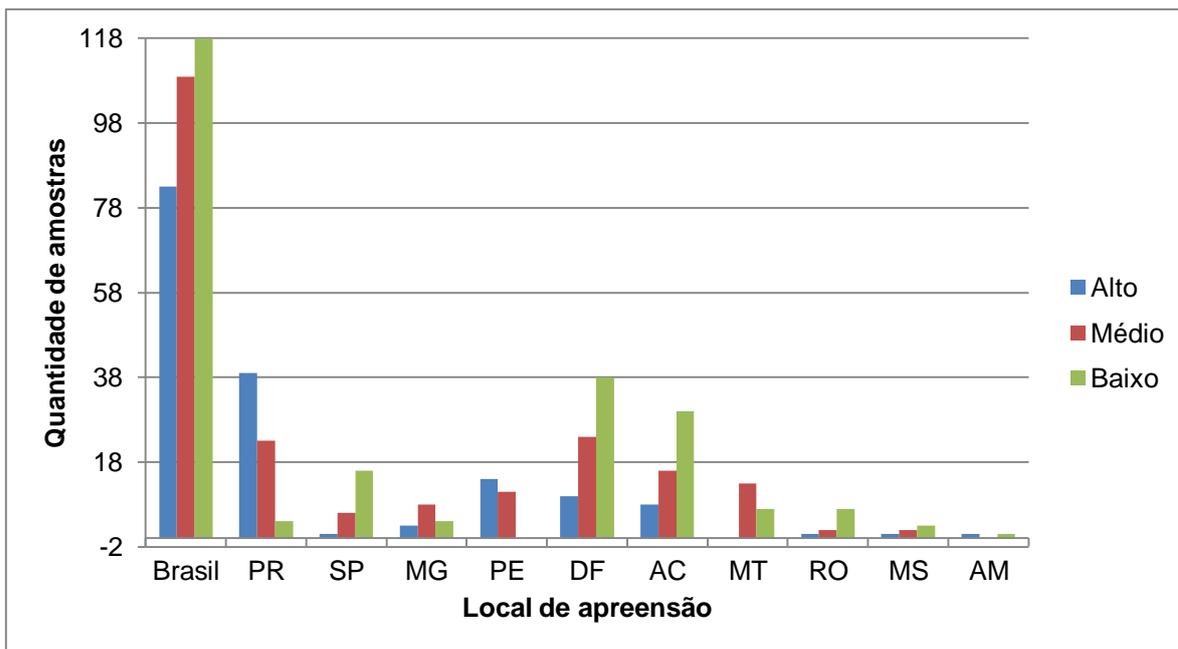


Figura 28 – Gráfico da quantidade de amostras contendo o grau de oxidação alto, médio e baixo por estado.

Pode-se observar, que na maioria dos estados a quantidade de amostras é muito baixa para se tirar conclusões sobre algum padrão por estado, mas algumas características já podem ser observadas, tais como: estados que fazem fronteira com países produtores (AC, MT, RO, MS e AM) e locais com grande consumo de crack (SP e DF) têm como características das suas amostras o baixo ou médio grau de oxidação, o que mostra que a droga ainda não foi muito refinada. Já no caso de estados mais distantes dessas fronteiras (PR, PE e MG), a droga geralmente chega mais refinada para que se tenha a ela um valor agregado.

Essas foram, portanto, as observações iniciais sobre a droga consumida no Brasil, com o progresso do projeto PeQui e a criação de mais subprojetos, espera-se que os dados sejam confrontados e ajudem na segurança pública do Brasil.

6. CONCLUSÕES

- Foram apresentados os resultados de análises por GC-FID da composição de drogas apreendidas em diferentes regiões do Brasil. Dessas análises foram quantificados teores de cocaína, cis e trans-cinamoilcocaínas e identificados os adulterantes utilizados em cada região.
- Pôde-se observar que a cromatografia gasosa é um bom método (preciso e exato) para a quantificação desses compostos devido às suas características como volatilidade, polaridade e resistência térmica.
- Observou-se também da técnica de cromatografia gasosa a possibilidade de analisar todas as formas da cocaína em um mesmo método de análise, facilitando o trabalho dos encarregados pelas análises.
- A observância dessa maior continuidade do trabalho será de grande ajuda principalmente nos estados mais afastados, com laboratórios menores e com maiores dificuldades de acesso, onde há menor número de equipamentos e maior demora para a chegada de um especialista.
- Com os dados gerados no trabalho, ainda não foi possível apontar nenhum padrão por estado, mas algumas conclusões importantes já podem ser tiradas:
- Estados como o Acre, que fazem fronteira com países produtores da droga, têm como características principais a presença de drogas pouco refinadas e ainda em formato de base livre;
- Estados como o Paraná, que fazem fronteira com países que não são produtores e regiões que não são de fronteira como o Distrito Federal, têm como características principais uma droga mais refinada, geralmente cloridrato de cocaína.
- Será necessário juntar os dados desse trabalho com os dados gerados nos outros subprojetos do PeQui para que um perfil químico completo de cada amostra seja produzido.

- Conclui-se então que a quantidade de amostras analisadas por estado, assim como a quantidade de informações sobre cada amostra, ainda são insuficientes para um estudo estatístico mais avançado.

7. PERSPECTIVAS

- A primeira perspectiva é a implantação desse método em todos os SETEC (setores técnico científicos) espalhados pelo país, visando facilitar e agilizar o trabalho dos peritos dentro do laboratório.
- Outra perspectiva é que, ao lado de projetos futuros e da criação do banco de dados, o método ajudará a Polícia Federal no combate ao tráfico de entorpecentes no Brasil.
- Mais projetos estarão por vir e ajudarão no combate ao crime organizado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Dujourdy, L.; Besacier, F.; *Foren. Sci. Intern.* **2008**, 179, 111.
- ² Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. *Química Orgânica*, 9ª Ed., LTC, Rio de Janeiro, 2009.
- ³ Nathanson, J. A.; Hunnicutt, E. J.; Kantham, L.; Scavone, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90, 9645.
- ⁴ Inaba, D. S.; Cohen, W. E.; *Upper, Downers and All Arounders: Physical and Mental Effects of Psychoactive Drugs*, 6ª Ed.; CNS Productions: Medford, 2007.
- ⁵ Lehninger, A. L. *Princípios de Bioquímica*, 5ª Ed., Sarvier, São Paulo, 2006.
- ⁶ Plowman, T. *In Cultural Survival Report 23 - Coca and Cocaine: Effects on People and Policy in Latin America*; Latin American Studies Program (LASP), and *Cultural Survival, Inc.*: Cornell University, 1985, cap. Coca Chewing and the Botanical Origins of Coca (*Erythroxylum* spp.) in South America.
- ⁷ Cartmell, L. W.; Aufderheide, A. C.; Springfield, A.; Buikstra, J.; Arriaza, B.; Weems, C. *Rev. Chungara.* **1994**, 26, 125.
- ⁸ Hastorf, C. A. *Econ. Bot.*, **1987**, 41, 292.
- ⁹ Oropesa Ortuno L., Oropesa Garcia J.C., Oropesa Garcia F., *Manual internacional de investigation y control quimico antonarcoticos*, 2ª Ed., FTM, La Paz, Bolivia, 2005.
- ¹⁰ <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/index.php#historico>, acessado em 20/08/2012.
- ¹¹ Drug Identification Bible. **2006**, 251-261. (ISBN: 0-9635626-8-1), disponível em <http://www.drugidbible.com>.
- ¹² Paula, S.; Tabet, M. R.; Farr, C. D.; Norman, A. B.; Ball, W. J.; *Journ. of Medic. Chem.* **2004**, 47, 133.
- ¹³ Brasil. Lei nº. 11.343/06 de 26 de agosto de 2006. Brasília, 2006.
- ¹⁴ Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS 344/98. Brasília, 1998.
- ¹⁵ Brasil. Lei nº 10.357/01 de 27 de dezembro de 2001. Brasília, 2001.
- ¹⁶ Brasil. decreto nº 4.262/02 de 10 de junho de 2002. Brasília, 2002.
- ¹⁷ Brasil. Ministério da Justiça. Portaria nº 1.274/03 de 25 de agosto de 2003. Brasília, 2003.

- ¹⁸ Brasil. Ministério da Justiça. Portaria nº 113/04 de 14 de janeiro de 2004. Brasília, 2004.
- ¹⁹ Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 21/2010 de 17 de julho de 2010. Brasília 2010.
- ²⁰ FINEP/MCT (PeQui 01.09.0275-00) CNPq. 555023/ 2010-9.
- ²¹ Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*, 1ª Ed., Unicamp, 2006.
- ²² Casale, J. F.; James, B. S.; Ehleringer, J. R.; Morello, D. R.; Loot, M. J.; *J. of Foren. Sci.* **2005**, 50, 1.
- ²³ Campanella, L.; Colapichchioni, C.; Tomassetti, M.; Dezzi, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, 14, 1047.
- ²⁴ Piñero, E. L.; Casale, J. F. *Microgram J.* **2006**, 4, 47.
- ²⁵ Moore, J. M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1973**, 56, 1199.
- ²⁶ Dujourdy, L.; Besacier, F.; *Foren, Sci. Intern.* **2008**, 179, 111.
- ²⁷ Yadav, A. K.; Singh, S. K.; Yashwant; Verma, S.; *International Journal of Natural Product Science*, **2012**, 1.
- ²⁸ Casale, J. F.; Klein, R. F. X.; *Foren. Sci. Review.* **1993**, 5, 95.
- ²⁹ http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html, acessado em 20/09/2012.
- ³⁰ EURACHEM – The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, **1998**.
- ³¹ FDA – Guideline for submitting samples and Analytical data for methods validation.
- ³² Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899/03, de 29 de maio de 2003. Brasília 2003.
- ³³ Loda, C.; Bernabe, E.; Nicoletti, A.; Bacchi, S.; Dams, R.; *Org. Process Res. Dev.*, **2011**, 15, 1388.
- ³⁴ Brendolan, G. *Validação de Métodos Analíticos*, SGB Consultoria Química Ltda, 2010.
- ³⁵ Hooff, G.P.; Meesters, R.J.W.; van Kampen, J. J. A.; van Huizen, N. A.; Koch, B.; Al Hadithy, A. F. Y.; van Gelder, T.; Osterhaus, A. D. M. E.; Gruters, R. A.; Luider, T. M.; *Anal Bioanal Chem*, **2011**, 400, 3473.
- ³⁶ Heuskin, S.; Rozet, E.; Lorge, S.; Farmakidis, J.; Hubert, P.; Verheggen, F.; Haubruge, E.; Wathelet, J. P.; Lognay, G.; *J Pharm Biomed Anal.* **2010**. 53, 962.

- ³⁷ Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quím. Nova*, **2004**, 27, 771.
- ³⁸ Swarts, M.; Krull, I.; *chromatographyonline.com*, **2011**, 29, 1.
- ³⁹ Peters, F. T.; Maurer, H. H.; *Intern. J. of Nat. Prod. Sci.*, **2001**, 28, 16.
- ⁴⁰ Soncin, S.; Panseri, S.; Rusconi, M.; Mariani, M.; Chiesa, L. M.; Biondi, P. A.; *Food Chem.*, **2012**, 134, 440.
- ⁴¹ Mol, H. G. J.; Reynolds, S. L.; Fussell, R. J.; Stajnbaher, D.; *Drug Test. and Anal.*, **2012**, 4, 10.
- ⁴² International Conference on Harmonization (ICH). Valid. of Anal. Meth.: Definitions and Terminology. ICH Q2 A. **1994**.
- ⁴³ Jin-Aa, O.; Ho-Sang, S.; *J. of Chrom. A*, **2012**, 1247, 99.
- ⁴⁴ Dinis-Oliveira, R.; Gouveia, C.; Oliveira, A.; Carvalho, F.; Moreira, R. F.; *Toxic. letters*, **2012**, 211, 148.
- ⁴⁵ Price, E. P.; Dale, J. L.; Cook, J. M.; Sarovich, D. S.; Seymour, M. L.; Ginther, J. L.; Kaufman, E. L.; Beckstrom-Sternberg, S. M.; Mayo, M.; Kaestli, M.; Glass, M. B.; Gee, J. E.; Wuthiekanun, V.; Warner, J. M.; Baker, A.; Foster, J. T.; Tan, P.; Tuanyok, A.; Limmathurotsakul, D.; Peacock, S. J.; Currie, B. J.; Wagner, D. M.; Keim, P.; Pearson, T.; *PLOS ONE*, **2012**, 7, 5.
- ⁴⁶ Fernandes, K. G.; Moraes, M.; Gomes Neto, J. A.; Nóbrega, J. A.; Oliveira, P. V.; *Quím. Nova*, **2003**, 26, 249.
- ⁴⁷ Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899/2003 de 23 de maio de 2003. Brasília 2003.
- ⁴⁸ International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH Q2 (R1). **2005**. Disponível em <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Acessado em 12/10/2010.
- ⁴⁹ AOAC International. 5. Peer-Verified Methods Program – Manual on Policies and procedures. **1993**.
- ⁵⁰ Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). 4. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008. **2007**.
- ⁵¹ Green, J. M.; *Analytical Chemistry*, **1996**, 56, 305A.
- ⁵² Zar, J. H.; *Biostatistic Analysis*, 3ª Ed., Prentice Hall College, 1996.
- ⁵³ Brendolan, G.; *SGB Consultoria Química Ltda*, **2006**, 001, 1.

⁵⁴ Casale, J. F.; Hays, P. A.; Toske, S. G.; Berrier, A. L.; *J Forensic Sci*, **2007**, 52, 860.

⁵⁵ Silva Junior, R. C.; Gomesa, C. S.; Goulart Junior S. S.; Almeida, F. V.; Grobério, T. S.; Braga, J. W. B, Zacca, J. J.; Vieira, M. L.; Botelho, E. D.; Maldaner, A. O.; *Forensic Science International*, **2012**.

APÊNDICE 01

PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUANT COCA-FID (QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E DETECÇÃO DE CINAMOILCOCAÍNAS E PRINCIPAIS ADULTERANTES POR CG-FID)

1 – OBJETIVO / PRINCÍPIOS

1.1– OBJETIVOS

O presente protocolo tem por finalidade descrever os procedimentos necessários para a validação do método analítico denominado Quant Coca, cuja finalidade é realizar a quantificação de COCAÍNA, CINAMOILCOCAÍNAS, BENZOCAÍNA, CAFEÍNA, PROCAÍNA, FENACETINA, LIDOCAÍNA, LEVAMISOL, DILTIAZEM e HIDROXIZINA em amostras de cocaína apreendidas pela Polícia Federal.

O procedimento da validação foi baseado no Guia Internacional do ICH Q2 (R1)¹, considerando também o guia DOQ-CGRE-008 do INMETRO² e informações da AOAC³.

O processo de validação será integralmente feito pelo analista principal.

1.2– PRINCÍPIOS

O método a ser validado tem como princípio básico a extração com solvente dos analitos da amostra, seguido pela quantificação por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (do inglês, FID) em coluna cromatográfica DB-1 da Agilent com fase de 100% Dimetilpolisiloxano.

2 - DEFINIÇÕES

- Branco de análise: Preparar solução contendo os padrões internos (PI), o solvente (clorofórmio) e o modificador de pH (dietilamina).

- Solução estoque: solução contendo todos analitos em investigação no Branco de análise.

- Controle fortificado: solução de todos analitos em investigação no Branco de análise. A concentração de cada analito deve estar entre o 3º e o 4º ponto da curva analítica.

3 - PARÂMETROS

Os parâmetros que serão avaliados no processo de validação serão:

- 1 – Seletividade
- 2 – Repetitividade de Sistema
- 3 – Repetitividade de Método
- 4 – Exatidão
- 6 – Linearidade da curva analítica
- 7 – Limite de Detecção e Quantificação
- 8 – Robustez

3.1 – SELETIVIDADE

A seletividade será realizada avaliando-se o perfil cromatográfico do solvente, amostra e padrão de forma a determinar se o método tem capacidade de identificar as substâncias sem a ocorrência de sobreposição por interferentes.

A avaliação será realizada analisando-se as seguintes soluções:

- 1 – Branco de análise
- 2 – Controle fortificado.

Crítérios de Aceitação: O método será considerado seletivo se não for observada qualquer coeluição na região dos tempos de retenção das substâncias investigadas. A presença de coeluentes, provenientes do branco ou do controle fortificado, implica na reavaliação do método.

3.2 – REPETITIVIDADE DE SISTEMA (PRECISÃO INTRA-DIAS)

É considerada repetitividade do sistema, o valor do coeficiente de variação (CV) da área de cada pico de interesse obtido a partir de:

-Preparar 6 soluções dos analitos de interesse na mesma concentração (entre o 3º e o 4º ponto da curva). Injetar cada uma individualmente.

Crítérios de Aceitação: O valor do coeficiente de variação para a repetitividade do sistema deverá ser de no máximo 1% no caso da cocaína e de no máximo 1,5% no caso da cis e da trans-cinamoilcocaína.

O desvio padrão e o coeficiente de variação deverão ser informados.

3.3 – REPETITIVIDADE DO MÉTODO (PRECISÃO INTER-DIAS)

É considerada repetitividade do método o valor do coeficiente de variação da área do pico de interesse obtido pela repetitividade do sistema em 2 dias consecutivos.

Crítérios de Aceitação: O valor do desvio padrão relativo para a repetitividade do método deverá ser de 2% para todos os analitos em questão.

O desvio padrão e coeficiente de variação deverão ser informados.

3.4 – EXATIDÃO

A exatidão será calculada da seguinte maneira:

- A partir de amostras de cocaína e cinamoilcocaínas certificadas pelo DEA (departamento americano especializado em análise quantitativa de drogas).

Neste processo a exatidão será calculada em 3 níveis de concentração da curva analítica. São eles:

- Nível baixo: entre o 1º e 2º ponto
- Nível médio: entre o 3º e 4º ponto
- Nível alto: entre o 5º e 6º ponto

Crítérios de Aceitação: Será considerado exato, o método que apresentar um valor de recuperação dentro do intervalo de 98 – 102% para cada analito em cada nível de concentração, em conformidade com os critérios da AOAC³.

3.6 – LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA

Procedimento:

A linearidade será avaliada em 8 (oito) níveis com triplicatas a cada nível, obtidos por diluições independentes a partir de uma solução estoque.

Cada nível será preparado por diluição da solução estoque em um balão volumétrico de 5 mL utilizando pipetas automáticas e depois transferidos para os vials. Os volumes utilizados para cada diluição estão descritos nas tabelas abaixo:

Tabela de diluição para a cocaína

Nível	Vol. Estoque (µL)	Vol. Branco (µL)	Fração da cocaína na amostra	Concentração (mg/mL)
1	50	4950	1,0%	0,0080
2	250	4750	5,0%	0,0402
3	500	4500	10,1%	0,0804
4	1000	4000	20,1%	0,1608
5	2000	3000	40,2%	0,3217
6	3000	2000	60,3%	0,4825
7	3750	1250	75,4%	0,6032
8	5000	0	100,5%	0,8042

Tabela de diluição para a cinamoilcocaína

Nível	Vol. Estoque (μL)	Vol. Branco (μL)	Fração da cocaína na amostra	Concentração (mg/mL)
1	50	4950	0,03%	0,000268
2	250	4750	0,16%	0,001338
3	500	4500	0,31%	0,002677
4	1000	4000	0,62%	0,005353
5	2000	3000	1,25%	0,010706
6	3000	2000	1,87%	0,016060
7	3750	1250	2,34%	0,020074
8	5000	0	3,12%	0,026766

Critérios de Aceitação: A linearidade da curva analítica será considerada adequada se: R2 maior que 0,99

3.7 – LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Limite de Detecção (LD): Será determinado de forma experimental através do processo de diluição sucessiva.

Procedimento:

Preparar um controle fortificado no ponto penúltimo ponto da curva e realizar em seguida diluições consecutivas até não se ter certeza de que o pico observado no cromatograma seja do analito de interesse. O ponto anterior será definido como sendo o LD.

Em seguida, a solução na concentração do LD deverá ser analisada por 6 vezes.

Critérios de Aceitação: Será considerado válido o valor somente se o composto alvo for detectado em todas as replicatas.

Limite de Quantificação (LQ): Será calculado a partir do valor do LD e confirmado experimentalmente.

Procedimento:

O limite de quantificação será determinado considerando-se o valor do limite de detecção, multiplicando-o por 3. Preparar um controle fortificado na concentração do LQ calculada e analisar por 6 vezes visando o cálculo do CV.

Crítérios de Aceitação: O Limite de Quantificação será considerado adequado se a recuperação estiver entre 90 – 107% e o coeficiente de variação for $\leq 20\%$.

Para os objetivos práticos do trabalho se o Limite de Quantificação estiver abaixo de 1% (m/m), o valor não mais será confiável. Portanto, se obtiver experimentalmente LQ menor do que esse valor, ele será considerado o limite.

3.8 – ROBUSTEZ

A robustez será avaliada pela modificação de parâmetros do método.

Os seguintes parâmetros serão avaliados com injeção do controle fortificado em triplicata:

Injeção no cromatógrafo com seringa de modelo diferente da utilizada durante os procedimentos da validação; porém do mesmo volume;

Injeção das amostras antes da limpeza do liner (imediatamente antes de exceder o número máximo de injeções por liner);

Injeção das amostras depois da limpeza do liner (imediatamente após a limpeza com solventes apropriados);

Injetar em outro equipamento de CG-FID;

Crítérios de Aceitação: Variação máxima absoluta de 3%

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH Q2 (R1). 2005. Disponível em <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Acessado em 12/10/2010.

² Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). 4. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008. 2007.

³ AOAC International. 5. Peer-Verified Methods Program – Manual on Policies and procedures. **1993**.

APÊNDICE 02

TABELA COMPLETA DAS AMOSTRAS QUANTIFICADAS

Tabela 12 - Tabela contendo informações do estado de origem, teor de cocaína, forma de apresentação, teor de cinamoilcocaína total, grau de oxidação e adulterantes presentes de todas as amostras analisadas neste trabalho.

Estado	Teor (%)	Forma	Cinamoil (%)	Oxidação**	Adulterantes
São Paulo	74,70	Base	7,40	Baixo	-
São Paulo	66,10	Mistura	9,09	Baixo	Fen
São Paulo	84,30	Cloridrato	2,47	Médio	-
São Paulo	61,60	Mistura	8,08	Baixo	Fen
São Paulo	85,60	Cloridrato	2,52	Médio	-
São Paulo	78,20	Base	13,02	Baixo	-
São Paulo	75,40	Base	9,24	Baixo	-
São Paulo	74,70	Base	14,07	Baixo	-
São Paulo	76,50	Base	9,06	Baixo	-
São Paulo	66,40	Mistura	9,04	Baixo	Fen
São Paulo	74,75	Cloridrato	7,62	Baixo	-
São Paulo	66,05	Cloridrato	9,38	Baixo	Fen
São Paulo	84,27	Cloridrato	2,55	Médio	-
São Paulo	61,64	Cloridrato	8,33	Baixo	Fen
São Paulo	85,59	Cloridrato	2,60	Médio	-
São Paulo	78,22	Cloridrato	13,41	Baixo	-
São Paulo	75,36	Cloridrato	9,54	Baixo	-
São Paulo	74,73	Cloridrato	14,49	Baixo	-
São Paulo	76,49	Cloridrato	9,33	Baixo	-
São Paulo	66,41	Cloridrato	9,31	Baixo	Fen
São Paulo	69,15	Cloridrato	2,35	Médio	-
São Paulo	81,68	Cloridrato	1,67	Alto	-
São Paulo	79,59	Cloridrato	3,23	Médio	-
Paraná	16,37	Cloridrato	0,00	Alto	Caf+Ldc
Paraná	17,52	Cloridrato	0,00	Alto	Caf+Ldc
Paraná	16,21	Cloridrato	0,00	Alto	Caf+Ldc
Paraná	17,19	Cloridrato	3,16	Médio	Caf+Ldc
Paraná	24,64	Cloridrato	0,00	Alto	Bzc+Ldc
Paraná	80,84	Cloridrato	2,85	Médio	Ldc
	79,83	Cloridrato	2,83	Médio	Ldc
	81,84	Cloridrato	3,04	Médio	Ldc
Paraná	21,38	Cloridrato	0,00	Alto	Bzc+Ldc
	21,05	Cloridrato	0,00	Alto	Bzc+Ldc
	22,88	Cloridrato	0,00	Alto	Bzc+Ldc
Paraná	4,33	Cloridrato	0,00	Alto	Caf+Ldc

Estado	Teor	Forma	Cinamoil	Oxidação	Adulterantes
Paraná	1,43	Cloridrato	0,00	Alto	Fen+Ldc
Paraná	75,78	Cloridrato	1,28	Alto	Dtz
Paraná	76,90	Cloridrato	1,21	Alto	Dtz
Paraná	73,43	Cloridrato	0,65	Alto	Dtz
Paraná	73,93	Cloridrato	0,00	Alto	Dtz
Paraná	73,88	Cloridrato	1,18	Alto	Dtz
Paraná	74,66	Cloridrato	0,00	Alto	Dtz
Paraná	61,04	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	59,62	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	58,89	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	65,56	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	62,94	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	74,66	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	70,44	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	67,32	Cloridrato	2,92	Médio	Hzn
Paraná	74,98	Cloridrato	1,08	Alto	Hzn
Paraná	74,49	Cloridrato	0,00	Alto	Hzn
Paraná	73,78	Cloridrato	1,08	Alto	Hzn
Paraná	76,13	Cloridrato	1,85	Alto	Lvm
Paraná	85,37	Cloridrato	0,69	Alto	-
Paraná	79,71	Cloridrato	2,01	Médio	-
Paraná	80,68	Cloridrato	1,63	Alto	-
Paraná	69,48	Cloridrato	1,98	Alto	Lvm
Paraná	70,80	Cloridrato	0,00	Alto	Hzn
Paraná	74,07	Cloridrato	0,00	Alto	Hzn
Paraná	60,79	Cloridrato	0,00	Alto	Dtz
Paraná	70,38	Cloridrato	1,24	Alto	Dtz
Paraná	58,64	Cloridrato	0,00	Alto	Lvm
Paraná	66,12	Cloridrato	3,58	Médio	Hzn
Paraná	81,60	Cloridrato	0,00	Alto	-
Paraná	23,46	Cloridrato	0,00	Alto	Bzc+Ldc
Paraná	80,12	Cloridrato	0,50	Alto	-
Paraná	69,62	Cloridrato	0,38	Alto	Lvm+Dtz
Paraná	84,12	Cloridrato	0,35	Alto	-
Paraná	84,71	Cloridrato	0,51	Alto	-
Paraná	85,20	Cloridrato	2,84	Médio	-
Paraná	85,61	Cloridrato	2,70	Médio	-
Paraná	82,65	Cloridrato	2,64	Médio	-
Paraná	84,72	Cloridrato	2,90	Médio	-
Paraná	85,73	Cloridrato	2,83	Médio	-
Paraná	84,87	Cloridrato	2,92	Médio	-

Estado	Teor	Forma	Cinamoil	Oxidação	Adulterantes
Paraná	83,97	Cloridrato	2,89	Médio	-
Paraná	80,93	Cloridrato	2,77	Médio	-
Paraná	84,26	Cloridrato	3,04	Médio	-
Paraná	83,51	Cloridrato	2,77	Médio	-
Paraná	84,66	Cloridrato	3,04	Médio	-
Paraná	78,53	Cloridrato	2,84	Médio	-
Paraná	84,31	Cloridrato	2,83	Médio	-
Paraná	85,05	Cloridrato	2,94	Médio	-
Paraná	85,41	Cloridrato	1,80	Alto	-
Paraná	88,64	Cloridrato	2,87	Médio	-
Paraná	90,28	Cloridrato	2,57	Médio	-
Paraná	75,66	Cloridrato	7,07	Baixo	Fen+Ldc
Paraná	80,71	Cloridrato	7,38	Baixo	Ldc
Paraná	78,39	Cloridrato	7,31	Baixo	Ldc
Paraná	80,48	Cloridrato	7,28	Baixo	Ldc
Paraná	91,64	Cloridrato	2,75	Médio	-
Paraná	91,69	Cloridrato	2,76	Médio	-
Mato Grosso do Sul	73,49	Cloridrato	2,15	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	72,72	Cloridrato	2,15	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	71,00	Cloridrato	2,11	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	74,87	Cloridrato	2,07	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	71,33	Cloridrato	2,09	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	71,30	Cloridrato	2,12	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	79,72	Cloridrato	2,23	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	76,74	Cloridrato	2,18	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	68,44	Cloridrato	2,01	Médio	Lvm
Mato Grosso do Sul	65,78	Base	10,48	Baixo	-
Mato Grosso do Sul	53,58	Base	6,89	Baixo	-
Mato Grosso do Sul	60,46	Base	8,84	Baixo	-
Mato Grosso do Sul	49,44	Base	6,09	Baixo	-
Mato Grosso do Sul	50,46	Base	5,83	Médio	-
Mato Grosso do Sul	54,36	Base	5,01	Médio	-
Mato Grosso do Sul	65,44	Base	10,49	Baixo	-
Mato Grosso do Sul	39,69	Base	4,66	Médio	-
Mato Grosso do Sul	66,26	Base	10,01	Baixo	-
Mato Grosso do Sul	69,77	Base	14,39	Baixo	-
Mato Grosso do Sul	77,72	Base	2,69	Médio	-
Pernambuco	65,43	HCl	0,32	Alto	-
Pernambuco	64,90	HCl	0,31	Alto	-
Pernambuco	66,38	HCl	0,32	Alto	-
Pernambuco	65,93	HCl	0,42	Alto	-

Estado	Teor	Forma	Cinamoil	Oxidação	Adulterantes
Pernambuco	75,11	HCl	4,35	Médio	-
Pernambuco	75,58	HCl	3,90	Médio	-
Pernambuco	74,90	HCl	1,87	Alto	-
Pernambuco	74,44	HCl	3,89	Médio	-
Pernambuco	68,56	HCl	0,00	Alto	-
Pernambuco	78,07	HCl	4,54	Médio	-
Pernambuco	68,25	HCl	0,47	Alto	-
Pernambuco	67,63	HCl	0,46	Alto	-
Pernambuco	78,54	HCl	2,01	Médio	-
Pernambuco	65,48	HCl	0,57	Alto	-
Pernambuco	75,06	HCl	1,56	Alto	-
Pernambuco	77,12	HCl	4,01	Médio	-
Pernambuco	76,21	HCl	3,87	Médio	-
Pernambuco	73,12	HCl	4,14	Médio	-
Pernambuco	72,40	HCl	4,32	Médio	-
Pernambuco	65,79	HCl	4,89	Médio	-
Pernambuco	78,80	HCl	1,39	Alto	-
Pernambuco	63,72	HCl	0,60	Alto	-
Pernambuco	67,14	HCl	4,73	Médio	-
Pernambuco	67,92	HCl	0,11	Alto	-
Pernambuco	64,65	HCl	0,77	Alto	-
DF	81,37	Cloridrato	2,86	Médio	-
DF	82,80	Cloridrato	2,80	Médio	-
DF	82,58	Cloridrato	2,74	Médio	-
DF	83,20	Cloridrato	2,89	Médio	-
DF	80,75	Cloridrato	2,77	Médio	-
DF	82,30	Cloridrato	2,81	Médio	-
DF	97,08	Cloridrato	2,81	Médio	-
DF	81,69	Cloridrato	2,82	Médio	-
DF	70,09	Cloridrato	2,77	Médio	-
DF	83,06	Cloridrato	2,82	Médio	-
DF	68,93	Cloridrato	3,32	Médio	-
DF	63,59	Cloridrato	3,27	Médio	-
DF	59,26	Cloridrato	0,35	Alto	-
DF	67,43	Cloridrato	0,35	Alto	-
DF	67,65	Cloridrato	3,24	Médio	-
DF	67,62	Cloridrato	3,41	Médio	-
DF	68,79	Cloridrato	3,48	Médio	-
DF	68,03	Cloridrato	3,28	Médio	-
DF	63,44	Cloridrato	0,37	Alto	-
DF	59,80	Cloridrato	0,36	Alto	-

Estado	Teor	Forma	Cinamoil	Oxidação	Adulterantes
DF	73,96	Cloridrato	0,27	Alto	-
DF	89,29	Cloridrato	2,90	Médio	-
	88,86	Cloridrato	2,93	Médio	-
	89,15	Cloridrato	2,92	Médio	-
DF	62,44	Base	13,45	Baixo	Lvm
DF	73,96	Base	7,23	Baixo	-
DF	71,07	Base	13,83	Baixo	-
DF	63,56	Base	5,36	Médio	Fen
DF	77,38	Base	10,38	Baixo	-
DF	79,32	Base	0,00	Alto	Lvm
DF	60,32	Base	5,11	Médio	-
DF	76,13	Base	0,29	Alto	-
DF*	62,49	Base	13,73	Baixo	-
DF*	67,50	Base	16,88	Baixo	-
DF*	63,97	Base	16,20	Baixo	Fen
DF*	52,40	Base	16,03	Baixo	-
DF*	59,93	Base	13,65	Baixo	Fen
DF*	8,51	Base	0,00	Alto	-
DF*	8,08	Base	6,93	Baixo	-
DF*	57,13	Base	2,54	Médio	-
DF*	66,88	Base	17,96	Baixo	-
DF*	68,92	Base	20,10	Baixo	-
DF*	26,83	Base	19,02	Baixo	-
DF*	64,60	Base	12,49	Baixo	Fen
DF*	67,39	Base	15,65	Baixo	-
DF*	68,09	Base	15,29	Baixo	-
DF*	67,58	Base	14,95	Baixo	Fen
DF*	50,92	Base	15,10	Baixo	-
DF*	60,68	Base	16,33	Baixo	Fen
DF*	63,28	Base	13,05	Baixo	-
DF*	65,35	Base	16,98	Baixo	-
DF*	67,62	Base	12,18	Baixo	-
DF*	57,35	Base	8,34	Baixo	Fen
DF*	57,82	Base	16,42	Baixo	Fen
DF*	60,86	Base	8,89	Baixo	Fen
DF*	3,06	Base	4,71	Médio	Caf+Ldc
DF*	55,65	Base	2,37	Médio	-
DF*	64,89	Base	20,12	Baixo	-
DF*	6,74	Base	4,83	Médio	-
DF*	2,38	Base	8,04	Baixo	Caf
DF*	6,23	Base	9,51	Baixo	Caf+Ldc

Estado	Teor	Forma	Cinamoil	Oxidação	Adulterantes
DF*	27,67	Base	1,47	Alto	-
DF*	67,90	Base	16,13	Baixo	-
DF*	67,65	Base	16,93	Baixo	-
DF*	67,23	Base	18,96	Baixo	-
DF*	61,66	Base	16,74	Baixo	-
DF*	53,52	Base	3,97	Médio	-
DF*	70,55	Base	14,57	Baixo	-
DF*	74,21	Base	13,38	Baixo	-
DF*	65,31	Base	7,29	Baixo	-
DF*	67,99	Base	17,54	Baixo	-
DF*	67,57	Base	16,65	Baixo	-
DF*	71,58	Base	18,52	Baixo	-
DF*	70,34	HCl	0,00	Alto	-
Acre	77,52	Base	2,72	Médio	Caf
Acre	78,63	Base	4,58	Médio	Caf
Acre	32,40	Base	7,37	Baixo	Caf
Acre	45,39	Base	12,45	Baixo	-
Acre	73,81	Base	4,53	Médio	Caf
Acre	76,45	Base	13,53	Baixo	Fen
Acre	75,48	Base	13,08	Baixo	-
Acre	77,56	Base	11,91	Baixo	-
Acre	74,41	Base	11,73	Baixo	Fen
Acre	76,84	Base	13,05	Baixo	Fen
Acre	73,87	Base	11,72	Baixo	-
Acre	82,64	Base	13,20	Baixo	-
Acre	79,97	Base	0,84	Alto	-
Acre	77,99	Base	12,73	Baixo	Fen
Acre	75,99	Base	11,50	Baixo	Fen
Acre	50,13	Base	1,14	Alto	Fen
Acre	69,70	Base	2,59	Médio	-
Acre	76,76	Base	3,39	Médio	Fen
Acre	78,44	Base	8,23	Baixo	-
Acre	78,42	Base	4,89	Médio	-
Acre	80,89	Base	12,26	Baixo	-
Acre	73,19	Base	1,78	Alto	-
Acre	76,29	Base	8,01	Baixo	-
Acre	56,84	Base	17,71	Baixo	-
Acre	77,55	Base	7,45	Baixo	-
Acre	65,64	Base	3,22	Médio	-
Acre	57,22	Base	0,70	Alto	-
Acre	71,76	Base	6,80	Baixo	-

Estado	Teor	Forma	Cinamoil	Oxidação	Adulterantes
Acre	77,69	Base	7,29	Baixo	Fen
Acre	71,93	Base	7,20	Baixo	-
Acre	76,31	Base	1,64	Alto	-
Acre	60,94	Base	0,85	Alto	-
Acre	85,10	Base	10,91	Baixo	-
Acre	75,54	Base	14,49	Baixo	-
Acre*	66,56	Base	7,62	Baixo	-
Acre*	84,89	Base	4,44	Médio	-
Acre*	43,35	Base	11,74	Baixo	Fen
Acre*	79,57	Base	8,85	Baixo	-
Acre*	50,32	Base	3,75	Médio	Fen
Acre*	73,48	Base	9,10	Baixo	-
Acre*	85,01	Base	7,28	Baixo	-
Acre*	29,64	Base	2,51	Médio	Fen
Acre*	43,20	Base	10,84	Baixo	Fen
Acre*	73,22	Base	7,87	Baixo	-
Acre*	73,63	Base	2,23	Médio	-
Acre*	57,38	Base	3,65	Médio	Caf
Acre*	55,62	Base	12,29	Baixo	Fen
Acre*	79,11	Base	3,58	Médio	-
Acre*	43,15	Base	1,87	Alto	Fen
Acre*	46,82	Base	5,03	Médio	-
Acre*	85,68	Base	1,71	Alto	-
Acre*	85,10	Base	2,70	Médio	-
Acre*	80,49	Base	3,09	Médio	-
Acre*	70,99	Base	8,26	Baixo	Fen
Minas Gerais	5,39	Cloridrato	6,31	Baixo	Caf+Ldc
Minas Gerais	17,17	Cloridrato	4,29	Médio	-
Minas Gerais	33,04	Cloridrato	4,76	Médio	-
Minas Gerais	1,86	Cloridrato	0,00	Alto	Caf+Ldc
Minas Gerais	20,57	Cloridrato	5,57	Médio	-
Minas Gerais	81,98	Cloridrato	13,47	Baixo	Lvm
Minas Gerais	11,19	Cloridrato	2,96	Médio	Bzc+Caf
Minas Gerais	83,10	Cloridrato	3,49	Médio	-
Minas Gerais	69,72	Cloridrato	6,79	Baixo	-
Minas Gerais	75,63	Cloridrato	1,83	Alto	Lvm
Minas Gerais	83,24	Cloridrato	3,39	Médio	-
Minas Gerais	84,75	Cloridrato	4,59	Médio	-
Minas Gerais	79,43	Cloridrato	8,58	Baixo	-
Minas Gerais	5,48	Cloridrato	5,06	Médio	Caf+Ldc
Minas Gerais	18,23	Cloridrato	0,00	Alto	-

Estado	Teor	Forma	Cinamoil	Oxidação	Adulterantes
Rondônia	22,82	Base	3,48	Médio	-
Rondônia	67,71	Base	8,49	Baixo	-
Rondônia	67,59	Base	6,15	Baixo	Lvm
Rondônia	84,80	Base	9,20	Baixo	-
Rondônia	70,37	Base	1,41	Alto	-
Rondônia	75,17	Base	6,93	Baixo	-
Rondônia	60,74	Base	13,60	Baixo	-
Rondônia	60,84	Base	12,83	Baixo	-
Rondônia	59,65	Base	5,50	Médio	-
Rondônia	64,17	Base	6,58	Baixo	-
Mato Grosso	38,52	Base	9,11	Baixo	-
Mato Grosso	65,51	Cloridrato	2,00	Alto	-
Mato Grosso	41,58	Base	6,11	Baixo	Lvm
Mato Grosso	64,50	Base	3,80	Médio	-
Mato Grosso	49,68	Base	12,70	Baixo	-
Mato Grosso	56,96	Base	4,86	Médio	Fen
Amazonas	65,96	Base	14,63	Baixo	-
Amazonas	19,44	Base	0,00	Alto	-
Outros	13,46	Cloridrato	0,00	Alto	-
Outros	77,94	Base	15,14	Baixo	-
Outros	77,65	Base	15,11	Baixo	-
Outros	78,40	Base	15,79	Baixo	-
Outros	78,33	Base	15,88	Baixo	-
Outros	6,47	Cloridrato	15,60	Baixo	-
Outros	11,97	Cloridrato	9,69	Baixo	-
Outros	70,70	Base	11,39	Baixo	-
Outros	70,79	Base	11,30	Baixo	-

Fen – Fenacetina; Bzc – Benzocaína; Caf – Cafeína; Ldc – Lidocaína; Lvm – Levamisol;
Dtz – diltiazem; Hzn – Hidrozina

* Amostras cedidas pela Polícia Civil do Estado

** Obtido através do teor relativo entre cinamoilcocaína e cocaína

Teor relativo > 6% (nível baixo)

Teor relativo entre 2% e 6% (nível médio)

Teor relativo < 2% (nível alto)

APÊNDICE 03

Procedimentos Operacionais Padrão (POP)

SEPLAB - Procedimento Operacional Padrão 01

Preparação da solução de Padrões Interno

1. OBJETIVO

Este documento tem como objetivo descrever o preparo da solução de Padrões Internos a ser utilizada na quantificação dos principais alcalóides e adulterantes de natureza orgânica presentes em amostras de cocaína por CG-FID, segundo as metodologias desenvolvidas no âmbito do Projeto de Perfil Químico de Drogas (PeQui).

2. INTRODUÇÃO

Para se fazer uma análise de cocaína e diluentes com detector de ionização de chama (FID) é preciso dissolver a amostra em padrões internos para eliminar possíveis variações temporais no aparelho.

O detector FID baseia-se na geração de um sinal elétrico a partir da combustão da amostra na chama. Com isso, diferentemente dos detectores mais comuns como o de massas, ele não tem uma biblioteca para se identificar o analito, ele apenas mostra a quantidade e o tempo de retenção do mesmo. Por isso, adota-se a colocação de um padrão interno para corrigir possíveis falhas ou variações ocorridas no aparelho. Então, a resposta dada será uma relação de área e de tempo de retenção entre padrão interno e analito.

3. REAGENTES

Clorofórmio com pureza HPLC

Dipentilftalato 97%

2,2,2-Trifenilacetofenona 99%

Dietilamina 99%

4. VIDRARIA

1 Balão volumétrico de 1,0 L

1 Balão volumétrico de 50,0 mL

1 Erlenmeyer de 25,0 mL

1 Frasco âmbar de 1,0 L

5. EQUIPAMENTO

Balança analítica XP 205, capacidade máxima 220 g, 0,01 mg, Mettler Toledo®

Pipeta volumétrica de 10,0 mL

Dispenser

6. PROCEDIMENTO

Pesar $51,3 \pm 0,2$ mg de 2,2,2-trifenilacetofenona em um erlenmeyer de 25 mL, dissolver em clorofórmio e transferir para um balão volumétrico de 1,0 L. Lavar o erlenmeyer 5 vezes com o mesmo clorofórmio.

Pesar 2526 ± 10 mg da solução de dipentilftalato em um balão volumétrico de 50,0 mL, completar o volume com o clorofórmio. Agitar bem e com uma pipeta volumétrica, transferir 10,0 mL dessa solução para o balão de 1,0 L já contendo a solução de 2,2,2-trifenilacetofenona. O restante da solução de dipentilftalato deve ser colocada em 2 frascos de headspace e guardado no congelador, pois serão reutilizadas nas próximas soluções de padrões interno.

Adicionar 3,0 mL de dietilamina ao balão de 1,0 L utilizando uma pipeta automática de 5,0 ou 10,0 mL.

Completar o volume do balão com o clorofórmio, agitar bem e transferir a solução para o frasco âmbar de 1,0 L e acoplar o dispenser ao frasco.

CUIDADOS: Este procedimento deve ser realizado com uso dos equipamentos de proteção (jaleco e luvas e óculos de segurança).

SEPLAB - Procedimento Operacional Padrão 02

Quantificação de cocaína e adulterantes por GC-FID

1. OBJETIVO

Este documento tem como objetivo descrever os procedimentos a serem adotados na preparação de amostras de cocaína em suas diversas formas de apresentação, para serem utilizadas na quantificação da própria cocaína, cinamoilcocaínas e principais adulterantes de natureza orgânica por CG-FID, segundo as metodologias desenvolvidas no âmbito do Projeto de Perfil Químico de Drogas (PeQui).

2. INTRODUÇÃO

A cocaína se apresenta em duas formas (base livre ou cloridrato), porém os resultados obtidos utilizando esta técnica será sempre dado em teor de cocaína base livre. Alguns dos diluentes também se apresentam como cloridrato e seus resultados também estarão apresentados em forma de base livre.

Como o detector utilizado será de ionização de chama (FID), ele não informa qual analito está sendo detectado e para evitar que sujeira ou resíduos de análises antigas sejam detectadas, antes de analisar as amostras deve-se injetar e analisar 3 amostras do clorofórmio, utilizado como solvente até não ser observado picos indesejados e 1 amostra da solução de padrão interno (branco da amostra).

3. REAGENTES

Solução de padrões interno em clorofórmio (POP 01)

4. VIDRARIA

1 Erlenmeyer 25 mL

1 vial de 2 mL com tampa e septo

5. EQUIPAMENTO

Balança analítica XP 205, capacidade máxima 220 g, 0,01 mg, Mettler Toledo®

Dispenser

Pipeta automática p1000

GC-FID, Agilent Technologies® 6890N, Detector por Ionização em Chama, Coluna para GC DB1-MS (25 m x 0,20 mm, filme 0,33 µm de Polidimetilsiloxano), Agilent Technologies®

6. PROCEDIMENTO

6.1. Homogeneização da amostra

Transferir parte da amostra do entorpecente para um gral. Caso se trate de amostra de cocaína na forma de sal, triturá-la diretamente no gral com o uso de um pistilo até que se transforme em um pó fino e homogêneo.

Na hipótese da amostra ser de cocaína na forma de base livre, após a transferência para o gral adicionar pequena quantidade de nitrogênio líquido (suficiente para cobrir a amostra) e iniciar imediatamente a trituração com o pistilo. A adição de nitrogênio líquido deve ser cuidadosa para que parte da amostra não seja lançada para fora do gral. Já a trituração deve ser realizada com movimentos rápidos, intensos e constantes, de modo que o entorpecente seja pulverizado antes que se inicie a condensação de água no gral, que se caracteriza pela formação de grumos e adição de umidade à amostra (caso isso ocorra, recomenda-se repetir o procedimento com outra porção do entorpecente). Para todos os casos o resultado final deve ser um sólido finamente dividido e homogêneo.

Após a homogeneização, o material resultante deve ser imediatamente transferido para um microtubo de amostragem com tampa.

6.2. Pesagem e preparação do material a ser analisado

Pesar em um erlenmeyer de 25 mL entre 8,00 e 9,00 miligramas da amostra com precisão de 2 casas decimais.

Dispensar 10 mL da solução de Padrão Interno no erlenmeyer contendo a amostra pesada (com um dispenser calibrado e certificado ou um balão volumétrico de 10,0 mL). No caso da utilização do dispensador automático, testá-lo inicialmente adicionando 10 mL da solução de Padrão Interno em um balão volumétrico de igual volume. Repetir o procedimento até que o valor obtido corresponda ao esperado.

Aliquotar 1 mL dessa solução para um vial de 2 mL utilizando pipeta automática p1000. Fechar o vial imediatamente com tampa (de rosca ou de crimpagem) e septo.

CUIDADOS: Este procedimento deve ser realizado com uso dos equipamentos de proteção (jaleco, luvas e óculos de proteção).

SEPLAB - Procedimento Operacional Padrão 03

Preparação da curva analítica

1. OBJETIVO

Este documento tem como objetivo descrever o preparo da curva analítica a ser utilizada na quantificação dos principais alcalóides e adulterantes de natureza orgânica presentes em amostras de cocaína por CG-FID, segundo as metodologias desenvolvidas no âmbito do Projeto de Perfil Químico de Drogas (PeQui).

2. INTRODUÇÃO

Para realizar a calibração do equipamento deve-se preparar uma curva analítica que consiste em utilizar padrões com concentrações conhecidas do analito em uma matriz o mais próximo da realidade da amostra em estudo. Através da curva analítica se obterá uma relação linear entre a concentração do analito (eixo x) e o sinal de resposta do equipamento (área do pico) (eixo y).

Através do cálculo do coeficiente de determinação (R^2) pode-se avaliar a precisão do método que, no caso do PeQui, deve apresentar valores acima de 0,99. A inclinação da curva está diretamente relacionada com a sensibilidade do método.

3. REAGENTES

Solução de Padrão Interno (POP 01)

4. VIDRARIA

1 Balão volumétrico de 50,0 mL

1 Balão volumétrico de 5,0 mL

Vials de 2 mL com tampa e septo

Béqueres

5. EQUIPAMENTO

1 Pipeta automática p5000

1 Pipeta automática p1000

1 Pipeta automática p100

Balança analítica

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparação da vidraria

Para preparar os balões para serem utilizados, lavar o balão primeiramente com água e detergente. Após essa limpeza, enxaguar por 5 vezes com clorofórmio grau HPLC, utilizando um volume próximo à metade do volume do balão. Em seguida, colocar em estufa à temperatura de no máximo 37 °C até secar por completo. A tampa do balão deve ser limpa com água e detergente, mergulhada por alguns segundos em clorofórmio e submetida à mesma estufa para secagem.

6.2. Pesagem e preparação da solução estoque

Selecionar um balão volumétrico de 50,0 mL calibrado, limpo e seco e mantê-lo por 30 minutos ao lado da balança atingir a temperatura da sala de pesagem.

Utilizando a balança analítica, transferir para o balão volumétrico 49 mg (anotar a massa com 2 casas decimais) da amostra de referência de cocaína (DEA10). Adicionar solução de PI para solubilizar a amostra e gerar assim a “solução estoque”.

6.3. Preparação dos pontos da curva analítica

A faixa de trabalho da curva analítica (Tabela 1) representa as concentrações de 1-100% de cocaína nas amostras, com base no procedimento de preparo da amostra descrito no item 6.2 do POP 02.

Os pontos da curva analítica serão feitos por diluições a partir da solução estoque. Cada ponto será obtido adicionando um determinado volume da solução estoque a um balão volumétrico de 10,0 mL. O balão será avolumado com a solução

de padrão interno. Os volumes a serem adicionados de cada solução para cada ponto da curva e suas concentrações finais estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 13 -Pontos da curva analítica, suas concentrações e volumes adicionados das soluções estoque e de PIs.

Pontos	Volume Solução estoque (µL)	Volume Solução PI (µL)	Concentração (mg/mL)
1	50	4950	0,008
2	250	4750	0,040
3	500	4500	0,081
4	1000	4000	0,161
5	2000	3000	0,322
6	3000	2000	0,483
7	3750	1250	0,604
8	5000	0	0,805

Objetivando otimizar o uso das pipetas automáticas sugere-se: utilizar a pipeta p100 para medir os volumes abaixo ou iguais a 100 µL; a pipeta p1000 para os volumes entre 250 µL e 1000 µL; e a pipeta p5000 para os volumes acima de 1000 µL.

Inicia-se o preparo das soluções da curva analítica pelo ponto de menor concentração (ponto 1). Para a obtenção das triplicatas de cada ponto, transfere-se 1 mL das soluções preparadas (tabela 1) para 3 vials diferentes (1 mL em cada vial). O restante de cada solução deve ser descartado em lugar apropriado para soluções cloradas.

Com o objetivo de minimizar o erro sistemático, utiliza-se o mesmo balão volumétrico para a preparação dos demais pontos da curva analítica. Para isso, deve-se lavar o balão com clorofórmio por 3 vezes e, em seguida, lavar uma única vez com a solução de PI. O balão estará pronto para ser reutilizado sem a necessidade da etapa de secagem. Repete-se o mesmo procedimento para os pontos seguintes.

CUIDADOS: Este procedimento deve ser realizado com uso dos equipamentos de proteção individual (jaleco, luvas e óculos de proteção).