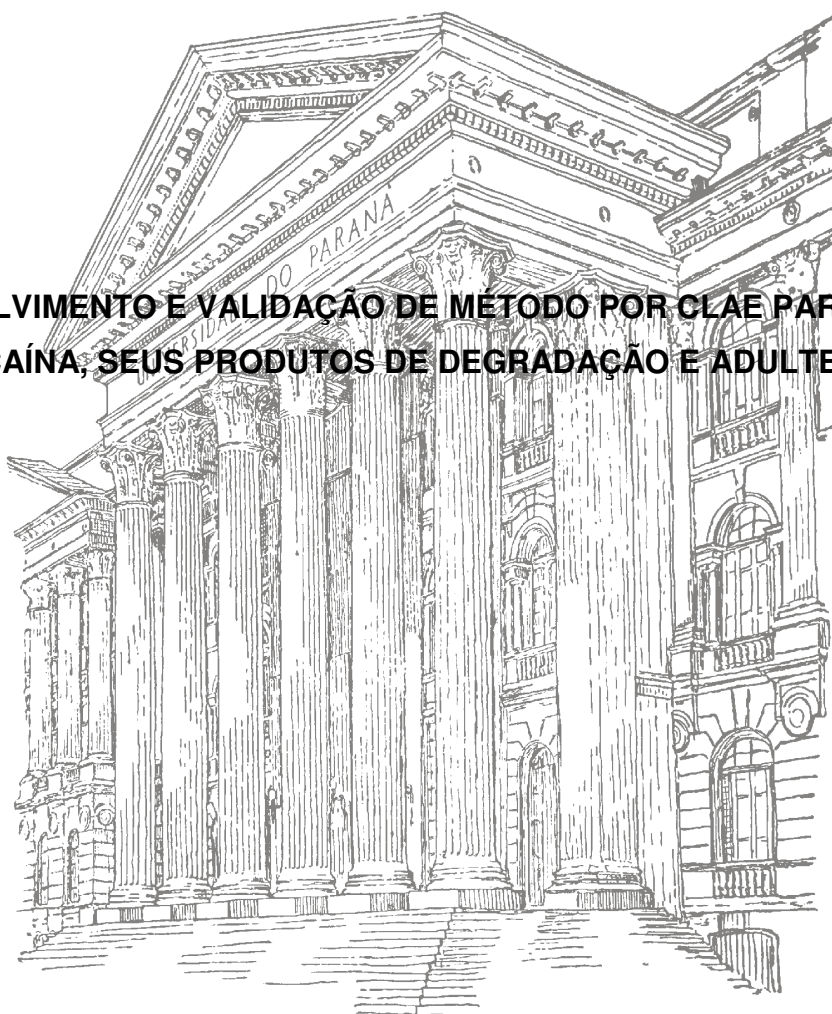


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GISELE FLORIANI**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA ANÁLISE  
DE COCAÍNA, SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E ADULTERANTES**



**CURITIBA  
2012**

**GISELE FLORIANI**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA ANÁLISE  
DE COCAÍNA, SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E ADULTERANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

**CURITIBA  
2012**

Floriani, Gisele

Desenvolvimento e validação de método por Clae para análise de cocaína, seus produtos de degradação e adulterantes. / Gisele Floriani – Curitiba, 2012.

80 f. ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Coorientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Área de Concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Inclui bibliografia

1. Clae-Dad. 2. Cocaína. 3. Adulterantes. 4. Produtos de degradação. I. Gonçalves, Alan Guilherme. II. Pontarolo, Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1

Aos meus pais, mas em especial à minha abnegada mãe por me permitir voar e por ter construído um lar para onde eu sempre posso voltar. Gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, na figura do Prof. Dr. Roberto Pontarolo, meu co-orientador, por contribuírem valorosamente com mais esta etapa do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves, por me aceitar e, apesar das dificuldades, acreditar e confiar no meu trabalho.

Ao querido João Gasparetto - pessoa valiosa e iluminada. Não seria possível a conclusão deste trabalho sem o seu apoio. É imensa a admiração que sinto por você.

Às queridas Leti e Thais pela amizade, pelas colaborações, pelas risadas e pela capacidade que vocês têm de deixar mais agradável o ambiente de trabalho.

À Sirlei, Flavinha, Cleverson, Carol, Mário, Carlos Pedroso e colegas do CEB pela sempre pronta disposição em contribuir.

À Nana, por me apoiar desde o início, por estar sempre disponível, pela objetividade e por ter o dom de prever, em detalhes, todas as etapas transcorridas até a conclusão.

Ao Marcão pelas significativas intervenções que enriqueceram este trabalho.

Ao Rafa pela amizade e por sempre torcer por mim.

À Luana Lenzi pelo incentivo inicial.

Aos Peritos Criminais Joice Malakoski, Marcio Borges de Macedo e Carlos Lima por permitirem e incentivarem o desenvolvimento intelectual.

Ao Toxicologista Forense José Scorsin e ao Delegado de Polícia Civil Riad Braga Farhat pelo imprescindível apoio.

Às minhas amadas irmãs pelos ombros e ouvidos amigos, por me incentivarem e me apoiarem e por mostrarem em atitudes e palavras que estão sempre comigo.

Ao Wagner, amor e gratidão por tudo que fez e faz por mim.

À minha bela Isabela, pela sua alegre presença que ilumina minha vida – amor infinito.

À Lei Maior e aos meus guias e protetores espirituais.

## RESUMO

A cocaína constitui o mais importante alcalóide natural extraído das folhas do arbusto *Erythroxylon coca*. Diversos adulterantes são adicionados nos produtos à base de cocaína com a finalidade de aumentar seu volume e, conseqüentemente, o lucro no mercado ilícito da droga. A quantificação de cocaína presente nas amostras apreendidas, bem como de seus adulterantes é importante para fornecer subsídios na caracterização da droga e na investigação do tráfico. Neste contexto, os métodos analíticos utilizados para análise de amostras apreendidas de cocaína devem ser periodicamente revisados e redeseñvolidos devido ao surgimento constante de novos adulterantes. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE-DAD para análise simultânea da cocaína, produtos de degradação (ácido benzoico e benzoilecgonina) e os principais adulterantes encontrados mundialmente com a droga (cafeína, lidocaína, fenacetina, benzocaína e diltiazem). O método foi desenvolvido e validado em uma coluna XBridge C18 (250 X 4,6 mm, 5 µm) utilizando como fase móvel um gradiente composto de acetonitrila e solução aquosa de formiato de amônio 0,05 M – pH 3,1, com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 10 µL sendo os analitos monitorados em comprimento de onda único de 274 nm. Os parâmetros de validação foram determinados e os resultados demonstraram que o método é seletivo, sensível, linear, preciso e exato. Os ensaios de robustez indicaram que pequenas modificações no fluxo, temperatura da coluna e pH da fase móvel podem comprometer a exatidão dos resultados. O novo método foi aplicado para determinação cocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina, benzocaína, diltiazem, benzoilecgonina e ácido benzoico em matrizes complexas como pasta base, cocaína base e sal na forma de cloridrato. Amostras de cocaína apreendidas no estado do Paraná entre 2007 e 2012 foram analisadas obtendo-se teores de cocaína muito variados (0,0 a 97,22%). Além disso, a presença de todos os adulterantes foi observada nessas amostras o que justifica a aplicação do método. O novo método pode ser considerado uma alternativa confiável em análises forenses.

Palavras-chave: CLAE-DAD, cocaína, adulterantes, produtos de degradação.

## ABSTRACT

Cocaine is a natural alkaloid extracted from *Erythroxylon coca* leaves and it is one of the most known illicit drugs worldwide. Several adulterants have been added to cocaine products in order to increase the drug dealing profits. The quantification of cocaine presented in seized samples, as well as the determination of drug adulterants is important to provide informations about the drug characterization and trafficking investigations. In this context, analytical methods utilized for the analysis of seized cocaine samples must be periodically revisited due to the appearing of new adulterants. The objective of this work was the development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, degradation products (benzoylecgonine and benzoic acid), and the main adulterants worldwide found in products based on cocaine (caffeine, lidocaine, phenacetin, benzocaine, diltiazem). The HPLC-DAD method was developed and validated using an XBridge C18 column (250 X 4.6 mm, 5 mm) with a mobile phase consisted of a gradient of acetonitrile and ammonium formate 0.05 M - pH 3, 1. The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup> and the volume of injection was 10 µL. The detector was set at 274 nm. The validation parameters demonstrated that the new method has high sensitivity, selectivity, linearity, precision and accuracy. The robustness study indicated that the flow rate, temperature and pH of the mobile phase are critical parameters and should not be changed under the conditions of the proposed method. The new method was successful applied for determining cocaine, benzoylecgonine, benzoic acid, caffeine, lidocaine, phenacetin, benzocaine and diltiazem in complex matrices such as cocaine paste, cocaine base and salt cocaine. Samples of cocaine seized in Paraná State, Brazil (2007 - 2012) were analyzed and the amounts of cocaine were varied (0.0 to 97.22%). The presence of all adulterants was observed among the samples, justifying the application of the method. The new method can therefore be used as a reliable alternative in forensic analysis.

Key-words: HPLC-DAD, cocaine, adulterants, degradation products.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FOTOGRAFIA DE UM ARBUSTO DE ERYTHROXYLUM COCA E A REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE SUAS FOLHAS, COM DESTAQUE ÀS DUAS LINHAS PARALELAS À NERVURA CENTRAL DA FOLHA.....	19
FIGURA 2 -	ALCALÓIDES DERIVADOS DA ECGONINA.....	20
FIGURA 3 -	ALCALÓIDES DERIVADOS DA TROPINA.....	21
FIGURA 4 -	ALCALÓIDES DERIVADOS DA HIGRINA.....	21
FIGURA 5 -	REAÇÕES DE HIDRÓLISE DA COCAÍNA.....	23
FIGURA 6 -	FORMAÇÃO DO CLORIDRATO DE COCAÍNA.....	23
FIGURA 7 -	FORMAS DE APRESENTAÇÃO DA COCAÍNA: (a) PASTA BASE, (b) CLORIDRATO DE COCAÍNA E (c) CRACK.....	25
FIGURA 8 -	FLUXOGRAMA ILUSTRANDO AS VIAS DE OBTENÇÃO DA COCAÍNA.....	27
FIGURA 9 -	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS ADULTERANTES DA COCAÍNA.....	30
FIGURA 10 -	FLUXOGRAMA ILUSTRANDO A VIA DE OBTENÇÃO DA COCAÍNA (BASE LIVRE) A PARTIR DE COCAÍNA BASE.....	44
FIGURA 11 -	ESPECTRO DE ESI-MS DA AMOSTRA PURIFICADA DE COCAÍNA BASE LIVRE. NA FIGURA ESTÃO INDICADOS OS ÍONS MOLECULARES $m/z$ 326 $[M+Na]^+$ ; $m/z$ 304 $[M+H]^+$ . O ÍON $m/z$ 182 É ORIGINADO DE FRAGMENTAÇÃO OCORRIDA NO IONIZADOR DO EQUIPAMENTO.....	44
FIGURA 12 -	FLUXOGRAMA ILUSTRANDO A VIA DE OBTENÇÃO DE CLORIDRATO DE COCAÍNA A PARTIR DE COCAÍNA (BASE LIVRE).....	45
FIGURA 13 -	FLUXOGRAMA ILUSTRANDO A VIA DE OBTENÇÃO DOS CRISTAIS DE COCAÍNA.....	47
FIGURA 14 -	ESPECTRO DE ESI-MS DA AMOSTRA PURIFICADA DE COCAÍNA, INDICANDO A PRESENÇA DE CINAMOILCOCAÍNA. NA FIGURA ESTÃO INDICADOS OS ÍONS MOLECULARES $m/z$ 304 $[M+Na]^+$ ; $m/z$ 330 $[M+H]^+$ . O ÍON $m/z$ 182 É ORIGINADO DE FRAGMENTAÇÃO OCORRIDA NO IONIZADOR DO EQUIPAMENTO.....	48
FIGURA 15 -	REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA CINAMOILCOCAÍNA EM MEIO COM PERMANGANATO DE POTÁSSIO.....	49
FIGURA 16 -	ESPECTRO DE ESI-MS/MS DA AMOSTRA PURIFICADA DE CLORIDRATO DE COCAÍNA E REPRESENTAÇÃO DE SUA VIA DE FRAGMENTAÇÃO.....	50
FIGURA 17 -	CROMATOGRAMA DA (1) CAFEÍNA - Tr: 5,7 min; (2) BENZOILECGONINA - Tr: 6,1 min; (3) LIDOCAÍNA - Tr: 6,7 min; (4) COCAÍNA - Tr: 7,9 min; (5) ÁCIDO BENZÓICO - Tr: 8,4	



	min; (6) FENACETINA – Tr: 9,0 min; (7) BENZOCAÍNA – Tr: 10,5 min e (8) DILTIAZEM – Tr: 11,3 min OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	58
FIGURA 18 -	FULL SCAN CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE COCAÍNA BASE FORTIFICADA COM ÁCIDO BENZÓICO E SEU RESPECTIVO ÍON MOLECULAR $[M - H]^-$ EXTRAÍDO DO PICO CORRESPONDENTE.....	59
FIGURA 19 -	FULL SCAN CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE COCAÍNA BASE FORTIFICADA COM CAFEÍNA, BENZOILECGONINA, LIDOCAÍNA, COCAÍNA, FENACETINA, BENZOCAÍNA E DILTIAZEM E SEUS RESPECTIVOS ÍONS MOLECULARES $[M + H]^+$ EXTRAÍDOS DOS PICOS CORRESPONDENTES.....	60
FIGURA 20 -	CURVAS DE CALIBRAÇÃO, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DA CAFEÍNA, BENZOILECGONINA, LIDOCAÍNA, COCAÍNA, ÁCIDO BENZÓICO, FENACETINA, BENZOCAÍNA E DILTIAZEM.....	62
FIGURA 21 -	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ INDICANDO OS LIMITES DAS REGIÕES GEOGRÁFICAS.....	70
FIGURA 22 -	QUANTIDADE DE AMOSTRAS APREENDIDAS QUE CONTINHAM OU NÃO ADULTERANTES.....	71
FIGURA 23 -	DISTRIBUIÇÃO DOS ADULTERANTES ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS EM ANÁLISE.....	72
FIGURA 24 -	TEOR DE COCAÍNA ENCONTRADA NAS 115 AMOSTRAS DA DROGA APREENDIDA NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	TEORES DE COCAÍNA E OUTROS ALCALÓIDES EM FUNÇÃO DA ESPÉCIE DE ERYTHROXYLUM.....	21
TABELA 2 -	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS APRESENTAÇÕES DE COCAÍNA.....	22
TABELA 3 -	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL.....	41
TABELA 4 -	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS NO ENSAIO DE LINEARIDADE.....	53
TABELA 5 -	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS NO ENSAIO DE PRECISÃO.....	54
TABELA 6 -	VALORES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD.....	61
TABELA 7 -	VARIAÇÕES OBTIDAS NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).....	63
TABELA 8 -	VARIAÇÕES OBTIDAS NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DO ENSAIO DE REPETIBILIDADE DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).....	64
TABELA 9 -	VARIAÇÕES OBTIDAS NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).....	64
TABELA 10 -	RESULTADO DE EXATIDÃO (EXPRESSO EM PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO) OBTIDO EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).....	65
TABELA 11 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ OBTIDOS COM VARIAÇÕES DO pH DA FASE MÓVEL.....	66
TABELA 12 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ OBTIDOS COM VARIAÇÕES DA TEMPERATURA.....	67
TABELA 13 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ OBTIDOS COM VARIAÇÕES NO FLUXO DA FASE MÓVEL.....	68
TABELA 14 -	PORCENTAGEM DE ERRO RELATIVO ENTRE AS ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS ADQUIRIDOS COM SOLUÇÕES ARMAZENADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES E AQUELAS PREPARADAS A FRESCO.....	69

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1 HISTÓRICO .....	17
2.2 BOTÂNICA E TAXONOMIA DAS PLANTAS DE COCA .....	18
2.3 PRINCIPAIS ALCALÓIDES ENCONTRADOS NAS FOLHAS DE COCA .....	20
2.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS DA COCAÍNA...22	
2.5 FORMAS DE APRESENTAÇÃO DA COCAÍNA .....	24
2.6 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DA COCAÍNA .....	26
2.7 ADULTERANTES E DILUENTES DO MERCADO DA COCAÍNA .....	27
2.8 A COCAÍNA NA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	30
2.9 METODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DA COCAÍNA .....	32
2.9.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	34
2.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
2.10.1 Seletividade.....	36
2.10.2 Linearidade.....	36
2.10.3 Precisão.....	37
2.10.3.1 Repetibilidade.....	37
2.10.3.2 Precisão Intermediária.....	37
2.10.3.3 Reprodutibilidade.....	37
2.10.4 Exatidão.....	38
2.10.5 Robustez .....	38
2.10.6 Estabilidade.....	38

2.10.7 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	38
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS.....	40
3.2 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS.....	40
3.3 REAGENTES E SOLVENTES .....	40
3.4 INSTRUMENTAÇÃO.....	41
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES .....	42
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	42
3.7 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE TRABALHO.....	42
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD .....	50
3.8.1 Seletividade.....	51
3.8.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	52
3.8.3 Linearidade.....	52
3.8.4 Precisão.....	53
3.8.5 Exatidão.....	54
3.8.6 Robustez .....	55
3.9 ESTABILIDADE.....	55
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO .....	57
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD .....	59
4.2.1 Seletividade.....	59
4.2.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	61
4.2.3 Linearidade.....	61
4.2.4 Precisão.....	63
4.2.5 Exatidão.....	64
4.2.6 Robustez .....	65
4.3 ESTABILIDADE.....	69

4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS APREENDIDAS DE COCAÍNA.....	70
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Relatório Mundial Sobre Drogas, estima-se que cerca de 230 milhões de pessoas, ou 5 % da população mundial adulta fez uso de alguma droga ilícita, ao menos uma vez, no ano de 2010 (World Drug Report, 2012). O documento relata, ainda, que o uso da cocaína permaneceu estável em 0,3-0,4 % da população compreendendo 15 a 64 anos (entre 13,2 e 19,5 milhões de usuários) percebendo-se, porém, um aumento do uso no Brasil, que não pôde ser estimado devido à ausência de dados fornecidos pelo país no ano de 2011.

Em 2009, 90% da cocaína apreendida no mundo foi interceptada nas Américas. Estes dados refletem o aumento crescente da importância desses países para o tráfico de cocaína, tanto para satisfazer a demanda interna quanto para exportar para mercados como Europa, África e região do Pacífico. O Brasil é o maior mercado consumidor da América do Sul, com 890.000 usuários ou 0,7% da população. As apreensões federais de cocaína triplicaram desde 2004, chegando a 27 toneladas em 2010 (UNODC, 2011).

Em todo o Paraná, no ano de 2011 e até o mês de julho de 2012 foram apreendidas mais de 3.500.000 pedras de crack, uma das formas de apresentação da cocaína (Paraná, 2012). De acordo com os dados do Narcodenúncia, dos 399 municípios paranaenses, apenas nove nunca tiveram apreensão da droga. Isso significa que apenas 2% das cidades do Paraná são consideradas "áreas livres" do crack (Paraná, 2012).

Diversos adulterantes são adicionados à cocaína com a finalidade de aumentar o volume da droga e, conseqüentemente, o lucro neste mercado ilícito. Tais adulterantes apresentam variações regionais, podendo indicar rotas de tráfico. Sabe-se ainda que a cocaína é hidrolisada (total ou parcialmente) em presença de água, substâncias ácidas ou básicas, sendo transformada em diversos outros produtos (CASALE & KLEIN, 1993) .

Os laboratórios periciais oficiais brasileiros rotineiramente identificam a cocaína presente no crack. A quantificação de cocaína bem como de seus adulterantes podem fornecer subsídios na caracterização da droga bem como nas investigações sobre o tráfico. Devido à grande quantidade de apreensões e à carência de recursos humanos dos laboratórios forenses, são grandes as

quantidades de amostras armazenadas à espera dos exames necessários para identificação. Por isso, cada vez mais os laboratórios necessitam de métodos rápidos, confiáveis e suficientemente seletivos para analisar a cocaína, produtos de degradação e adulterantes.

Diversos métodos cromatográficos são descritos na literatura para análise da cocaína e seus adulterantes. Um exemplo é a Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), uma técnica amplamente utilizada em laboratórios forenses e recomendada nos manuais da Organização das Nações Unidas para Drogas e Crimes (UNODC). O predomínio do CG-EM nesses laboratórios é explicado pela possibilidade de utilização das bibliotecas eletrônicas, as quais disponibilizam numerosos espectros de massas para fins comparativos. Todavia, CG-MS é uma técnica complexa que requer amplo conhecimento para operação e interpretação dos resultados. Além disso, esta técnica exige derivatização das amostras para otimizar a sensibilidade de detecção e o comportamento cromatográfico de alguns analitos, o que onera os custos do laboratório e gera problemas ambientais devido à quantidade de agentes químicos utilizados (CHASIN & LIMA, 1998; CHRISTOPHERSEN & MORLAND, 1994; Johansen & Bhatia, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por sua vez não apresenta problemas quanto à necessidade de volatilidade e estabilidade térmica dos analitos, e, ainda, permite uma excelente separação dos compostos, com economia de tempo e sem etapas adicionais no preparo das amostras (AEHLE & DRÄGER, 2010). Desta forma, vários métodos de CLAE vêm sendo desenvolvidos para a análise de amostras apreendidas de cocaína. Ainda, ressalta-se a importância do desenvolvimento de novos métodos empregando CLAE, uma vez que um grande número de substâncias podem ser potencialmente utilizadas como adulterantes.

Na literatura, quase todos os métodos descritos por CLAE utilizam analisador de massas para análise da cocaína, produtos de degradação e adulterantes. Esse analisador é, sem dúvida, muito importante nas análises forenses, sobretudo pela sensibilidade e seletividade. No entanto, apesar do CLAE-EM analisar múltiplas matrizes com alta seletividade, não há métodos disponíveis na literatura que contemplem a determinação simultânea da cocaína, produtos de degradação e adulterantes nas amostras comercializadas na forma de sal, pasta base e cocaína

base. Além disso, CLAE-EM ainda é uma técnica onerosa, complexa e que exige mão de obra especializada para a condução dos ensaios. De encontro a essas explanações, a utilização de detectores mais baratos e difundidos como o de arranjo de diodos (DAD) se tornam interessantes, pois apresentam boa sensibilidade, são de fácil execução e facilmente encontrados na maioria dos laboratórios analíticos.

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-DAD para análise simultânea da cocaína, produtos de degradação (ácido benzóico e benzoilecgonina), e os principais adulterantes encontrados mundialmente com a droga (cafeína, lidocaína, fenacetina, benzocaína e diltiazem). Dos métodos descritos na literatura, este é o único que contempla a determinação desses compostos nas matrizes pasta base, cocaína base e sal, sem a necessidade de etapas adicionais no preparo das amostras. Portanto, o novo método é uma alternativa rápida, de baixo custo e ambientalmente adequada para ser utilizado em análises forenses.



## 1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar uma metodologia por CLAE para quantificação simultânea da cocaína, dois de seus produtos de degradação (ácido benzoico e benzoilecgonina) e adulterantes (cafeína, lidocaína, fenacetina, benzocaína e diltiazem), em amostras apreendidas no Estado do Paraná.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter cocaína purificada a partir das amostras apreendidas para geração de padrões de trabalho;
- ✓ Otimizar parâmetros cromatográficos em CLAE para identificação e quantificação simultânea da cocaína, seus produtos de degradação e adulterantes;
- ✓ Validar a metodologia por CLAE através de norma nacional (ANVISA);
- ✓ Caracterizar e quantificar os principais componentes presentes em amostras de cocaína apreendidas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

O cultivo e uso da folha de coca, historicamente concentrada na região andina, são conhecidos desde 3.000 a.C. Os primeiros relatos europeus sobre esse vegetal são de autoria de Américo Vespúcio (1499), publicados em 1507, nos quais descreve a coca sendo mastigada com cinzas e alguns efeitos da planta mascarada pelos índios. Quando os espanhóis conquistaram a América do Sul, em 1492, a Igreja Católica pressionou as autoridades espanholas para eliminar completamente o cultivo de coca, denunciando como influência do demônio a percepção amplamente difundida de que a coca aumentava a força de trabalho. Os interesses econômicos do novo império colonial mudaram este pensamento ao perceberem o aumento de desempenho dos trabalhadores ao receberem folha de coca para mascar. Também nesse século a cocaína foi introduzida na Europa para fins medicamentosos (anestésico tópico em cirurgias oftalmológicas e otorrinolaringológicas devido as suas propriedades vasoconstritoras), porém, não se difundiu, pois as folhas chegavam deterioradas pela longa viagem da América até a Europa (BAHLS; BAHLS, 2002; UNODC, 2008).

Esta situação mudou drasticamente após o isolamento do alcalóide cocaína, atribuído ao químico alemão Albert Niemann, em 1859/1860. Em 1863, um químico chamado Angelo Mariani passou a comercializar um vinho chamado Vin Mariani, constituído de vinho e extrato de folhas de coca. A cocaína quando combinada com álcool resulta em um potente composto, hoje conhecido por cocaetileno. O vinho de coca recebeu o endosso de primeiros-ministros, membros da realeza, e até mesmo o Papa. A popularidade da cocaína nas sociedades ocidentais aumentou dramaticamente após a publicação de um estudo do médico austríaco Sigmund Freud, que experimentou cocaína e escreveu um artigo amplamente divulgado intitulado *Über Coca* em 1884, listando os efeitos benéficos para a terapia da depressão (FERREIRA; MARTINI, 2001; GOLDSTEIN *et al*, 2009).

Em 1885, a indústria farmacêutica Parke-Davis começa a apresentar ao mercado diversas formas de consumo, sendo elas na forma de charutos, cigarros, inalantes, soluções, cristais e até injetáveis. A Coca-cola, bebida isenta de álcool,

que utilizava na composição noz de cola e folhas de coca, e era consumida pelas classes menos favorecidas para problemas gástricos, dores de cabeça, cansaço, entre outros, foi lançada em 1886 por John Styth Pemberton. Só em 1906 que as folhas de coca da formulação foram substituídas por cafeína e folhas de coca descocainizadas. (LEITE; ANDRADE, 1999).

A partir da primeira guerra mundial os efeitos da cocaína começaram a tornar-se mais evidentes e em 1914 os Estados Unidos publica o Harrison Act, proibindo o uso da cocaína pela população (FERREIRA; MARTINI, 2001).

Em 1921 no Brasil o Decreto-Lei Federal nº4.292 de 06 de julho de 1921 restringe o uso de cocaína. Na década de 70 a cocaína ressurgiu para uso “recreacional” e na década de 80 o consumo de cocaína torna-se abusivo. Em 1985 a cocaína na forma de “crack” começa a ser consumida no Brasil (VARGAS; TALHAVINI, 2000).

## 2.2 BOTÂNICA E TAXONOMIA DAS PLANTAS DE COCA

A cocaína é um dos principais alcalóides extraídos das folhas de plantas do gênero *Erythroxylum* (família Erythroxylaceae). Embora haja mais de 250 espécies e variedades desse vegetal nativo da Cordilheira dos Andes, apenas uma pequena parcela fornece quantidades consideráveis do referido alcalóide.

Dentre as diversas fontes de cocaína destacam-se a *Erythroxylum coca* v. *coca*, *Erythroxylum novogranatense* v. *novogranatense* e *Erythroxylum novogranatense* v. *truxillense*. De suas folhas, comumente referidas como “folhas de coca”<sup>1</sup> independentemente da espécie que lhes deu origem, podem ser obtidos teores que variam de 0,5 a 1,5% em alcalóides totais (cerca de 20 substâncias químicas diferentes), dos quais aproximadamente 75% são correspondentes à cocaína (UNODC, 2008).

As regiões de cultivo das variedades de *Erythroxylum* são inerentes, quase que exclusivamente, de regiões andinas da América do Sul (principalmente da Colômbia, Peru, Bolívia e Equador), Austrália, Índia e África. O Brasil, que também

---

<sup>1</sup> De acordo com o estabelecido no Art. 1º da Convenção Única sobre Entorpecentes, de 1961, a terminologia “folhas de coca” pode ser aplicada somente àquelas que não sofreram extração total de cocaína, ecgonina e de quaisquer outros alcalóides relacionados.

possui condições climáticas favoráveis ao plantio de espécies de *Erythroxylum*, isto é, clima tropical úmido e altitudes de 500 a 2000 metros acima do nível do mar, não figura entre os maiores produtores de cocaína. A variedade chamada de Ipadu, Patu ou Epadu (*Erythroxylum coca* v. *ipadu*), cultivada por indígenas na região norte do país, apresenta baixos teores de cocaína, razão pela qual o extrativismo ilícito dessa substância não é considerado viável e, praticamente, não ocorre. Por se tratar de planta espermatófita e dicotiledônea, isto é, que dão sementes e crescem como arbustos e árvores, o plantio do *Erythroxylum* é feito semeando-se viveiros, sendo as mudas depois transplantadas para os locais definitivos (CALDAS NETO, 1998).

A principal espécie cultivada na América do Sul é a *Erythroxylum coca* (Figura 1) uma árvore pequena, muitas vezes tratada como arbusto, com casca de coloração vermelho-amarronzada, folhas dispostas de maneira espiral, órgãos florais de cor branca ou amarelada nas axilas e cuja estatura pode atingir cerca de 5,50 m. A planta se mantém ativa por cerca de 50 anos e os teores apreciáveis de cocaína surgem após dezoito meses do plantio. Geralmente, as folhas de coca são colhidas três vezes por ano, sempre em tempo seco, sendo a primeira safra no início da primavera, a segunda em junho e a terceira em outubro (VARGAS; TALHAVINI, 2000).



FIGURA 1: FOTOGRAFIA DE UM ARBUSTO DE *ERYTHROXYLUM COCA* E A REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE SUAS FOLHAS, COM DESTAQUE ÀS DUAS LINHAS PARALELAS À NERVURA CENTRAL DA FOLHA.

FONTE: (UNITED NATIONS. Office on Drugs and Crime, 2003)

## 2.3 PRINCIPAIS ALCALÓIDES ENCONTRADOS NAS FOLHAS DE COCA

Entre os alcalóides tropânicos, é possível que a cocaína seja o mais conhecido, por seu uso como droga de abuso.

Bacchi (2004) classifica em três grupos os alcalóides encontrados nas folhas de coca:

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

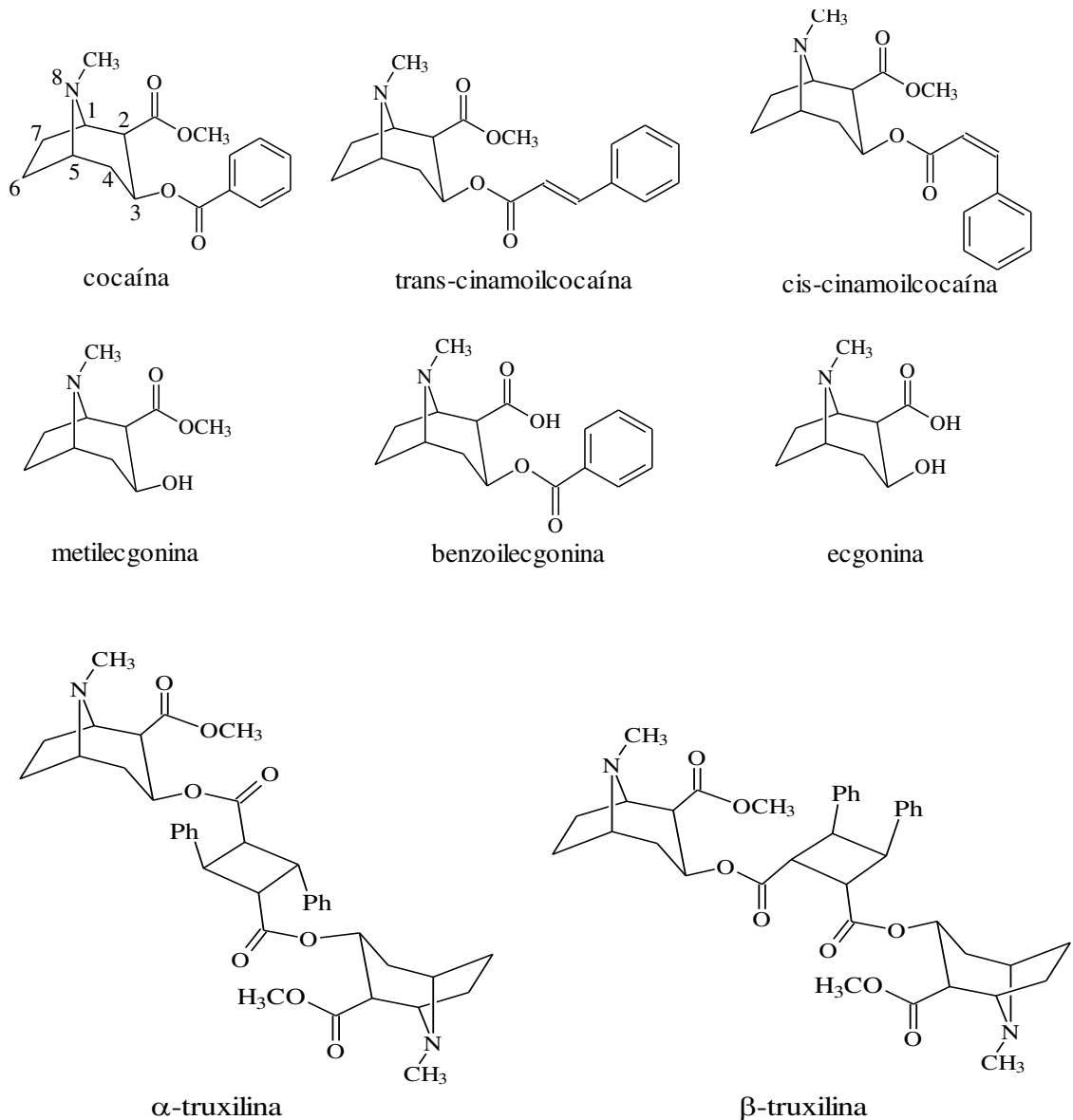


FIGURA 2: ALCALÓIDES DERIVADOS DA ECGONINA.  
 FONTE: (MOORE; CASALE, 1994) com adaptações.

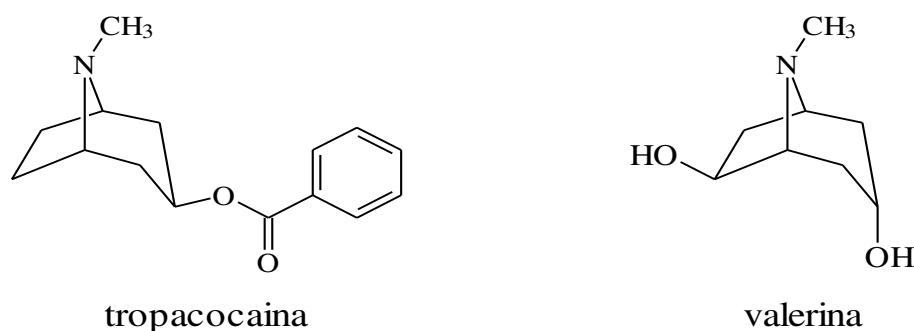


FIGURA 3: ALCALÓIDES DERIVADOS DA TROPINA.  
 FONTE: (MOORE; CASALE, 1994) com adaptações.

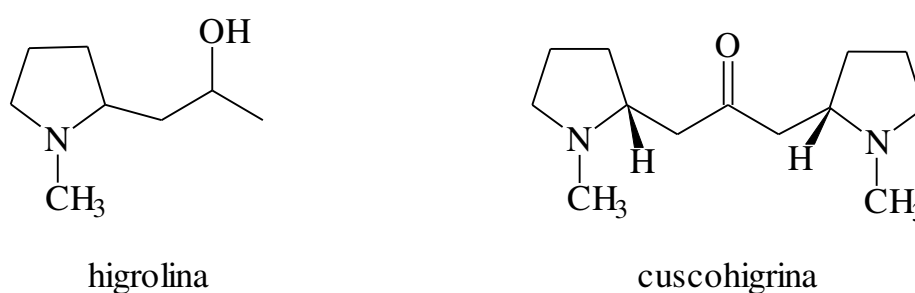


FIGURA 4: ALCALÓIDES DERIVADOS DA HIGRINA.  
 FONTE: (MOORE; CASALE, 1994) com adaptações

A Tabela 1 mostra os teores de alguns desses alcalóides em relação à cocaína e em função da espécie vegetal.

TABELA 1: TEORES DE COCAÍNA E OUTROS ALCALÓIDES EM FUNÇÃO DA ESPÉCIE DE *ERYTHROXYLUM*.

Alcalóide	ENVN <sup>a</sup>	ECVC <sup>b</sup>
Cocaína	0,43	0,67
Metil ecgonina	29	47
Cuscohigrina	5,8	61
Tropacocaina	3,8	0,16
Cis-cinamoilcocaína	53	18
Trans-cinamoilcocaína	170	22

Notas: <sup>a</sup> ENVN = *Erythroxylum novogranatense* v. *novogranatense*; <sup>b</sup> ECVC = *Erythroxylum coca* v. *coca*. Os conteúdos de cocaína estão reportados em % (m/m) em relação às folhas secas. Os teores dos demais alcalóides estão descritos em relação à percentagem do teor de cocaína.  
 FONTE: adaptada de (MOORE; CASALE, 1994)

## 2.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS DA COCAÍNA

O nome da cocaína preconizado pela IUPAC<sup>2</sup> é éster metílico do ácido [1R-(exo,exo)]-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxílico. A Tabela 2 mostra algumas características físicas e químicas da cocaína base e do sal cloridrato de cocaína (cocaína.HCl).

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS APRESENTAÇÕES DE COCAÍNA

Forma de apresentação	Fórmula Molecular	Massa Molar (g. mol <sup>-1</sup> )	p.f. (°C)	Características de Solubilidade			
				H <sub>2</sub> O	MeOH	Et <sub>2</sub> O	CHCl <sub>3</sub>
Cocaína	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	303,4	98	i	s	s	S
Cocaína. HCl	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> .HCl	339,8	157	s	s	i	S

Notas: s, solúvel; i, insolúvel.

FONTE: adaptada de (VARGAS & TALHAVINI, 2000)

Os dois grupos funcionais éster são facilmente hidrolisados, total ou parcialmente, em presença de água ou substâncias ácidas ou alcalinas, como pode ser visualizado na Figura 5 (BOTELHO, 2011).

Apesar de estarem presentes na planta, a ecgonina, metilecgonina e benzoilecgonina não são extraídas nos processos de refino. As reações de hidrólise da cocaína, que podem ainda gerar metanol, ácido benzoico e benzoato de metila, são responsáveis por suas contínuas aparições nas amostras de cocaína. Por ser um alcaloide, e uma base fraca, a cocaína reage com soluções de ácidos orgânicos ou inorgânicos formando sais, como o cloridrato e o sulfato de cocaína. Esta reação é uma eficaz ferramenta para se isolar alcaloides de matrizes complexas, pois as propriedades de solubilidade dos produtos de reação são, geralmente, antagônicas às da base livre correspondente, conforme Figura 6 (VARGAS; TALHAVINI, 2000).

<sup>2</sup> IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry - União Internacional de Química Pura e Aplicada (UIQPA).

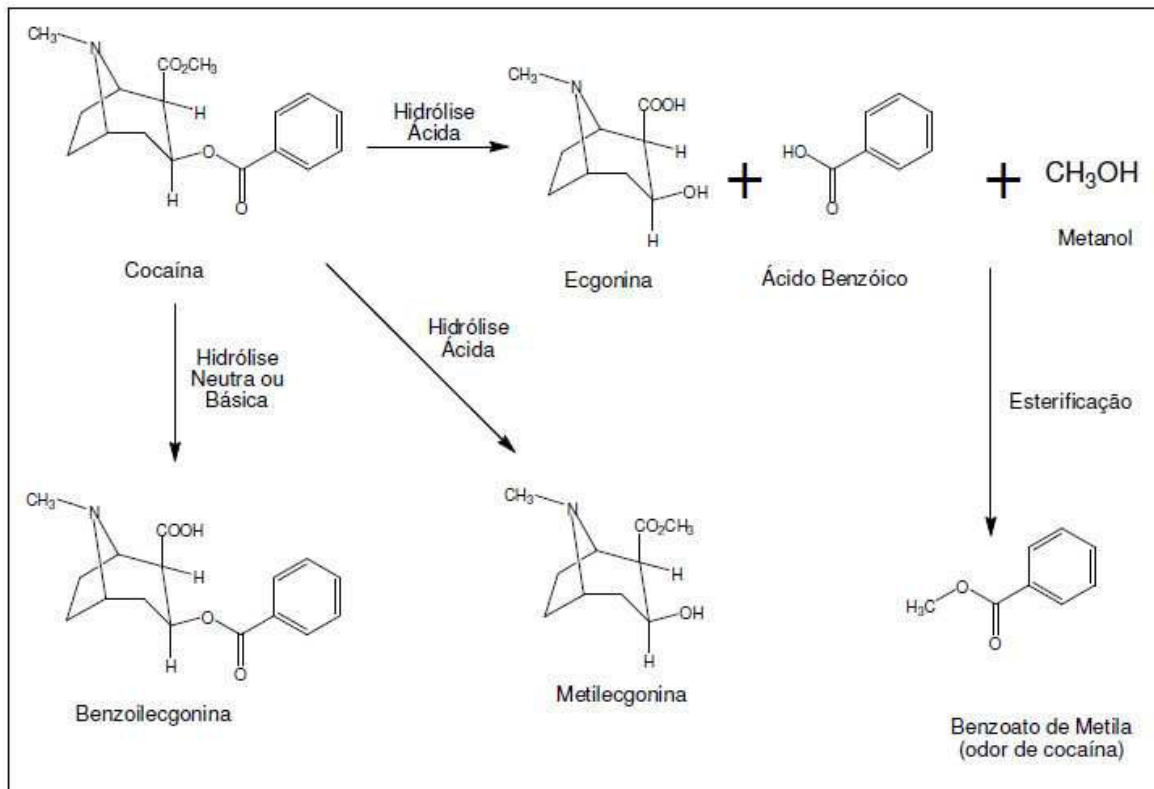


FIGURA 5: REAÇÕES DE HIDRÓLISE DA COCAÍNA.  
 FONTE: adaptada de (BOTELHO, 2011)

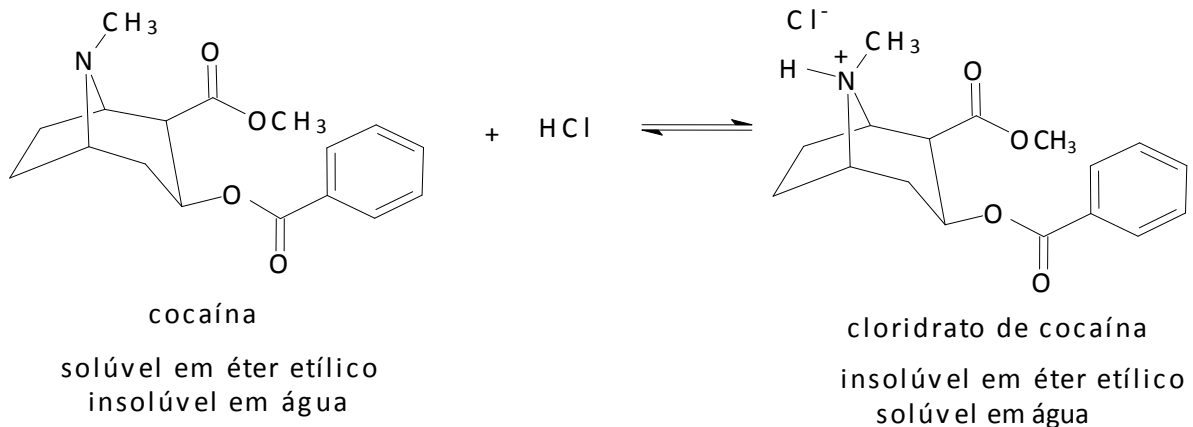


FIGURA 6: FORMAÇÃO DO CLORIDRATO DE COCAÍNA.  
 FONTE: adaptada de (VARGAS; TALHAVINI, 2000)

A cocaína – benzoilmetilecgonina – apresenta em sua estrutura, assim como a maioria dos anestésicos locais, um sítio hidrofílico, representado pela amina terciária do anel tropanico, e um sítio hidrofóbico, que é a estrutura aromática presente como éster do ácido benzóico. O átomo de nitrogênio, possivelmente na forma de cátion, combina-se com receptores da membrana celular e bloqueia a



condução de íons sódio e potássio, impedindo assim tanto a geração como a condução do impulso nervoso. O efeito anestésico está relacionado também à inibição do apetite. A estrutura éster é importante, pois esta ligação é facilmente hidrolisada durante a degradação metabólica e a inativação no organismo. Em adição ao bloqueio na condução pelo sistema nervoso periférico, a cocaína interfere com a função de todos os órgãos em que a transmissão de impulsos ocorre. Apresenta efeitos importantes no sistema nervoso central (SNC), nos gânglios autônomos, na junção neuromuscular e em todas as formas de fibra muscular. O efeito sistêmico mais notável é a estimulação do SNC, onde atua em processos que reduzem a recaptação da dopamina elevando o nível desse neurotransmissor. A ação da cocaína no córtex cerebral é particularmente forte, propriedade responsável pelo seu potencial para o uso abusivo. Os efeitos letais ou subletais da cocaína decorrem, principalmente, de ações sobre o sistema cardiovascular e cérebro. Há evidências de que causa espasmo coronariano ou que promove trombose e às vezes coagulação intravascular disseminada. Tem sido relatada a ocorrência de infarto do miocárdio de 30 minutos a 11 horas após o uso de cocaína por qualquer via. Casos de morte têm sido atribuídos à arritmias ventriculares seguidas de fibrilação. Nas estruturas cerebrais têm sido observados isquemia, infarto, hemorragias e, em consequência destes, convulsões, hiperpirexia, depressão e parada respiratória (GOODMAN; GILMAN; GILMAN, 2010).

A cocaína produz euforia, loquacidade, atividade motora e prazer aumentados, semelhantes aos efeitos da anfetamina, embora tenda a produzir menos alucinações, paranoias e comportamentos estereotipados. Não produz uma síndrome nítida de dependência física, mas tende a causar depressão e disforia, acoplados com o desejo à droga, em um considerável grau de dependência psicológica (RANG *et al.*, 2012).

## 2.5 FORMAS DE APRESENTAÇÃO DA COCAÍNA

No Paraná, conforme as perícias realizadas pelo Laboratório de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Criminalística, a cocaína é utilizada nas seguintes formas de apresentação:

- Pasta base – cocaína na forma de base livre, de cor marrom ou amarela escura, obtida na primeira etapa do processo de extração das folhas de coca, podendo ser fumada. Raramente se apresenta na forma de pasta, mas sim na forma de grumos ou pedras quando prensada para o transporte, podendo ser, à primeira vista, confundida com crack;
- Cloridrato de cocaína – sal solúvel da droga, com coloração esbranquiçada, inodoro ou com leve odor, destinado ao uso por aspiração nasal ou endovenoso;
- Crack – cocaína base em forma de pedras, de coloração amarelada, destinada ao fumo. Ao contrário da idéia corrente, o crack não é um subproduto do refino, mas sim uma forma de apresentação com baixo valor de mercado.

Imagens das três formas de apresentação podem ser visualizadas na Figura 7.



FIGURA 7: FORMAS DE APRESENTAÇÃO DA COCAÍNA: (a) PASTA BASE, (b) CLORIDRATO DE COCAÍNA E (c) CRACK.

FONTE: adaptada de ALMEIDA (2003).

Segundo ALMEIDA (2003) a cocaína é utilizada, ainda, no Brasil, nas seguintes formas de apresentação:

- Cocaína base – base livre mais refinada, de cor clara e odor leve, podendo ser fumada ou aspirada;
- Merla – cocaína base apresentada na forma de pasta branca, com altos teores de água (até 70%) e de sais de sódio (sulfato, carbonato, bicarbonato), também é destinada ao fumo. A merla é uma forma de apresentação exclusivamente encontrada no Brasil, mais especificamente no Distrito Federal e arredores.

Uma outra forma de apresentação da cocaína, presente nos Estados Unidos e na Europa é o *free-base*, composto de cristais de cocaína base. O *free-base* é

preparado a partir do cloridrato de cocaína e é destinado ao fumo ou a inalação (ARUFE-MARTINEZ; ROMERO-PALANCO, 1988).

## 2.6 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DA COCAÍNA

Os procedimentos de extração de cocaína a partir das folhas de coca seguem duas etapas principais:

- a) imersão das folhas de coca em soluções aquosas ácidas ou alcalinas ou diretamente em um determinado solvente orgânico, e
- b) processos de purificação baseados em precipitações e solubilizações sucessivas.

Tais procedimentos de purificação, independentemente de suas particularidades individuais, são chamados genericamente de *refino*, e são responsáveis pela obtenção da cocaína em suas diversas formas de apresentação. Há uma infinidade de substâncias capazes de atuar com eficiência em cada etapa. A produção ilícita de cocaína envolve solventes e reagentes pouco dispendiosos e de fácil obtenção. A obtenção da cocaína base a partir da pasta base envolve uma reação de oxidação, seguida de purificação, visando extrair as *cis* e *trans*-cinamoilcocaínas e o clareamento do produto. Assim, as cinamoilcocaínas são transformadas em ecgonina, que é facilmente retirada da cocaína pela diferença de solubilidade. Utilizando-se permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) a cocaína também pode oxidar formando ecgonina e benzoilecgonina e metilecgonina, mas o aparecimento de tais produtos nas amostras de cocaína refinada é resultado de hidrólise (BREWER, 1991; ENSING, 1991; CASALE & KLEIN, 1993).

A Figura 8 mostra os processos de obtenção mais tradicionais descritos na literatura.

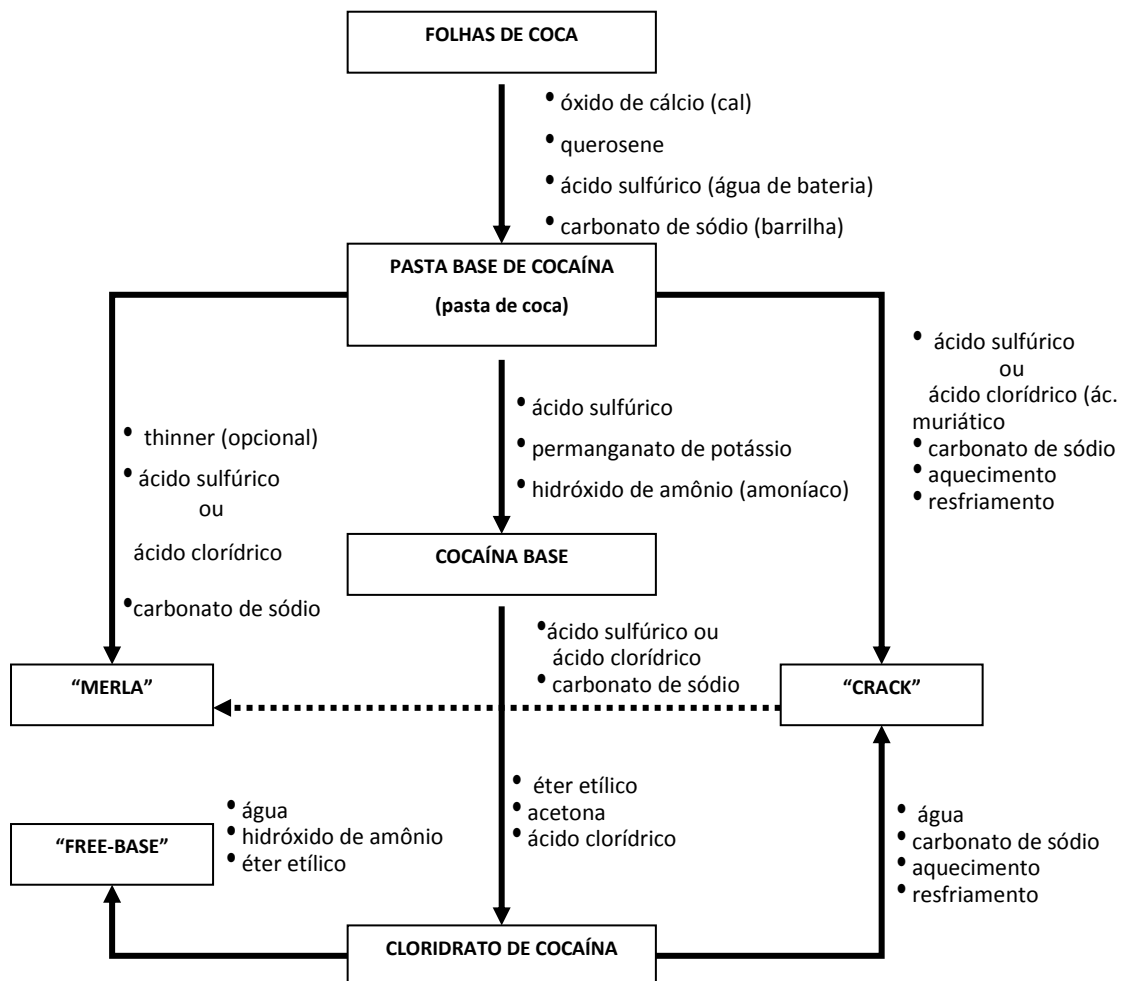


FIGURA 8: FLUXOGRAMA ILUSTRANDO AS VIAS DE OBTENÇÃO DA COCAÍNA.  
 FONTE: adaptada de CASALE & KLEIN (1993)

## 2.7 ADULTERANTES E DILUENTES DO MERCADO DA COCAÍNA<sup>3</sup>

São adicionadas à cocaína substâncias diversas com o objetivo de aumentar a massa e assim o lucro na venda. Adulterantes são substâncias que apresentam algum efeito farmacológico, podendo potencializar ou assemelhar-se a algum dos efeitos da cocaína. Os diluentes são usados apenas para dissolver a droga, sendo inativos e sem efeito farmacológico. Para adulteração opta-se, principalmente, por substâncias que tenham aparência semelhante à cocaína, propriedades anestésicas, sabor amargo e coloração esbranquiçada. Os adulterantes tanto podem

<sup>3</sup> Não há um mercado lícito de cocaína, portanto, sempre que se falar em “mercado” de drogas deve-se entender que este mercado é ilegal (Convenção Única sobre Entorpecentes, de 1961).

simular os efeitos da cocaína, quanto reduzir efeitos indesejados provocados pela droga. Os produtos mais comumente encontrados misturados à cocaína são:

- Adulterantes: lidocaína, benzocaína, procaína, tetracaína, cafeína, efedrina, dipirona, fenacetina, levamisol, diltiazem, hidroxizina, prilocaína, ácido acetil-salicílico, paracetamol;
- Diluentes: açúcares e derivados (lactose, sacarose, glicose, manitol, amido, sorbitol), compostos inorgânicos (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, sulfato de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, borato de sódio, ácido bórico), produtos alimentícios (leite em pó e farinhas em geral).

Os mercados e diferentes regiões apresentam variações pela disponibilidade dos adulterantes e diluentes e perfil do usuário (MAIETTI, 2009; UNODC, 2005).

Em diversas províncias da Espanha, 9.681 amostras de cocaína apreendidas foram analisadas entre 1985 – 1993 por BARRIO *et al.* (1997). Dentre as provenientes de Madrid e Sevilha, a lidocaína foi o principal adulterante detectado entre 1985 – 1987 (69,6% das amostras em 1985). Entre 1992 – 1993 a lidocaína não foi mais encontrada, período em que a cafeína passou a ser o adulterante mais comum.

Em Roma, FUCCI e DE GIOVANI (1998) investigaram 156 amostras, entre 1996 e 1997. Encontraram 14 adulterantes diferentes, dentre os quais se destacam a lidocaína em 16,5 % das amostras em 1996 e 12,3 % em 1997; cafeína em 11 % das amostras em 1996 e 6,1 % em 1997 e fenacetina em 6,1 % em 1997.

Nos EUA, hidroxizina, em teores de 2 a 20 %, e diltiazem, entre 8 e 20%, foram encontrados pela primeira vez em amostras de cocaína, por ODENEAL (2004) e PETERS (2004), pesquisadores do *Drug Enforcement Administration* (DEA).

VALENTINO & FUENTECILLA (2005), também pesquisadores do *Drug Enforcement Administration* (DEA), respondem pela primeira publicação sobre detecção de levamisol e citam que desde então têm rotineiramente encontrado tal produto em amostras de cocaína, sendo atualmente o principal adulterante nos EUA.

Foram analisadas por BRUNT *et al.* (2009), amostras apreendidas entre 1999 e 2007 na Holanda, nas quais foram encontrados principalmente benzocaína, cafeína, fenacetina, lidocaína, levamisol, diltiazem, procaína e atropina. O adulterante majoritário desde 2003 é a fenacetina, detectada em 40,6 % das

amostras em 2007. A partir de 2004, observou-se um número cada vez maior de amostras contendo levamisol, diltiazem e hidroxizina. Em 2007, 53,6 % das amostras de cocaína apresentavam adulterações, contra 6,5 %, em 1999.

As análises de 209 amostras apreendidas em 2001, no interior do estado de Minas Gerais, sendo 186 positivas para cocaína, indicaram a presença de cafeína em 50,2 % das amostras, lidocaína em 65 % e prilocaína em 11 % (BERNARDO *et al.*, 2003).

CARVALHO E MIDIO (2003) relataram a presença de lidocaína, procaína e cafeína como adulterantes principais em 389 amostras apreendidas em São Paulo, no ano de 1997.

Um estudo sobre a composição das amostras de cocaína apreendidas no Brasil, realizado por ALMEIDA (2003), revelou que o principal adulterante nas amostras oriundas do estado do Amazonas é a fenacetina. Tal fármaco não foi detectado nas amostras do estado do Rio Grande do Sul, onde a cocaína apresenta adulterações por lidocaína e cafeína. Foram observadas adulterações em 48,2 % das amostras do estado do Amazonas e 60,9 % das amostras do estado do Rio Grande do Sul. Diluentes, segundo o estudo, não são comuns em amostras provenientes do Amazonas, sendo detectados em apenas 11,1 % das amostras. Porém, no Rio Grande do Sul, 73,9 % das amostras apresentavam-se diluídas e açúcares e derivados.

BOTELHO (2011) analisou 39 amostras de cocaína provenientes da região sul do Brasil e constatou a presença de fenacetina em 35 % delas.

A Figura 9 mostra as estruturas químicas dos principais adulterantes utilizados no mercado da cocaína.

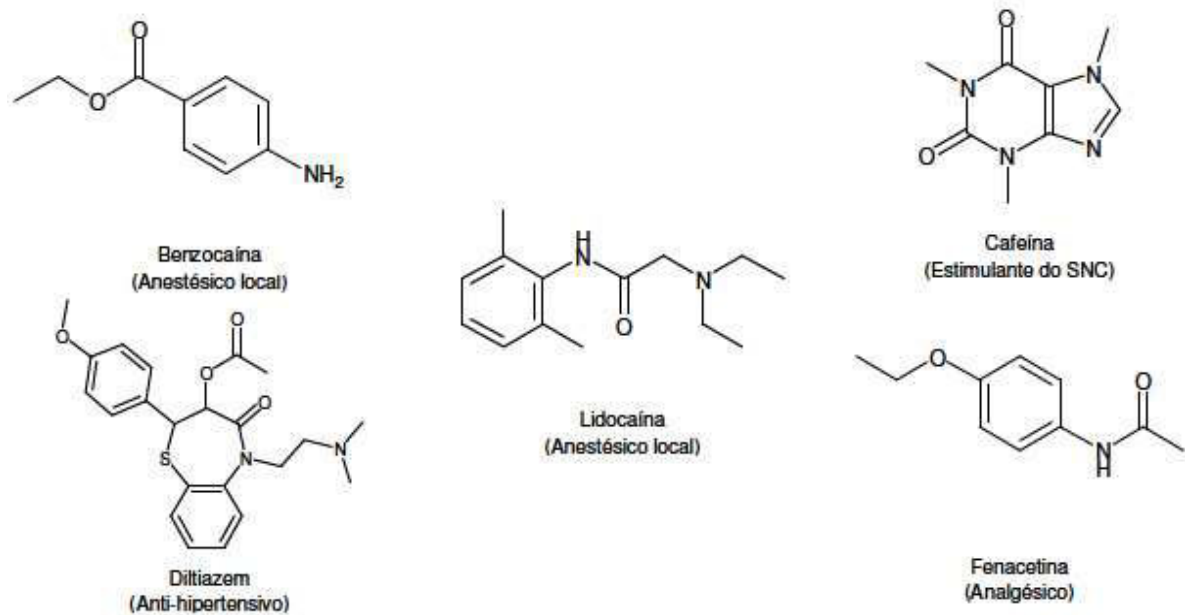


FIGURA 9: ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS ADULTERANTES DA COCAÍNA.  
 FONTE: (BOTELHO, 2011 COM ADAPTAÇÕES).

## 2.8 A COCAÍNA NA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

O Brasil, estrategicamente localizado na América do Sul e com vastas áreas de fronteira, não figura entre os maiores produtores de cocaína, mas apresenta o maior trânsito desta droga, nas Américas. Pelos portos e aeroportos brasileiros é enviada para Europa e África a cocaína produzida na Colômbia, Peru, Venezuela e Bolívia (World Drug Report – WDR 2011).

A cocaína é transportada por vias aéreas, fluviais e principalmente terrestres até os grandes centros urbanos e portos, de onde é exportada (World Drug Report – WDR 2011).

Além do tráfico, o Brasil é um grande mercado consumidor com 33 % do total de usuários das Américas do Sul, América Central e Caribe. As apreensões de cocaína passaram de 8 toneladas em 2004 para 24 toneladas em 2009 (World Drug Report – WDR 2011).

Como país membro das Organizações das Nações Unidas (ONU), o Brasil, por meio do Decreto nº 54.216, de 27/08/1964, promulgou a Convenção Única sobre

Entorpecentes e aprovou no Decreto nº 162, de 1991, o texto da Convenção Contra o Tráfico Ilícito de Entorpecentes e de Substâncias Psicotrópicas de 1988.

A Lei 11.343, de 23/08/2006 e o Decreto 5.912, de 27/09/2006 regulamentam a prevenção, a fiscalização, o controle e repressão à produção, ao uso e ao tráfico de produtos, substâncias ou drogas ilícitas que causem dependência física ou psíquica, assim relacionadas pelo Ministério da Saúde (MS).

Por meio da Portaria nº 344, publicada pela Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) em 12/05/1998, o Ministério da Saúde aprovou o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a diversos níveis de controle especial. As listas de substâncias elencadas no Anexo I – Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial – são atualizadas por resoluções publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A cocaína e a ecgonina, bem como os sais e isômeros da cocaína, os ésteres e derivados da ecgonina que sejam transformáveis em ecgonina e cocaína encontram-se relacionados na Lista de Substâncias Entorpecentes (Lista F1), de uso proscrito no Brasil, consideradas capazes de causar dependência física e/ou psíquica, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 21 da ANVISA, de 17/06/2010, em conformidade com a Portaria nº 344-SVS/MS, de 12/05/98.

A planta *Erythroxylum coca* Lamark e todos os sais, isômeros, ésteres e éteres das substâncias obtidas a partir da planta são controladas pela Resolução RDC nº 21-ANVISA/MS em sua Lista E - Lista de Plantas que Podem Originar Substâncias Entorpecentes e/ou Psicotrópicas.

Normas de controle e fiscalização sobre produtos e insumos químicos que possam ser destinados direta ou indiretamente à elaboração de substâncias entorpecentes ou que determinem dependência física e/ou psíquica são estabelecidas pela Lei nº 10.357 de 27/12/2001, regulamentada pelo Decreto nº 4.262 de 10/06/2002. São controlados pela Portaria nº 1.274 de 25/08/2003 do Ministério da Justiça, alterada pela Portaria nº 113 de 14/01/2004 os produtos químicos relacionados nas Listas I, II, III e IV e adendos.

Conforme a Lista D2 – Lista de Insumos Químicos Utilizados para a Fabricação e Síntese de Entorpecentes e/ou Psicotrópicos – integrante da Resolução RDC nº 21-ANVISA/MS, estão submetidos a controle 12 reagentes



químicos: acetona, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, anidrido acético, cloreto de etila, cloreto de metileno, clorofórmio, éter etílico, metiletilcetona, permanganato de potássio, sulfato de sódio e tolueno.

A atualização da legislação, em especial a lista de produtos e insumos químicos controlados, como já foi dito, é elaborada pela ANVISA em acordo com a DRE/DPF que, por sua vez, mantém intercâmbio com a Associação Brasileira de Indústrias Químicas (ABIQUM) e outros órgãos.

Os órgãos estatais das políticas nacionais de controle e repressão ao narcotráfico são as polícias civis e militares, subordinadas aos governos estaduais, a polícia federal e polícia rodoviária federal, órgãos do Ministério da Justiça, a Secretaria Nacional da Segurança Pública (SENASP) e a Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD).

## 2.9 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DA COCAÍNA

Entre os diversos métodos recomendados para análise de cocaína, a cromatografia ocupa lugar de destaque graças à facilidade com que se efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria e a espectrometria de massas (CLARKE, 2011).

As técnicas cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) são rotineiramente empregadas na análise de cocaína, sendo indicadas pelas Nações Unidas (UNITED NATIONS. Division of Narcotics Drugs, 1986).

Ho (1990) cita trabalhos em que se estudou a cocaína, seus metabólitos e diluentes por CG, bem como a diferenciação de diastereoisômeros e separou os diversos alcalóides presentes em amostras de cocaína, que foram analisados com detector seletivo de massas. Morello e Meyers (1995) utilizaram a técnica de *headspace* para identificar e quantificar por CG/EM solventes residuais ocluídos em amostras de cloridrato de cocaína e cloridrato de heroína. As técnicas cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC) e CG/EM foram utilizadas por Fucci e Giovanne (1998) para determinações qualitativas e quantitativas de cocaína

e seus adulterantes em amostras apreendidas em Roma, Itália, entre janeiro de 1996 e junho de 1997.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método simples e confiável de análise da maioria das drogas, sendo especialmente útil para os compostos que são termicamente lábeis. Há sistemas capazes de separar a cocaína, suas impurezas e seus subprodutos simultaneamente (MOORE & CASALE, 1994).

Nishikawa *et. al* (1994) estudaram um método para determinação simultânea de cocaína e os metabólitos benzoilecgonina, ecgonina metil éster, ecgonina e norcocaína em urina por CLAE.

Pan e Hedaya (1997) desenvolveram um método por CLAE com detector de ultra-violeta (CLAE/UV) para analisar amostras de plasma de rato após administração de cocaína isolada e combinada com álcool. Os perfis farmacocinéticos da cocaína e seus metabólitos também foram descritos.

Bogusz (2000) destaca que a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC/EM) tornou-se um método poderoso e flexível para análises de substâncias de interesse forense, como a cocaína e seus metabólitos, assegurando alto nível de confiabilidade.

Além de CG e CLAE, a espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR) é usada rotineiramente na distinção entre a cocaína na forma de sal (cloridrato de cocaína) e cocaína base livre (crack) (ELSHERBINI, 1998). A técnica de FTIR é muito empregada para análise de cocaína, sendo o método para obtenção de espectros de transmissão, bem como as principais absorções características, descritos no manual das Nações Unidas (UNITED NATIONS. Division of Narcotics Drugs, 1986; CLARKE, 2011).

Moss *et. al* (1980) utilizaram espectros de infravermelho para diferenciação de 15 diferentes drogas, incluindo barbitúricos, anfetaminas, heroína e cocaína. A determinação quantitativa de cocaína e heroína medindo-se a intensidade do pico de absorção da carbonila foi feita por Ravreby (1987). O autor utilizou pastilhas de Brometo de Potássio (KBr) e avaliou o efeito de diversos diluentes, entre eles talco, manitol, cafeína e procaína.

### 2.9.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) surgiu na década de 60 como a aplicação da cromatografia líquida às teorias e instrumentações desenvolvidas originalmente para cromatografia gasosa. A principal diferença entre a cromatografia líquida e a CLAE está no princípio de que a eficiência da separação aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária, tornando necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel (CASS; DEGANI, 2001).

Nos últimos anos, essa técnica de separação passou a ser uma das mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, e as razões para esse crescimento estão na sensibilidade e na seletividade do método, com destaques em determinações ambientais, médicas e principalmente nas indústrias farmacêuticas. Os números são surpreendentes sendo estimados que mais de 90% dos laboratórios de análises espalhados pelo mundo utilizam pelo menos uma modalidade de CLAE em fase reversa (TONHI *et al.*, 2002).

O princípio de separação é baseado nas características físico-químicas de cada composto e uma ou mais interações entre o soluto e a fase estacionária, o que resulta numa migração pela coluna de forma seletiva. Essas interações podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals e tamanho molecular, as quais de acordo com sua natureza, classificam os modos de separação em cromatografia em fase reversa, fase normal, troca iônica e por exclusão (CASS; DEGANI, 2001).

A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada e consiste em uma fase estacionária de baixa polaridade e uma fase móvel de maior polaridade enquanto que na fase normal têm-se estas polaridades invertidas (TONHI *et al.*, 2002).

A escolha do modo mais adequado de separação cromatográfica é baseada na natureza do composto, no peso molecular, na polaridade e no caráter iônico, dependendo, além disso, da fase estacionária e da fase móvel para cada classe de soluto (CASS; DEGANI, 2001).

O equipamento é composto por alguns módulos como bombas de fluxo constante, injetor de amostra, forno da coluna, detector, interface de dados e

computador. Na atualidade, estes módulos são totalmente computadorizados e permitem que alguns parâmetros como temperatura da coluna, vazão de fluxo, e alteração na composição da fase móvel (eluição gradiente) sejam alterados individualmente no equipamento, sendo estes fundamentais para o desenvolvimento dos métodos analíticos. Além disso, a composição da fase estacionária é um fator de grande relevância na separação de compostos e deve ser avaliada antes do desenvolvimento do método (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; CASS; DEGANI, 2001).

A temperatura do forno é um parâmetro muito importante em CLAE pois afeta diretamente o perfil cromatográfico dos compostos. Além disso, favorece na redução do tempo de retenção principalmente de amostras ionizáveis, embora as amostras neutras também possam ter mudanças significativas na retenção. Portanto é um parâmetro muito útil para melhorar a resolução entre picos, sem haver necessidade de mudança de coluna ou da fase móvel (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A vazão de fluxo da fase móvel também é um parâmetro importante para separação de compostos em CLAE, pois, afeta diretamente o tempo de retenção dos analitos e a pressão do sistema (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A eluição gradiente por sua vez, é uma alternativa para melhorar a resolução e a seletividade do método, favorecendo, adicionalmente, na separação de macromoléculas e na diminuição do tempo de corrida em amostras que contenham analitos com ampla faixa de retenção (K). As desvantagens da utilização deste sistema estão principalmente a sua maior complexidade, pois possui um maior número de variáveis, o que dificulta a reprodutibilidade dos dados (CASS; DEGANI, 2001).

Os sistemas de detecção utilizados em CLAE são os mais diversos. Alguns parâmetros como alta sensibilidade, alta seletividade, rapidez de resposta, informação qualitativa do pico desejado, linearidade, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças de temperatura e composição da fase móvel caracterizam a escolha do sistema. Os mais utilizados por sua vez são o arranjo de foto diodos (DAD) ou UV-Visível, fluorescência, índice de refração, infravermelho, polarímetro e dicroísmo circular, eletroquímicos, espalhamento de luz (light-scattering), ressonância nuclear magnética e espectrômetro de massas (EM). (CASS; DEGANI, 2001).

## 2.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O objetivo da validação de uma técnica analítica é demonstrar que ela é apropriada para a sua finalidade pretendida, garantindo por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

Parâmetros como especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e exatidão garantem que o método atenda às exigências das aplicações analíticas. Para a validação deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopeia Brasileira ou, na ausência destas, padrões de trabalho, desde que a identidade e teor sejam devidamente comprovados (ANVISA, 2003).

### 2.10.1 Seletividade

A avaliação deste parâmetro envolve ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem analito de interesse, bem como avaliação da capacidade de identificação do analito em presença de interferentes. Não havendo interferentes, sugere-se a avaliação da seletividade por diferentes métodos ou por variações nas condições instrumentais (ANVISA, 2003).

### 2.10.2 Linearidade

A linearidade mostra a capacidade do método em indicar que os resultados do teste estão diretamente proporcionais à concentração de analitos na amostra, dentro de um determinado intervalo (CLARKE, 2011).

### 2.10.3 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de testes independentes obtidos em condições prescritas. Os três parâmetros para expressar a precisão são repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2010).

#### 2.10.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade, ou precisão intra-corrída, expressa a concordância entre os resultados utilizando-se o mesmo procedimento de análise, mesmo observador, mesmo instrumento e dentro das mesmas condições, mesmo local e as repetições dentro de um curto período de tempo (INMETRO, 2010; ANVISA, 2003).

#### 2.10.3.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas com variações em uma ou mais condições como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos (INMETRO, 2010).

#### 2.10.3.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade pode ser chamada de precisão inter-laboratorial e, embora não seja um componente necessário à concessão de registro, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial. Indica o grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes (INMETRO, 2010; ANVISA, 2003).

#### 2.10.4 Exatidão

Exatidão de um método analítico significa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro. É avaliada com pelo menos nove determinações (triplicatas) de amostras em três diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto), após estabelecidas a linearidade, precisão e seletividade.

#### 2.10.5 Robustez

A robustez mostra a confiabilidade de uma análise em relação às variações deliberadas de parâmetros do método. Considera-se robusto o método capaz de resistir a pequenas mudanças nas condições operacionais ou ambientais, semelhantes às que podem surgir em laboratórios diferentes ou ao longo do tempo. (CLARKE, 2011; ICH, 2005; ANVISA, 2003).

#### 2.10.6 Estabilidade

Parâmetro que objetiva determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz, sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (ANVISA, 2003).

#### 2.10.7 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração de analito em uma amostra que possa ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. No caso de procedimentos analíticos, como CLAE, que apresentam ruído na linha de base, o limite de detecção é estabelecido com base na relação sinal-ruído, onde o sinal do analito deve ser pelo menos três vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010; CLARKE, 2011).

O limite de quantificação é o valor do ponto de concentração mais baixo na curva de calibração que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, nas condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado considerando-se o limite de quantificação numa concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003; ICH, 2005).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS

As 115 amostras analisadas neste trabalho, cedidas pelo Instituto de Criminalística do Paraná (IC) e Divisão Estadual de Narcóticos (DENARC) com autorização judicial, são provenientes de apreensões realizadas no Estado do Paraná e encaminhadas para pesquisa de cocaína ao IC. Todas as amostras foram, separadamente, trituradas, identificadas e armazenadas em local seco, ao abrigo da luz e em temperatura controlada de 21 °C, até o momento de sua utilização.

#### 3.2 OBTENÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS

O padrão analítico de ácido benzóico, com pureza de 99,9 % foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O padrão analítico de cafeína, com pureza de 99,0 % foi obtido da ChromaDex (Irvine, EUA). O padrão de fenacetina 98,0 % foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), enquanto que o padrão de benzocaína 98,0 % da Quimidrol (Joinville, Brasil). Os padrões analíticos de cloridrato de lidocaína (99,7 %) e diltiazem (99,8 %) foram obtidos da Farmacopéia Brasileira (Brasil). O padrão de benzoilecgonina (~90,0%) foi purificado e gentilmente cedido pelo Instituto Médico Legal do Paraná. O padrão de cocaína (81,97%) foi obtido pelo Instituto de Criminalística do Paraná.

#### 3.3 REAGENTES E SOLVENTES

A acetonitrila (grau CLAE) foi obtida da Tedia (Fairfield, EUA) e o ácido fórmico 88% foi obtido da J.T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Holanda). O formiato de amônio foi obtido da Acros Organics (New Jersey, EUA). A água ultrapura foi

obtida através do sistema de purificação Milli-Q da Millipore Corporation (Bedford, EUA).

### 3.4 INSTRUMENTAÇÃO

O CLAE-EM utilizado nas análises foi um modelo Agilent® Technologies 1200 Series, com bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B e forno de coluna TCC SL G1316B. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da Applied Biosystems® modelo API 3200, utilizando fonte de ionização do tipo *Eletrospray* (ESI). O injetor automático e gerenciador de amostras utilizado foi o modelo CTC Waters® 2777 Sample Manager, e os dados obtidos pelo CLAE-EM/EM foram processados através do *software Analyst*®, versão 1.4.2.

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 Series (Waldbronn, Germany), consistindo de bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1379A, injetor automático G1320A e detector de fotodiodo G1315B. A separação cromatográfica foi realizada em coluna XBridge C18 250 X 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation, Mildford, EUA), mantida a 60 °C. A fase móvel consistiu de um gradiente entre acetonitrila e solução aquosa de formiato de amônio 0,05 M – pH 3,1 (pH corrigido com ácido fórmico). O fluxo foi mantido a 1 mL min<sup>-1</sup> sendo o gradiente de eluição demonstrado na Tabela 3. O volume de injeção foi de 10 µL e os dados adquiridos foram processados pelo software ChemStation® versão A.10.02.

TABELA 3 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL

TEMPO (min)	SOLVENTES	
	Formiato de amônio 0,05 M – pH 3,1 (%)	Acetonitrila
0.0	98	2
2.0	75	25
9.0	60	40
10.0	0	100
13.0	0	100
13.1	98	2
17.0	98	2

FONTE: o autor.

### 3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES

As soluções estoque de cafeína, benzoilecgonina, lidocaína, cocaína, ácido benzóico, fenacetina, benzocaína e diltiazem foram preparadas, separadamente, em acetonitrila na concentração de  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . A partir destas soluções, novas soluções de trabalho foram preparadas em acetonitrila/água (80:20 v/v), de acordo com a necessidade de cada experimento.

### 3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras apreendidas e selecionadas para análise foram pesadas e diluídas em acetonitrila de modo a obter uma concentração final de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . A partir dessas soluções, novas foram preparadas em acetonitrila/água (80:20 v/v) a fim de obter uma concentração final de  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as amostras foram filtradas em filtro de PVDF  $0,45 \text{ } \mu\text{m}$  (Millipore Millex (Billerica, EUA) antes das injeções por CLAE-DAD.

### 3.7 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE TRABALHO

A geração de padrão de trabalho (ou padrão secundário) é uma forma usual de evitar que o esgotamento dos padrões certificados não interrompa o estudo. Padrões de trabalho apresentam a mesma identidade química do padrão primário podendo ser utilizados durante a execução dos ensaios, sem grandes restrições em função da quantidade.

Amostras (cocaína nas formas de sal e base) obtidas de apreensões foram utilizadas para produção de cocaína purificada utilizando-se de métodos descritos por CASALE & KLEIN (1993). Esta cocaína purificada foi utilizada como padrão de trabalho até a obtenção de padrão certificado.

### 3.7.1 Obtenção de cocaína purificada a partir de cocaína base

A amostra de cocaína base foi primeiramente dissolvida em uma pequena quantidade de ácido sulfúrico diluído (quantidade suficiente para diluição), obtendo-se uma solução de coloração marrom-amarelada. Em seguida, aumentou-se ligeiramente o pH da solução com adição cuidadosa de base (hidróxido de amônio). A solução foi então titulada com uma solução concentrada aquosa de permanganato de potássio. O permanganato de potássio resulta numa solução intensamente roxa quando dissolvido em água e, como ele reage com as impurezas oxidáveis dos alcalóides presentes na pasta de coca, é reduzido para dióxido de manganês, um precipitado insolúvel, marrom-preto sólido. A adição da solução de permanganato foi continuada até surgimento de um tom róseo permanente. Assim, o permanganato de potássio também atua como indicador visual.

Após a adição da solução de permanganato, a solução foi filtrada para remover o precipitado de dióxido de manganês. A solução incolor, ligeiramente ácida foi então novamente tratada com uma solução básica (amoniacal), sob agitação. A amônia neutraliza o sulfato de cocaína e qualquer ácido sulfúrico restantes, resultando em um precipitado da base purificada, o qual foi filtrado e secado.

Da amostra inicial de cocaína base foi retirada uma alíquota de 0,445 g e, após o processo de purificação obteve-se 0,218 g de cocaína na forma de base livre, resultando em um rendimento de 50%. O fluxograma mostrado na Figura 10 resume a obtenção de cocaína (base livre) a partir de pasta base de cocaína. A Figura 11 mostra o espectro de ESI-MS da fração purificada obtida, indicando ausência de contaminantes.

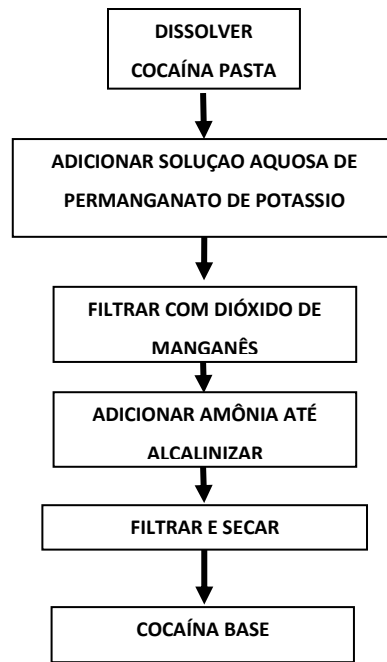


FIGURA 10. FLUXOGRAMA ILUSTRANDO A VIA DE OBTENÇÃO DA COCAÍNA (BASE LIVRE) A PARTIR DE COCAÍNA BASE.

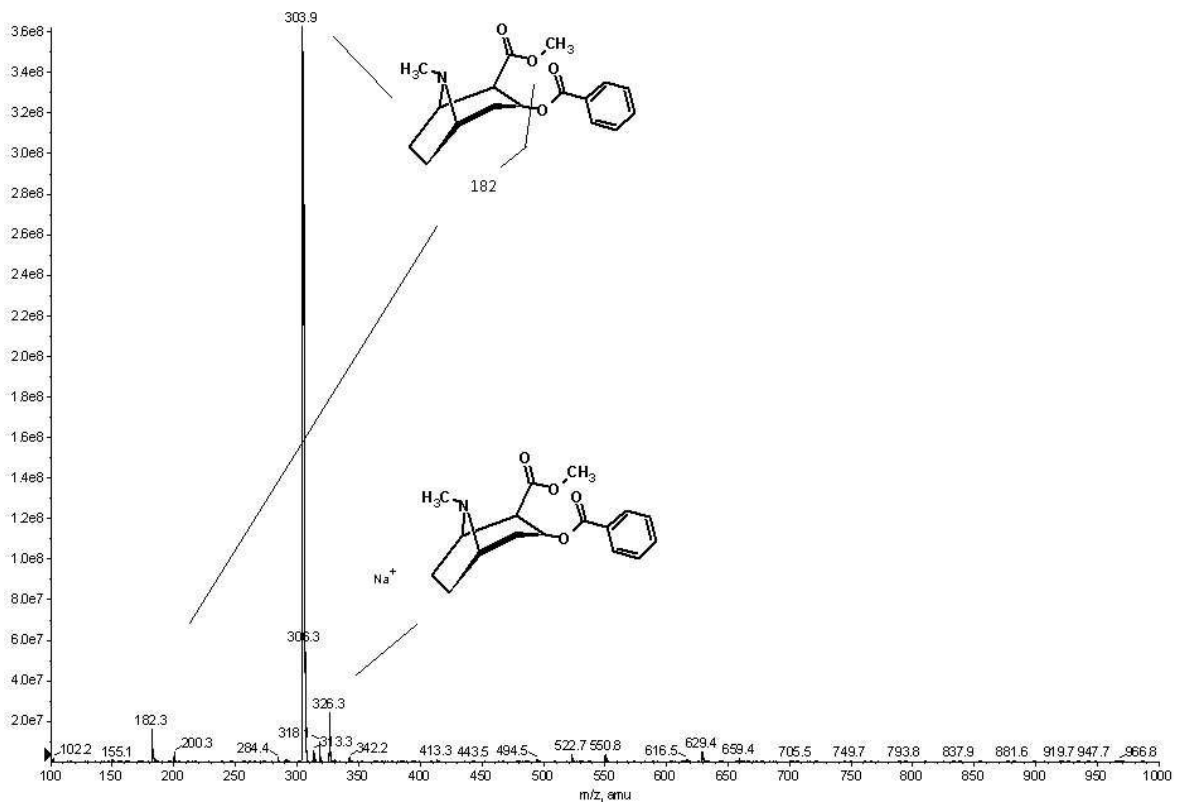


FIGURA 11. ESPECTRO DE ESI-MS DA AMOSTRA PURIFICADA DE COCAÍNA BASE LIVRE. NA FIGURA ESTÃO INDICADOS OS ÍONS MOLECULARES  $m/z$  326  $[M+Na]^+$ ;  $m/z$  304  $[M+H]^+$ . O ÍON  $m/z$  182 É ORIGINADO DE FRAGMENTAÇÃO OCORRIDA NO IONIZADOR DO EQUIPAMENTO.

Para obtenção do cloridrato de cocaína, a fração de cocaína purificada (base livre) foi dissolvida em éter etílico, filtrada e então adicionada de igual volume de acetona contendo uma quantidade estequiométrica de ácido clorídrico concentrado. O ácido clorídrico imediatamente reagiu com a base livre formando cloridrato de cocaína na forma de cristais brancos e brilhantes. Após a conclusão do processo de cristalização, o produto foi filtrado e seco. A Figura 12 mostra os procedimentos adotados para a obtenção do cloridrato de cocaína a partir da cocaína (base livre) obtida na etapa anterior.

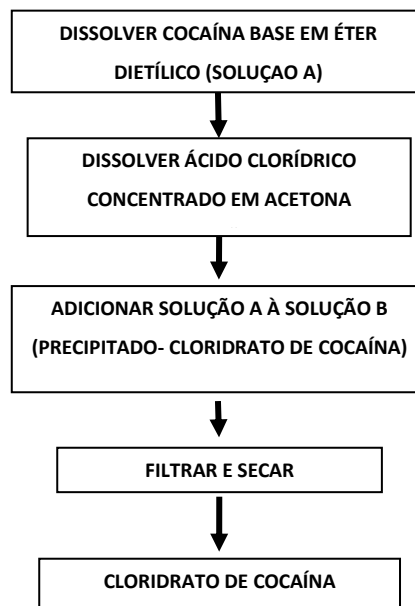


FIGURA 12. FLUXOGRAMA ILUSTRANDO A VIA DE OBTENÇÃO DE CLORIDRATO DE COCAÍNA A PARTIR DE COCAÍNA (BASE LIVRE)

FONTE: adaptada de CASALE & KLEIN (1993).

### 3.7.2 Obtenção de cocaína purificada a partir de cloridrato de cocaína

A amostra de cloridrato de cocaína foi inicialmente solubilizada em água sendo esta solução subsequentemente submetida à partição frente a diclorometano para remoção de impurezas insolúveis em água. Após separação da fração aquosa com auxílio de um funil de separação, adicionou-se à mesma hidróxido de amônio concentrado até a solução atingir  $\text{pH} = 12$ . Nesta etapa, a cocaína contida na

solução passou à sua forma de base livre, tornando-se insolúvel no meio aquoso. A esta solução foi adicionado volume equivalente de éter dietílico para extração da cocaína (base livre). O extrato orgânico foi então filtrado em sulfato de sódio anidro para a remoção de qualquer traço de água. A solução da cocaína base livre em éter etílico foi submetida à lenta evaporação em temperatura ambiente onde se constituíram cristais. Neste caso, retirou-se uma alíquota de 1,823 g da amostra de cloridrato de cocaína inicial e, após o processo de purificação e cristalização, obteve-se 1,200 g de cristais de cocaína (base livre), resultando em um rendimento de 65%.

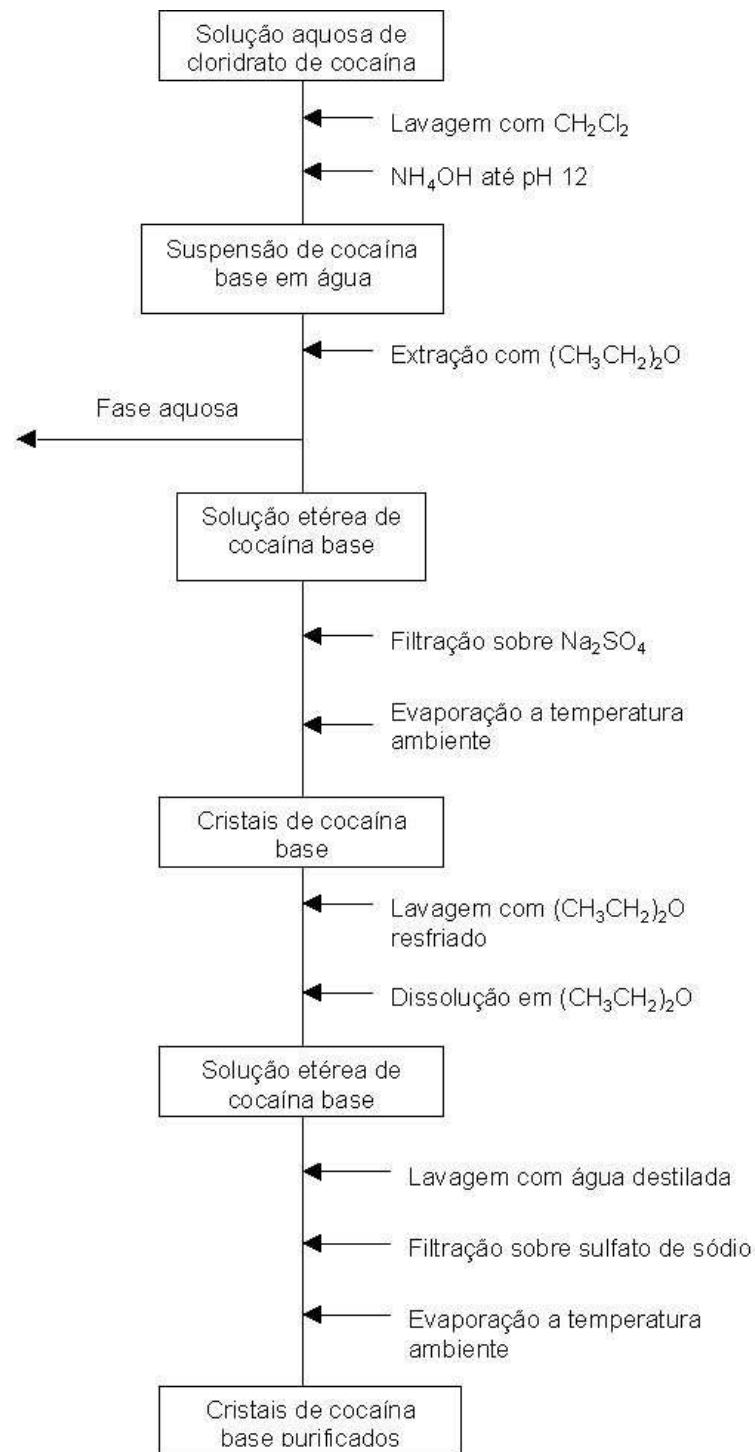


FIGURA 13. FLUXOGRAMA ILUSTRANDO A VIA DE OBTENÇÃO DOS CRISTAIS DE COCAÍNA. FONTE: CALDAS NETO, O. B. (1998).

Para a obtenção do cloridrato de cocaína, a cocaína base livre purificada foi submetida à dissolução em éter dietílico, acetona e quantidade estequiométrica de ácido clorídrico, de forma similar à indicada na Figura 13.



De acordo com o espectro de ESI-MS para a fração purificada obtida a partir da amostra inicial de cloridrato de cocaína, a mesma apresenta-se ainda contaminada por uma pequena quantidade de cinamoilcocaína (Figura 14). Este fato pode ser explicado pela ausência do procedimento envolvendo o uso do permanganato de potássio, o qual oxida duplas ligações não pertencentes a sistemas aromáticos (como é o caso da cinamoilcocaína) (Figura 15). O produto oxidado da cinamoilcocaína é provavelmente removido nos processos de purificação subsequentes devido a sua maior solubilidade em meios aquosos.

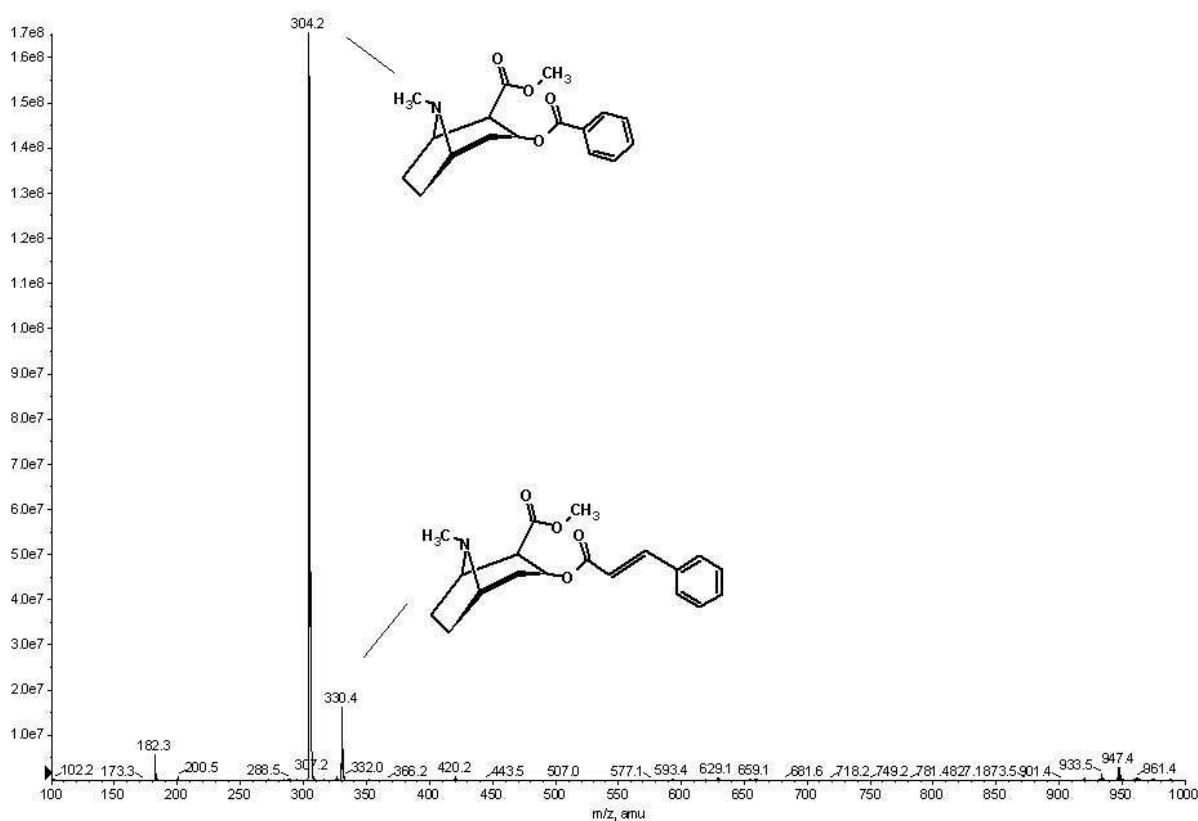


FIGURA 14. ESPECTRO DE ESI-MS DA AMOSTRA PURIFICADA DE COCAÍNA, INDICANDO A PRESENÇA DE CINAMOILCOCAÍNA. NA FIGURA ESTÃO INDICADOS OS ÍONS MOLECULARES  $m/z$  304  $[M+Na]^+$ ;  $m/z$  330  $[M+H]^+$ . O ÍON  $m/z$  182 É ORIGINADO DE FRAGMENTAÇÃO OCORRIDA NO IONIZADOR DO EQUIPAMENTO.

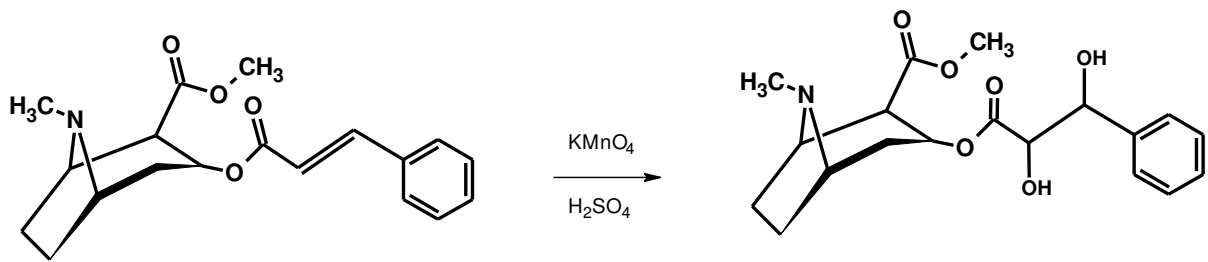


FIGURA 15. REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA CINAMOILCOCAÍNA EM MEIO COM PERMANGANATO DE POTÁSSIO.  
 FONTE: o autor.

### 3.7.3 Estudo das amostras purificadas de cocaína por ESI-MS/MS

Uma das amostras purificadas de cocaína (cloridrato obtido a partir da cocaína base) foi submetida a análises de ESI-MS/MS para confirmação estrutural a partir da fragmentação da molécula. Nessa análise o equipamento foi ajustado para selecionar exclusivamente o íon  $m/z$  304, o qual foi direcionado à câmara de colisão do equipamento. A partir daí os fragmentos da molécula em análise foram mensurados, como mostrado na Figura 16. O padrão de fragmentação da amostra analisada correlaciona-se com a via de fragmentação esperada para a cocaína. O principal fragmento observado corresponde ao íon  $m/z$  182 atribuído à massa da cocaína com perda do radical benzilóxi.

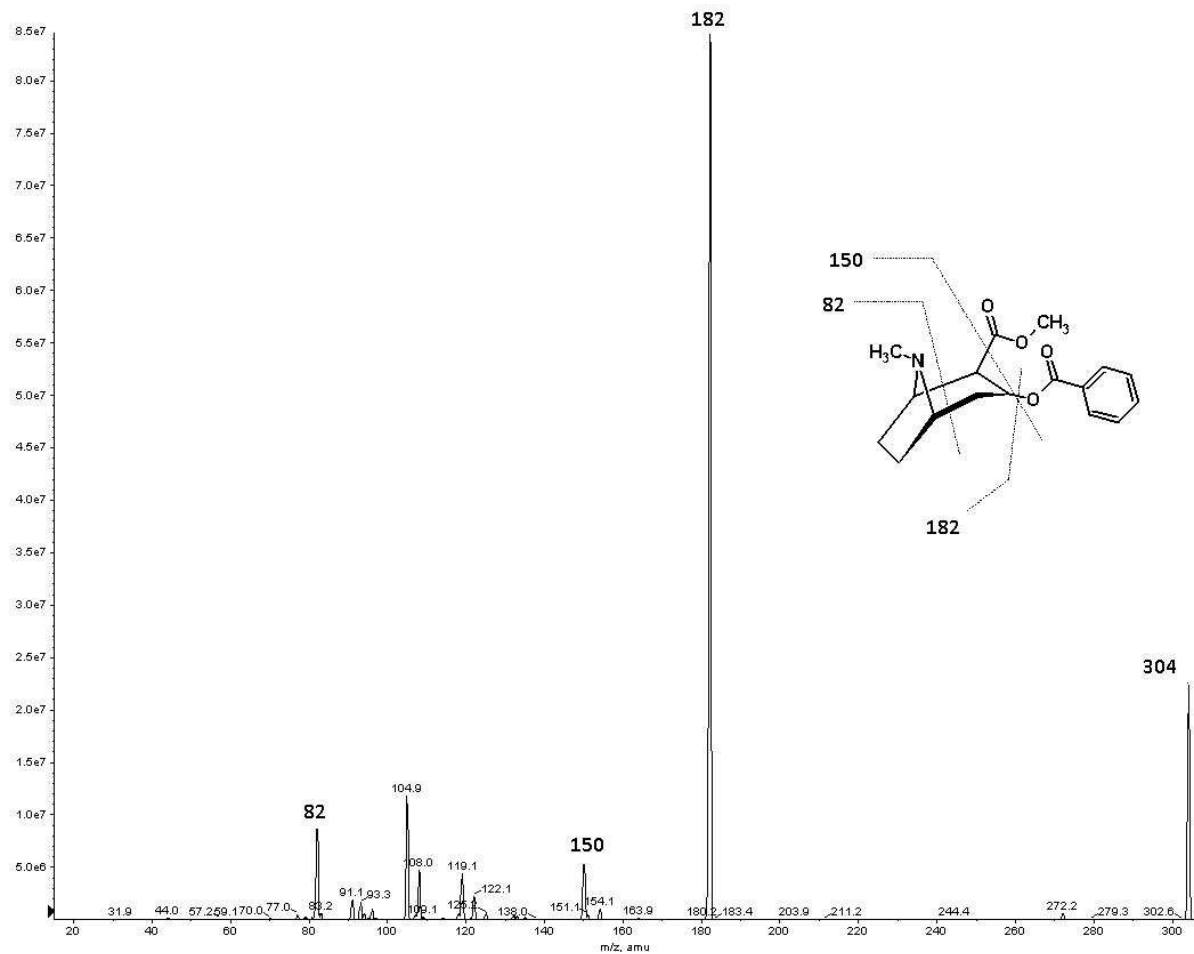


FIGURA 16. ESPECTRO DE ESI-MS/MS DA AMOSTRA PURIFICADA DE CLORIDRATO DE COCAÍNA E REPRESENTAÇÃO DE SUA VIA DE FRAGMENTAÇÃO.

### 3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD

O método desenvolvido foi validado de acordo com os critérios descritos na Resolução – RE nº 899, de 29 de março de 2003, ANVISA, categoria II, que dispõe sobre testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas (ANVISA, 2003). Conforme a referida resolução, os ensaios a serem realizados incluem: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação, exatidão e robustez.

### 3.8.1 Seletividade

A seletividade foi determinada através do uso de uma técnica específica (CLAE-EM), a qual possibilitou avaliar a pureza dos picos cromatográficos. Para tanto, amostras de cocaína base foram diluídas 1:50 v/v em acetonitrila, e em seguida fortificadas com soluções contendo mistura dos analitos nas seguintes concentrações: cafeína  $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , benzoilecgonina  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , lidocaína  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , cocaína  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ácido benzóico  $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , fenacetina  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , benzocaína  $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e diltiazem  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras foram injetadas no CLAE-EM o qual operou em modo *full scan* nas seguintes condições:

- ✓ Cromatógrafo líquido: utilizou-se as mesmas condições do método descrito por CLAE-DAD (Seção 3.3).
- ✓ Espectrômetro de massas: a fonte *electrospray* foi operada no modo positivo de ionização para todos os analitos, com exceção do ácido benzóico (modo negativo). Para ambos (modos positivo e negativo de ionização) a posição do capilar foi mantida em 1,0 mm na vertical e 5 mm na horizontal. Para o modo positivo e ionização os parâmetros ajustados manualmente para estabilização do sinal foram: voltagem do capilar (IS): 5500 V, temperatura (T): 650 °C, potencial de entrada no cone (EP): 6 eV, potencial de desagrupamento (DP): 30 eV, gás de Interface (CUR): 10 psi, gás de nebulização (GS1): 50 psi e gás auxiliar (GS2): 50 psi. Para o modo negativo de ionização os parâmetros ajustados foram: IS: -4500 V, T: 650 °C, EP: -1 eV, DP: -7 eV, CUR: 10 psi, GS1: 50 psi e gás auxiliar GS2: 50 psi. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR e GS1 foi produzido por um gerador de nitrogênio (Peak Scientific Instruments). Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 50 a 600 Daltons (Da) utilizando o software Analyst 1.4 (ABI/Sciex). Nenhum pico interferente deve ser observado nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse para que o método seja considerado seletivo.

### 3.8.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram avaliados através da relação sinal/ruído. Para conduzir este estudo, soluções de trabalho contendo  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , de cada analito foram preparadas em triplicada, diluídas em série, e em seguida injetadas no CLAE-DAD até o menor pico detectável. O limite de detecção foi estimado através da relação sinal/ruído 3:1 enquanto que o limite de quantificação estimado pela relação sinal:ruído de pelo menos 10:1, até que precisão desejada fosse alcançada.

### 3.8.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do método da padronização externa, em sete níveis de concentração para cada composto. Para tanto soluções de trabalho contendo uma mistura de cafeína, benzoilecgonina, lidocaína, cocaína, ácido benzóico, fenacetina, benzocaína e diltiazem foram preparadas de modo a abranger as seguintes faixas: 5 a  $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a cafeína; 10 a  $300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a benzoilecgonina; 15 a  $300 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a lidocaína; 5 a  $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a cocaína; 5 a  $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para o ácido benzóico; 2,5 a  $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a fenacetina; 2,5 a  $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a benzocaína e 2,5 a  $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para o diltiazem (Tabela 4). As curvas de calibração foram geradas automaticamente pelo *software* ChemStation® versão A.10.02 sendo a linearidade confirmada através do coeficiente de regressão (r) . Foram consideradas lineares as curvas que apresentaram valores de  $r > 0,99$ .

TABELA 4 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS NO ENSAIO DE LINEARIDADE.

Níveis de concentração	ANALITOS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )							
	Cafeína	Benzoil-ecgonina	Lidocaína	Cocaína	Ácido benzóico	Fenacetina	Benzocaína	Diltiazem
1	5,0	10,0	15,0	5,0	5,0	2,5	2,5	2,5
2 <sup>a</sup>	10,0	25,0	25,0	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0
3	25,0	50,0	50,0	25,0	25,0	10,0	10,0	10,0
4 <sup>b</sup>	50,0	75,0	75,0	50,0	50,0	25,0	25,0	25,0
5	75,0	100,0	100,0	100,0	100,0	50,0	50,0	50,0
6	100,0	150,0	150,0	250,0	250,0	100,0	100,0	100,0
7 <sup>c</sup>	250,0	300,0	300,0	500,0	500,0	250,0	250,0	250,0

**NOTA:** <sup>a</sup> Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Baixa concentração; <sup>b</sup> Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Média concentração; <sup>c</sup> Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Alta concentração.

FONTE: o autor.

### 3.8.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Este parâmetro de validação foi investigado através de injeções de uma triplicata de soluções de trabalho preparadas em diferentes níveis de concentrações, conforme descrito na Tabela 5.

A repetibilidade foi realizada em um curto período de tempo (manhã e tarde) por um mesmo analista, no mesmo equipamento, sob condições idênticas de uso. A precisão intermediária foi realizada por um segundo analista, nas mesmas condições, após dois dias do ensaio da repetibilidade. A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as áreas obtidas com as duas corridas analíticas (repetibilidade), e entre as áreas obtidas entre os dois analistas (precisão intermediária). Desvios menores que 5% indicam que um método é preciso.

TABELA 5 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS NO ENSAIO DE PRECISÃO

Níveis de concentração	ANALITOS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )							
	Cafeína	Benzoil-ecgonina	Lidocaína	Cocaína	Ácido benzóico	Fenacetina	Benzocaína	Diltiazem
CQB	10,00	25,00	25,00	10,00	10,00	5,00	5,00	5,00
CQM	50,00	75,00	75,00	50,00	50,00	25,00	25,00	25,00
CQA	250,00	300,00	300,00	500,00	500,00	250,00	250,00	250,00

**NOTA:** CQB – Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Baixa concentração; CQM – Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Média concentração; CQA – Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Alta concentração.

FONTE: o autor.

### 3.8.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de adição do padrão, que consiste na determinação da percentagem do erro relativo obtido entre a concentração teórica e a concentração experimental dos analitos.

Para a análise da concentração teórica, uma solução contendo mistura dos analitos foi preparada em triplicata, contemplando os níveis de concentração baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), demonstrados anteriormente na Tabela 5 (ensaio de Precisão). Os resultados, obtidos após as injeções no cromatógrafo, foram considerados teóricos.

Para análise da concentração experimental, primeiramente uma amostra de cocaína na forma base foi escolhida aleatoriamente e diluída 1:50 v/v em acetonitrila. Registrou-se o teor de cada analito presente nessa amostra. Em seguida, a amostra diluída foi fortificada com soluções de trabalho, respeitando os níveis de concentração teórica do ensaio. A quantidade recuperada dos analitos foi calculada subtraindo o teor encontrado nas amostras fortificadas daqueles obtidos nas amostras sem fortificação.

O ensaio foi conduzido em triplicata e a percentagem de recuperação foi calculada através da equação:

$$E (\%) = \frac{\text{concentração experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Erros menores que 5% são aceitáveis para que um método seja considerado exato.

### 3.8.6 Robustez

A robustez do método desenvolvido foi testada através de pequenas variações no pH da fase móvel ( $\pm 0,1$ ), fluxo da fase móvel ( $\pm 0,01 \text{ mL min}^{-1}$ ), temperatura ( $\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e diferentes marcas de colunas (Agilent e Phenomenex), porém de mesmo tamanho, diâmetro e fase estacionária (C18). Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata, utilizando soluções contendo mistura dos analitos na concentração média (CQM) da curva de calibração (item 3.8.3). As áreas dos picos cromatográficos obtidas com o método modificado foram comparadas com aquelas obtidas com o método original. Os resultados foram expressos em termos de coeficiente de variação (CV%) entre as corridas, sendo as diferenças entre os grupos avaliadas através do teste *t* (duas amostras em par para médias). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas valores de  $p \leq 0,05$ .

### 3.9 ESTABILIDADE

O ensaio de estabilidade foi realizado com o objetivo de avaliar a degradação sofrida pelos analitos nas condições reais de armazenamento e manuseio da amostra. O teste foi conduzido através de injeções de uma sextuplicata de soluções de trabalho contendo uma mistura dos analitos preparadas no nível médio de concentração (CQM) da curva de calibração (item 3.8.3). As condições de armazenamento testadas foram:

- Estabilidade das soluções estoque armazenadas em refrigerador durante 7 e 30 dias ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ );
- Estabilidade das soluções de trabalho armazenadas durante 24 horas no gerenciador de amostras;



- Estabilidade das soluções de trabalho mantidas na bancada, à temperatura ambiente ( $\sim 21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 6 e 24 horas.

A estabilidade foi avaliada através do erro relativo (%) obtido entre as áreas dos analitos adquiridas nas condições de armazenamento com aquelas obtidas em amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método por CLAE-DAD para quantificação simultânea da cafeína, benzoilecgonina, lidocaína, cocaína, ácido benzóico, fenacetina, benzocaína e diltiazem. Paralelamente a isto, amostras de cocaína apreendidas no estado do Paraná foram analisadas com o novo método para que se tenha conhecimento dos principais adulterantes presentes no mercado de cocaína desta região.

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE CLAE

O início do desenvolvimento analítico deu-se pela definição dos parâmetros cromatográficos, com base na revisão bibliográfica de metodologias existentes para quantificação de cocaína, adulterantes e produtos de degradação. Inicialmente foram obtidos os espectros de varredura no ultravioleta (UV) dos analitos por meio do detector de DAD. Através desse experimento foi possível visualizar que as menores interferências dos solventes e impurezas, bem como o comprimento de onda ideal para análise dos compostos ocorre em 274 nm.

Nas primeiras injeções, a coluna Waters XBridge C18 (100 x 2,1 mm, 5 µm de partícula) foi utilizada. Diversas proporções de água e acetonitrila foram avaliadas para compor a fase móvel, e os primeiros ensaios demonstraram que pequenas variações de pH podem ser críticas na reprodução dos tempos de retenção de alguns analitos. Assim a fase móvel mantida durante todo o desenvolvimento do método foi tampão acetonitrila e formiato de amônio 0,05 M – pH 3,1 (ajustado com ácido fórmico). A escolha desse sistema tampão foi em virtude de serem substâncias voláteis, que não prejudicam o sistema cromatográfico e são perfeitamente ajustáveis em espectrômetros de massas.

Após diversas tentativas de separação dos compostos, devido à complexidade da matriz, tanto no modo isocrático quanto em diversos gradientes de eluição, não foi possível obter um cromatograma adequado utilizando a coluna XBridge C18 (100 x 2,1 mm, 5 µm de partícula).

Na tentativa de obter uma maior eficiência de separação, uma coluna de mesma fase estacionária apresentando menor tamanho de partícula foi testada (Symmetry, 75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  de partícula), não sendo observadas melhorias significativas na separação dos compostos. Em outra tentativa, uma coluna C18 150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de partícula da marca Shodex (Toquio, Japão) foi utilizada e esta apresentou uma boa eficiência de separação, porém com uma resolução muito estreita entre os picos cromatográficos. Assim pequenas modificações passíveis de ocorrer durante o preparo da fase móvel (por exemplo) poderiam comprometer as análises. Por fim, utilizando uma coluna XBridge C18 250 X 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula uma excelente eficiência de separação foi demonstrada mediante todas as matrizes testadas (pasta base, cloridrato de cocaína e cocaína base). O cromatograma representativo de uma amostra de cocaína base fortificada com padrões dos analitos é apresentado na Figura 17.

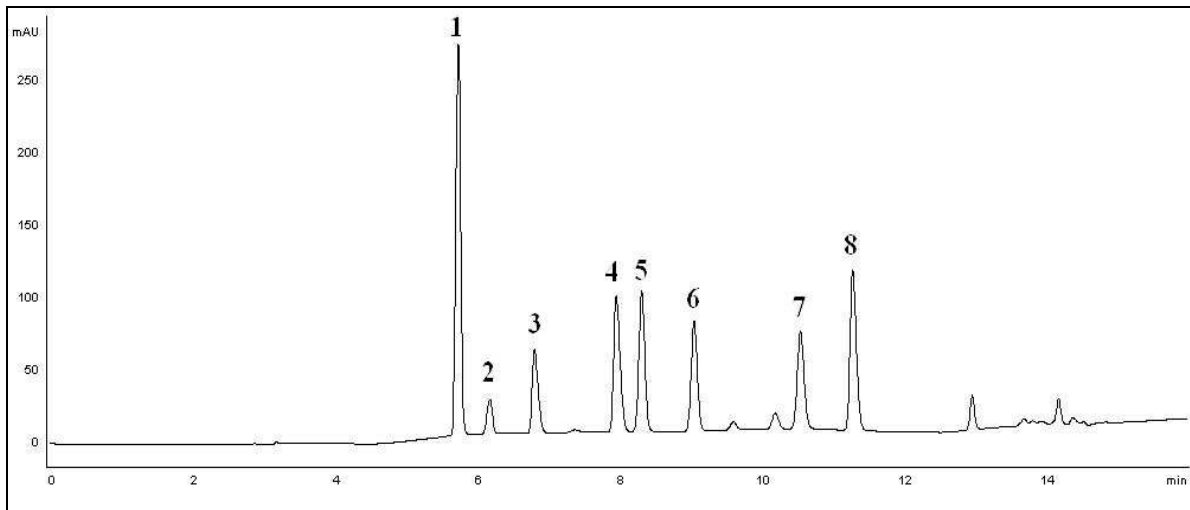


FIGURA 17: CROMATOGRAMA DA (1) CAFEÍNA - Tr: 5,7 min; (2) BENZOILECGONINA - Tr: 6,1 min; (3) LIDOCAÍNA - Tr: 6,7 min; (4) COCAÍNA - Tr: 7,9 min; (5) ÁCIDO BENZÓICO - Tr: 8,4 min; (6) FENACETINA - Tr: 9,0 min; (7) BENZOCAÍNA - Tr: 10,5 min e (8) DILTIAZEM - Tr: 11,3 min OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD (coluna XBridge C18 250 X 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula).

## 4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD

### 4.2.1 Seletividade

Com o propósito de avaliar a seletividade do método desenvolvido, análises por CLAE-EM foram realizadas para determinar a pureza dos picos cromatográficos. Conforme demonstrado nas Figuras 18 e 19, nenhum sinal interferente foi observado nos mesmos tempos de retenção dos analitos. Portanto, o método foi considerado seletivo para as matrizes analisadas.

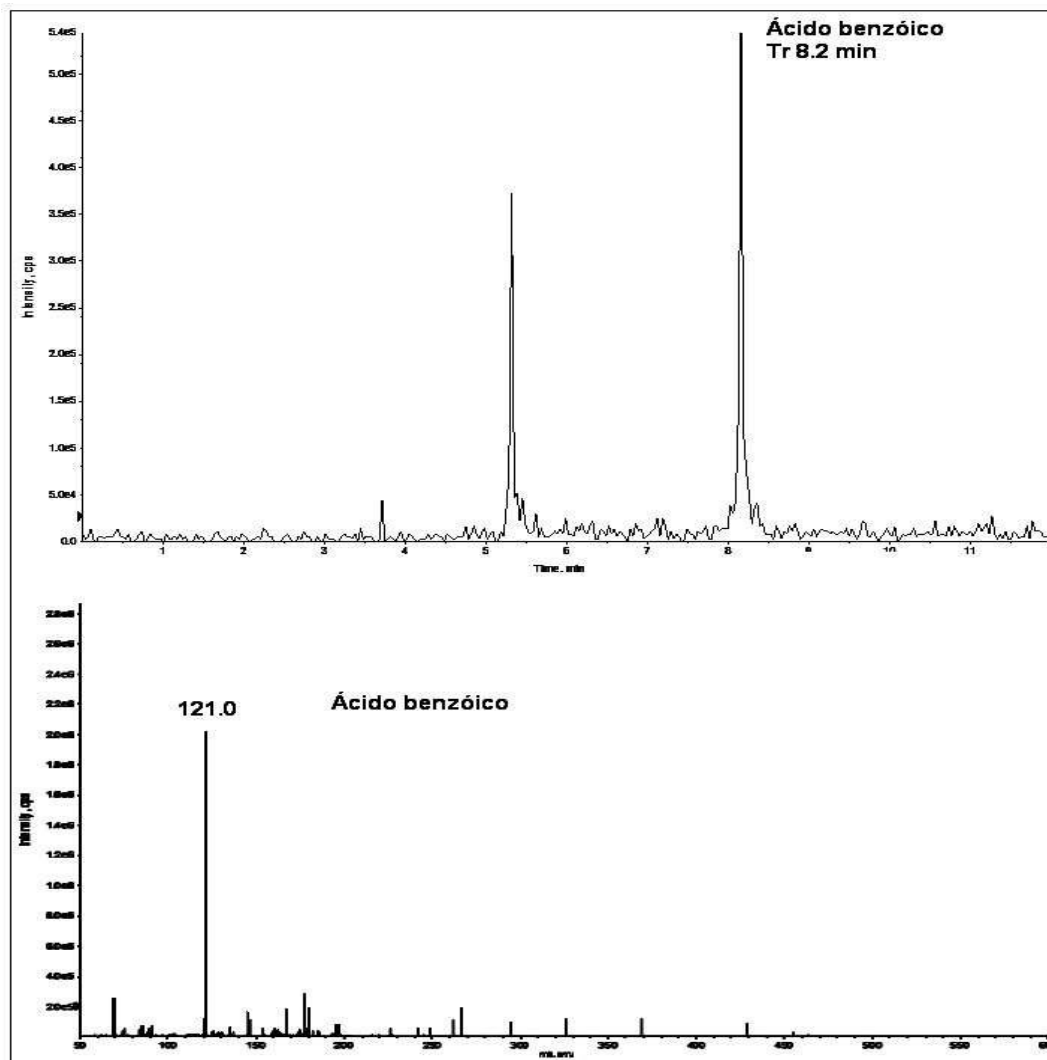


FIGURA 18: *FULL SCAN* CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE COCAÍNA BASE FORTIFICADA COM ÁCIDO BENZÓICO E SEU RESPECTIVO ÍON MOLECULAR  $[M - H]^-$  EXTRAÍDO DO PICO CORRESPONDENTE.

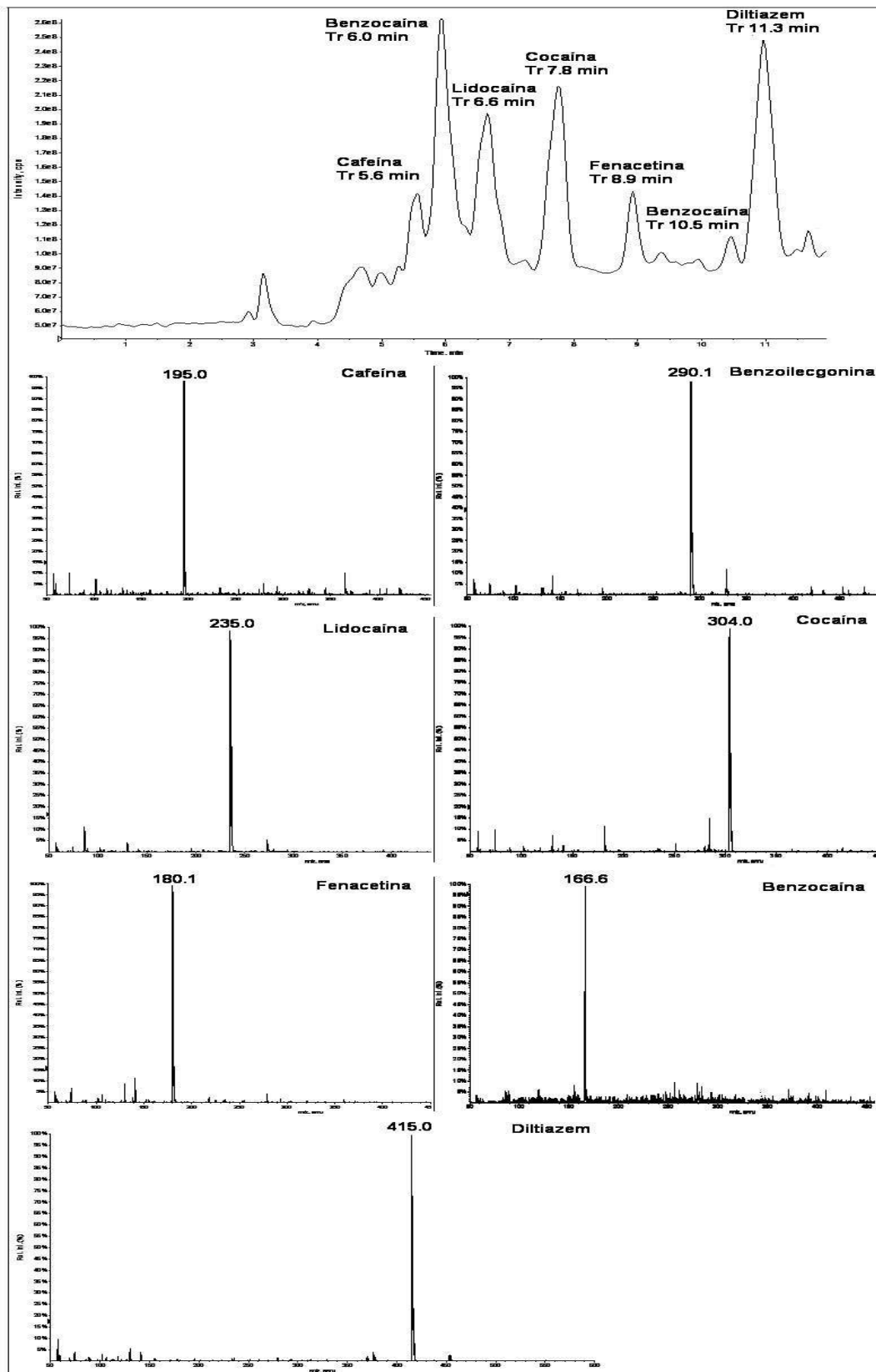


FIGURA 19: *FULL SCAN* CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE COCAÍNA BASE FORTIFICADA COM CAFEÍNA, BENZOILECGONINA, LIDOCAÍNA, COCAÍNA, FENACETINA, BENZOCAÍNA E DILTIAZEM E SEUS RESPECTIVOS ÍONS MOLECULARES  $[M + H]^+$  EXTRAÍDOS DOS PICOS CORRESPONDENTES.

#### 4.2.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram avaliados a partir da relação sinal ruído (3:1 e 10:1, respectivamente). Dessa forma, soluções de concentração conhecida dos analitos foram diluídas sucessivamente e injetadas até a obtenção do menor pico detectável. Conforme demonstrado na Tabela 6, o método desenvolvido apresentou uma alta sensibilidade com limites de detecção variando entre 0,3 e 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e limites de quantificação entre 2,5 e 15,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O método demonstrou, portanto, ser capaz de determinar com segurança as substâncias analisadas mesmo que estas estejam presentes em baixas concentrações.

TABELA 6 – VALORES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE CLAE-DAD.

ANALITO	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Cafeína	1,2	5,0
Benzoilecgonína	3,0	10,0
Lidocaína	3,0	15,0
Cocaína	1,2	5,0
ácido benzóico	1,2	5,0
Fenacetina	0,7	2,5
Benzocaína	0,3	2,5
Diltiazem	0,3	2,5

FONTE: o autor.

#### 4.2.3 Linearidade

Para todos os compostos, as curvas de calibração demonstraram uma excelente linearidade com coeficiente de correlação ( $r$ ) > 0,99. Além disso, os erros de precisão obtidos em cada nível de concentração foram menores que 5,0%, resultados estes considerados satisfatórios. Em virtude desses resultados, pode-se inferir que dentro das faixas de concentração estabelecidas, o método desenvolvido garante uma resposta linear para os analitos. Os valores individuais de precisão para cada nível de concentração são demonstrados na Tabela 7 enquanto que as regressões lineares obtidas em cada curva de concentração são apresentadas na Figura 20.

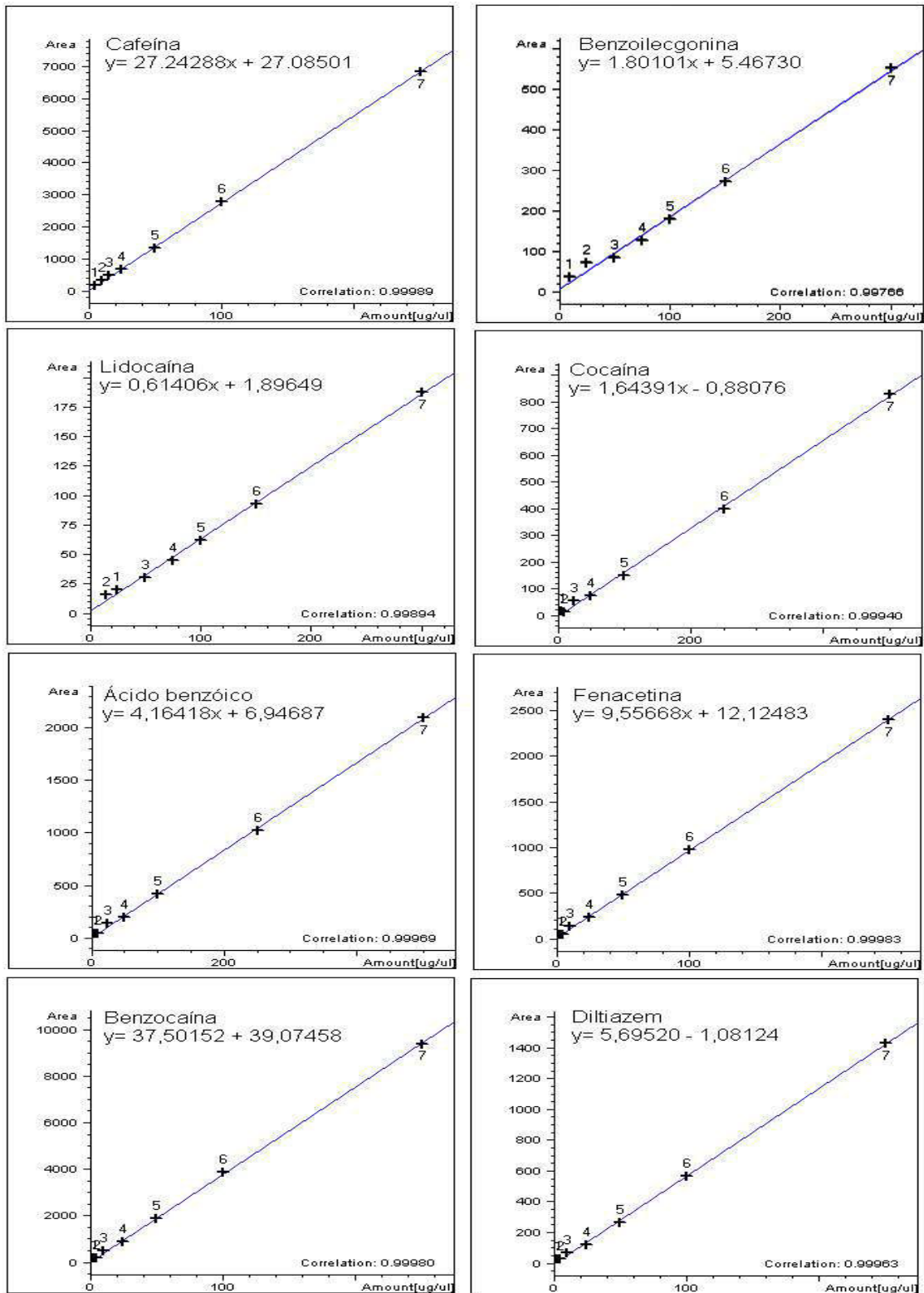


FIGURA 20: CURVAS DE CALIBRAÇÃO, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DA CAFEÍNA, BENZOILECGONINA, LIDOCAÍNA, COCAÍNA, ÁCIDO BENZÓICO, FENACETINA, BENZOCAÍNA E DILTIAZEM.

FONTE: o autor.

TABELA 7 – VARIAÇÕES OBTIDAS NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).

Níveis de concentração das curvas de calibração	Analitos							
	CAF (CV%)	BEC (CV%)	LID (CV%)	COC (CV%)	ABZ (CV%)	FEN (CV%)	BEN (CV%)	DTZ (CV%)
1	4,27	3,83	4,54	3,10	3,08	3,55	3,28	3,97
2	1,49	1,23	1,56	2,72	1,67	1,94	2,13	3,84
3	1,62	1,93	0,77	4,82	1,36	0,70	2,63	1,93
4	2,32	1,80	1,51	1,84	1,27	4,58	0,66	1,92
5	2,16	2,20	3,70	2,79	1,40	4,33	2,46	3,24
6	3,75	1,80	0,59	2,03	1,72	1,93	1,54	1,37
7	0,97	1,56	1,49	1,60	2,23	2,54	1,70	1,07

FONTE: o autor.

#### 4.2.4 Precisão

O ensaio de repetibilidade foi realizado em triplicata, em três níveis de concentração. O parâmetro foi avaliado em termos da dispersão dos resultados obtidos com amostras similares injetadas em um curto período de tempo (6 horas), por um mesmo analista. A precisão intermediária foi realizada de forma similar ao ensaio de repetibilidade, no entanto foi avaliada a dispersão dos resultados obtidos com amostras similares injetadas em dias diferentes e com analistas diferentes.

As Tabelas 8 e 9 demonstram as variações obtidas para cada composto no ensaio de repetibilidade e precisão intermediária. Conforme pode ser verificado, as variações obtidas no ensaio de precisão foram menores que 4,36%. Esses resultados estão de acordo com o preconizado pela RE N° 899/03 (BRASIL, 2003), que preconiza variações menores que 5% para métodos analíticos. Em virtude dos baixos coeficientes de variação obtidos tanto na repetibilidade quanto na precisão intermediária, o método desenvolvido foi considerado preciso.



TABELA 8 – VARIAÇÕES OBTIDAS NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DO ENSAIO DE REPETIBILIDADE DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).

Níveis de concentração	Analitos							
	CAF (CV%)	BEC (CV%)	LID (CV%)	COC (CV%)	ABZ (CV%)	FEN (CV%)	BEN (CV%)	DTZ (CV%)
Baixo	4,36	4,19	1,65	2,25	0,39	0,13	3,28	1,19
Médio	1,25	1,44	2,83	1,34	1,15	1,65	1,83	1,44
Alto	0,79	0,73	0,66	0,26	2,87	1,38	0,87	0,08

FONTE: o autor.

TABELA 9 – VARIAÇÕES OBTIDAS NOS DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).

Níveis de concentração	Analitos							
	CAF (CV%)	BEC (CV%)	LID (CV%)	COC (CV%)	ABZ (CV%)	FEN (CV%)	BEN (CV%)	DTZ (CV%)
Baixo	0,98	0,82	0,12	1,89	1,52	0,15	2,62	1,01
Médio	2,13	0,53	0,30	0,29	0,90	3,83	0,64	0,36
Alto	0,36	0,57	1,87	0,01	0,58	0,50	1,32	0,03

FONTE: o autor.

#### 4.2.5 Exatidão

Os resultados do ensaio de exatidão são apresentados na Tabela 10. O método desenvolvido apresentou exatidão satisfatória, com valores de recuperação variando entre 100,15% e 104,86% para cafeína, 96,70% e 102,40% para benzoilecgonina, 98,45% e 101,48% para lidocaína, 96,21% e 100,56% para cocaína, 96,80% e 101,58% para ácido benzoico, 98,17% e 103,40% para fenacetina, 97,06% e 99,24% para benzocaína e 97,40% e 97,93% para diltiazem. Não há, de fato, legislação que determine um valor ideal para exatidão, haja visto que as variações deste parâmetro são dependentes do nível de detecção, da matriz e do detector utilizado. Em nosso estudo, considerando o uso de um detector de DAD, os níveis de concentração analisados ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e a complexidade das matrizes

avaliadas (pasta base, sal e base livre) foram estabelecidos erros de exatidão de no máximo 5%. Sendo assim, o método foi considerado exato.

TABELA 10 – RESULTADO DE EXATIDÃO (EXPRESSO EM PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO) OBTIDO EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DA CAFEÍNA (CAF), BENZOILECGONINA (BEC), LIDOCAÍNA (LID), COCAÍNA (COC), ÁCIDO BENZÓICO (ABZ), FENACETINA (FEN), BENZOCAÍNA (BEN) E DILTIAZEM (DTZ).

Níveis de concentração	Analitos							
	CAF (%)	BEC (%)	LID (%)	COC (%)	ABZ (%)	FEN (%)	BEN (%)	DTZ (%)
Baixo	104,86	102,40	101,48	98,23	96,80	103,40	97,06	97,40
Médio	101,09	100,40	99,44	100,56	101,58	100,28	99,24	97,93
Alto	100,15	96,70	98,45	96,21	99,65	98,17	97,28	97,56

FONTE: o autor.

#### 4.2.6 Robustez

Durante o desenvolvimento do método foi possível verificar que colunas menores que 250 x 4.6 mm dificilmente são capazes separar os compostos de interesse em virtude do número de substâncias e da complexidade da matriz. Portanto, adaptações do método com outras colunas de comprimentos e tamanhos de partícula inferiores à utilizada podem ser realizadas, porém a seletividade deve ser avaliada com muito critério a fim de manter qualidade desejada nas análises.

As Tabelas 11, 12 e 13 demonstram os resultados das análises estatísticas aplicadas para avaliar o ensaio de robustez (comparativo das áreas obtidas com o método original e aquelas obtidas com o método modificado). De acordo com os resultados obtidos, uma pequena redução no pH da fase móvel, bem como a variação de 1 °C na temperatura original do método podem comprometer a exatidão dos resultados da benzoilecgonina e lidocaína ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, pequenas variações no fluxo comprometeram a exatidão da cafeína, lidocaína e fenacetina. Esses resultados indicam que o pH da fase móvel, temperatura e fluxo podem ser parâmetros críticos na qualidade dos resultados, e por isso devem ser mantidos conforme especificado.

TABELA 11 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ OBTIDOS COM VARIAÇÕES DO pH DA FASE MÓVEL

Analito	pH da fase móvel	Área dos picos (Media ± DP)	CV%	Valor de <i>p</i> (teste <i>t</i> de student)
Cafeína	3	776,62±0,99	0,12	0,95805
	3.1*	750,47±2,01	0,26	-
	3.2	839,78±18,65	2,22	0,86455
Benzoilecgonina	<b>3</b>	<b>149,68±0,72</b>	<b>0,48</b>	<b>0,02038</b>
	3.1*	147,77±0,35	0,24	-
	3.2	150,44±4,63	3,08	0,97821
Lidocaína	<b>3</b>	<b>51,95±0,17</b>	<b>0,33</b>	<b>0,00233</b>
	3.1*	51,35±0,30	0,58	-
	3.2	49,93±1,66	3,33	0,20886
Cocaína	3	87,69±0,11	0,12	0,10985
	3.1*	88,22±2,04	2,31	-
	3.2	88,35±0,59	0,67	0,05373
Ácido benzoico	3	311,59±130,47	41,87	0,99855
	3.1*	311,86±134,98	43,28	-
	3.2	350,39±199,83	57,03	0,80907
Fenacetina	3	276,84±4,86	1,75	0,99883
	3.1*	276,58±0,38	0,13	-
	3.2	276,18±6,39	2,31	0,99872
Benzocaína	3	1018,04±4,03	0,39	0,56785
	3.1*	1016,48±0,15	0,01	-
	3.2	1034,63±25,37	2,45	0,97854
Diltiazem	3	142,95±1,51	1,06	0,41323
	3.1*	143,60±0,24	0,16	-
	3.2	142,18±2,29	1,61	0,41044

\*pH da fase móvel do método original

FONTE: o autor.

TABELA 12 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ OBTIDOS COM VARIAÇÕES DA TEMPERATURA

Analito	Variações temperatura	Área dos picos (Media ± DP)	CV%	Valor de <i>p</i> (teste <i>t</i> de student)
Cafeína	59 °C	776,67±5,24	0,67	0,46489
	60 °C*	747,94±4,17	0,55	-
	61 °C	777,57±6,95	0,89	0,45997
Benzoilecgonina	<b>59 °C</b>	<b>149,51±1,57</b>	<b>1,05</b>	<b>0,02838</b>
	60 °C*	147,42±0,62	0,42	-
	61 °C	153,05±4,14	2,70	0,44477
Lidocaína	<b>59 °C</b>	<b>51,99±0,30</b>	<b>0,58</b>	<b>0,00640</b>
	60 °C*	51,35±0,30	0,58	-
	<b>61 °C</b>	<b>52,24±0,25</b>	<b>0,48</b>	<b>0,01981</b>
Cocaína	59 °C	88,16±0,25	0,29	0,37098
	60 °C*	88,22±2,046	2,31	-
	61 °C	88,11±0,22	0,25	0,36394
Ácido benzoico	59 °C	236,69±1,23	0,52	0,19363
	60 °C*	234,69±2,00	0,86	-
	61 °C	237,27±1,10	0,46	0,19153
Fenacetina	59 °C	281,20±2,36	0,84	0,42734
	60 °C*	275,74±1,55	0,56	-
	61 °C	281,39±1,38	0,49	0,41995
Benzocaína	59 °C	1018,29±5,94	0,58	0,38398
	60 °C*	1014,71±2,50	0,24	-
	61 °C	1022,04±6,02	0,58	0,38761
Diltiazem	59 °C	144,53±0,78	0,54	0,51395
	60 °C*	144,03±0,79	0,55	-
	61 °C	144,68±0,50	0,34	0,38173

\*Temperatura de forno do método original

FONTE: o autor.

TABELA 13 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ OBTIDOS COM VARIAÇÕES NO FLUXO DA FASE MÓVEL

Analito	Variações	Área dos picos (Media ± DP)	CV%	Valor de p (teste t de student)
Cafeína	<b>0,99</b>	<b>774,77±3,25</b>	<b>0,42</b>	<b>0,00138</b>
	1	747,94±4,17	0,55	-
	<b>1,01</b>	<b>775,10±2,05</b>	<b>0,26</b>	<b>0,00047</b>
Benzoilecgonina	0,99	149,21±1,28	0,86	0,06705
	1	147,42±0,62	0,42	-
	1,01	148,97±1,09	0,73	0,06613
Lidocaína	<b>0,99</b>	<b>51,94±0,28</b>	<b>0,55</b>	<b>0,04047</b>
	1	51,35±0,30	0,58	-
	<b>1,01</b>	<b>52,01±0,41</b>	<b>0,79</b>	<b>0,03364</b>
Cocaína	0,99	87,55±0,44	0,51	0,37204
	1	88,22±2,04	2,31	-
	1,01	87,69±0,24	0,27	0,57245
Ácido benzoico	<b>0,99</b>	<b>235,99±0,68</b>	<b>0,29</b>	<b>0,00661</b>
	1	233,19±1,08	0,46	-
	<b>1,01</b>	<b>235,89±0,68</b>	<b>0,28</b>	<b>0,04782</b>
Fenacetina	<b>0,99</b>	<b>279,64±1,35</b>	<b>0,48</b>	<b>0,00175</b>
	1	275,74±1,55	0,56	-
	<b>1,01</b>	<b>280,49±1,028</b>	<b>0,36</b>	<b>0,00178</b>
Benzocaína	0,99	1016,84±3,53	0,34	0,05546
	1	1014,71±2,50	0,24	-
	1,01	1037,62±47,83	4,61	0,36248
Diltiazem	0,99	143,98±0,67	0,46	0,93269
	1	144,03±0,79	0,55	-
	1,01	149,02±11,06	7,42	0,34060

\*Fluxo da fase móvel do método original

FONTE: o autor.

### 4.3 ESTABILIDADE

A estabilidade das soluções estoque e de trabalho foi avaliada para verificar o comportamento dos analitos mediante as condições normais de trabalho. A Tabela 14 apresenta os erros relativos entre as áreas dos picos cromatográficos adquiridas com soluções armazenadas em diferentes condições e aquelas obtidas com soluções preparadas a fresco. Conforme demonstrado, os erros observados encontram-se dentro da própria variação de precisão e exatidão do método (<5%). Em outras palavras, mediante as condições normais de trabalho não houve ocorrência de degradação significativa para todos os compostos. Portanto, uma excelente estabilidade foi observada.

TABELA 14 – PERCENTAGEM DE ERRO RELATIVO ENTRE AS ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS ADQUIRIDOS COM SOLUÇÕES ARMAZENADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES E AQUELAS PREPARADAS A FRESCO

Analito	Condições de armazenamento			
	6 horas na bancada	24 horas no gerenciador de amostras	7 dias no refrigerador (4 °C)	30 dias no refrigerador (4 °C)
	<i>Erro relativo (%)</i>	<i>Erro relativo (%)</i>	<i>Erro relativo (%)</i>	<i>Erro relativo (%)</i>
Cafeína	-1,24	-2,62	-1,50	-4,35
Benzoilecgonina	-0,02	-0,86	-2,14	-2,65
Lidocaína	-0,74	0,47	-0,38	-3,61
Cocaína	0,22	-0,86	-2,97	-3,83
Ácido Benzoico	-0,52	-1,93	-2,17	-1,71
Fenacetina	1,50	-0,75	3,02	1,95
Benzocaína	-3,01	-1,30	-3,64	-4,96
Diltiazem	-0,13	-0,30	-2,99	-2,69

FONTE: o autor.

#### 4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS APREENDIDAS DE COCAÍNA

O estado do Paraná está situado na região sul do Brasil e faz divisa com os estados de São Paulo, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, fronteira com a Argentina e Paraguai e limite com o Oceano Atlântico.

Apresenta-se dividido em 10 regiões geográficas: Metropolitana, Sudeste, Sudoeste, Centro Sul, Centro Oriental, Centro Ocidental, Oeste, Noroeste, Norte Central e Norte Pioneiro conforme Figura 21.

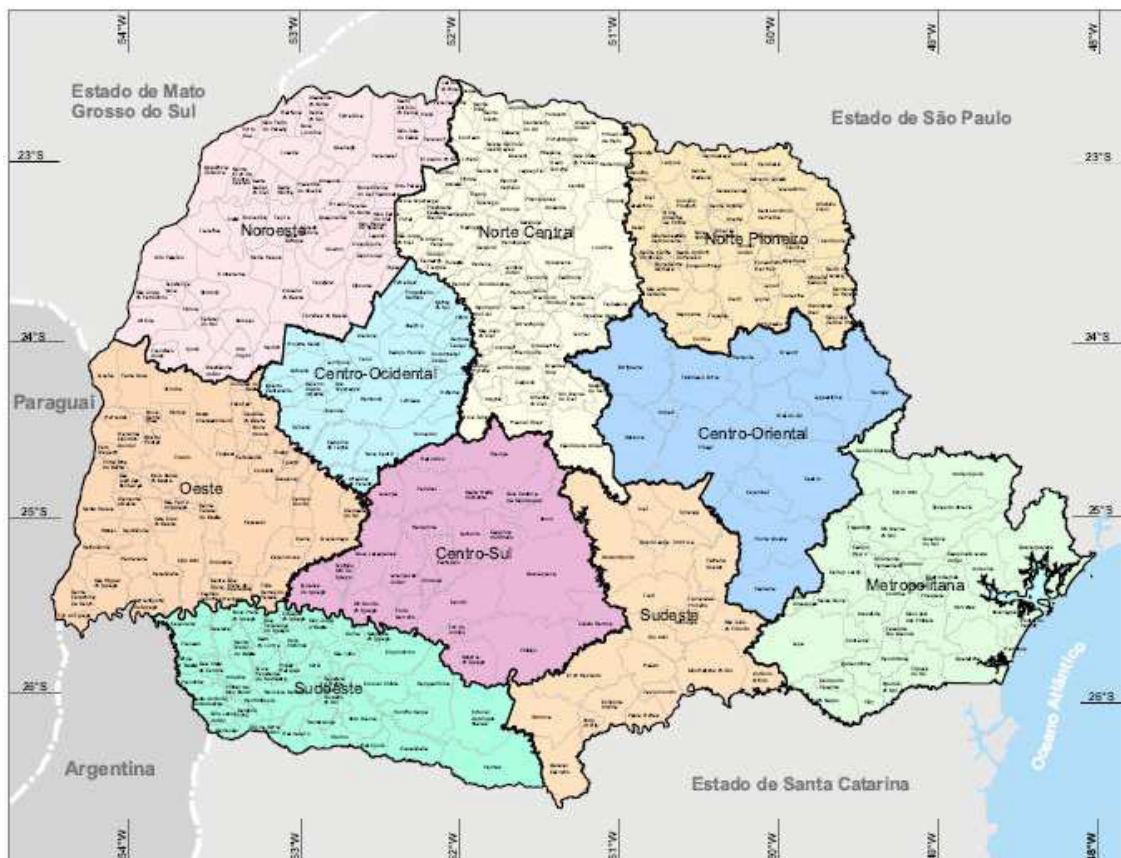


FIGURA 21: MAPA DO ESTADO DO PARANÁ INDICANDO OS LIMITES DAS REGIÕES GEOGRÁFICAS.

FONTE: [http://www.ipardes.gov.br/pdf/mapas/base\\_fisica/regioes\\_geograficas\\_parana.pdf](http://www.ipardes.gov.br/pdf/mapas/base_fisica/regioes_geograficas_parana.pdf)

Foram selecionadas aleatoriamente 115 amostras do volume total recebido para pesquisa de cocaína pelo Instituto de Criminalística do Paraná e apreendido pelo Departamento Estadual de Narcóticos entre os anos de 2007 e 2012. São amostras provenientes tanto de usuários quanto de grandes apreensões destinadas

ao mercado, sendo 85 amostras provenientes de apreensões na região Metropolitana, 2 amostras da região Sudeste, 4 da região Sudoeste, 3 da região Centro Oriental, 5 da Centro Ocidental, 4 da Centro Sul, 1 da região Oeste, 7 da região Noroeste e 4 da região Norte Central.

As amostras são compostas de cocaína sal e cocaína base, sendo 26 amostras (22,60%) na forma de cocaína sal e 89 (77,39%) na forma de cocaína base ou pasta base (não foram diferenciadas). As análises foram realizadas com o objetivo de identificar quais os principais adulterantes encontrados nas amostras de cocaína apreendidas no estado do Paraná.

A Figura 22 demonstra 71,43% das amostras apreendidas continham adulterantes.

A ausência de adulterantes em 29,56% das amostras não significa maior teor de cocaína, pois as amostras podem apresentar diluentes inorgânicos os quais não foram motivo de análise.

Cabe a ressalva de que a amostra com maior teor de cocaína (97,22%) apresentava-se na forma de sal, e não apresentou nenhum dos adulterantes avaliados.

### Percentagem de amostras com adulterantes

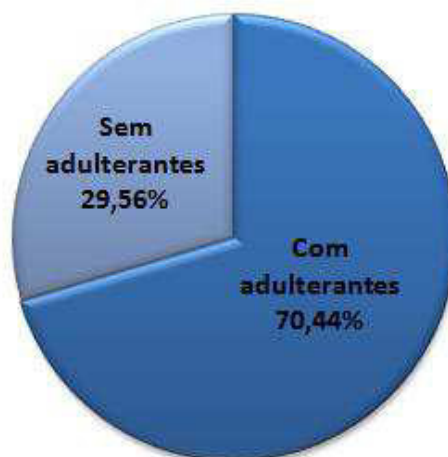


FIGURA 22: QUANTIDADE DE AMOSTRAS APREENDIDAS QUE CONTINHAM OU NÃO ADULTERANTES  
FONTE: o autor.



A cafeína foi o adulterante mais encontrado, estando presente em 37,39% das amostras. A distribuição dos demais adulterantes é apresentada na Figura 23. É importante ressaltar que das 115 amostras analisadas, 106 amostras (92,17%) vieram de apreensões de usuários, com massa menores que 5g. As demais amostras são oriundas de apreensões com massas superiores a 7kg.

A presença de benzoilecgonina em 68,69% das amostras indica a degradação devido ao tempo. Apesar da benzoilecgonina poder ser formada no processo de refino pela oxidação da cocaína, segundo CASALE & KLEIN (1993) o aparecimento desse produto em amostras purificadas é normalmente resultante de degradação.

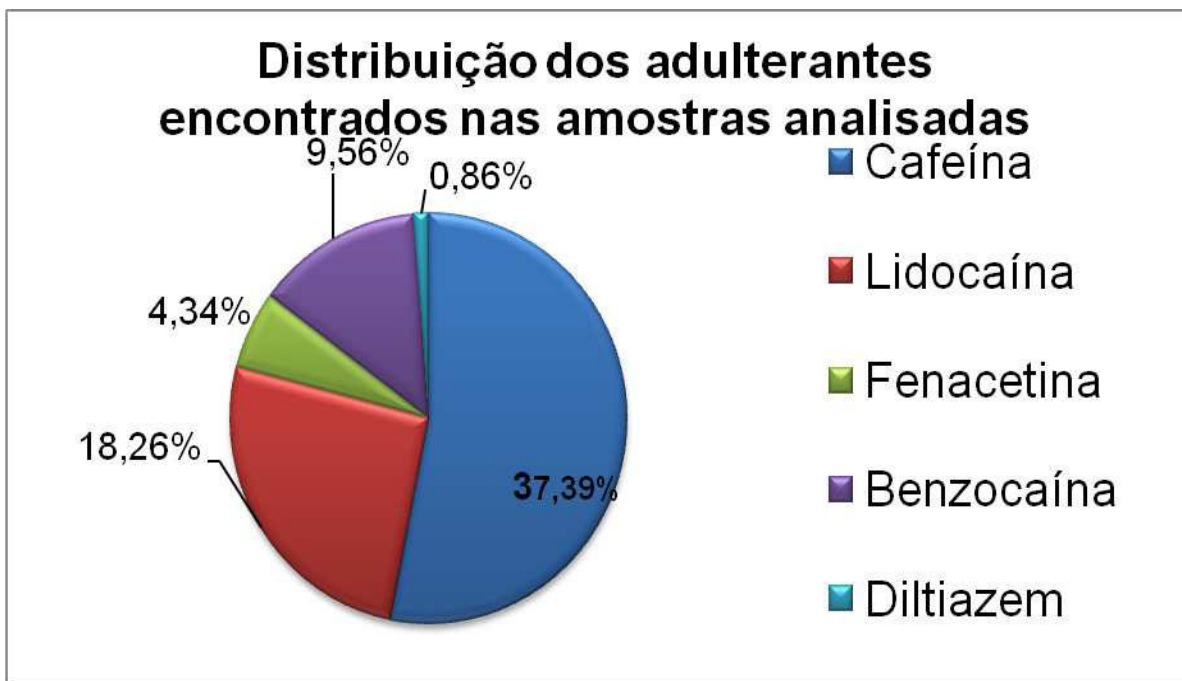


FIGURA 23: DISTRIBUIÇÃO DOS ADULTERANTES ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS EM ANÁLISE

FONTE: o autor.

Da mesma forma que os adulterantes, grandes variações no teor de cocaína também foram observadas. Além disso, das 115 amostras analisadas 13% não apresentaram cocaína.

O teor médio de cocaína encontrado nas amostras foi de 70,37%. Valores bem superiores aos encontrados por ALMEIDA (2003) que foram de 28,8%, porém compatíveis com os valores encontrados por BOTELHO (2011) que foram de 70,5%.

BARRIO (1997) e FUCCI (1998) constataram que na Europa amostras de cocaína provenientes de grandes apreensões apresentaram maiores teores do que amostras provenientes de usuários (*street drugs*). Porém, em nosso estudo onde apenas 7,82% das amostras são provenientes de grandes apreensões tais dados não procedem, pois 45,21% das amostras analisadas continham entre 80-97,22% de cocaína (Figura 24). Estes resultados vêm de encontro aos descritos por ALMEIDA (2003), a qual não encontrou relação entre altos teores de cocaína e grandes apreensões realizadas no Brasil.

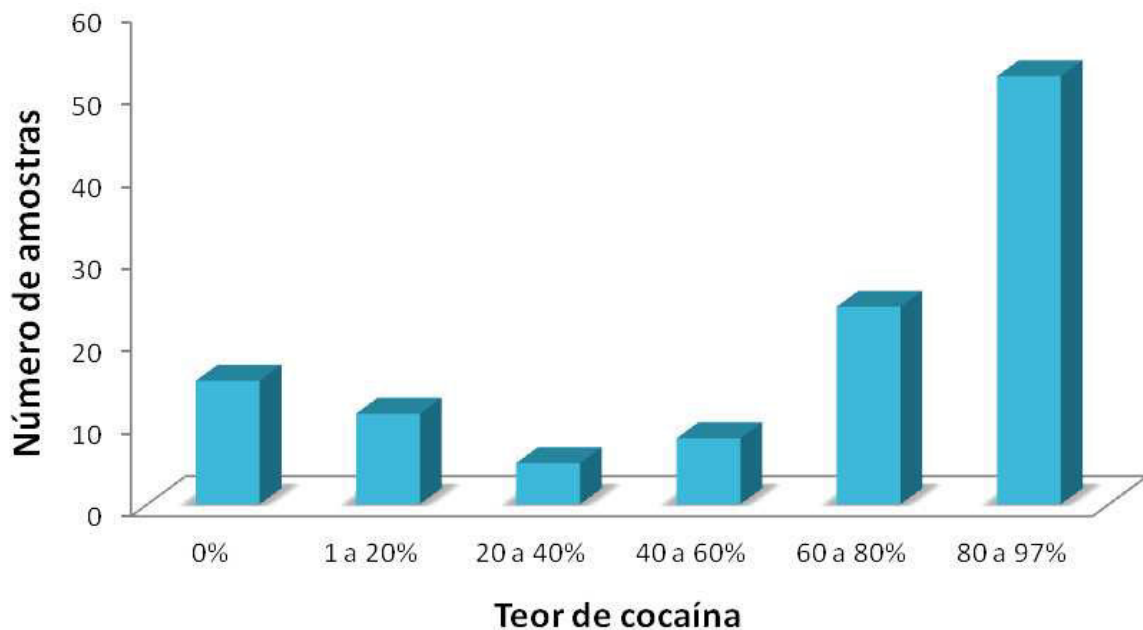


FIGURA 24: TEOR DE COCAÍNA ENCONTRADA NAS 115 AMOSTRAS DA DROGA APREENDIDA NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Apenas a região Norte Pioneiro, não estava representada entre as amostras analisadas. Comparando as regiões geográficas, a maior média de teor de cocaína foi encontrada nas amostras apreendidas na região Sudeste – 94,90 % e a menor média na região Oeste – 29,07 %. Com relação aos adulterantes há o predomínio da cafeína em todas as regiões analisadas, com exceção das regiões Centro Oriental e Oeste. Nas amostras provenientes da região Metropolitana todos os adulterantes

pesquisados (cafeína, lidocaína, fenacetina, benzocaína e diltiazem) foram encontrados.

Comparando-se por ano de apreensão, entre 2007 e 2011 os teores de cocaína encontrados ficaram entre 64,40% e 73,41%, com aumento para 86,01 % no ano de 2012. Observou-se, ainda, no ano de 2007, a presença de todos os adulterantes pesquisados, no ano de 2008 observou-se a presença de todos menos diltiazem. Em 2009 apenas a presença de cafeína e fenacetina, nos anos de 2010 e 2011 cafeína e lidocaína e as amostras apreendidas no ano de 2012 não apresentavam nenhum dos adulterantes analisados.

## 5. CONCLUSÃO

O método por CLAE-DAD desenvolvido nesse trabalho apresentou-se adequado para quantificação de cafeína, benzoilecgonina, lidocaína, cocaína, ácido benzoico, benzocaína, fenacetina e diltiazem em matrizes como pasta base, cocaína base e sal. O método apresentou excelente sensibilidade, seletividade, linearidade, precisão e exatidão. O ensaio de robustez demonstrou que a temperatura, o pH e o fluxo da fase móvel podem ser críticos na exatidão dos resultados, portanto não devem ser modificados sem prévia revalidação do método. Nas condições normais de trabalho, uma excelente estabilidade foi observada para todos os analitos.

O método foi aplicado com sucesso na análise de amostras reais de cocaína apreendidas no estado do Paraná entre 2007 e 2012, sem a necessidade de etapas de pré-tratamento das amostras. Sob todos os aspectos o novo método é apresentado como uma alternativa confiável para o fornecimento de subsídios na caracterização da droga, investigações sobre o tráfico e aplicação em análises forenses.

## REFERÊNCIAS

- AEHLE, E.; DRÄGER, B. Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: an update. **Journal of Chromatography B**, 878, 1391-1406, 2010.
- ALMEIDA, F. L. A. A. **Análise comparativa de amostras de cocaína apreendidas em diferentes estados brasileiros**. Brasília, 1993. Dissertação. Universidade de Brasília.
- ARUFE-MARTINEZ, M. I.; ROMERO-PALANCO, J. L. Identification of Cocaine in Cocaine-Lidocaine Mixtures ("Rock Cocaine") and Other Illicit Cocaine Preparations Using Derivative Absorption Spectroscopy. **Journal of Analytical toxicology**, Vol. 12, 192-196, 1988.
- BACCHI, E. S. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 5 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2004.
- BAHLS, F. C.; BAHLS, S. C. Cocaína: origem, passado e presente. **Interação em Psicologia**, 6(2), 177-181, 2002.
- BARRIO, G. *et al.* Purity of cocaine seized in Spain, 1985-1993: variations by weight, province and year of seizure. **Forensic Science International**, 85, 15-28, 1997.
- BERNARDO, N. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; PAIVA, M. J. N.; MAIA, P. P. Caffeine and others adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. **Journal of Drug Policy**, 14, 331-334, 2003.
- BOGUSZ, M. J. Liquid chromatography–mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. **Journal of Chromatography B**, 748, 3-19, 2000.
- BOTELHO, E. D. **Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)**. Brasília, 2011. Dissertação. Programa de Pós-Graduação – Instituto de Química, Universidade de Brasília.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 fev. de 2003.
- BREWER L. M., ALLEN A. C. N-Formyl cocaine: a study of cocaine comparison parameters; **Journal of Forensic Science**, 36, 697, 1991.
- BRUNT, T. M.; RIGTER, S.; HOEK, J.; VOGELS, N.; DIJK, P.; NIESINK, R. J. M. An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. **Addiction**, 104, 798-805, 2009.

BRUNTON, Laurence L. *et al.* GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ª Edição. Porto Alegre (RS): Mc Graw Hill/Artmed, 2010.

CALDAS NETO, O. B. **Cocaína**. Monografia de finalização do Curso Superior de Polícia, Departamento de Polícia Federal, Academia Nacional de Polícia, Brasília, 1998.

CARVALHO, V. M.; CHASIN, A. A. D.; CARVALHO, D. G. A study on the stability of anhydroecgonine methyl ester (crack biomarker), benzoylecgonine, and cocaine in human urine. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 35, 17-20, 2008.

CARVALHO, D.G.; MÍDIO, A.F. Quality of cocaine seized in 197 in the street-drug market of São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 39, 71-75, 2003.

CASALE, J. F.; KLEIN, R. F. X. Illicit production of cocaine. **Forensic Science Review** 5, 95-107, 1993.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. UFSCAR, São Carlos, 2001.

CHASIN, A. A. M.; LIMA, I. V. Detecção de cocaína, cocaetileno e bezoilecgonina em urina por técnicas cromatográficas (HPTLC, GC-FID e GC/MS). **Revista Brasileira de Toxicologia**, 11, 45-49, 1998.

CHRISTOPHERSEN, A. S.; MORLAND, J. Drug analysis for control purposes in forensic toxicology, workplace testing, sports medicine and related areas. **Acta Pharmacologica et Toxicologica ( Copenhagen)**, 74, 202-210, 1994.

CLARKE, E. G. C. **Clarke's isolation and identification of drugs**. 4ª Ed. London: The Pharmaceutical Press, 2011.

ELSHARBINI, S. H. Cocaine base identification and quantification, **Forensic Science Review**, 10, 1-12, 1998.

ENSING J. G., HUMMELEN J. C. Isolation, identification and origin of three previously unknown congeners in illicit cocaine, **Journal of Forensic Science**, 36, 1666, 1991.

FERREIRA, P.E.M.; MARTINI, R.K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 23(2), 96-99, 2001.

FUCCI, N.; GIOVANNI, N. D. Adulterants encountered in the illicit cocaine market. **Forensic Science International**, 95, 247-252, 1998.

GOLDSTEIN, R. A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A. M. Cocaine: history, social implications, and toxicity – a review. **Seminars in Diagnostic Pathology**, 26 (1), 10-17, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. L.; GILMAN A. **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2010.

HO, M. H. (Editor) **Analytical Methods in Forensic Chemistry**. Chichester – England: Ellis Horwood Limited, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Orientações sobre validação de Métodos e Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008**. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. mar. de 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Nov. de 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p.649-666, 1995.

JOHANSEN, S. S.; BHATIA, H. M. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 852, 338-344, 2007.

LEITE, M.C.; ANDRADE, A.C.; ET AL. **Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento**. Editora Artes Médicas Sul. Porto Alegre, 1999.

MAIETTI, S.; CASTAGNA, F.; MOLIN, L.; FERRARA, S. D.; TRALDI, P. Cocaine adulterants used as marker compounds. **Journal of Mass Spectrometry**, 44-47, 1124-1126, 2009.

MOORE, J. M.; CASALE, J. F. In-depth chromatographic analyses of illicit cocaine and its precursor, coca leaves. **Journal of Chromatography A**, 674, 165-205, 1994.

MORELLO, D. R.; MEYERS, R. P. Qualitative and Quantitative Determination of Residual Solvents in Illicit Cocaine HCl and Heroin HCl. **Journal of Forensic Sciences**, Vol. 40, 957-963, 1995.

MOSS, W. W.; POSEY, F. T.; PETERSON, P. C. A Multivariate Analysis of the Infrared Spectra of Drugs of Abuse. **Journal of Forensic Sciences**, Vol. 25, Nº 2, 304-313, 1980.

NISHIKAWA, M.; NAKAJIMA, K; TATSUNO, M.; KASUYA, F.; IGARASHI, K.; FUKUI, M.; TSUCHIHASHI, H. The analysis of cocaine and its metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC/APCI-MS). **Forensic Science Internacional**, Vol. 25, Nº 2, 304-313, 1994.

ODENEAL II N. G., CASALE J. F., WOJNO H. L. Hydroxyzine: An analytical profile. **Microgram Journal**, 2, 17-22, 2004.

PAN, W.; HEDAYA, M. A. Sensitive and specific high-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for the determination of cocaine and its metabolites in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, 703, 129-138, 1997.

PARANÁ – Secretaria de Estado da Justiça e Cidadania – Secretaria de Estado da Segurança Pública. 181 Narcodenúncia. Disponível em: [http://www3.pr.gov.br/narcodenuncia/relatorios/rel\\_apr\\_ano.php](http://www3.pr.gov.br/narcodenuncia/relatorios/rel_apr_ano.php). Acessado em 21 de setembro de 2012.

PARANÁ – Secretaria de Estado da Justiça e Cidadania – Secretaria de Estado da Segurança Pública. 181 Narcodenúncia. Disponível em: [http://www3.pr.gov.br/narcodenuncia/relatorios/rel\\_atendmunic.php?opt=1](http://www3.pr.gov.br/narcodenuncia/relatorios/rel_atendmunic.php?opt=1). Acessado em 21 de setembro de 2012.

PETERS D. E. Diltiazem HCl: An analytical profile. **Microgram Journal**, 2, 11-6, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAVREBY, M. Quantitative Determination of Cocaine and Heroin by Fourier Transform Infrared Spectrophotometry. **Journal of Forensic Sciences**, Vol. 32, Nº 1, 20-37, 1987.

SNYDER, L. R. Changing reversed-phase high performance liquid chromatography selectivity wich variables should be tried first?. **Journal of Chromatography B**, 689, 105-115, 1997.

TONHI, E; BACHMANN, S.; ALBERT, K.; JARDIM, I. C. S. F.; COLINS, K. E.; COLLINS, C. H. High performance liquid chromatography stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica. I. Physical and chemical characterization. **Journal of Chromatography A**, 948, 97-107, 2002.



UNITED NATIONS. Division of Narcotics Drugs. **Recommended Methods for Testing Cocaine: Manual for Use by National Narcotics Laboratories**. New York, 1986.

UNITED NATIONS. Office on drugs and crime. **Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine**. New York, 2005.

UNITED NATIONS. Office on drugs and crime. **Terminology and Information on Drugs**. New York, 2003.

UNODC. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **A Century of International Drug Control**. 2008.

UNODC. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Coca Cultivation in the Andean Region: A Survey of Bolivia, Colombia and Peru**. 2008.

UNODC. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report**. 2011.

VALENTINO A. M. M., FUENTECILLA K. Levamisole: An analytical profile. **Microgram Journal**, 3, 134-7, 2005.

VARGAS, R. M.; TALHAVINI, M. **Cocaína**. Relatório de atividades do projeto FAPDF nº 193.000.360/99, Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal, Brasília, 2000.