

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“USO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR SEM
SOLVENTE DEUTERADO (*No-D NMR*) PARA ANÁLISE DE
COCAÍNA E SEUS ADULTERANTES”**

Lucas de Almeida Gama

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2014**

Lucas de Almeida Gama

**“USO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR SEM SOLVENTE
DEUTERADO (*No-D NMR*) PARA ANÁLISE DE COCAÍNA E SEUS
ADULTERANTES”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Cunha Neto

**VITÓRIA
2014**

“USO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR SEM SOLVENTE DEUTERADO (*No-D NMR*) PARA ANÁLISE DE COCAÍNA E SEUS ADULTERANTES”

Lucas de Almeida Gama

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovado em 27/08/2014 por:

Prof. Dr. Alvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Wanderson Romão
Instituto Federal do Espírito Santo

Dr. Jorge Jardim Zacca
Instituto Nacional de Criminalística

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Agosto de 2014

“Não deixe o barulho da opinião dos outros abafar sua voz interior. E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o mais é secundário.”

STEVEN PAUL JOBS

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ELE nada teria sido possível.

Aos meus pais, Euda e Luiz, e meu irmão e minha irmã, Leonardo e Diana, pelo apoio incondicional e por confiarem em mim.

À minha vó, Edith, por sempre querer o melhor para mim e por rezar todos os dias para que eu consiga um emprego.

À Ana Cristina Tenes Cozer, por ser a mulher incrível que é e por me amar tanto e não deixar que eu desanimasse e aos meus primos Raphael, Amanda, Junior, Sabrina, Brandon, Isabela, Karolina, Bruno, Nego, Wagner, Drica e todos os demais e ainda à Flávia por sempre me fazerem feliz.

Aos meus tios, que sempre me deram o que podiam para que eu fosse o homem e ser humano que sou.

Aos meus amigos **Vitor Gilles, Lindamara, Gabriela, Heloisa, Helber, Letícia e Lilian** pelas análises **retroconversativas** realizadas e pelas ajudas em todo o mestrado.

Aos meus amigos, **Thales Altoé, Rafael Mantovanelli, Felipe Dal Bem, Armando Cozer, Thiago Freitas e Isaac** por sempre estarem ali para ouvirem minhas bobagens.

Ao Prof. Dr. Alvaro, por ter confiado a mim essa dissertação e por ter se apresentado um excelente orientador.

À Emanuele, Christiane e Ludmila, por sempre me ajudarem no Laboratório de RMN de Alto Campo.

À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo e seus colaboradores por toda ajuda técnica fornecida durante este trabalho mediante a convênio UFES-Polícia Civil (ES).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Espírito Santo – FAPES pelas bolsas concedidas.

À banca de examinadora (Prof. Dr. Wanderson Romão e Dr. Jorge Jardim Zacca) pelo aceite em participar da avaliação desta dissertação.

Por fim, ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo por ter me dado a oportunidade e a ajuda necessária para concluir este mestrado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flor e folhagem do arbusto do gênero <i>Erythroxylum</i>	19
Figura 2. Estrutura molecular dos principais alcaloides das folhas de coca.....	20
Figura 3. Exemplos de rotas de extração das formas de cocaína comercializada.....	21
Figura 4. Núcleos de $I=1/2$ submetidos a campo externo, B_0	27
Figura 5. Vetor de magnetização resultante, M_0	28
Figura 6. Espectro de hidrogênios para o padrão de cocaína, (a) dissolvida em metanol deuterado e (b) dissolvida em metanol comercial com expansão dos sinais dos hidrogênios aromáticos.	47
Figura 7. Expansão da região de aromáticos dos espectros de <i>No-D</i> NMR- ^1H para cocaína (1), cafeína (2), fenacetina (3) e lidocaína (4).....	47
Figura 8. Sequência de pulso de ^1H	49
Figura 9. Sequência de pulso INVREC.	51
Figura 10. Rotação da magnetização resultante, M_0 , sob a influência de INVREC. .	51
Figura 11. Varredura de tempos δ pela sequência INVREC.....	51
Figura 12. Expansão da região de hidrogênios aromáticos e seus deslocamentos químicos em evidência.	52
Figura 13. Resultado do array para pw.	53
Figura 14. Retorno de M_0 em relação ao tempo de repetição.....	55
Figura 15. Sequência de pulso PRESAT e o efeito da pré-saturação em um espectro distorcido pela grande quantidade de solvente.	57
Figura 16. Efeito da pré-saturação em um espectro com distorção.	58
Figura 17. Efeito do I_b sobre espectro com pouca massa.....	59
Figura 18. Distorção na região de hidrogênios aromáticos gerada por <i>zero filling</i>	61
Figura 19. Espectro com destaque ao problema de fase no sinal do metanol.	61
Figura 20. Importância da correção da linha de base para integração.....	62
Figura 21. Ampliação da região dos aromáticos de espectros de apreensão de cocaína solubilizada em (a) em metanol comercial e em (b) metanol deuterado.	63
Figura 22. Expansão da região de ^1H aromáticos de apreensões de cocaína.	64
Figura 23. Espectro de <i>No-D</i> NMR- ^1H do ácido maléico.....	66
Figura 24. Espectro da Mistura 1. (a-cocaína, b-lidocaína, c-cafeína, d-fenacetina, *-impurezas metanol, **-metanol, ***- H_2O)	67

Figura 25. Espectro da Mistura 2: Mistura 1 + paracetamol (f-paracetamol).....	68
Figura 26. Espectro da Mistura 3: Mistura 2 + ibuprofeno (g-ibuprofeno)	68
Figura 27. Espectro da Mistura 4: Mistura 3 + benzocaína (h-benzocaína)	69
Figura 28. Integrais dos sinais utilizados para o estudo de linearidade	72
Figura 29. Curva analítica da cocaína.....	73
Figura 30. Curva analítica da cafeína.....	73
Figura 31. Curva analítica da lidocaína.	73
Figura 32. Curva analítica da fenacetina.	74
Figura 33. Ampliação da região de ^1H aromáticos para a apreensão 20.....	78
Figura 34. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões de 1-9.....	88
Figura 35. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões de 10-18.....	89
Figura 36. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões de 19-27.....	90
Figura 37. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões 28 e 29.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Faixa de concentração de cocaína nas variedades de folha de coca.....	20
Tabela 2. Adulterantes e diluentes encontrados na cocaína comercializada.....	23
Tabela 3. Valores de T_1 para metanol comercial e deuterado para os hidrogênios aromáticos.....	52
Tabela 4. Valores de T_1 e o retorno da magnetização dos sinais de hidrogênios aromáticos para cada Tr realizado, sendo utilizado $7 \times T_1$ para <i>No-D NMR</i>	55
Tabela 5. Preparo das soluções para a avaliação da linearidade.....	71
Tabela 6. Retorno da magnetização dos sinais de hidrogênios aromáticos.	71
Tabela 7. Estudo de Limite de Detecção e de Quantificação através das curvas analíticas.	74
Tabela 8. Estudo de exatidão para cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina em nível alto de concentração (obs. Concentração em 550 μ L de metanol comercial).	75
Tabela 9. Estudo de exatidão para cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina em nível médio de concentração (obs. Concentração em 550 μ L de metanol comercial).	76
Tabela 10. Estudo de exatidão para cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina em nível baixo de concentração (obs. Concentração em 550 μ L de metanol comercial).	76
Tabela 11. Porcentagem, em massa, de cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina nas apreensões.....	78
Tabela 12. Valores da razão entre d1 e Aq utilizados para a avaliação do Tr.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aq – Tempo de aquisição

ARTSI – Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection

GC/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada com a Espectrometria de Massas

GC/FID - Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama

CPP – Código Processual Penal

D1, *delay* – tempo de espera

DEA – *Drug Enforcement Administration*

DSS – sal de sódio do ácido sulfônico 3-trimetil-silil-1-propano

ERETIC – Electronic Reference Method

et.al. – “e colaboradores”

EUA – Estados Unidos da América

FID – Free Induction Decay

INVREC – Sequência de pulso Inversão-Recuperação

IV – Espectroscopia de Infravermelho

lb – line broadening

LD – Limite de detecção

lock – sinal de trava para o deutério

LQ – Limite de quantificação

LSD – Dietilamida do ácido lisérgico

No-D NMR – Ressonância Magnética Nuclear Sem Solvente Deuterado

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

PeQui – Perfil Químico de Drogas

PF – Polícia Federal

PIG – Pulse Into Gradient

PRESAT – Sequência de pulso de Pré-Saturação

qNMR – RMN quantitativo

QUANTAS – Quantification by Artificial Signal

RES – Resolução Digital

RF – Radiofrequência

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

S/N – relação sinal ruído

SISNAD – Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas

SNC – Sistema Nervoso Central

Sol. – Solução

TD – Pontos no domínio do tempo

TMS – tetra metil silano

TSP – fosfato trissódico

Var. – Variedade

LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentagem

Σ - somatório

μ - momento magnético

μL – microlitros

μs – microssegundos

^{13}C – isótopo de carbono

^{19}F – isótopo de flúor

^1H – isótopo de hidrogênio

^2H – isótopo de hidrogênio (deutério)

A_x – área de um sinal de RMN

B_0 – campo magnético externo

B_1 – campo magnético originada de pulso de radiofrequência

e – número de Euler (2,718...)

estado α – estado de menor energia, após aplicação do campo externo B_0 na RMN

estado β – estado de maior energia, após aplicação do campo externo B_0 na RMN

g/mol – massa molar (gramas/quantidade de matéria ou gramas/moles)

h – constante de Planck

Hz – Hertz

l – número quântico de spin

k – constante de Boltzmann

m/m – massa/massa

M_0 – magnetização resultante inicial

mg – miligrama

$\text{mg}/\mu\text{L}$ – concentração em miligrama por microlitro

MHz – mega Hertz

M_x – massa molar de uma substância

m_x – massa, em peso, de uma substância

M_z – magnetização resultante que retornou ao eixo Z

N_x – número de núcleos que um sinal corresponde

n_x – quantidade de matéria de uma substância (número de moles)

n_α – população de spins no estado α

n_β – população de spins no estado β

$^{\circ}\text{C}$ – temperatura em Celsius

ppm – deslocamento químico em RMN

pw – pulso de excitação

P_x – pureza de uma substância

R^2 - regressão de mínimos quadrados

S – desvio padrão

s – segundo

T – grandeza de Tesla

T – temperatura em Kelvin

T_1 – tempo de relaxação longitudinal

T_r – tempo de repetição para uma nova sequência de pulso

y – constante de razão magnetogírica

α – coeficiente angular da reta.

ΔE – Diferença de energia entre os estados α e β

π – constante pi (3,141...)

RESUMO

As análises de drogas de abuso são realizadas principalmente por técnicas analíticas como a cromatografia gasosa, podendo estar acoplada com a espectrometria de massas (GC/MS) ou com detector por ionização de chama (GC/FID) e também técnicas de infravermelho (IV). Outras técnicas que antes eram inviáveis, tanto pelo alto custo dos equipamentos quanto pela baixa sensibilidade, agora estão se tornando técnicas viáveis para análises destas drogas. Um exemplo disso é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que devido à necessidade de uma quantidade maior de amostra e ao alto custo de solventes deuterados, empregados na dissolução da amostra, tornavam a RMN uma técnica com alto custo agregado.

Neste trabalho, foram realizados estudos de RMN sem a utilização de solvente deuterado na diluição das amostras de cocaína apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, denominada *No-D NMR*. A aplicação desta técnica diminuiu o custo das análises uma vez que não são utilizados compostos deuterados como solvente. Como se tratava de uma nova metodologia de análise, otimizaram-se parâmetros de aquisição e de processamento característicos da RMN. A qualidade espectral obtida permitiu a distinção dos sinais característicos da cocaína e seus principais adulterantes: cafeína, fenacetina e lidocaína.

Uma segunda etapa deste trabalho foi a aplicação de figuras de mérito para validar a *No-D NMR* como uma nova metodologia de quantificar a cocaína e seus principais adulterantes. Foram realizados estudos de especificidade/seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e exatidão/precisão que mostraram que a metodologia proposta é adequada para quantificar as substâncias em apreensões de cocaína. Após a obtenção das “figuras de mérito”, quantificaram-se 29 apreensões que possuíam uma baixa quantidade de cocaína (cerca de 24% m/m) o que demonstrou que ocorre uma adulteração significativa das amostras comercializadas no Espírito Santo.

Palavras-chave: *No-D NMR*. COCAÍNA. IDENTIFICAÇÃO. QUANTIFICAÇÃO.

ABSTRACT

Analysis of illicit drugs are mainly performing by analytical techniques such as gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC/MS) or with flame ionization detector (GC/FID) and Infrared Spectroscopy (IR). Other non-conventional techniques for drugs analysis, because of the spectrometer cost and low sensitivity, are now becoming viable for analysis of these samples. An example is Nuclear Magnetic Resonance (NMR), due to the larger amount of sample and the high cost of deuterated solvents employed in solution samples became NMR technique with a high added value.

In this work, NMR studies were performing without the use of deuterated solvent in the dilution of samples of cocaine seized by the State Civil Police of Espirito Santo, called No-D NMR. The application of this technique reduces the cost of analysis since deuterated compounds are not using as the solvent. As this was a new method of analysis was optimized acquisition parameters and processing characteristic of NMR. The spectral quality obtained allowed separation of the characteristic signs of cocaine and its major adulterants: caffeine, phenacetin and lidocaine.

A second step of this work was the application of figures of merit to validate the No-D NMR as a new methodology to quantify cocaine and its main adulterants. Studies of specificity/selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and accuracy/precision were performing and showed that the proposed methodology is adequate to quantify cocaine and its adulterants in seizures. After obtaining the "figures of merit", was quantified 29 seizures that had a low amount of cocaine (about 24% w/w) which demonstrated that occurs much adulteration of samples sold in the Espirito Santo.

Keywords: *No-D NMR*. COCAINE. IDENTIFICATION. QUANTIFICATION.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. COCAÍNA	19
1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	25
1.2.1. ESPECTROSCOPIA DE RMN SEM SOLVENTE DEUTERADO (<i>NO-D NMR</i>)	29
1.2.2. ESPECTROSCOPIA DE RMN QUANTITATIVO (<i>QNMR</i>)	31
2. OBJETIVOS	38
2.1. OBJETIVO GERAL	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	39
A) MATERIAIS	39
B) INSTRUMENTAÇÃO	39
3.1. OTIMIZAÇÃO DE <i>NO-D NMR</i> PARA IDENTIFICAR A COCAÍNA E SEUS ADULTERANTES	39
3.1.1. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS	39
3.1.2. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA A TÉCNICA DE <i>NO-D NMR</i> ..	40
3.1.3. UTILIZAÇÃO DA <i>NO-D NMR</i> , OTIMIZADA, PARA ANALISAR APREENSÕES DE COCAÍNA	43
3.2. VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE <i>NO-D NMR</i> PARA QUANTIFICAR COCAÍNA, CAFEÍNA, FENACETINA E LIDOCAÍNA	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. OTIMIZAÇÃO DE <i>NO-D NMR</i> PARA IDENTIFICAR A COCAÍNA E SEUS ADULTERANTES	46
4.2. VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE <i>NO-D NMR</i> PARA QUANTIFICAR COCAÍNA, CAFEÍNA, LIDOCAÍNA E FENACETINA	65
5. CONCLUSÃO	80
PROPOSTAS FUTURAS	80

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXO 1.....	85
ANEXO 2.....	87

1. INTRODUÇÃO

A Criminalística é disciplina que com metodologias próprias, estuda, pesquisa e analisa os cenários criminais para obter indícios materiais extrínsecos (fora da pessoa) relativos ao crime ou à identidade do infrator.

Com o passar dos anos, os avanços tecnológicos e a mentalidade do infrator foram se aperfeiçoando de modo que outras áreas de estudo como a química e as engenharias se desenvolveram com o intuito de ajudar na investigação dos crimes; assim ramos específicos como a Química Forense foram criados e englobados pela Criminalística para estudar os vestígios de projéteis e de substâncias de abuso, principalmente.^{1,2}

Substâncias de abuso é a denominação utilizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para as substâncias psicoativas, que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC), utilizadas de forma nociva e/ou perigosa como os medicamentos (drogas farmacêuticas), álcool e drogas ilícitas. Drogas são compostos naturais ou sintéticos que interferem no funcionamento normal do organismo, sendo denominadas drogas ilícitas quando as mesmas possuem restrições de uso e comercialização por força de lei.¹⁻³

O uso de drogas psicoativas é relatado através dos séculos desde a Antiguidade tendo se diversificado ao longo dos tempos. Os relatos mais antigos remetem ao uso recreativo e religioso e com o passar dos tempos foram utilizadas como medicação e bebidas, chegando ao presente onde possuem utilização abusiva.

Drogas lícitas como álcool e tabaco e as ilícitas como maconha, heroína, anfetaminas, *ecstasy* e cocaína são significativamente correlacionadas com acidentes de veículos automotores, overdoses, homicídios e suicídios. Elas estão inseridas no contexto social não apenas pela necessidade de investimentos com tratamentos, mas por afetar o convívio familiar e social, além de movimentar um mercado ilícito de bilhões, em dinheiro, por todo o mundo.

Percebe-se a influência das drogas na sociedade devido a quantidade de prisões ou delitos associados ao consumo dessas substâncias de abuso. Seus usuários estão mais suscetíveis à prática de delitos seja para arrecadar fundos para

a manutenção do consumo/vício, seja por estarem em estado de desequilíbrio gerado pela perturbação do SNC.⁴⁻⁶

As autoridades necessitam identificar substâncias ilícitas para que possam ocorrer as punições cabíveis. Diversos países têm tomado atitudes de prevenção às drogas como principal meio de combate ao crescimento do consumo ilegal. O Brasil não se mostra indiferente, possuindo uma política organizada para a prevenção de drogas como, por exemplo, a Portaria da Secretária de Vigilância Sanitária (Ministério da Saúde) nº 344 de 12 de maio de 1998, na qual foram inseridas listas de insumos proibidos ou de severo regime de fiscalização. Possui também a Lei 11.343 de 23 de agosto de 2006 a qual instituiu o Sisnad – Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas que visa não somente a reinserção dos usuários na sociedade, mas também orienta sobre uma política de prevenção aos crimes relacionados às drogas e também a prevenção contra novos usuários.²⁻⁴

O Sisnad permitiu o combate as drogas, prevenindo o uso indevido, dando atenção e reinserção social aos usuários e dependentes além, de estabelecer normas contra a produção ilegal e o tráfico, definindo estes dois atos como crime.

De acordo com BRASIL (2012)⁷, [...] As drogas, verdadeiro martírio para os que delas são dependentes, arruinaram o presente e comprometem o futuro de um povo, pela sedução ardilosa com que viciam e matam.

A questão interessa especialmente a países como o Brasil, que possui parcela substancial da população na faixa dos 15 aos 24 anos, sendo que muitos desses jovens estão entregues à dependência desses produtos.

Outrora a regra era a repressão. Sem que procedesse à necessária distinção entre fornecedores e usuários, traficantes e dependentes, todos eram inseridos na vala comum da transgressão e do crime. Hoje, o Sisnad estabelece a diferença entre criminosos e vítimas, entre os que merecem a força da lei e da Justiça e os que têm direito ao tratamento médico, ao apoio psicológico e à assistência social – meios para se recuperar, se reabilitar e se reinserir na sociedade.

Não basta, porém, que exista a lei: impõe-se dá-la ao conhecimento da sociedade, fazê-la chegar às mãos das pessoas, para que seja efetivamente aplicada e rigorosamente cumprida [...].

A lei também delimita que fica proibido no território nacional: o plantio, a cultura, a colheita e a exploração de vegetais e substratos dos quais podem-se extrair drogas, excluindo o uso estritamente ritualístico-religioso. Para efeito desta lei, define-se

drogas como as substâncias ou os produtos capazes de causar dependência, assim especificados em lei ou relacionados em listas atualizadas periodicamente pelo Poder Executivo da União.⁷

O artigo 50 da lei, citada anteriormente, determina que, ocorrendo prisão em flagrante, a autoridade policial deve comunicar o juiz competente por intermédio de laudo sendo que neste deve conter a constatação da natureza e quantidade da droga, firmado por perito. É assim realizado para que se evite excesso de autoridade ou apreensões de drogas lícitas,

Os testes realizados nos exames preliminares são qualitativos necessitando assim de testes definitivos que há anos vem sendo desenvolvidos pela *Drug Enforcement Administration* (DEA) e a Organização das Nações Unidas (ONU) para padronizar os exames químicos relacionados às drogas. Trabalho conjunto que já reúne categorias de análises para a identificação segura das substâncias, sendo as técnicas de Infravermelho, Espectroscopia de Massas, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Raman e as diversas técnicas de Cromatografia as mais indicadas.

No Brasil, o Código Processual Penal (CPP), a partir do artigo 158, determina que quando uma infração deixar vestígios será indispensável o exame dos mesmos (direto ou indireto), sendo que a confissão do infrator não pode suprir os exames e, segundo o artigo 564, a não realização dos exames será punida com a nulidade do caso, mostrando assim a importância que o Estado dá aos exames periciais.^{1,2}

Existem diferentes regulamentações em relação às drogas por todo mundo, as quais podem acarretar penas brandas e severas por portar quantidades pequenas, porém as penalidades normalmente seguem o potencial de periculosidade que as drogas têm sobre o indivíduo e a sociedade. Alguns países categorizam as substâncias de abuso em diversas classes de periculosidade.

Uma classificação que não leva em consideração a periculosidade, mas sim o efeito no organismo é a farmacológica que classifica as drogas como:

a) Depressoras: drogas que têm propriedades sedativas/hipnóticas e/ou anestésicas podendo levar ao coma ou a morte, com dosagem alta. Ex.: Etanol e barbitúricos;

b) Estimulantes: induzem a euforia, uma sensação de bem-estar aumentando a atividade mental e em alguns casos causa anorexia. Ex.: Anfetaminas, cocaína e cafeína;

c) Analgésicas: aliviam a dor. Ex: Narcóticos;

d) Alucinógenas: criam as alucinações. Ex.: Maconha e LSD;

e) Cardiovasculares, Gastrointestinais e Quimioterápicos, sendo que estas são pouco utilizadas em abuso.³

1.1. COCAÍNA

A cocaína é um psicoativo estimulante do SNC extraído das folhas de arbusto do gênero *Erythroxylum*, mais conhecidas como folhas de coca, FIGURA 1. Dentre as 23 espécies de plantas que possuem o alcaloide cocaína, quatro espécies correspondem a 97% da produção mundial de folhas de coca. Estas quatro espécies estão na TABELA 1 juntamente com a faixa do teor do alcaloide cocaína encontrado em suas folhas.^{8,9}

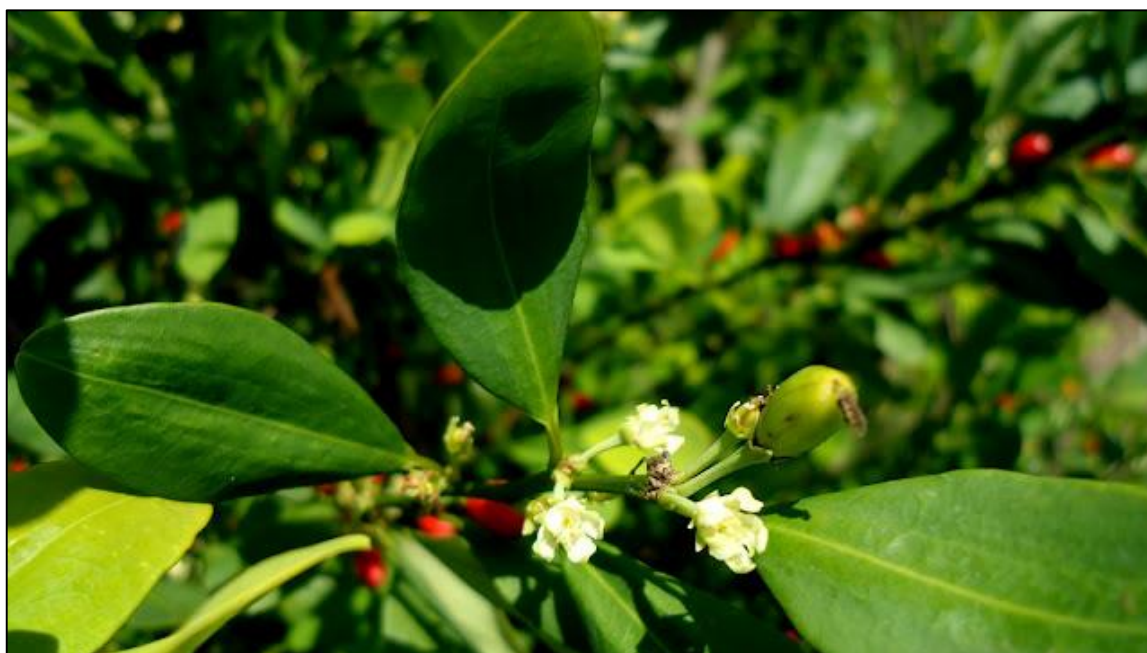
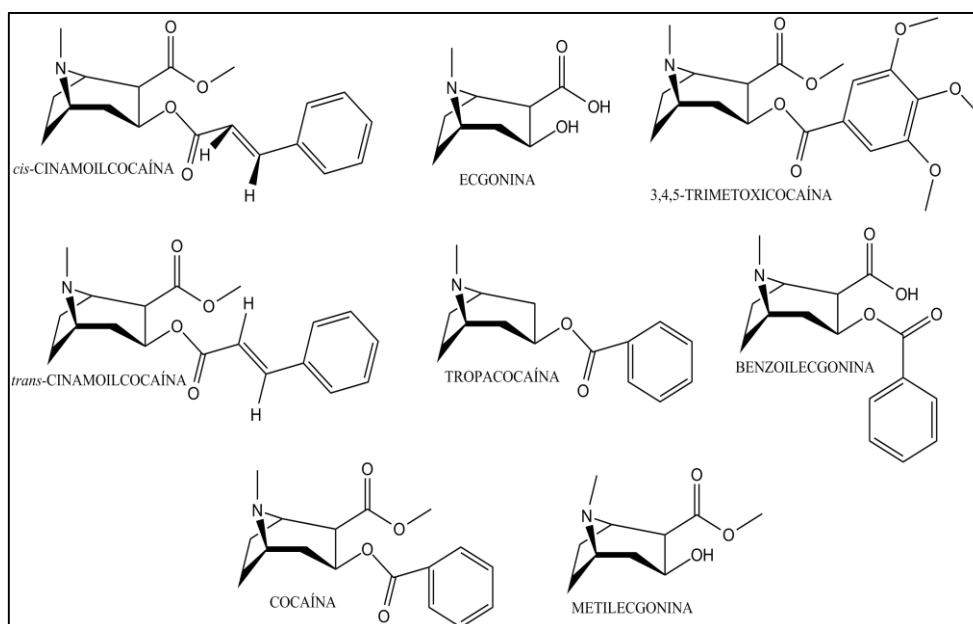


Figura 1. Flor e folhagem do arbusto do gênero *Erythroxylum*.

Tabela 1. Faixa de concentração de cocaína nas variedades de folha de coca.⁸

Espécie/Variedade	Teor de cocaína (mg/100mg de folha seca)
<i>Erythroxylum coca</i> var. <i>coca</i>	0,23-0,96
<i>Erythroxylum coca</i> var. <i>ipadu</i>	0,11-0,41
<i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>novogranatense</i>	0,55-0,93
<i>Erythroxylum novogranatense</i> var. <i>truxilense</i>	0,42-1,02

Alcaloides são substâncias produzidas através de biossíntese (de plantas, fungos, bactérias e animais) advinda de aminoácidos. Apresentam caráter básico e em sua fórmula estrutural possuem apenas nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono além, de um anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio. A FIGURA 2 apresenta os principais alcaloides presentes nas folhas de coca, os quais possuem um mesmo biciclo (8-metil-8-azobiciclo[3,2,1]octano) e seus teores podem auxiliar na tentativa de correlacionar o país de origem das apreensões.⁸

**Figura 2.** Estrutura molecular dos principais alcaloides das folhas de coca.³

Quando se menciona refino deve-se subentender a combinação de extração e purificação para obtenção do alcaloide e as transformações deste nas diferentes formas a serem comercializadas. Os reagentes utilizados nas etapas de refino da FIGURA 3 mudam de acordo com os diferentes locais de refino, pois os laboratórios clandestinos muitas vezes não possuem acesso a alguns reagentes, necessitando assim alterações na cadeia produtiva. O mercado ilícito vislumbra a utilização de

reagentes baratos, de fácil acesso, substituíveis e de grande eficiência.⁸⁻¹⁰

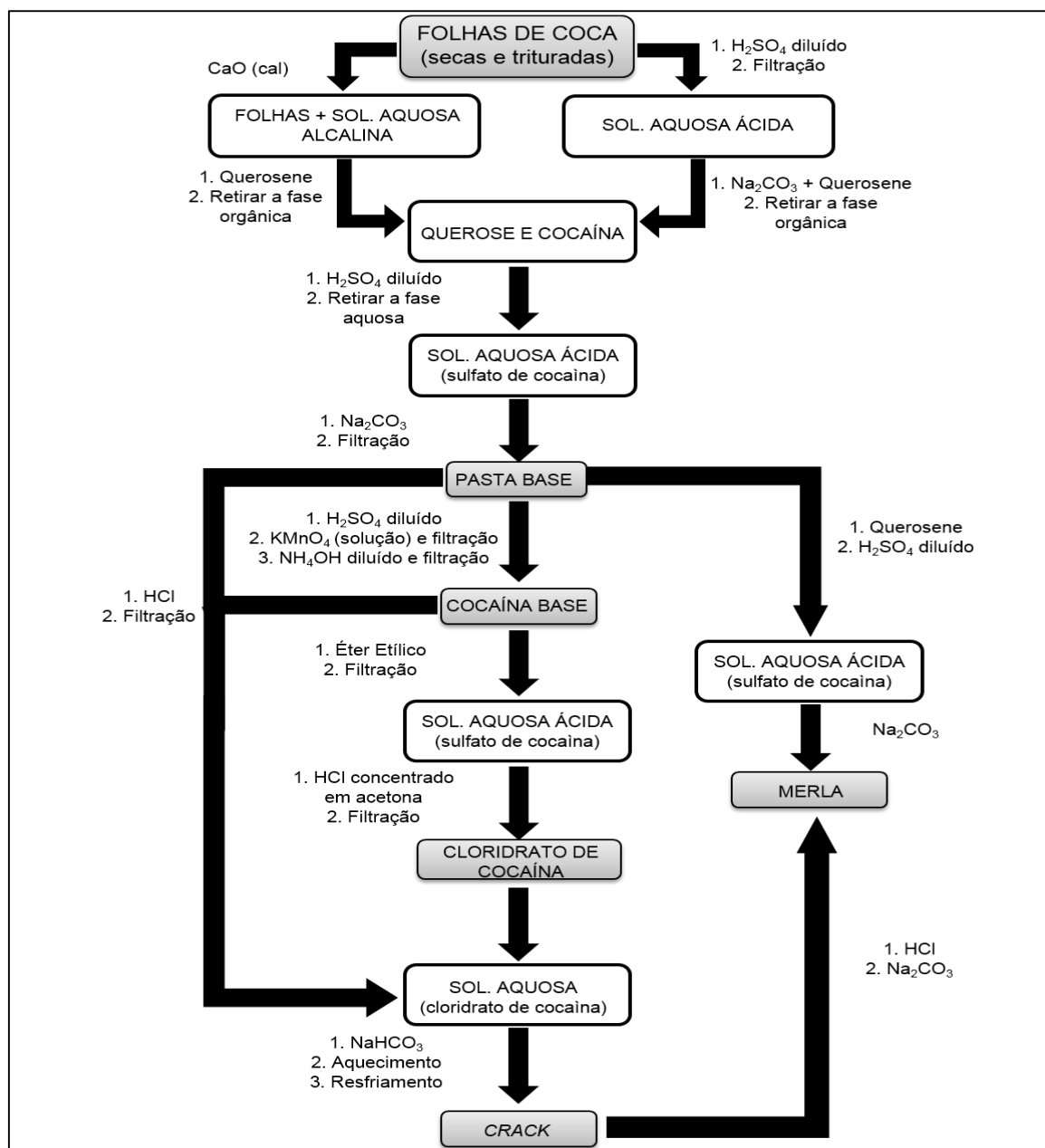


Figura 3. Exemplos de rotas de extração das formas de cocaína comercializada.^{9,11,12}

Conforme a FIGURA 3, a cocaína possui as seguintes formas de apresentação:

I. Pasta base, pasta de cocaína ou de coca: Forma base livre da cocaína. É o produto obtido da extração direta das folhas de coca, das quais transporta os agregados e as impurezas. Possui coloração bege escura ou marrom clara e pós secagem é normalmente encontrada na forma em pó e não na forma pastosa. Quando compactada pode ser confundida com o *crack* e em sua forma granulosa com a cocaína base, podendo ser diferenciada pela presença elevada de *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína.^{3,11}

II. Cocaína Base: É a forma base livre originada através de processos oxidativos e de lavagem da pasta base, apresentada na coloração bege/marrom clara.^{8,10,11}

III. *Crack*: É uma forma de base livre da cocaína, porém originada de um aquecimento da cocaína base ou cloridrato de cocaína (desde que transformado em base livre, previamente) até que ocorra a fundição e quando resfriada forma-se “pedras” (caracterizada por não esfarelar facilmente). Não é um subproduto de refino, mas sim uma forma de apresentação diferente da base livre. O processo de formação se dá de uma maneira “lenta” que é a dissolução do cloridrato em água com adição de amônia e coleta do precipitado o qual é aquecido até fusão da substância, a qual se deixa esfriar formando as “pedras” de *crack*. Uma forma rápida de obtenção de *crack* é o aquecimento de solução de amônia e cloridrato de cocaína em forno de microondas, porém a pureza do material obtido é menor do que da forma lenta. É utilizado em “cachimbos” para vaporização e inalação.^{3,11}

IV. Merla: É a base livre com altos teores de água e sais de sódio. Possui grande quantidade de benzoilecgonina originada da hidrólise da cocaína pela água. É apresentada na forma de pasta branca molhada.^{8,10,11}

V. Cloridrato de cocaína ou cocaína hidroclorada: É a forma de sal mais comumente encontrada da cocaína. Originada da reação entre cocaína base livre e um ácido com posterior precipitação em solvente orgânico. É encontrada na forma de pó branco-acinzentado. Normalmente, injetada intravenosamente ou aspirada.^{3,11}

A produção do arbusto de coca é ideal no clima tropical úmido de altitude, sendo os países andinos (principalmente Colômbia, Peru, Equador e Bolívia) e países africanos os locais mais propícios para o plantio. A área total de cultivo de coca no mundo não sofreu alterações significativas em relação aos anos de 2010 e 2011. Sabe-se que em 2011 a área total era de 155.600 hectares de plantação de coca, porém é um valor 30% menor se comparado ao ano de 2000.^{10,13}

A produção andina de cocaína corresponde a grande porcentagem da produção mundial. Do fim da Segunda Guerra Mundial até o fim da década de 90 tinha-se que o Peru e a Bolívia eram os maiores produtores e a Colômbia o maior refinador de cocaína do mundo, porém, com o passar dos tempos a Colômbia foi se sobressaindo sobre os demais.⁸

Até 2011 a Colômbia e os EUA eram os locais de maiores apreensões de drogas no mundo correspondendo, juntos a 294 toneladas de apreensões de cocaína neste mesmo ano. Entretanto, o panorama mundial tende devido ao endurecimento da lei nos EUA e conflitos entre cartéis na Colômbia, sua principal exportadora.¹³

Os maiores mercados consumidores de cocaína, América do Norte e Europa, presenciam um declínio do uso de cocaína entre a população adulta enquanto que o Brasil tem tido aumento substancial. No ano de 2010, foram apreendidas pela Polícia Federal Brasileira o montante de 27 toneladas de cocaína.^{11,13}

Sabe-se que a entrada no Brasil, proveniente principalmente da Colômbia, Peru e Bolívia, é geralmente de pasta base, cloridrato de cocaína e *crack*. A cocaína é exportada (preferencialmente a forma de cloridrato), principalmente por via marítima, com destino a Europa, África e EUA sendo os estados do Amazonas, Roraima, Acre, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Paraná as principais rotas de entrada, principalmente por vias aéreas e terrestres.

As amostras de cocaína comercializadas em grandes centros urbanos podem apresentar uma pureza baixa, devida a 2 tipos de substâncias:

- I. Adulterantes: são compostos farmacologicamente ativos que potencializam, minimizam ou mascaram os efeitos da cocaína;
- II. Diluentes: são compostos farmacologicamente inativos que servem, apenas, para aumentar a massa da amostra comercializada.

As formas de utilização da cocaína mudam de acordo com variações de disponibilidade e preço, como também com a intensidade da fiscalização por parte dos órgãos competentes. Os adulterantes e diluentes comumente encontrados estão apresentados na tabela a seguir.^{8,10}

Tabela 2. Adulterantes e diluentes encontrados na cocaína comercializada.⁸

ADULTERANTES	DILUENTES
Benzocaína	Açúcares e derivados: lactose, sacarose, glicose, manitol, amido e sorbitol
Cafeína	
Fenacetina	
Lidocaína	
Levamisol	
Diltiazem	Compostos inorgânicos: bicarbonato de sódio, carbonatos de sódio e cálcio, sulfatos de
Hidroxizina	

Procaína	cálcio, de magnésio e de sódio,
Tetracaína	cloretos de sódio e magnésio, borato de sódio e ácido bórico
Prilocaina	
Efedrina	Produtos diversos: Leite em pó,
Dipirona	amido de milho e farinhas em geral
Ácido acetilsalicílico	
Paracetamol	

Nos países onde a cocaína é comercializada ilegalmente, podem haver adulterantes que são característicos de suas apreensões como nos EUA que apresentam, por exemplo, levamisol e diltiazem e no Brasil os carbonatos e bicarbonatos, além de fenacetina, lidocaína e cafeína. Estudos químicos são realizados para identificar essas tendências de adulterações.⁸

Outras substâncias, principalmente os alcaloides da folha de coca, contribuem para o estudo relacionado ao tráfico de cocaína. Estas substâncias, geralmente minoritárias nas amostras de cocaína podem auxiliar na identificação de locais e períodos de produção da droga além de identificar a quais ambientes a amostra esteve sujeita.^{5,14}

Segundo Maldaner et. al. (2011)¹⁵, a Polícia Federal do Brasil (PF) vem, desde 2006, implementado o programa de Perfil Químico de Drogas (PeQui), juntamente com a cooperação técnica de instituições forenses nacionais e internacionais. O objetivo do PeQui é utilizar análises químicas de drogas de abuso apreendidas pela PF para identificar características de origem e de correlações entre as apreensões, permitindo assim identificar origens geográficas e rotas do tráfico de drogas de abuso no Brasil, além de identificar tendências mercadológicas dessas drogas.

Botelho (2011)⁸ cita os objetivos de um programa de perfil químico de drogas:

- I. Comparação de amostras: correlacionar amostras de diferentes locais para desvendar a estruturação das organizações criminosas;
- II. Origem geográfica: indicar a origem das amostras que estão sendo apreendidas para um melhor combate nas regiões de possível entrada das drogas;
- III. Rotas de distribuição: observar a distribuição das drogas, principalmente no próprio país, possibilitando identificar os meios que as organizações criminosas utilizam para importar e exportar drogas ilícitas;
- IV. Avaliação dos reagentes químicos utilizados: possibilitar a identificação dos meios utilizados para produção e refino fomentando as polícias para aumentar o

rigor no controle dos reagentes;

V. Classificação entre drogas ilegais e legais; lembrando-se que novos compostos podem ser inseridos à classe dos ilegais, visto a rapidez com que são produzidas sinteticamente novas drogas;

VI. Determinação de adulterantes com efeitos toxicológicos: permitir o tratamento mais adequado aos usuários de drogas.

As técnicas analíticas utilizadas nos laboratórios forenses, para o estudo das drogas, são basicamente a cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massas (GC/MS), com detector por ionização de chama (GC/FID) e a espectroscopia de infravermelho (IV), porém técnicas como a RMN vem sendo muito utilizadas para elucidação estrutural de drogas.

A espectroscopia IV fornece informações quanto aos grupos funcionais presentes. Em conjunto com os dados da CG/MS pode fornecer informações estruturais, além de fornecer a quantidade dos compostos em misturas específicas.

A importância da RMN se vê pela sua capacidade de fornecer informações estruturais, além de permitir quantificar misturas complexas, até mesmo de novas drogas. Ela se apresenta como ferramenta versátil para análise forense devido ser uma metodologia de identificação e quantificação simultânea sem necessidade de derivatização. Uma característica importante da RMN é a possibilidade de utilizar padrões de análises sem alta pureza para quantificação da substância objetivada, além de analisar amostras sem interferir no processo normal de investigação visto que é uma análise não invasiva.¹⁴

1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A história da RMN iniciou-se na década de 20, quando estudos revelaram que feixes de átomos eram suscetíveis a campos magnéticos não homogêneos externos, devido ao momento magnético dos átomos, ou seja, os núcleos destes átomos se comportavam como ímãs. Em 1945-46, os detentores do Prêmio Nobel de Física de 1952, Bloch e Purcell, além de detectar a ressonância magnética nuclear procuraram mensurar o seu efeito, o que lhes valeu o prêmio em conjunto. Em seguida, Packard e assistentes de Bloch observaram diferença química entre os hidrogênios do etanol e atribuíram essa diferença à estrutura química da substância, fenômeno denominado

por eles de deslocamento químico, sendo este o mais importante para identificação e diferenciação de moléculas.¹⁶

Ao passar dos anos a técnica foi se desenvolvendo, partindo de uma varredura contínua de frequências da radiação (ou do campo magnético aplicado à amostra) até a introdução de técnicas de pulsos de rádio frequência que, aliados a Transformada de Fourier, permitiram a análise de amostras mais diluídas e de outros núcleos com momento magnético de menor abundância isotópica. As aplicações são diversas passando muito além da simples identificação e elucidação estrutural e chegando a estudos de reações químicas, de macromoléculas como polímeros e biopolímeros, de processos de biossíntese e metabolismo, dentre outras.^{16,17}

A RMN é um método espectroscópico devido a utilização da interação da radiação eletromagnética com a matéria, porém, diferentemente de outras técnicas espectroscópicas mais conhecidas, ela se utiliza da componente magnética da radiação e não da elétrica.¹⁷

O estudo da RMN é intrínseco ao spin nuclear (I). O spin nuclear é descrito pela mecânica quântica e cada partícula elementar possui um valor de número quântico de spin. Os átomos que possuem número de spin igual a 0 ($I = 0$), aqueles que apresentam massa atômica e número atômicos pares, são ditos não ativos na RMN.^{17,18}

Os spins nucleares encontram-se em estado degenerado e com orientação randômica quando não influenciados por campo magnético externo (B_0), porém ao ser aplicado um campo externo, ocorre a quebra da degenerescência e os spins se orientam de formas limitadas aos valores da seguinte fórmula:

$$\text{Número de orientações} = 2I + 1$$

onde I é o número de spin do núcleo submetido ao campo externo B_0 .

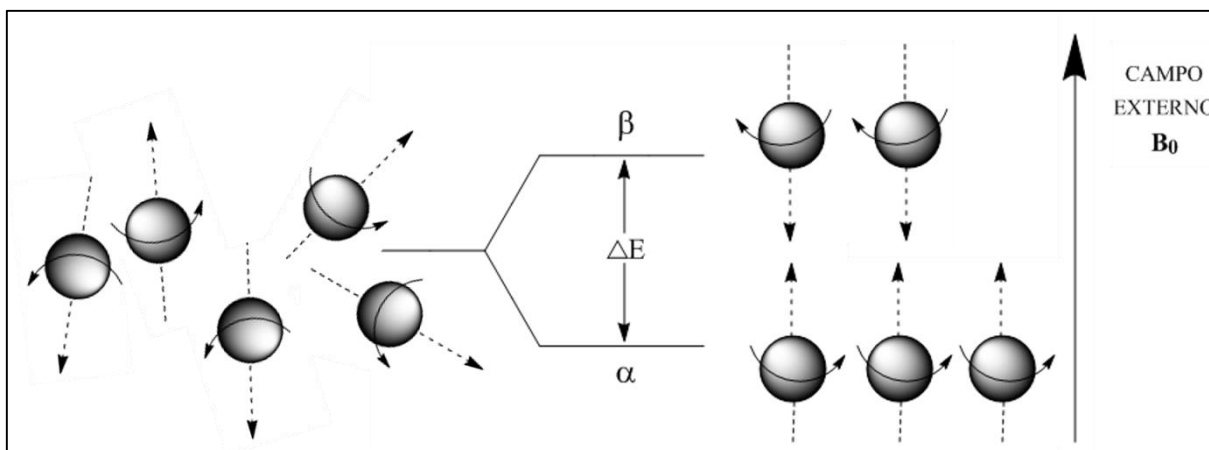


Figura 4. Núcleos de $I=1/2$ submetidos a campo externo, B_0 .

Tendo como exemplo núcleos com $I = 1/2$, teremos duas orientações possíveis, sendo uma a favor do campo externo, denominada como estado α , e uma contra o campo externo, denominada como estado β (FIGURA 4). Ambas orientações possuem uma quantidade de energia quantizada, sendo que a diferença energética entre esses estados (ΔE) é dada pela equação abaixo:^{16,17}

$$\Delta E = (h\gamma/2\pi)B_0$$

onde temos h = constante de Planck; γ = razão magnetogírica do núcleo estudado e B_0 a intensidade do campo externo aplicado.

A equação demonstra que a diferença energética entre os estados é proporcional ao campo magnético externo aplicado. A razão magnetogírica é a proporcionalidade entre os vetores momento angular e momento magnético de cada núcleo, sendo específica para cada tipo de núcleo ou elemento.^{17,18}

A população dos dois estados energéticos é diferente e pode ser obtida através da equação de Boltzmann:

$$n_\alpha / n_\beta = e^{\Delta E/kT}$$

Onde temos que k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura, em Kelvin, a qual a amostra está submetida.

Através das equações anteriores, percebe-se que a diferença populacional é dependente do campo magnético externo, ou seja, quanto maior o campo B_0 maior será a diferença populacional. O campo magnético cria um torque sobre o momento

magnético, que passa a descrever uma trajetória circular em torno do eixo z e a frequência é denominada de frequência de Larmor. A diferença populacional resulta em uma magnetização resultante (M_0) alinhada ao campo, FIGURA 5. ¹⁷

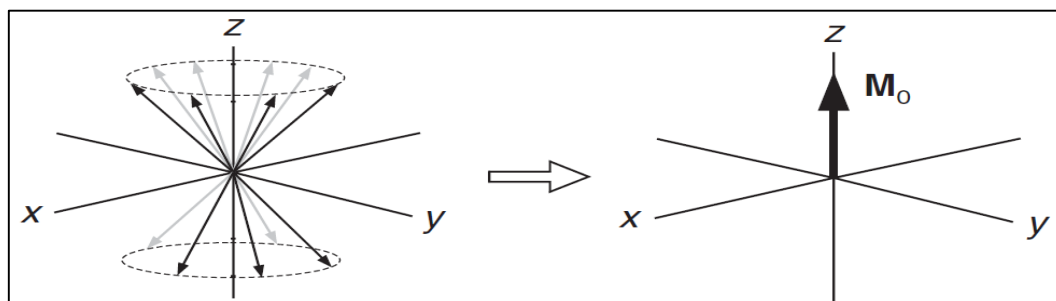


Figura 5. Vetor de magnetização resultante, M_0 .

Sob efeito de um campo magnético oscilante B_1 com frequência igual à de Larmor e gerado por uma bobina de radiofrequência, localizada perpendicularmente a B_0 , M_0 é transportada para o plano x - y .

Esse transporte é dependente do tempo de aplicação de B_1 , onde acarretam em transposições em relação ao eixo de equilíbrio. Com o término da aplicação de B_1 , M_0 retorna ao eixo de equilíbrio e esse retorno é conhecido como relaxação. Existem dois tipos de relações: Longitudinal (spin-rede ou T_1) e Transversal (spin-spin ou T_2).

A relaxação longitudinal é um processo de características entálpicas, que corresponde à troca de energia entre os spins nucleares excitados e o meio circundante (rede). Ela corresponde ao retorno das populações de spins ao equilíbrio inicial, por meio da perda de energia absorvida durante a excitação. Um tempo de relaxação longo significa que os núcleos interagem pouco com as vizinhanças e assim as trocas de energias ocorrem lentamente. Substâncias paramagnéticas estimulam as transferências de energia e por isso são utilizadas para diminuir o tempo de relaxação longitudinal (T_1).

A relaxação transversal é um processo de características entrópicas, e é a responsável pelo decaimento da componente M_0 no plano x - y . Esta ocorre paralelamente à relaxação longitudinal e gera o processo de perda de coerência de fase devido a campos magnéticos flutuantes. A coerência de fase ocorre após a aplicação de B_1 e era de se esperar que o vetor M_0 retornasse coeso ao eixo Z , mas isto não ocorre pelo fato de M_0 ser constituído de vetores de núcleos individuais, que experimental um campo magnético local ligeiramente diferente. Assim ocorre a perda

de coerência de fase, após B_1 , que conduz a uma diminuição da magnetização resultante no plano transversal (x-y).¹⁹

O sinal somatório das relaxações, dos spins responsáveis por M_0 , gera o que se chama de *FID* (*Free Induction Decay*) que é o decaimento da magnetização detectado em função do tempo. Este sinal retrata justamente o decaimento de M_0 ao longo do plano x-y, pois é somente a magnetização nesse plano que gera sinal no receptor. É necessário um tratamento matemático, através da Transformada de Fourier, para que o *FID* seja convertido do domínio do tempo para o domínio da frequência gerando assim o espectro de RMN.¹⁷⁻¹⁹

1.2.1. Espectroscopia de RMN sem solvente deuterado (*No-D NMR*)

A espectroscopia de RMN convencional sempre se utilizou de solventes deuterados para dissolver as amostras. Os solventes deuterados são empregados por não interferirem no espectro de ressonância de ^1H . Os sinais dos solventes que aparecem no espectro de ressonância, são sinais de ^1H que trocaram quimicamente com os átomos de ^2H . Teoricamente, solventes não deuterados teriam sinais alargados e de grande intensidade que se sobreporiam nas regiões espectrais, em que outros sinais poderiam aparecer no espectro. Na prática é importante tentar realizar espectros com solventes não deuterados, para se averiguar se ocorre distinção adequada de sinais que possibilitem obter informações suficientes sobre as amostras estudadas.

A espectroscopia de *No-D NMR* foi uma metodologia desenvolvida, inicialmente, para a determinação da concentração de reagentes e acompanhamento de reações. Se baseia, normalmente, em espectros de ^1H obtidos para amostras dissolvidas em solventes comuns de laboratório, e não enriquecidos com deutério. Tem se mostrado uma metodologia com boas relações sinal/ruído (S/N) e resoluções adequadas para rotinas experimentais, podendo ser utilizada ainda para obter valores quantitativamente confiáveis.²⁰

Os espectros de *No-D NMR* podem ser obtidos sem o sinal de trava para o deutério (*lock*) e esta metodologia possui como vantagens o menor custo, por utilizar solventes não deuterados, a possibilidade de automatização dos experimentos e permitir a análise de reações químicas em seus próprios solventes, eliminando as

etapas de extração e solubilização, demonstrando a possibilidade de seu uso como uma rotina. O *lock* é uma forma de corrigir deslocamentos inapropriados em um espectro. O pulso de radiofrequência é ajustado em relação a frequência do *lock* para que o campo magnético se mantenha constante próximo desse valor.^{21,22}

Os parâmetros mais importantes para a *No-D NMR* são: tempo de aquisição, tempo de espera, largura do pulso, número de transientes e ganho, o qual deve ser baixo o suficiente para se evitar imperfeições na linha de base e que não ocorra a queima do filtro amplificador de sinal.

Hoye et. al. (2004b)²¹ citam seis métodos usados para realizar o *shimming*, que é a forma de corrigir as inhomogeneidades do campo magnético através da criação de pequenos campos magnéticos a favor e contra o campo externo para que o mesmo se torne homogêneo, em uma pequena porção de espaço. Em amostras de *No-D NMR* podem ser realizados: 1) Uso de tubo de referência com volume de solvente deuterado igual ao de outro tubo com amostra, no qual será realizado o sinal de trava (*lock*) e o *shimming* para então ser trocado pelo tubo com a amostra; 2) Utilização de *shimming*, obtido e salvo previamente, considerado ótimo para o solvente da amostra; 3) Uso de capilar contendo solvente deuterado do mesmo solvente da amostra, podendo assim ser realizado o sinal de trava e o *shimming*; 4) *gradient shimming*; 5) *Shimming* utilizando o FID da amostra; 6) *Shimming* utilizando o espectro da amostra. Os métodos 3 e 4 são considerados compatíveis com amostradores automáticos pois ambos são *shimming* realizados automaticamente.

Hoye et. al. (2004a)²⁰ demonstram a utilidade da *No-D NMR* para acompanhamento de reações. Para a esterificação de Fischer do ácido acético com metanol, os autores monitoraram o progresso da reação com o surgimento de sinais correspondentes à etila do ester formado até o equilíbrio da reação. Acompanhamento semelhante também foi realizado para a decomposição do tetrahydrofurano por *n*-BuLi à temperatura ambiente podendo ser reconhecido o decréscimo do sinal do tetrahydrofurano e o surgimento e aumento da intensidade do etileno e do enolato de lítio-acetaldeído, produtos da decomposição.

Hoye e col. demonstram também, metodologias de titulação usando a *No-D NMR*, onde além das metodologias é apresentada a comparação das titulações de

reagentes de alquil-lítio e de Grignard por *No-D NMR* e titulação colorimétrica obtendo excelente concordância com os valores padrões para ambas, mas tendo a RMN como a técnica mais rápida.^{20,21}

1.2.2. Espectroscopia de RMN quantitativo (*qNMR*)

A análise quantitativa através da espectroscopia de RMN (*qNMR*) foi desenvolvida na década de 60 a partir de estudos farmacêuticos, sendo sua principal vantagem a de ser um método instrumental analítico de mensuração por relação direta, além de apresentar: fácil preparo de amostras, possibilita elucidação estrutural em conjunto com a quantificação, não necessita de padrão analítico com mesmas propriedades do analito de interesse, tempo baixo de análise, não destrói a amostra e quantifica múltiplos compostos, em misturas, sem separação prévia.^{23,34}

Quando comparada com a cromatografia, apresenta vantagens e desvantagens. A cromatografia é uma técnica dependente das propriedades físicas das moléculas, além de possuir dificuldades na análise de amostras com baixo ponto de ebulição, baixa massa molecular e ou mistura complexa de moléculas com propriedades físicas similares. A *qNMR* possui problemas quanto a sobreposição de sinal, que pode ser solucionada quando utilizamos outros núcleos ativos, e quando há grande diferença de concentração entre os analitos de uma mesma amostra, pois assim é necessário analisar os sinais de maior intensidade (maior concentração) e em seguida suprimi-los para quantificar os de menor intensidade (menor concentração).^{25,26,27}

Devido aos avanços tecnológicos relacionados à RMN, como campos magnéticos de alta intensidade e a utilização de probes criogênicos, o limite de detecção (LD) desta técnica tem sido considerado oportuno para análises de baixas concentrações de analitos. Hoje, é utilizada como método primário de análise quantitativa para determinação de pureza de compostos, devido à utilização de padrão primário para uma estimativa de quantificação e também é utilizada para estudos de contaminação ambiental, de drogas, metabolismo de câncer, dentre outros.^{23-25,28}

A *qNMR* apresenta exatidão na faixa de 98% o que é considerado como aceitável para uma análise quantitativa precisa e exata. Segundo Bharti (2012)²⁵, os seguintes parâmetros são normalmente otimizados para uma boa quantificação com

altos valores de exatidão:

- a) Seleção da sequência de pulso;
- b) *Shimming*;
- c) *Gain* (ganho);
- d) Medida do tempo de relaxação longitudinal (T_1);
- e) Calibração do pulso de 90° ;
- f) Proporção do tempo de repetição (T_r);
- g) Desacoplamento de ^{13}C ;
- h) Tempo de aquisição;
- i) Pontos no domínio do tempo;
- j) Resolução Digital;
- k) Técnicas de supressão de solvente;
- l) *Line broadening* (lb);
- m) *Zero filling* (preenchimento com zeros);
- n) Correção de fase;
- o) Correção de linha de base;
- p) Integração.

A *qNMR* é baseada no processo de relaxação-excitação-aquisição e como todas as metodologias de RMN, necessita de um correto *shimming* para melhorar a resolução. Também propõem-se que não ocorra rotação do tubo contendo a amostra para que evite-se *spinning sidebands*, que são sinais provenientes da modulação do campo magnético com a frequência de rotação da amostra. As intensidades desses sinais são proporcionais a de sinais genuínos da amostra e estão deslocados desses sinais no valor da rotação, por exemplo 20Hz.^{25,29,30}

Para a *qNMR* o tempo de espera de relaxação é muito importante. Pulsos rápidos em espaço de tempo curto diminuem substancialmente a intensidade do sinal adquirido, é necessário que a magnetização resultante retorne cerca de 99,33% ao estado de equilíbrio antes de um novo pulso de radiofrequência, o que é garantido pelo período de tempo de $5 \times T_1$ para o tempo de repetição, onde T_1 é o correspondente ao núcleo que relaxa mais lentamente. Por definição, T_1 é o tempo gasto para que 63% da magnetização resultante retornem para o eixo de equilíbrio com o campo externo.^{25,29,30}

A janela espectral deve ser definida e recomenda-se um adicional de 2ppm à mais e a menos em relação a região onde se obtém todos os sinais do experimento que auxiliará no ajuste da linha de base.

Os parâmetros de processamento são importantes para a *qNMR*. A multiplicação dos dados do FID por funções exponenciais, como a função Lorentz-Gauss, reduz o ruído do espectro aumentando a relação S/N. O preenchimento com zeros no final do FID (*zero filling*) dobrando o número de dados adquiridos no domínio do tempo maximiza a relação S/N por um fator de $2^{1/2}$. Os ajustes de fase e de linha de base são normalmente realizados automaticamente na RMN.

O parâmetro que exige mais cuidado é a integração dos sinais, visto que a área do sinal é diretamente proporcional ao núcleo correspondente a ele. Ajuste de fase e de linha de base diminuem os erros de integração. Os maiores erros são advindos das aproximações quando se inicia e termina um sinal, pois a integral deveria se prolongar ao infinito em ambas as direções. Segundo revisão feita por Soininen (2008)²⁹, para se incluir 99,0% da real área do sinal é necessário estender 39 vezes a largura à meia altura para ambas direções e para erros menores que 1,0% é necessário estender 76 vezes. Como exemplo foi dado que em um espectrômetro de 500MHz, onde a largura do sinal é de 1Hz, a região de integração deverá ser de 152Hz (~0,30ppm).

A quantificação na *qNMR* é baseada na relação da área do sinal desejado comparada com a área do sinal de uma referência. Uma maneira de se quantificar é relacionar a massa da substância com a área do sinal e o número de núcleos correspondente a partir da equação abaixo:^{23,25,28,29}

$$\frac{n_X}{n_Y} = \frac{A_X}{A_Y} \times \frac{N_Y}{N_X}$$

onde *n* é a quantidade de matéria (número de moles), *A* é a área de um sinal e *N* é o número de núcleos correspondente.

Para se calcular a fração de um composto em uma mistura pode se usar:^{23,25,28,29}

$$\frac{n_X}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{\frac{A_X}{N_X}}{\sum_{i=1}^m \frac{A_i}{N_i}} \times 100\%$$

onde n_i é a quantidade de matéria de cada componente da mistura, A_i é a área de um sinal de cada componente e N_i o número de núcleos correspondente ao sinal.

Já para o cálculo de pureza utiliza-se da seguinte equação:^{23,25,28,29}

$$P_x = \frac{A_X}{A_{ref}} \times \frac{N_{ref}}{N_X} \times \frac{M_X}{M_{ref}} \times \frac{m_{ref}}{m_X} \times P_{ref}$$

onde M_X e M_{ref} são as massas molares, m_X e m_{ref} são as massas da substância e do material de referência, respectivamente e P_{ref} , N_{ref} e A_{ref} são a pureza, o número de núcleos e a área da integral do material de referência.

Os materiais de referência utilizados na *qNMR* necessitam de parâmetros como estabilidade, preço, não volatilidade, não reatividade entre outros como qualquer material de referência. Para a RMN, o fato de a referência ser um sinal singlete bem separado dos sinais da amostra é considerado como fundamental, sendo a referência advinda de um padrão interno, externo ou eletrônico.^{23,25}

Padrões internos são materiais de referência com massas ou concentrações estabelecidas previamente em um volume conhecido de solução, adicionado diretamente à uma solução a ser quantificada. Os materiais de referência mais conhecidos são TMS (tetra metil silano), DSS (sal de sódio do ácido sulfônico 3-trimetil-silil-1-propano) e TSP (fosfato trissódico), porém para a *qNMR* o TMS não é muito indicado devido a sua alta volatilidade.^{25,29,31}

Padrão externo é a inserção de material de referência separadamente da solução do analito a ser quantificado. Utiliza-se da inserção de um capilar contendo a solução de material de referência, evitando-se a contaminação e/ou reação entre as soluções. O padrão externo deve ser calibrado com a inserção do capilar com solução de referência em tubo com solução padrão. O capilar é então removido, lavado e seco e utilizado na solução do analito e pode ser reutilizado para várias amostras.²⁵

Devido a problemas de realizar o *shimming* e a redução da sensibilidade por causa do menor volume de analito, o uso de um padrão externo na *qNMR* não é a metodologia mais indicada para amostras com baixa concentração, porém apresenta as seguintes vantagens:^{25,29}

- a) Uma simples calibração pode ser usada;
- b) O padrão é dissolvido em solvente deuterado, auxiliando no *lock*;
- c) Não existe contaminação da amostra;
- d) Não ocorre interações químicas entre amostra e padrão de referência.

Utilizando-se os padrões internos e externos pode-se usar as metodologias analíticas de curva de adição de padrão e curva de calibração para determinar as concentrações. As curvas são geradas através da regressão linear dos mínimos quadrados sendo a análise feita a partir de adições de soluções padrão ou por diluições sucessivas do mesmo e análise da área do sinal, correspondente, em diferentes concentrações. Vale salientar que ao quantificar mais de um composto em uma mistura, se deve desenvolver uma curva de calibração para cada composto a partir do padrão.²⁵

Análises quantitativas por meio de adição padrão ou curva de calibração são metodologias que anulam os efeitos de relaxação e de outros parâmetros que influenciam na exatidão, tendo sido relatados valores de 99% para curtos tempos de tempo de espera. A única exigência para suas utilizações é a repetição dos mesmos parâmetros de execução das curvas e das quantificações. Porém, como todas as demais técnicas estas possuem problemas, sendo neste caso, a múltipla calibração para todos os analitos de interesse na amostra.²⁵

A utilização de um sinal eletrônico para quantificação se dá principalmente por cinco técnicas, sendo elas a *ERETIC*, *ARTSI*, *QUANTAS*, *PIG* e *PULCON*. A *ERETIC* (*Electronic reference method*) consiste na produção de um pseudo-*FID* que é inserido no espectro da amostra e necessita ser calibrado por uma concentração conhecida. A *ARTSI* (*Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection*) é similar a *ERETIC*, porém possui maior exatidão. A *QUANTAS* (*Quantification by Artificial Signal*) deve ser calibrada como a *ERETIC* porém ao adicionar um sinal padrão artificial, a sua escala é acertada automaticamente junto aos parâmetros

experimentais. A *PIG (Pulse Into Gradient)* utiliza-se de um segundo canal de radiofrequência para gerar uma frequência próxima da que foi aplicada ao sistema para assim gerar um padrão de sinal. Por último a *PULCON*, que é realizada com o auxílio de uma amostra de referência de proteína.^{23,25,29}

A comprovação da qualidade dos resultados analíticos vem sendo avaliada por processos de validação através de algumas figuras de mérito, como precisão, exatidão, linearidade, reprodutibilidade, limite de detecção e de quantificação, seletividade, robustez e especificidade. A validação é a confirmação através de exames objetivos que os requerimentos para um específico estudo são cumpridos. É realizada para avaliar se um procedimento demonstra resultados válidos para o que se pretende.^{25,28,29}

A **exatidão** é o quanto as análises feitas se aproximam do valor considerado correto (verdadeiro) para as mesmas, já a **precisão** é o quanto os resultados de um mesmo experimento se aproximam. Segundo Bharti (2012)²⁵, para obter exatidão menor do que 1,0% a otimização dos parâmetros de análise devem ser minuciosas, sendo que para resultados mais precisos é necessário que os parâmetros não variem durante diferentes amostras sendo que normalmente os laboratórios mais experientes apresentam precisão maiores que 99%.^{23,25,29}

A **linearidade** é a habilidade de se produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. Uma quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Deve ser realizada a cada seis meses. É usualmente encontrado um coeficiente de determinação $\geq 0,999$.^{25,29}

Reprodutibilidade, para a RMN, é verificar se ocorrem variações nos resultados das análises ao passar do tempo. A instrumentação é muito estável fazendo com que a reprodutibilidade varie menos que 1,0% ao passar dos anos.^{25,29}

O **limite de detecção (LD)** é a concentração mínima detectável com um bom nível de confiança, sem que haja influência do sinal de base do espectro. O **limite de quantificação (LQ)** é a menor concentração quantificável com precisão e exatidão e ambos são influenciados pela razão S/N, por isso tem se conseguido valores reduzidos de LD e LQ com o advento de campos magnéticos maiores que 1GHz e

pobres criogênicos.^{25,29}

A **robustez** é a verificação das variações, nos resultados, ocasionadas pelos procedimentos analíticos utilizados no experimento. Quanto mais robusto menos sensível a variações externas é o experimento.^{25,29}

Especificidade e seletividade são outras figuras de mérito estudadas para a validação, sendo a especificidade a capacidade de responder a um único analito e a seletividade a capacidade de determinar um analito em uma complexa mistura sem interferência de outros componentes da mistura.^{25,29}

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Pretende-se realizar estudos do emprego da espectroscopia de RMN, especificamente *No-D NMR*, em amostras de cocaína apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, para se avaliar o Perfil Químico das mesmas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Otimizar *No-D NMR* para identificar a cocaína e seus adulterantes;
- ❖ Validar a metodologia de *No-D NMR* para quantificar cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

a) Materiais

- Foram utilizados padrões de cocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina, ácido maléico e apreensões de cocaína.
- Utilizou-se metanol P.A - A.C.S (Synth), previamente seco com Na₂SO₄ Anidro (Synth), para dissolver as amostras.³²
- Utilizou-se metanol deuterado (Sigma-Aldrich, 99,8% D) em tubo de inserção, puro e dissolvendo o ácido maléico.

As apreensões foram cedidas pela Polícia Civil do Espírito Santo (PC – ES).

b) Instrumentação

Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos utilizando-se tubos de ressonância e tubos de inserção coaxial em uma sonda de líquidos 5mm BroadBand ¹H/¹⁹F/X em um espectrômetro de 9,4T Varian Agilent®, modelo VNMRS 400 a uma temperatura de 25°C.

Todos os espectros de *No-D NMR* foram obtidos usando tubo de inserção coaxial contendo metanol deuterado.

3.1. Otimização de *No-D NMR* para identificar a cocaína e seus adulterantes

3.1.1. Estudo das características das amostras estudadas

Prepararam-se as seguintes soluções para esta etapa do estudo:

- Solução I: 550µL de solução, em metanol comercial, de 10,5mg do padrão de cocaína;
- Solução II: 600µL de solução, em metanol deuterado, de 10,5mg do padrão de cocaína.

A diferença de volume se dá pelo uso de tubo de inserção coaxial para o estudo com metanol comercial, necessitando assim de um volume menor de solução para ser obter o espectro.

Os espectros para ambas soluções foram adquiridos sob as seguintes condições: tempo de aquisição = 20,000s, tempo de espera = 20,000s, pulso = 90° (13,50µs), número de transientes = 8 e uma janela espectral = 6410,3Hz, como foi proposto por Hoye et. al.(2004b)²¹.

3.1.2. Otimização dos parâmetros para a técnica de *No-D NMR*

Nesta etapa avaliaram-se os parâmetros necessários para adquirir um espectro de ¹H sob as condições de *No-D NMR*. As seguintes soluções foram utilizadas:

- Solução III: 550µL de solução, em metanol comercial, da mistura dos padrões com 20,1mg de cocaína; 20,5mg de lidocaína; 20,1mg de fenacetina e 5,0mg de cafeína;
- Solução IV: 600µL de solução, em metanol deuterado, da mistura dos padrões com 20,0mg de cocaína; 20,2mg de lidocaína; 19,8 mg de fenacetina e 5,2mg de cafeína;
- Solução V: 550µL de solução, em metanol comercial, de 20,0mg de uma apreensão de cocaína em que seu espectro de ¹H continha problema na linha de base na região de ¹H aromáticos.

A Solução III foi utilizada para a otimização dos parâmetros “a-h” e “j-m”, a seguir; a Solução IV foi utilizada juntamente com a Solução III para avaliar o parâmetro “c” e a Solução V foi utilizada para avaliar o parâmetro “i”.

Os parâmetros otimizados estão apresentados abaixo juntamente com a metodologia de aquisição ou tratamento do espectro de ¹H utilizadas. A otimização é necessária por se tratar de uma metodologia nova.

a) *Shimming*

Para avaliar o *shimming* foram realizados o *shimming* automático e o *shimming* manual para as metodologias propostas por Hoye et. al. (2004b)²¹. O *shimming* automático foi selecionado na interface principal e o *shimming* manual foi feito pela interface *Shim*, através de alterações dos campos Z1-Z3-Z2-Z4 para o *FID* e para o espectro de ¹H.

b) *Gain* (ganho)

Foi realizado uma varredura (*array*) para avaliar o ganho. Para isso, foi

adquirido um espectro de ^1H com ganho automático e 7 espectros com incrementos de uma unidade de ganho variando de 0-6. Os parâmetros utilizados foram tempo de aquisição = 20,000s, tempo de espera = 20,000s, pulso = 90° (13,50 μs), número de transientes = 8 e uma janela espectral = 6410,3Hz, como foi proposto por Hoye e col. (2004b).

c) Medida do tempo de relaxação longitudinal(T_1)

Para medir o valor T_1 foi utilizado a sequência de pulso Inversão-Recuperação (INVREC) com os seguintes parâmetros: tempo de espera = 20s, número de transientes = 16, ganho = 0, janela espectral = 6410,3Hz, acoplado – NOE com mínimo de 0,5s e máximo de T_1 de 5s e um tempo total de experimento de 0,2h.

d) Calibração do pulso de 90°

Foi realizado um *array* para calibrar o tempo necessário para um pulso de 90° . Para isso, foi realizado a função *array* para *pw* na sequência de pulso para ^1H , onde foi selecionado o valor mínimo de 25,00 μs e valor máximo de 33,64 μs sendo este intervalo dividido em 13 pontos. Os parâmetros utilizados foram tempo de aquisição = 20,00s, tempo de espera = 20,00s, número de transientes = 8 e uma janela espectral = 6410,3Hz.

O importante é que tenha-se o dobro do valor calibrado no equipamento para *pw90*, neste caso 13,50 μs dentro do intervalo do *array*.

e) Tempo de repetição (T_r)

O tempo de repetição foi avaliado pela obtenção de espectros de ^1H com os seguintes parâmetros: pulso = 90° (14,64 μs), número de transientes = 8, ganho = 0 e uma janela espectral = 6410,3Hz com variações de T_r entre $1 \times T_1$ e $9 \times T_1$ nas proporções 1:9 – 9:1 para tempo de aquisição (*Aq*) e tempo de espera (*delay*, *d1*) com variações de proporções por valores inteiros.

f) Desacoplador de ^{13}C

O desacoplamento foi testado realizando sequência de pulso para hidrogênio com os seguintes parâmetros: tempo de aquisição = 21,042s, tempo de espera = 2,338s, pulso = 90° (14,64 μs), número de transientes = 8, ganho = 0 e uma janela espectral = 6410,3Hz para dois espectros, estando em um o desacoplador ligado e no outro ligado.

g) Pontos no domínio do tempo (TD)

Ao realizar as variações em T_r foi possível avaliar as variações de TD pois o mesmo é alterado automaticamente quando variam-se os valores de d_1 e A_q .³³

h) Resolução digital

A avaliação da resolução digital pôde ser feita pelas variações de T_r , pois a resolução digital é igual a $(A_q)^{-1}$.

i) Supressão de solvente

Foi adquirido um espectro de hidrogênio com os seguintes parâmetros tempo de aquisição = 21,042s, tempo de espera = 2,338s, pulso = 90° (14,64 μ s), número de transientes = 8, ganho = 0 e uma janela espectral = 6410,3Hz e em seguida foi realizado a sequência de pulso PRESAT (pré-saturação), para a qual foi selecionado a região espectral a qual desejou-se saturar o sinal, região do sinal da água, e utilizaram-se os seguintes parâmetros: número de transientes = 8 e tempo de espera de pré-saturação = 2,000s.

Para avaliar os parâmetros descritos abaixo, foi adquirido um espectro de ^1H nas seguintes condições: tempo de aquisição = 21,042s, tempo de espera = 2,338s, pulso = 90° (14,64 μ s), número de transientes = 8, ganho = 0 e uma janela espectral = 6410,3Hz.

j) *Line broadening (lb)*

Foram avaliadas melhoria nos sinais com a utilização de *lb* de 0,1-1,0.

k) *Zero filling* (preenchimento com zeros)

Foi realizada a adição de *zero filling* com 2x o número de pontos.

l) Correção de fase

Realizou-se a correção de fase no modo automático e manual.

m) Correção de linha de base

Realizou-se correção de linha de base pela aplicação da função automática (*Bernstein Polynomials*) e pela aplicação manual das funções *Polynomial Fit* e *Whittaker Smoother*.

3.1.3. Utilização da *No-D NMR*, otimizada, para analisar apreensões de cocaína

- Solução VI: 550µL de solução, em metanol comercial, de 20,2mg de apreensões de cocaína (espectro que possuía cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina);
- Solução VII: 600µL de solução, em metanol deuterado, de 20,4mg de apreensões de cocaína (espectro que possuía cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina).

As Soluções VI e VII foram utilizadas para avaliar a otimização realizada através dos parâmetros anteriores.

A diferença de volume se dá pelo uso de tubo de inserção coaxial para o estudo com metanol comercial, necessitando assim de um volume menor de solução para ser obter o espectro.

Prepararam-se 12 soluções de apreensões de cocaína utilizando-se 20,0mg de apreensão e 550µL de metanol comercial.

Os espectros dessas todas as soluções foram obtidos com as seguintes condições: tempo de aquisição = 21,042s, tempo de espera = 2,338s, pulso = 90° (14,64µs), número de transientes = 8, ganho = 0 e uma janela espectral = 6410,3Hz.

3.2. Validação e aplicação da metodologia de *No-D NMR* para quantificar cocaína, cafeína, fenacetina e lidocaína

- Validação de *No-D NMR*;

Antes de se realizar a quantificação, determinou-se qual norma de validação seria utilizada para que fornecesse os parâmetros (figuras de mérito) necessários para dar confiabilidade aos resultados analíticos obtidos.

Como o estudo foi de interesse forense, decidiu-se usar as normas de uma entidade que seja exclusiva desta área. Adotou-se o *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens* publicado pela UNODC.³⁴

Todos os espectros usados na validação usaram os seguintes parâmetros:

tempo de aquisição = 21,042s, tempo de espera = 2,338s, pulso = 90° (14,64 μ s), número de transientes = 8, ganho = 0 e uma janela espectral = 6410,3Hz.

a) Especificidade / Seletividade

Foram preparadas 550 μ L, em metanol comercial, das seguintes misturas:

- Mistura 1: Cocaína (20,3mg), Fenacetina (19,7mg), Lidocaína (20,1mg) e Cafeína (5,0mg);
- Mistura 2: Mistura 1 + Paracetamol (10,3mg);
- Mistura 3: Mistura 2 + Ibuprofeno (10,2mg);
- Mistura 4: Mistura 3 + Benzocaína (10,2mg).

Foi preparada uma solução de 80 μ L contendo 17,1mg de ácido maléico, dissolvido em metanol deuterado, e a mesma transferida para o tubo de inserção coaxial que foi utilizado na identificação dos sinais em todas as misturas.

b) Linearidade

Foram preparados 550 μ L das seguintes soluções:

- Ponto 1: Cocaína, Fenacetina, Lidocaína (1,00mg) e Cafeína (0,25mg);
- Ponto 2: Cocaína, Fenacetina, Lidocaína (2,00mg) e Cafeína (0,50mg);
- Ponto 3: Cocaína, Fenacetina, Lidocaína (4,00mg) e Cafeína (1,00mg);
- Ponto 4: Cocaína, Fenacetina, Lidocaína (8,00mg) e Cafeína (2,00mg);
- Ponto 5: Cocaína, Fenacetina, Lidocaína (16,00mg) e Cafeína (4,00mg);
- Ponto 6: Cocaína, Fenacetina, Lidocaína (20,00mg) e Cafeína (5,00mg).

Foi utilizado tubo de inserção contendo 80 μ L de solução de metanol deuterado contendo 20,1 mg de ácido maléico.

As curvas analíticas foram geradas tendo como eixo das ordenadas a relação entre as áreas dos sinais dos analitos/área do sinal de ácido maléico e no eixo das abscissas a massa dos analitos. Elas foram estabelecidas juntamente com suas equações e os valores de regressão linear por mínimos quadrados (R^2).

c) Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram avaliados pelas curvas analíticas obtidas para o estudo de linearidade através das equações a seguir:

$$LD = 3S/\alpha \quad LQ = 10S/\alpha$$

onde S é o desvio padrão do branco ou do coeficiente linear e α é a inclinação da curva analítica.

d) Exatidão/Precisão

Foram usadas as misturas dos pontos 2, 4 e 6 para avaliar a exatidão e a precisão. Essas foram analisadas em três dias consecutivos sendo avaliadas as diferenças entre os resultados e os valores teóricos (exatidão) e os desvios padrões relativos (precisão).

Os resultados de exatidão deviam ser de 80-120% para as menores concentrações e de 85-115% para as maiores quando comparados com o valor de massa teórico. Para a precisão, os resultados expressos como desvio padrão relativo (RSD) deviam $\pm 20\%$ para as menores concentrações e $\pm 15\%$ para as maiores.

➤ Quantificação em apreensões de cocaína

Nesta etapa preparou-se uma solução de 550 μ L, em metanol comercial, contendo 20,0mg de cada uma das 29 apreensões de cocaína.

Todos os espectros de hidrogênio foram obtidos com os seguintes parâmetros: tempo de aquisição = 21,042s, tempo de espera = 2,338s, pulso = 90° (14,64 μ s), número de transientes = 8, ganho = 0 e uma janela espectral = 6410,3Hz.

Utilizou-se solução de 80 μ L contendo 17,1mg de ácido maléico, de metanol deuterado, e a mesma em um tubo de inserção coaxial que foi utilizado na quantificação de todas as apreensões.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização de *No-D NMR* para identificar a cocaína e seus adulterantes

A técnica de *No-D NMR* permite a não utilização de solvente deuterado para dissolver as amostras fazendo com que o custo de solvente diminua consideravelmente. Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros para uma nova metodologia:

- a) *Shimming*;
- b) “Ganho”;
- c) Medida do tempo de relaxação longitudinal T1;
- d) Pulso de excitação;
- e) Tempo de repetição;
- f) Desacoplador de ^{13}C ;
- g) Pontos no domínio do tempo;
- h) Resolução digital;
- i) Técnicas de supressão de solvente;
- j) Número de scans (ns)
- k) *Line broadening (lb)*;
- l) *Zero filling* (preenchimento com zeros);
- m) Correção de fase;
- n) Correção de linha de base.

Antes de realizar a otimização devemos conhecer as características da amostra em estudo. A região espectral dos hidrogênios aromáticos é a que permite melhor distinção entre a cocaína e seus adulterantes. A FIGURA 6, demonstra uma boa qualidade espectral com a utilização de metanol comercial, vista na expansão dos sinais dos hidrogênios aromáticos, como também é obtido com metanol deuterado. Para visualizar os sinais referentes a cocaína, quando dissolvida em metanol comercial, é necessário fazer expansão das regiões espectrais, pois os sinais dos hidrogênios do metanol e da água estão em uma concentração muito maior do que da cocaína.

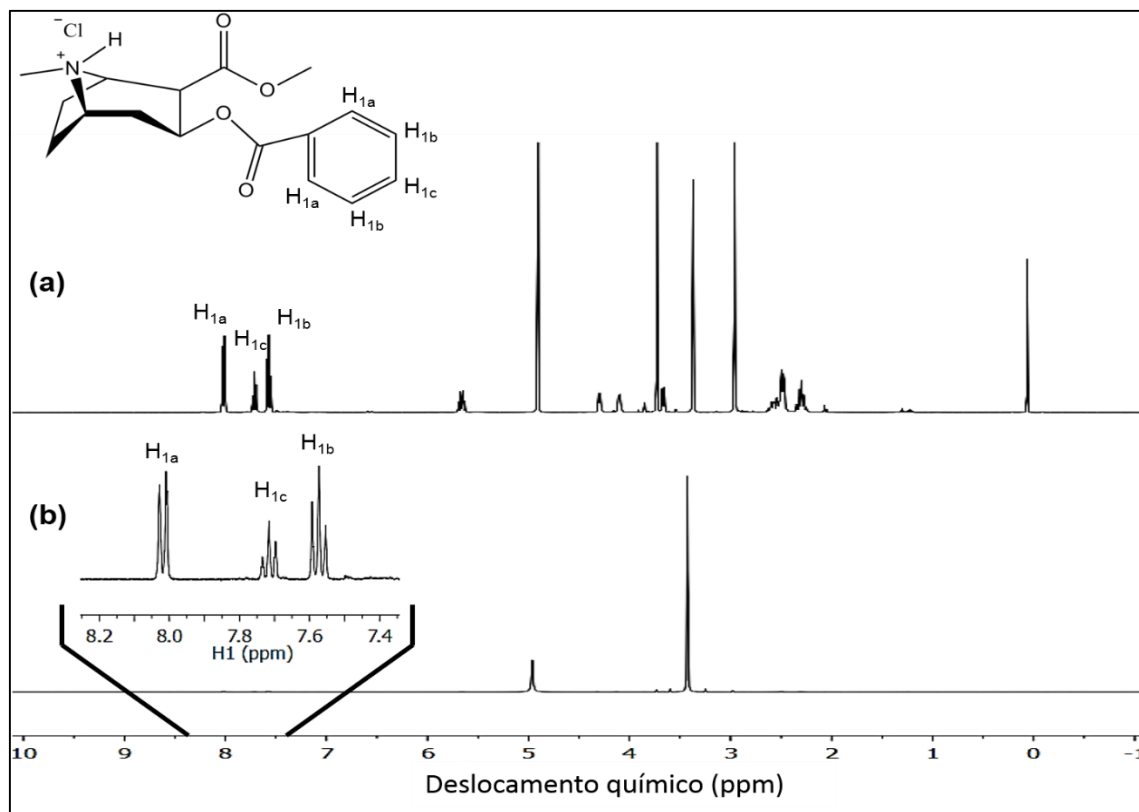


Figura 6. Espectro de hidrogênios para o padrão de cocaína, (a) dissolvida em metanol deuterado e (b) dissolvida em metanol comercial com expansão dos sinais dos hidrogênios aromáticos.

Os sinais na região dos aromáticos utilizados para identificar a cocaína e seus principais adulterantes estão representados na FIGURA 7. Por informações prévias fornecidas para este trabalho, é sabido que os principais adulterantes encontrados nas apreensões de cocaína no Estado do Espírito Santo são: cafeína, lidocaína e fenacetina.

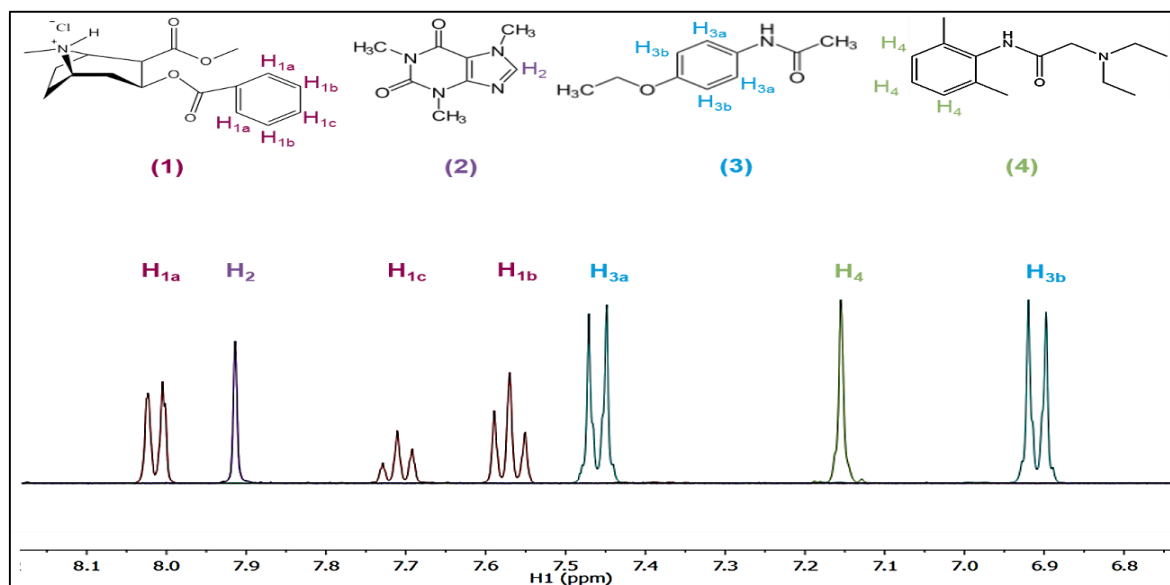


Figura 7. Expansão da região de aromáticos dos espectros de ^1H NMR para cocaína (1), cafeína (2), fenacetina (3) e lidocaína (4).

A cocaína possui três sinais na região de hidrogênios aromáticos; um dubleto em 8,02 ppm que refere-se aos hidrogênios H_{1a} e que acoplam com o hidrogênio H_{1b}; o tripleto em 7,71 ppm que representa um hidrogênio (H_{1c}) que acopla com dois hidrogênios H_{1b} e por fim o tripleto em 7,57 ppm que representa os hidrogênios H_{1b} que estão acoplados com os hidrogênios H_{1a} e H_{1c}.

A cafeína possui um hidrogênio (H₂) com deslocamento químico em 7,92 ppm; a fenacetina possui dois pares de hidrogênios equivalentes onde os hidrogênios H_{3a}, em 7,46 ppm, que acoplam com os hidrogênios H_{3b}, com deslocamento químico em 6,91 ppm. A lidocaína possui um sinal com deslocamento químico 7,15 ppm que representa três hidrogênios equivalentes (H₄).

A metodologia de *No-D NMR* perde resolução ao se comparar com a RMN convencional, não permitindo assim identificar acoplamentos (J) pequenos, mas a importância dela para este trabalho é o deslocamento químico e a integração dos sinais que não são afetados.

Tendo o conhecimento dos sinais que estamos estudando e a quem eles correspondem, pode-se passar a otimizar os parâmetros da *No-D NMR*.

A sequência de pulso é uma série de pulsos de radiofrequência (RF) ou pulsos de gradiente de campo. São usados para manipular os spins nucleares para obter o *FID*, de tal forma que este responda as necessidades do usuário da técnica de ressonância quanto ao ambiente químico a que esses spins estão submetidos, permitindo assim elucidação estrutural, identificação de componentes de mistura, quantificação, etc. A sequência de pulso utilizada neste trabalho foi do tipo *delay-pulso-aquisição* (d1-pw-Aq, respectivamente, FIGURA 8) que é a mais recomendada para o estudo do deslocamento químico de hidrogênios por ser uma sequência simples e rápida.³³

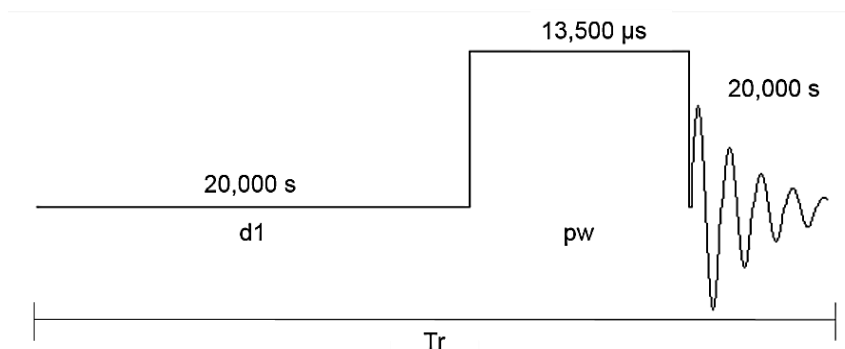


Figura 8. Sequência de pulso de ^1H .

➤ **Shimming;**

O primeiro parâmetro otimizado foi o *shimming*, que é a correção de inhomogeneidades do campo magnético B_0 . As inhomogeneidades criam distorção dos sinais ou formas inapropriadas no topo dos sinais. Esta correção se dá por bobinas, instaladas na sonda (*probe*), geradoras de pequenos campos magnéticos que irão somar-se ou subtrair-se com o campo magnético externo B_0 , tornando-o homogêneo em curto espaço dentro do espectrômetro.

As metodologias de *shimming* citadas por Hoyer et. al. (2004b)²¹ foram testadas, porém não se mostraram individualmente satisfatórias. Apenas quando se utilizou tubo de inserção coaxial contendo solvente deuterado e realizou-se *lock* e *shimming* automáticos, se obteve um espectro com boa resolução. Com a metodologia utilizando tubo de referência e utilizando *shimming* obtido e salvo previamente, sendo este considerado ótimo para a amostra, não obteve-se distinção adequada dos sinais no espectro de ^1H , o mesmo possuía distorções nos sinais da cocaína que não permitiram identificar esses sinais em relação aos sinais da literatura.³ A melhora do *shimming* utilizando o *FID* da amostra e utilizando o espectro se mostraram muito demoradas não atendendo o intuito de fazer com que essas análises se tornem rotina experimental.

➤ **Ganho;**

O ganho também foi otimizado. É um parâmetro utilizado para amplificar os sinais em relação ao ruído. O modo automático foi utilizado para que fosse possível

estabelecer os valores de ganho que o equipamento ajustaria, para uma amostra sem solvente deuterado. Este modo forneceu valores de 0-3.

Valores próximos de “0” como 1, 2 e 3 podem ser realizados para algumas amostras, porém não para todas. Caso um desses valores seja setado manualmente para uma amostra que o valor correto seria “0” pode ocorrer a queima do filtro utilizado para o ganho.

O valor de “0” (zero) foi determinado o melhor, para que a interface do espectrômetro não fornecesse a informação “ganho máximo excedido”. Esta mensagem é informada pelo software do equipamento após cada tentativa do modo automático de ajustar o ganho. Cada tentativa de ajuste de ganho aumenta o tempo do experimento.

➤ Medida do tempo de relaxação T_1 ;

Em seguida, avaliou-se o T_1 dos sinais do espectro de ^1H da mistura de padrões. A medição do tempo de relaxação longitudinal (ou spin-rede), T_1 , é um dos processos mais importantes para utilizar a RMN como um método quantitativo.

A medição do T_1 pode ser realizada pela sequência de pulso denominada Inversão-Recuperação (INVREC), FIGURA 9, que consiste na aplicação de um pulso de 180° sobre o sistema, invertendo a magnetização resultante, e após a espera de um tempo δ , um pulso de 90° é aplicado, provocando o deslocamento da magnetização resultante para o plano transversal, FIGURA 10, após esse novo pulso a magnetização resultante retorna ao eixo Z originando assim o FID. Com baixos tempos δ o espectro, FIGURA 11, possui intensidades negativas e com tempos longos intensidades positivas. O valor de T_1 informado para cada sinal é o tempo necessário para que sua intensidade seja nula em um dos espectros obtidos pela INVREC.

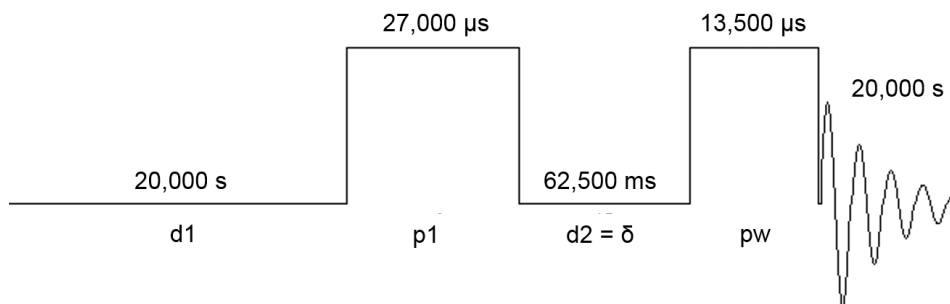


Figura 9. Sequência de pulso INVREC.

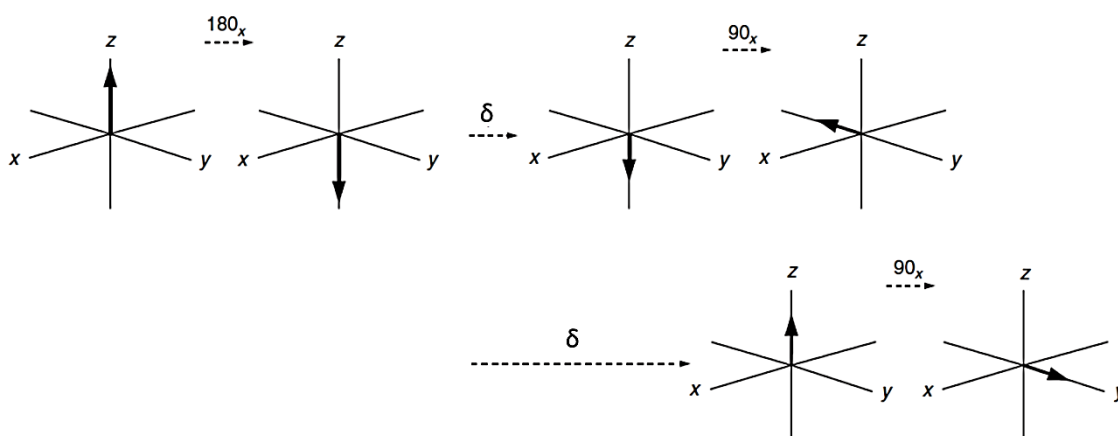


Figura 10. Rotação da magnetização resultante, M_0 , sob a influência de INVREC.

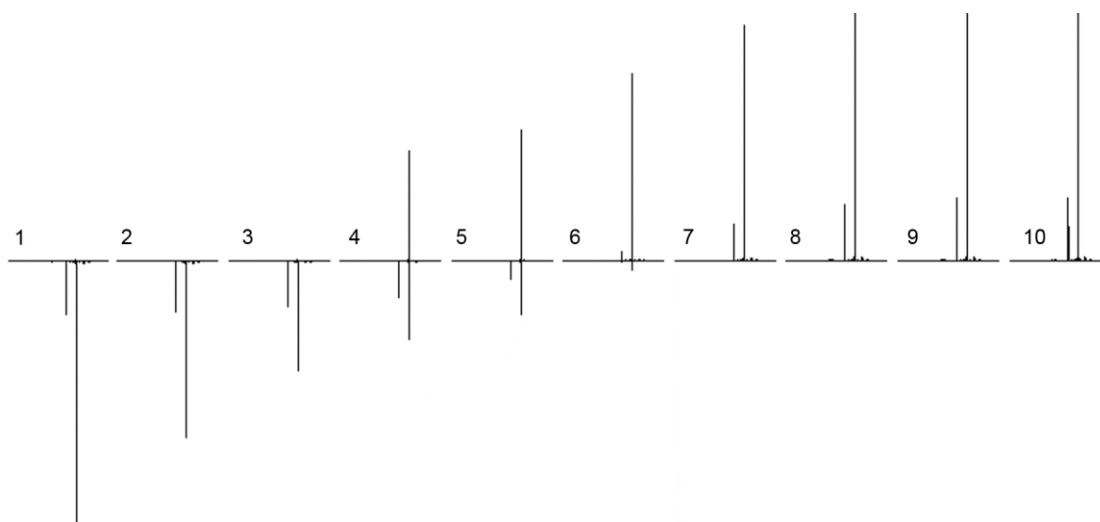


Figura 11. Varredura de tempos δ pela sequência INVREC.

O T_1 foi mensurado para a SOLUÇÃO III e SOLUÇÃO IV. Foram encontrados os valores de 3,34s para solubilização em metanol comercial, que é menor do que aquele para a amostra dissolvida em metanol deuterado que foi de 5,09s. Isto significa que os experimentos em *No-D NMR* podem ser adquiridos com um tempo de análise menor do que a RMN convencional.

Ressalta-se que estes valores de T_1 foram encontrados para o sinal da cafeína em 7,92 ppm, pois, segundo o método INVREC, este é o sinal que necessita de maior tempo para realizar a relaxação spin-rede. Ao dizer que uma amostra possui um valor de T_1 não quer dizer que todos hidrogênios possuem um mesmo tempo de relaxação mas que o maior tempo gasto para esse processo é o valor do T_1 .

A TABELA 3 mostra os valores de T_1 dos deslocamentos químicos para a região dos hidrogênios aromáticos, FIGURA 12, para a mistura em solvente comercial e solvente deuterado.^{19,35}

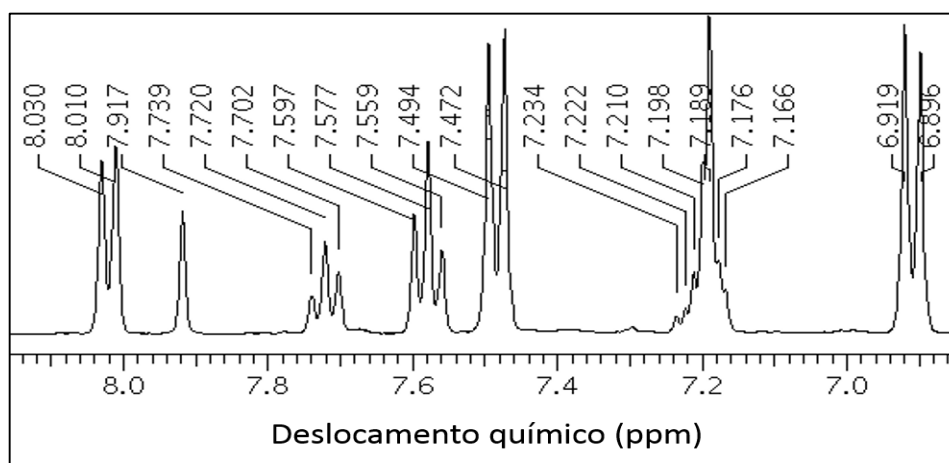


Figura 12. Expansão da região de hidrogênios aromáticos e seus deslocamentos químicos em evidência. (Separação decimal americana)

Tabela 3. Valores de T_1 para metanol comercial e deuterado para os hidrogênios aromáticos.

Substância	Deslocamento químico (ppm)	T_1 metanol comercial (s)	T_1 metanol deuterado (s)
COCAÍNA	8,030	2,324	2,880
	8,010	2,353	2,828
CAFEÍNA	7,917	3,339	5,094
	7,739	2,414	3,073
	7,720	2,278	2,736
COCAÍNA	7,702	2,333	2,888
	7,597	1,986	2,340
	7,577	1,969	2,331
	7,559	1,937	2,323
FENACETINA	7,494	2,165	3,253
	7,472	2,170	3,274
LIDOCAÍNA	7,234	2,234	2,864
	7,222	2,117	2,705

LIDOCAÍNA	7,210	2,003	2,422
	7,198	2,139	2,608
	7,189	2,125	2,579
	7,176	2,139	2,732
	7,166	2,005	2,528
FENACETINA	6,919	2,052	2,491
	6,896	2,057	2,497

➤ Calibração do pulso de 90°;

O ângulo do pulso de RF foi analisado. O ângulo do pulso corresponde ao tempo de aplicação de uma RF, de amplitude definida, a qual irá realizar um torque sobre M_0 . Sabe-se que um pulso de 90° corresponde a um deslocamento total de M_0 para o plano perpendicular ao B_0 , o que resultará em um FID com intensidade máxima.

A calibração do pulso é usualmente realizada com uma varredura de tempos de aplicação da RF próxima ao dobro do valor setado para o parâmetro *pw90* do equipamento. Isto permite, pela visualização do espectro, identificar o tempo necessário para que não obtenhamos o FID, pois exatamente a 180° a magnetização resultante estará contrária ao campo magnético não permitindo assim que obtenhamos o FID, pois este é detectado no plano transversal e uma magnetização à 180° não possui componente no plano transversal.

Esta forma é utilizada pois a identificação do espectro com intensidade máxima, pulso de 90°, é muito difícil de ser realizada, pois as variações de próxima a ele são mínimas, FIGURA 13.

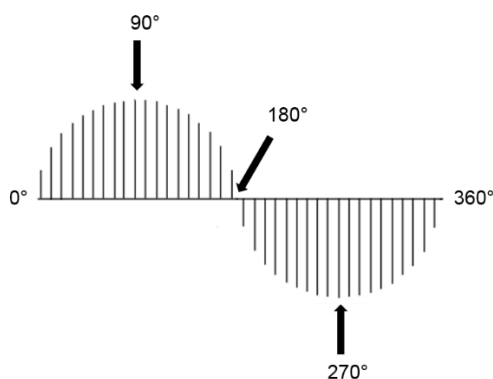


Figura 13. Resultado do array para pw.

Sabendo-se o tempo necessário para o pulso de 180°, basta dividir o valor de tempo por 2 (dois) para que tenhamos o valor necessário para termos um pulso de 90°. O valor encontrado neste trabalho para o pulso de 90° foi de 14,64µs.

➤ Tempo de repetição (Tr);

O tempo de repetição (Tr) foi um dos parâmetros otimizados para a *No-D NMR*. O Tr é o tempo total para que se possa adquirir um espectro. Pela sequência de pulso utilizada o Tr é dado por:

$$Tr = D1 + Aq + Pulso$$

onde D1 é o *delay* ou tempo de espera, Aq é o tempo de aquisição do FID e Pulso é o tempo de aplicação do pulso de RF. Como o tempo do Pulso, em microssegundos, é muito menor do que D1 e Aq, estes dados em segundos, podemos desprezá-lo na fórmula do Tr. O Tr é então função do *delay* e do tempo de aquisição, sendo que para avaliar os melhores valores de ambos foram utilizadas as proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1 para os valores de 1xT₁ à 9xT₁ conforme o ANEXO 1.

A partir dos 81 espectros de hidrogênios obtidos com as proporções do ANEXO 1, pôde-se perceber que os parâmetros *delay* e tempo de aquisição são muito importantes para adquirir espectros de hidrogênio. Tempos de repetições sugeridos como ideais (5 à 7xT₁) possibilitam a aquisição de espectros com truncamento do FID, que são os casos das proporções 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1 para 5xT₁; 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1 para 6xT₁ e 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1 para 7xT₁. Esse truncamento pode acarretar na perda de sinais importantes em um espectro e/ou em intensidades que não representam a realidade da amostra.

Levando em consideração o menor Tr sem truncamento do FID, teria-se para 4xT₁ na proporção 1:9 (1,336s: 12,024s) o tempo ideal para essa metodologia, sendo esse o único abaixo de 5xT₁ que não possui truncamento. A não utilização das proporções para 4xT₁, 5xT₁ e 6xT₁ é devido à porcentagem de retorno de magnetização resultante após cada Tr. A fórmula, a seguir, é utilizada para determinar essa porcentagem:

$$\frac{M_z}{M_0} = (1 - e^{-T_r/T_1})$$

onde M_z é a magnetização resultante que retornou ao eixo Z; M_0 é a magnetização resultante inicial; Tr é o tempo de repetição e T_1 é o tempo de relaxação transversal (spin-rede). Pela fórmula temos no intervalo de $4 \times T_1 - 7 \times T_1$, como valores de Tr , uma porcentagem de 98,17 – 99,91% de retorno para cada *scan* realizado, FIGURA 14.

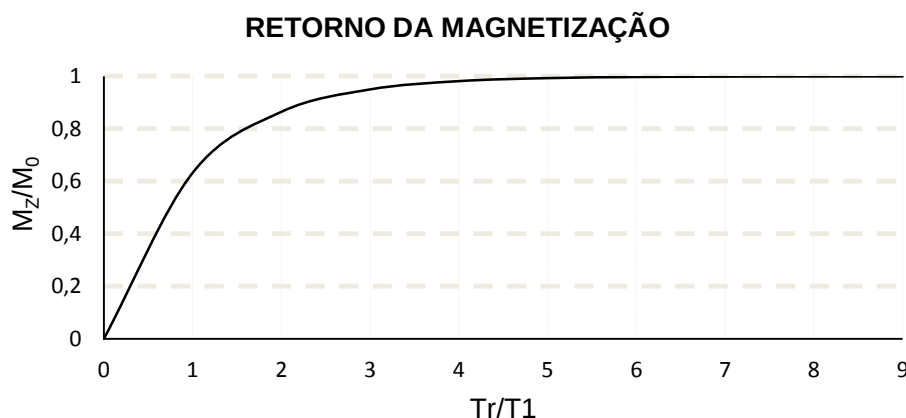


Figura 14. Retorno de M_0 em relação ao tempo de repetição. (Adaptado de CLARIDGE, 2009)

Assim, o valor considerado ótimo para essa metodologia é o de $7 \times T_1$ na proporção 1:9 (2,338 : 21,042). Esta proporção nos fornece um espectro sem truncamento do *FID* e um retorno de magnetização mínimo de 99,909% para cada *scan* realizado, TABELA 4, que possui um erro total de $\approx 0,729\%$ na identificação do sinal da cafeína, pois são realizadas 8 *scans*, ou seja, o Tr é realizado 8 vezes. Cada sinal possui uma porcentagem diferente.

A TABELA 4 mostra os tempos de relaxações para os sinais que são as referências para identificar a cocaína e os adulterantes, FIGURA 8. Avaliando estes resultados vemos que mesmo após 8 *scans* o erro é muito baixo para a cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina.

Tabela 4. Valores de T_1 e o retorno da magnetização dos sinais de hidrogênios aromáticos para cada Tr realizado, sendo utilizado $7 \times T_1$ para *No-D NMR*.

Substância	ppm	T_1 (s)	$M_z / M_0 \times 100(\%)$
COCAÍNA	8,030	2,324	99,996
	8,010	2,353	99,995
CAFEÍNA	7,917	3,339	99,909
COCAÍNA	7,739	2,414	99,994
	7,720	2,278	99,997
	7,702	2,333	99,996

	7,597	1,986	99,999
	7,577	1,969	99,999
	7,559	1,937	99,999
FENACETINA	7,494	2,165	99,998
	7,472	2,170	99,998
	7,234	2,234	99,997
LIDOCAÍNA	7,222	2,117	99,998
	7,210	2,003	99,999
	7,198	2,139	99,998
	7,189	2,125	99,998
	7,176	2,139	99,998
	7,166	2,005	99,999
	6,919	2,052	99,999
FENACETINA	6,896	2,057	99,999

➤ Desacoplador de ^{13}C ;

O desacoplamento de carbono-13 remove os sinais referentes a acoplamentos entre hidrogênios e carbonos. Quando comparados os espectros, com acoplamento e sem acoplamento, não notou-se diferença nas intensidades, nas áreas dos sinais e em nenhum aspecto visual dos espectros.

➤ Pontos no domínio do tempo (TD);

O *FID* é um espectro em função do tempo devido a ser proveniente do decaimento do sinal captado pelo aparelho de ressonância quando os spins nucleares relaxam, assim o próprio espectrômetro registra o *FID* a partir de pontos oscilantes no tempo. O número de pontos no domínio do tempo (TD) é um parâmetro a ser otimizado porém os espectrômetros atuais já variam o número de pontos com a alteração dos valores de tempo de aquisição tornando-se assim desnecessário essa otimização.³³ O valor de 21,042s, para tempo de aquisição, resultou na quantidade de 8K para TD.

➤ Resolução digital;

Um outro parâmetro otimizado é a resolução digital dada por:

$$\text{RES} = 1/\text{Aq}$$

onde RES é a resolução digital e Aq é o tempo de aquisição. A resolução para o tempo

de aquisição ótimo deste experimento é de 0,05 Hz/ponto.

A resolução digital informa se há pontos, que definem um sinal, que são advindos de artifícios numéricos para resolução da Transformada de Fourier. Se houver pontos, por exemplo, entre 0,05 Hz de deslocamento do espectro, esses não são pontos considerados reais, e sim imaginários, ou seja, advindos dos artifícios numéricos.

A resolução digital obtida mostra que qualquer sinal que escolhermos possuem pontos originados do *FID*, pois todos os sinais usados para a identificação da cocaína e seus adulterantes possuem mais de 3 pontos que definam os mesmos visto que eles possuem muito uma largura maior do que 0,15 Hz.

➤ Supressão de solvente;

A pré-saturação, FIGURA 15, consiste em uma sequência de dois pulsos, sendo um pulso, longo, de baixa potência usado para saturar a ressonância desejada ou seja, suprimir o sinal do solvente e o outro para adquirir o espectro.

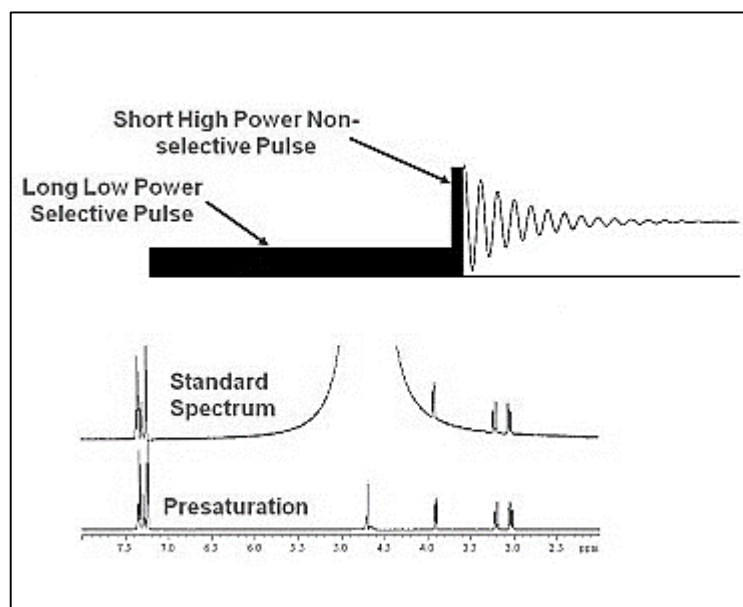


Figura 15. Sequência de pulso PRESAT e o efeito da pré-saturação em um espectro distorcido pela grande quantidade de solvente.

Para se avaliar a supressão de sinais, foram adquiridos espectros de apreensões de cocaína, pois não havia necessidade de usá-la para os padrões devido a qualidade dos sinais obtidos. Percebeu-se problemas de linha de base, conforme mostrado na FIGURA 16, porém este problema não pode ser corrigido pelo ajuste da

linha de base e nem de fase, mas foi resolvido pela pré-saturação do sinal da água próximo à 5ppm. O problema não atrapalhou na identificação dos sinais referentes a cocaína e seus adulterantes, assim o fato de aumentar o tempo total da análise pela pré-saturação não é justificável para um estudo puramente qualitativo.

A quantidade de água influencia na qualidade espectral, assim a utilização de metodologias capazes de remover água do metanol comercial é indicada. Armarego et. al. (2003)³² cita metodologias que são úteis para a retirada parcial ou total da água do metanol comercial podendo ser utilizadas antes do preparo das soluções das apreensões, evitando-se o uso de metodologias de supressão.

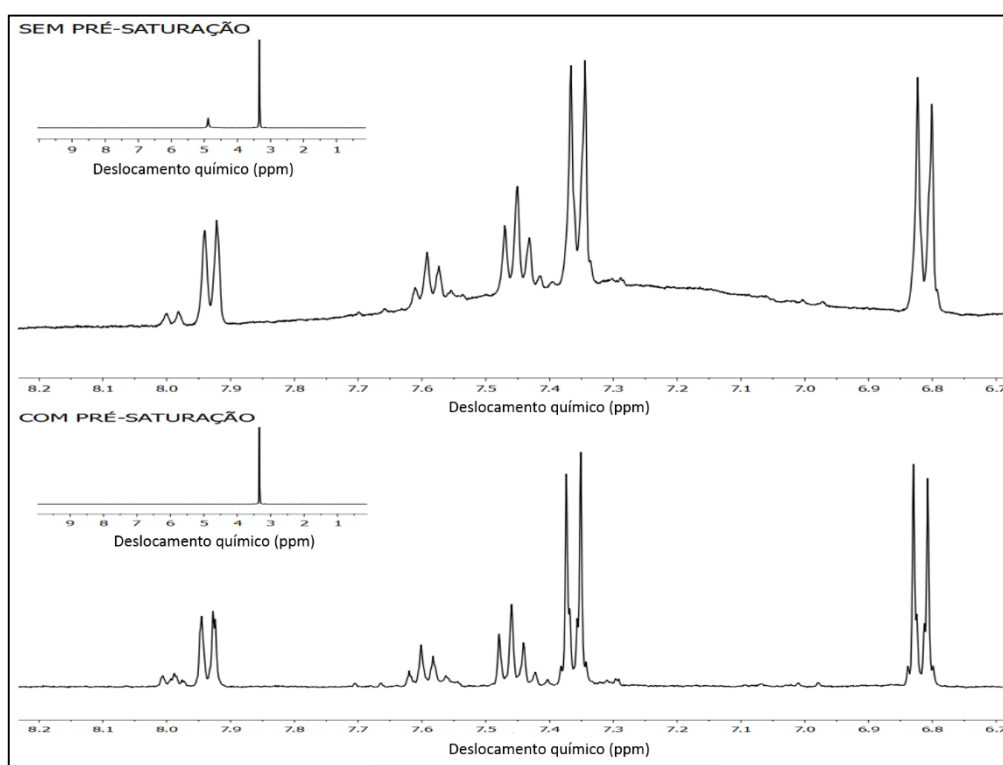


Figura 16. Efeito da pré-saturação em um espectro com distorção.

➤ *Line broadening (lb);*

O *lb* (*line broadening*) é uma técnica de processamento em que se utiliza da multiplicação do *FID* por uma função de decaimento exponencial para que se ganhe em sensibilidade em detrimento da resolução. Para avaliar o efeito do *lb* a Solução III foi diluída 100x. A FIGURA 17, demonstra a melhora drástica na identificação dos sinais com amostra com baixa massa. Percebe-se que é necessário aplicar, no mínimo, $lb = 0,1$ para que se possa identificar os três sinais da cocaína. O aumento do *lb* é acompanhando pelo decréscimo da intensidade do sinal.

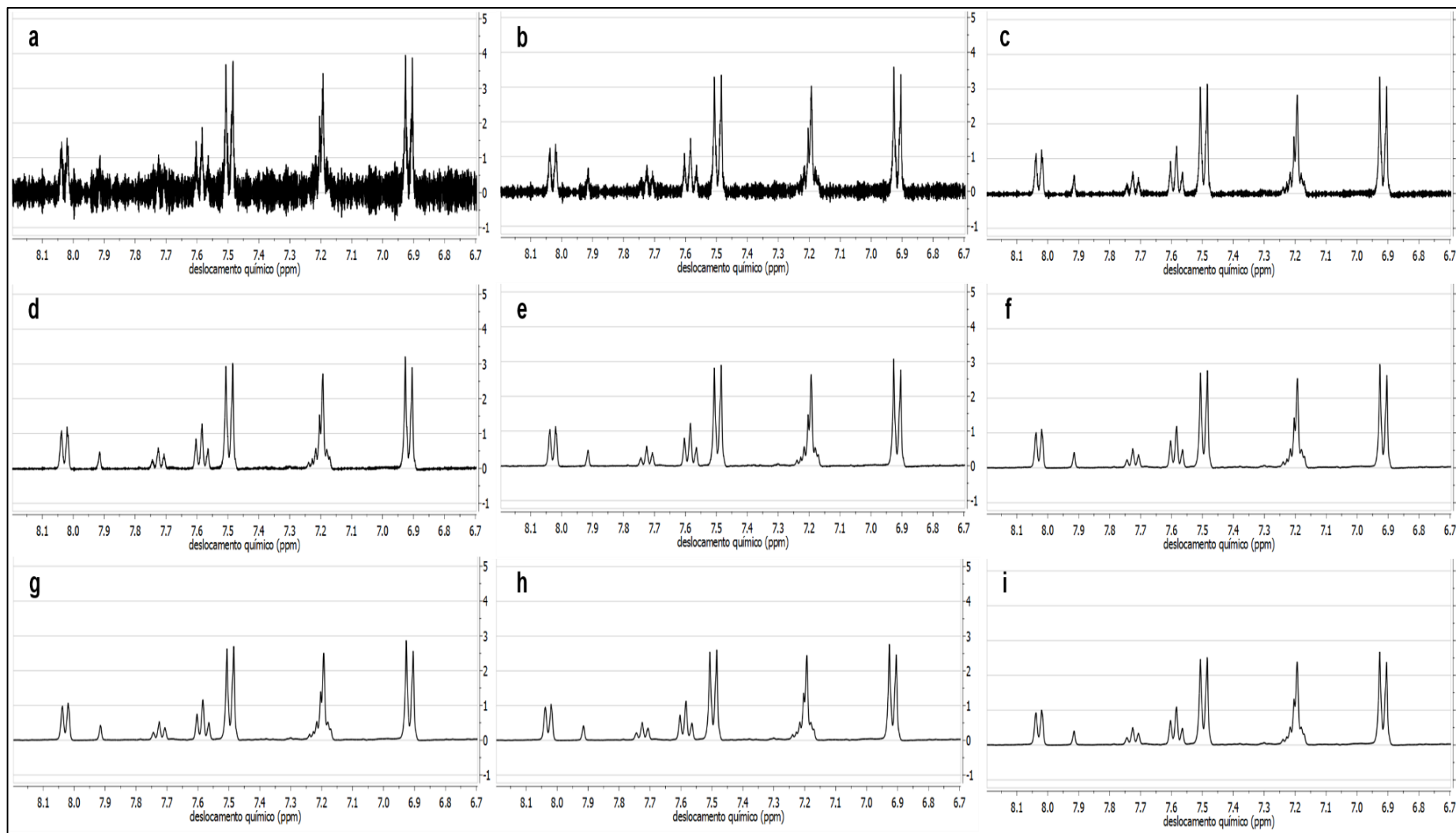


Figura 17. Efeito do lb sobre espectro com pouca massa
 (a – $lb=0$; b – $lb=0,1$; c – $lb=0,2$; d – $lb=0,3$; e – $lb=0,4$; f – $lb=0,5$; g – $lb=0,6$; h – $lb=0,7$; i – $lb=0,8$)

➤ *Zero filling* (preenchimento com zeros);

O preenchimento com zeros (*zero filling*) é o processo pelo qual melhora-se a qualidade do sinal e a relação S/N pela adição ao *FID* de valores determinados de “zeros” (ruídos), geralmente múltiplos inteiros (2x,3x,4x, etc.) da quantidade de pontos em que o *FID* original foi obtido. A adição do ruído influencia diretamente na resolução digital.

$$RES = 1/Aq$$

onde RES é a resolução digital e Aq é o tempo de aquisição. Pode-se notar que, dobrando a aquisição pela adição de zeros, tem-se metade do valor de Hz/pontos fazendo então com que a resolução dobre. A adição dos zeros faz com que não seja necessário o aumento do tempo de aquisição experimental o que é importante, pois diminui o tempo total de análise.

Nessa metodologia não se percebeu melhora qualitativa ou quantitativa nos espectros ao se usar 2x, ao contrário, ocorreu piora qualitativa. Os pontos adicionados geraram distorções por todo o espectro da mistura de padrões, principalmente na região de hidrogênios aromáticos, conforme a FIGURA 18. Não recomenda-se utilizar *zero filling*.

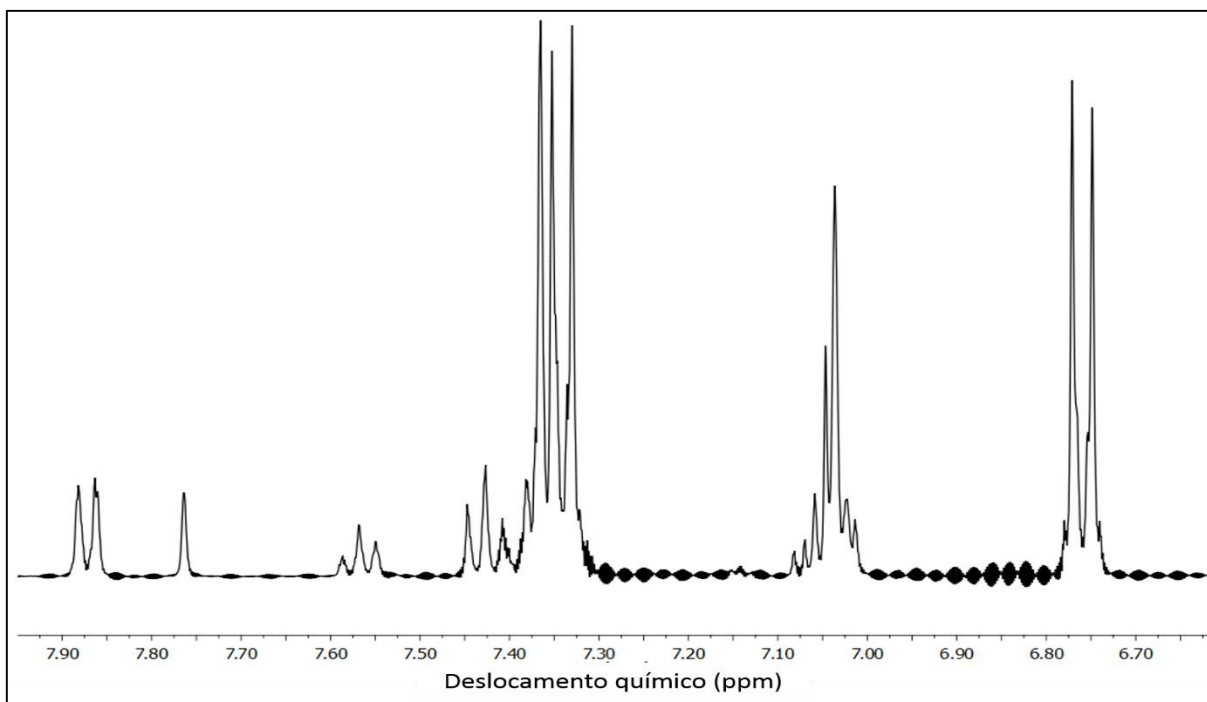


Figura 18. Distorção na região de hidrogênios aromáticos gerada por *zero filling* (2x).

➤ Correção de fase;

A correção da fase é importante principalmente para quantificação em RMN, porém a mesma não pode ser realizada automaticamente para a *No-D NMR*. Todos os espectros obtidos por esta metodologia possuem problema de fase que não se consegue resolver em determinadas regiões espectrais, principalmente próximo ao sinal do metanol, FIGURA 19. Este é o fator pelo qual a correção automática não funciona, porém a região de hidrogênios aromáticos pode ter sua fase corrigida, se necessário, manualmente.

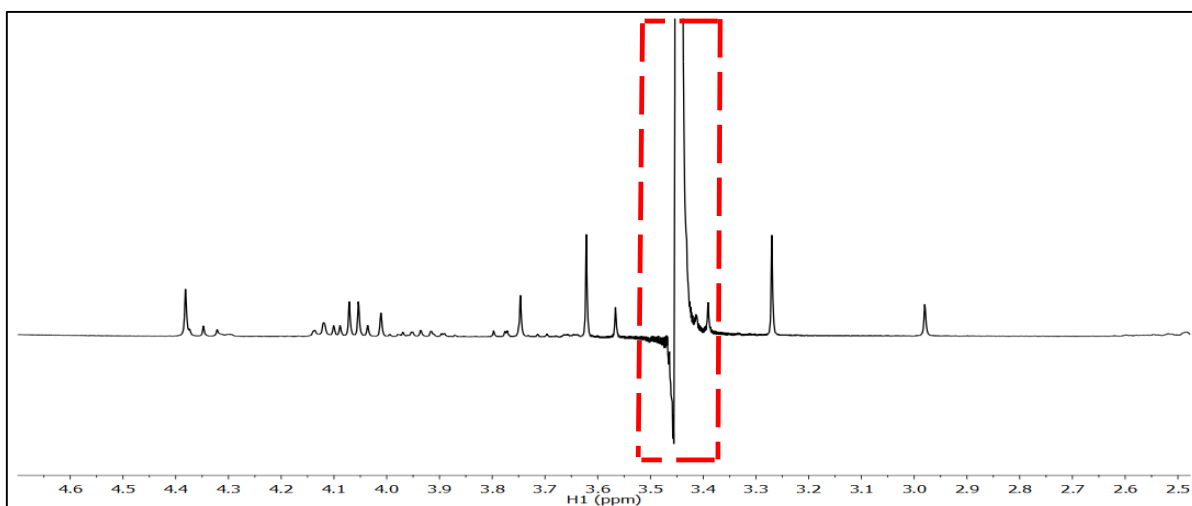


Figura 19. Espectro com destaque ao problema de fase no sinal do metanol.

➤ Correção de linha de base;

A correção de linha de base foi avaliada. A correção automática se mostrou rápida, no software utilizado, diferentemente das correções manuais. A automatização foi suficiente para alinhá-los, fazendo assim com que o tempo de processamento diminua pois em alguns casos a realização manual é demorada. A FIGURA 20, mostra como é importante a correção da linha de base para a integração dos sinais. As integrais a seguir são referentes a dois hidrogênios e um hidrogênio da cocaína, da esquerda para direita, respectivamente. A FIGURA 20-a, que é o espectro sem correção da linha de base, possui a relação de integral incorreta, ao contrário da FIGURA 20-b, com correção automática da linha de base.

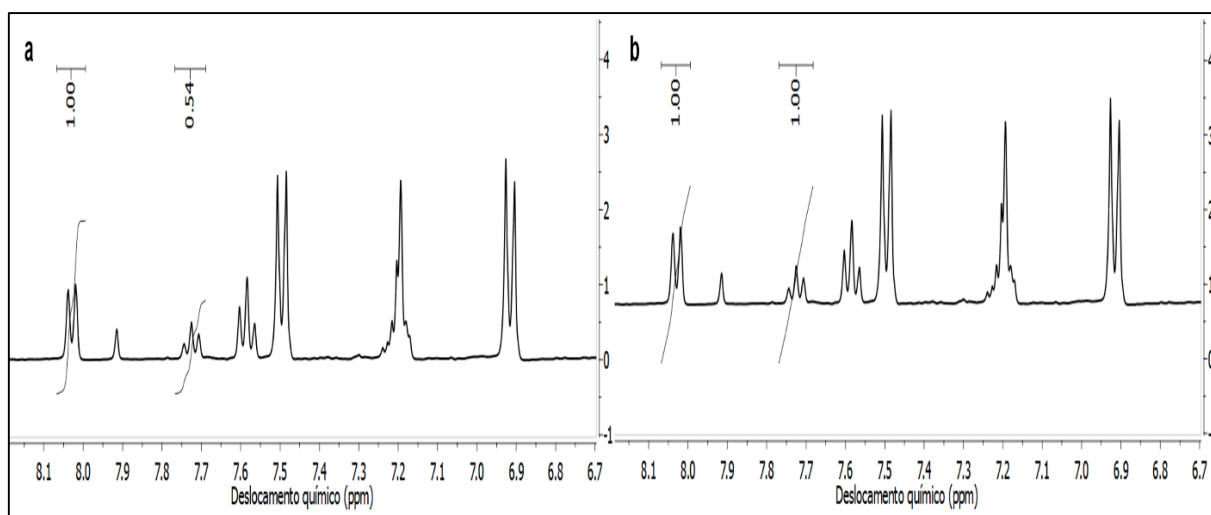


Figura 20. Importância da correção da linha de base para integração (a-integrais em espectro sem correção; b-integrais em espectro com correção)

➤ Aplicação da *No-D NMR* às apreensões de cocaína

A FIGURA 21 mostra dois espectros de uma mesma apreensão de cocaína com expansão na região de hidrogênios aromáticos, onde a FIGURA 21a ilustra o espectro obtido por dissolução em metanol comercial e a FIGURA 21b a dissolução em solvente deuterado. A identificação dos sinais na região dos hidrogênios aromáticos da cocaína (H_{1a} , H_{1b} e H_{1c}) e dos seus principais adulterantes: cafeína (H_2), fenacetina (H_{3a} e H_{3b}) e lidocaína (H_4) não foi prejudicada, onde nota-se a boa qualidade dos espectros demonstrando que as análises de *No-D NMR* podem substituir a RMN convencional na identificação de cocaína e seus adulterantes, podendo auxiliar no estabelecimento das tendências do tráfico de cocaína.

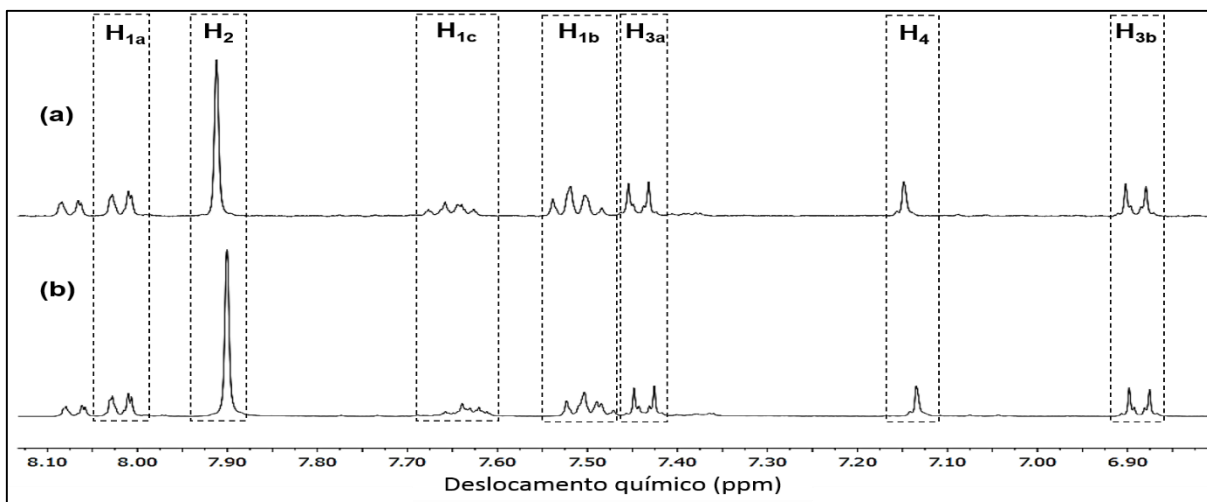


Figura 21. Ampliação da região dos aromáticos de espectros de apreensão de cocaína solubilizada em (a) em metanol comercial e em (b) metanol deuterado.

A FIGURA 22 demonstra outras expansões na região de hidrogênios aromáticos de 12 apreensões de cocaína. Nota-se a diversificação das adulterações e até mesmo apreensão que não possui cocaína. A fenacetina foi o adulterante mais encontrado nas apreensões estudadas sendo este um material que pode auxiliar bastante no estudo de rota de tráfico, pois é um material que não vem sendo comercializado em grande escala, principalmente pelas farmácias de manipulação, por possuir efeitos adversos como danos aos rins e aumento da probabilidade de alguns tipos de câncer.

A FIGURA 22 ainda nos fornece espectros que possuem adulterantes diferentes da cafeína, fenacetina e lidocaína. A presença de paracetamol nas FIGURAS 22-c e 22-g é identificada pelos dubletos em 6,79ppm e 7,36ppm que correspondem a dois pares de hidrogênios aromáticos, cada. O estudo dos sinais do paracetamol está apresentado no próximo subitem deste Resultados e Discussão.

Como mostrado na otimização, ocorre problema na linha de base do espectro na região de hidrogênios aromáticos mas a mesma não interfere na identificação dos sinais. Como o metanol comercial foi utilizado, em todo o trabalho, sob ação de um agente secante, $MgSO_4$, percebe-se que essa metodologia não é suficiente para melhorar a qualidade espectral. A supressão do sinal do solvente ou outras metodologias, prévias, de secagem do metanol devem ser utilizadas para acertar a linha de base.

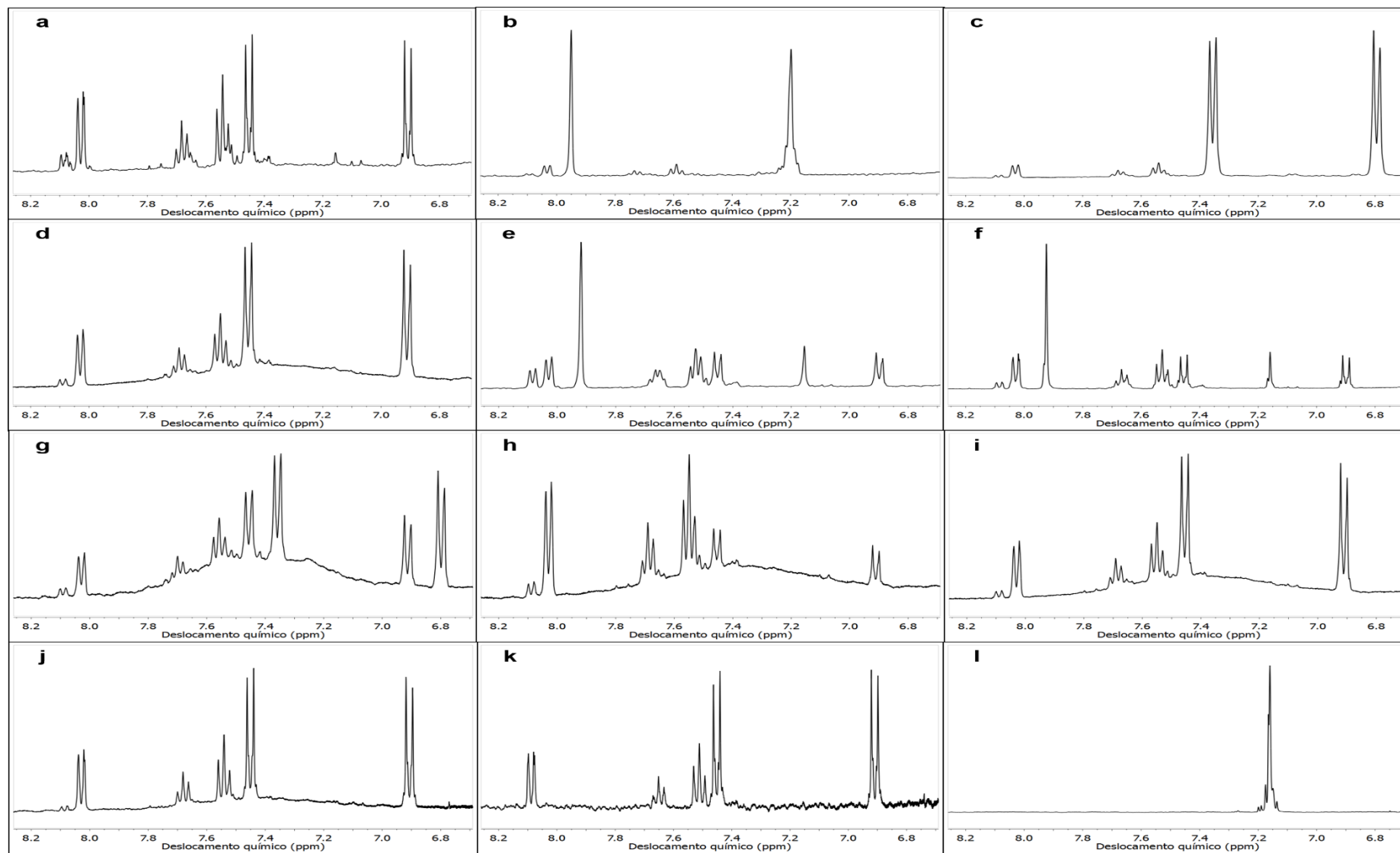


Figura 22. Expansão da região de ^1H aromáticos de apreensões de cocaína.

4.2. Validação e aplicação da metodologia de *No-D NMR* para quantificar cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina

O estudo de quantificação por RMN é considerado um método analítico primário devido não necessitar de padrões de referência do analito de interesse e por que não precisa de uma calibração com uma amostra pura do mesmo material.

O procedimento de quantificação ocorreu com a utilização de padrão interno, para que fosse possível minimizar erros de medida e flutuações devidas a técnica utilizada. Esta metodologia se baseia em adicionar um material de referência sobre as amostras de interesse e então realizar uma relação entre os sinais das amostras e os sinais do material de referência, para isto devemos saber a massa e a pureza da referência. Esta maneira de proceder a quantificação diminui os erros e incertezas das técnicas, pois a referência e os analitos alvos estão submetidos ao mesmo ambiente no mesmo momento quando se obtém o espectro de ressonância.

O material utilizado, como padrão de referência para quantificação, foi o ácido maléico. Um ácido dicarboxílico, insaturado, que possui peso molecular de, aproximadamente, 116g/mol e alta solubilidade em metanol. Possui dois hidrogênios de mesmo ambiente químico, em carbonos sp^2 , sendo assim geradores de apenas um sinal no espectro de 1H . Na FIGURA 23, podemos perceber que não há a presença de sinal advindo dos hidrogênios ácidos.

Como o ácido maléico é adicionado dentro de um tubo de inserção, este pode ser reutilizado para diversas amostras e desta forma não reagindo com as mesmas ele assume a característica fundamental para um estudo quantitativo que é a não reatividade.

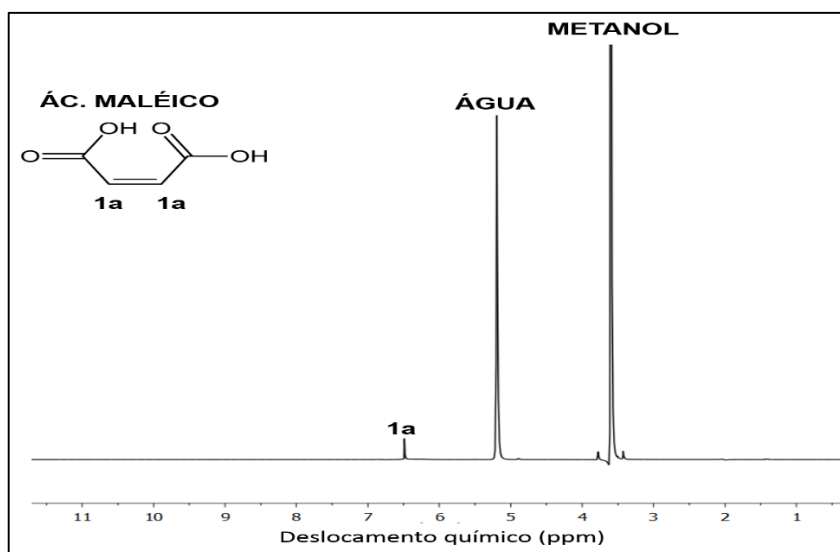


Figura 23. Espectro de *No-D* NMR^1H do ácido maléico.

Qualquer substância que possua sinais distintos e que se saiba a quantos hidrogênios esses sinais representam, pode ser utilizada como referência quantitativa na $q\text{NMR}$, desde que seja solúvel, em quantidade apreciável, no solvente que será usado no tubo de inserção coaxial. Para a $q\text{NMR}$ o importante é que todas as substâncias a serem quantificadas possuam sinais em deslocamento químico diferente dos sinais do material de referência. A sobreposição de um dos sinais, usados para quantificar, leva a uma quantificação equivocada do analito.

A validação do método é a parte mais importante quando avaliamos as respostas oriundas de uma metodologia. Ela representa, através das figuras de mérito, se os resultados obtidos são fieis e reproduzíveis usando as condições empregadas para obtê-los, além de estabelecer limites de uso para a metodologia proposta.

a) Especificidade / Seletividade

A especificidade / seletividade são comprovadas a partir de ensaios das amostras de interesse com impurezas e/ou possíveis interferentes. O estudo foi realizado com a cocaína e os principais adulterantes encontrados nas apreensões brasileiras (cafeína, lidocaína e fenacetina) e demais adulterantes já encontrados em apreensões (paracetamol, ibuprofeno, benzocaína, diclofenaco e hidroxizina).

É importante avaliar se os sinais dos adulterantes também interferem nos sinais do material de referência de quantificação, pois isto faz com que as quantificações

sejam errôneas. Para isto foi usado, em tubo de inserção coaxial, uma quantidade suficiente de ácido maléico que foi reutilizado para todas as misturas.

Conforme mostrado na FIGURA 23 o ácido maléico possui apenas um sinal em 6,40ppm referente a dois hidrogênios.

As FIGURAS 24-27 representam os espectros de hidrogênio referentes as misturas abaixo:

- I. Mistura 1: cocaína, fenacetina, lidocaína e cafeína (FIGURA 24);
- II. Mistura 2: Mistura 1 + paracetamol (FIGURA 25);
- III. Mistura 3: Mistura 2 + ibuprofeno (FIGURA 26);
- IV. Mistura 4: Mistura 3 + benzocaína (FIGURA 27).

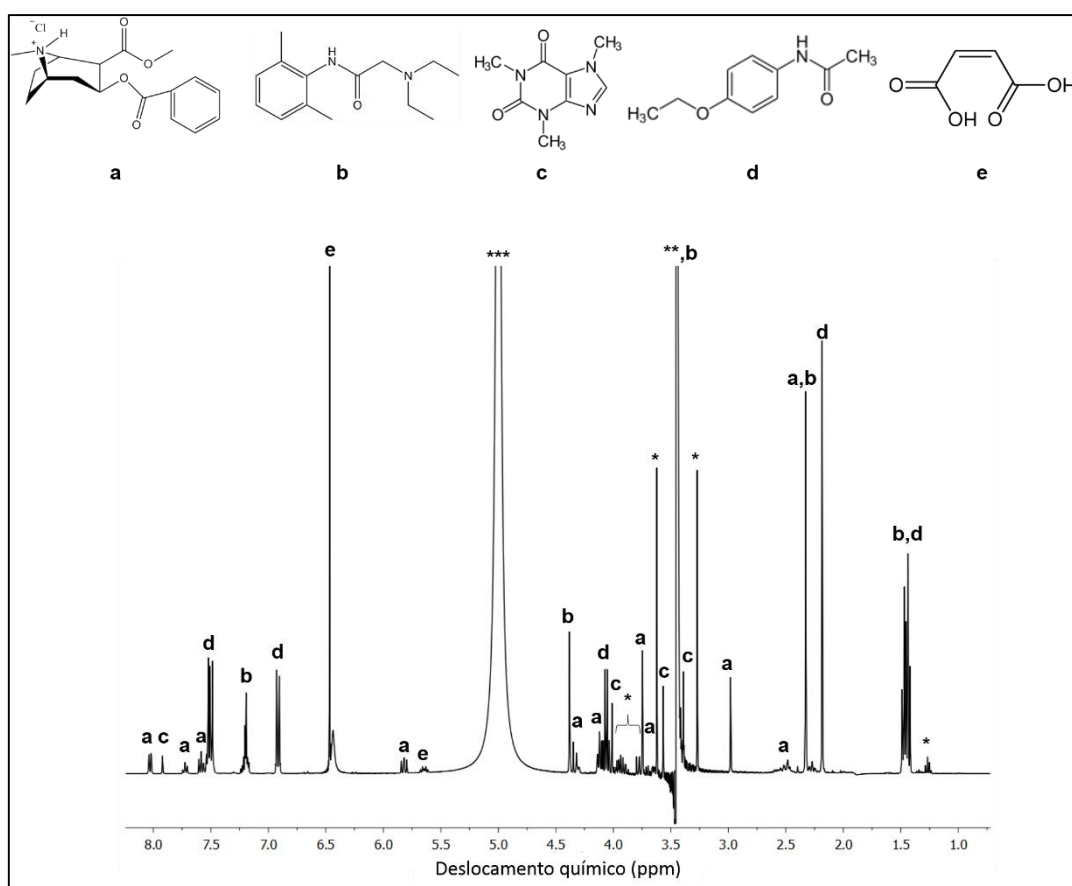


Figura 24. Espectro da Mistura 1. (a-cocaína, b-lidocaína, c-cafeína, d-fenacetina, *-impurezas metanol, **-metanol, ***-H₂O)

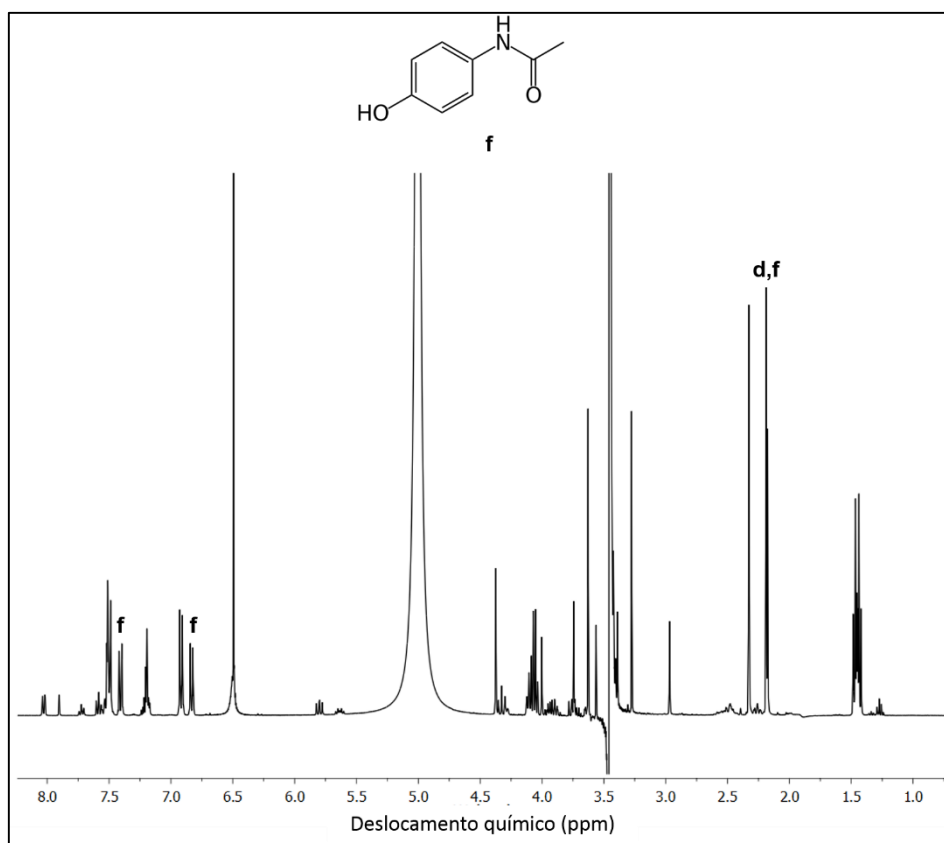


Figura 25. Espectro da Mistura 2: Mistura 1 + paracetamol (f-paracetamol)

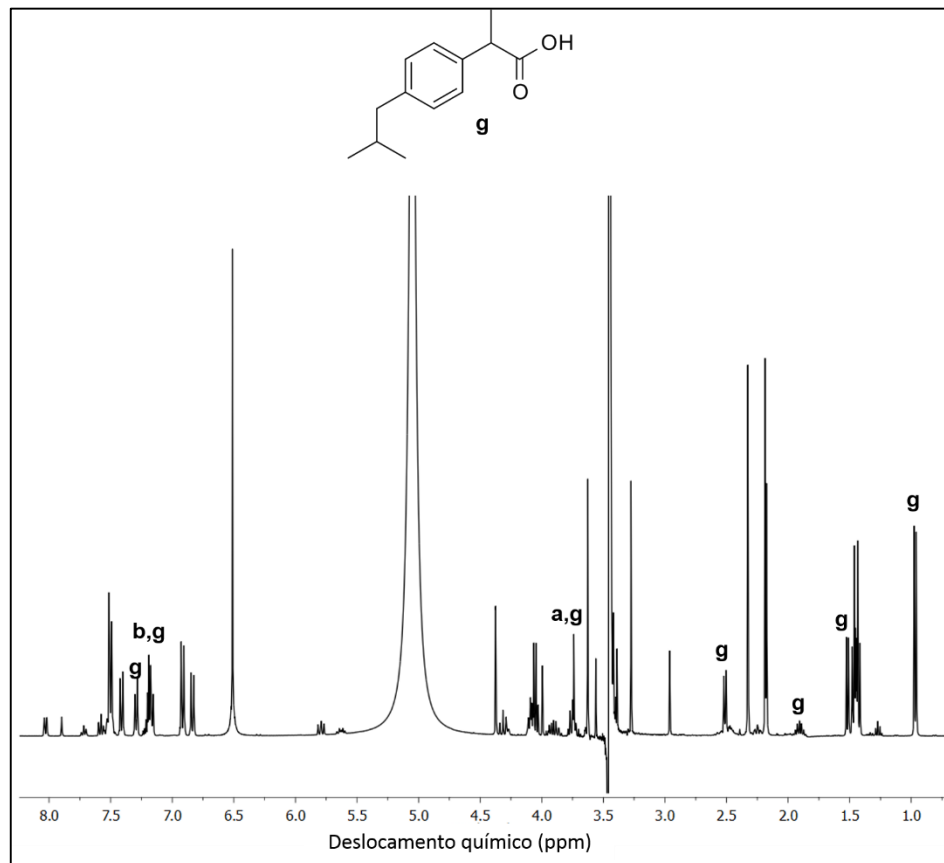


Figura 26. Espectro da Mistura 3: Mistura 2 + ibuprofeno (g-ibuprofeno)

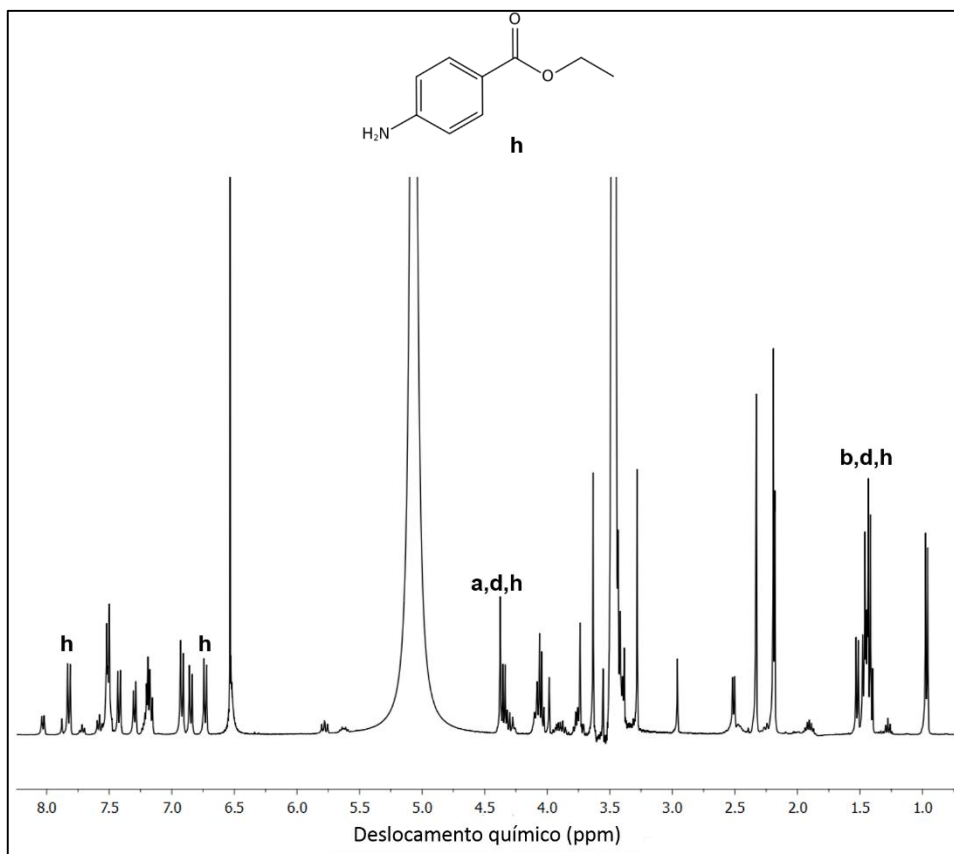


Figura 27. Espectro da Mistura 4: Mistura 3 + benzocaína (h-benzocaína)

Nas Misturas 1 e 2 é possível identificar e quantificar todos os adulterantes através dos sinais da região de hidrogênios aromáticos, pois não ocorreu sobreposição de sinais. A cocaína ainda possui um sinal em 2,98 ppm adequado para realizar a quantificação.

Na Mistura 3 nota-se que o ibuprofeno atrapalha na identificação da lidocaína, pois ocorre sobreposição do hidrogênio correspondente aos três hidrogênios aromáticos da lidocaína em 7,19 ppm. Para quantificar na presença de ibuprofeno é necessário retirar a porcentagem de ibuprofeno no sinal de 7,19 ppm e para isto deve-se seguir os seguintes passos:

- I. Integrar o sinal em 7,19 ppm e o sinal em 7,39 ou o sinal em 0,98 ppm;
- II. Subtrair a integral do sinal em 7,19 pela integral do sinal em 7,39 ou por 1/3 da integral do sinal em 0,98.
- III. Realizar a quantificação em relação ao sinal do ácido maleíco sabendo-se que o sinal da lidocaína corresponde a 3 hidrogênios e o sinal do ácido maleíco corresponde a 2 hidrogênios.

O segundo passo dessa metodologia se dá pelos sinais em 7,39 e em 7,19 ppm corresponderem a dois hidrogênios e em 0,98 ppm corresponder a seis hidrogênios do ibuprofeno. Os demais adulterantes podem ser quantificados diretamente em relação ao ácido maléico.

A Mistura 4 não possui sobreposição nos sinais de hidrogênios aromáticos necessários para quantificar os adulterantes e, caso haja ibuprofeno e lidocaína basta usar os passos descritos anteriormente.

Com isto podemos comprovar que a metodologia de *No-D NMR* é seletiva para cocaína na presença dos adulterantes: cafeína, lidocaína, fenacetina, paracetamol, ibuprofeno e benzocaína, além de permitir a quantificação de todos esses adulterantes.

Todos os estudos realizados, a seguir, são em relação a cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina, pois estes três últimos são os adulterantes mais encontrados nas apreensões de cocaína.

b) Linearidade

É fundamental, para um método analítico, determinar a rampa de concentração para a qual um método pode ser empregado. A linearidade mostra como se dá o comportamento dessa rampa de concentração em relação a uma variável espectral (curva analítica) que, por exemplo na RMN, pode ser a razão entre a integral do sinal do analito de interesse e a integral do sinal do material de referência de quantificação.

Foram usadas curvas analíticas para cada analito de interesse: cocaína, cafeína, fenacetina e lidocaína, conforme a TABELA 5. Cada ponto da tabela corresponde a uma mistura de padrões e foram os espectros dessas misturas que utilizaram-se para avaliar a linearidade. Cada ponto das curvas analíticas vem de um mesmo espectro de mistura, pois assim diminuimos interferências e erros nas curvas. Como o ambiente químico é importante para a RMN essa metodologia de obtenção de pontos, para as curvas analíticas, foi considerada a melhor em detrimento da obtenção convencional, que seria realizar espectros separados para cada ponto e para cada analito.

Tabela 5. Preparo das soluções para a avaliação da linearidade

Pontos	Massa de Cocaína (mg)	Massa de Fenacetina (mg)	Massa de Lidocaína (mg)	Massa de Cafeína (mg)
1	1,00	1,00	1,00	0,25
2	2,00	2,00	2,00	0,50
3	4,00	4,00	4,00	1,00
4	8,00	8,00	8,00	2,00
5	16,00	16,00	16,00	4,00
6	20,00	20,00	20,00	5,00

A massa de cafeína é $\frac{1}{4}$ menor do que as demais devido a solubilidade em metanol. Na prática, percebeu-se que não é possível dissolver mais do que 5,0mg de cafeína em metanol comercial.

Como foi utilizado um Tr de $7 \times T_1$ (7 vezes o valor encontrado para a cafeína), foi necessária uma obtenção de valores de T_1 , adicional à da otimização, devido a presença do ácido maléico nas amostras usadas no estudo de quantificação. Não ocorreu problema com a inserção desta nova substância visto que o seu sinal usado na quantificação, em 6,488ppm, possui um T_1 menor do que o da cafeína. As porcentagens de magnetização, erros intrínsecos do tempo de repetição, para os sinais utilizados no estudo de linearidade estão mostradas na TABELA 6.

Tabela 6. Retorno da magnetização dos sinais de hidrogênios aromáticos.

Substância	Ppm	$M_z / M_0 \times 100(\%)$	Erro (1 scan)	Erro (8 scan)
COCAÍNA	8,030	99,996	0,004	0,032
	8,010	99,995	0,005	0,040
CAFEÍNA	7,917	99,909	0,091	0,728
	7,234	99,997	0,003	0,024
LIDOCAÍNA	7,222	99,998	0,002	0,016
	7,210	99,999	0,001	0,008
	7,198	99,998	0,002	0,016
	7,189	99,998	0,002	0,016
	7,176	99,998	0,002	0,016
	7,166	99,999	0,001	0,008
	6,919	99,999	0,001	0,008
FENACETINA	6,896	99,999	0,001	0,008
	6,488	99,989	0,021	0,168

A FIGURA 28 mostra as integrações realizadas para avaliação da linearidade.

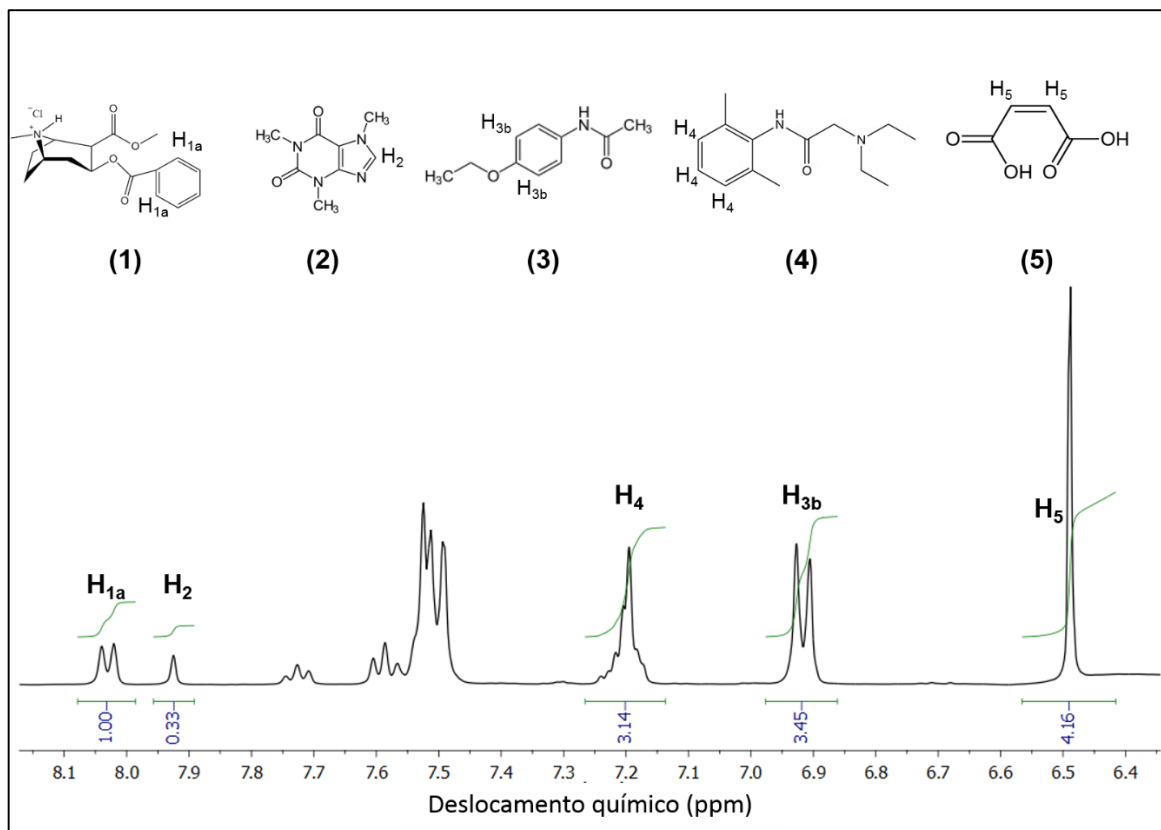


Figura 28. Integrações dos sinais utilizados para o estudo de linearidade

As FIGURAS 29-32 mostram as curvas analíticas da cocaína, lidocaína e fenacetina. Essas foram plotadas como relação entre a razão das integrações (substância de interesse / ácido maléico) e a massa das substâncias de interesse.

A linha de tendência de uma curva analítica é uma reta, logo as equações são dadas pela equação da reta da forma $y = ax + b$ onde a é o coeficiente angular (inclinação da reta) e b o coeficiente linear (interseção com o eixo y).

Segundo Soinninen (2008)²⁹ inúmeros trabalhos obtiveram um $R^2 = 0,999$, este valor sendo o parâmetro usado para avaliar que o método de RMN é linear, ou seja, as integrações são altamente relacionadas com a massa da substância. Todas as curvas abaixo possuem um $R^2 \geq 0,999$ demonstrando que a *No-D NMR* é uma metodologia linear.

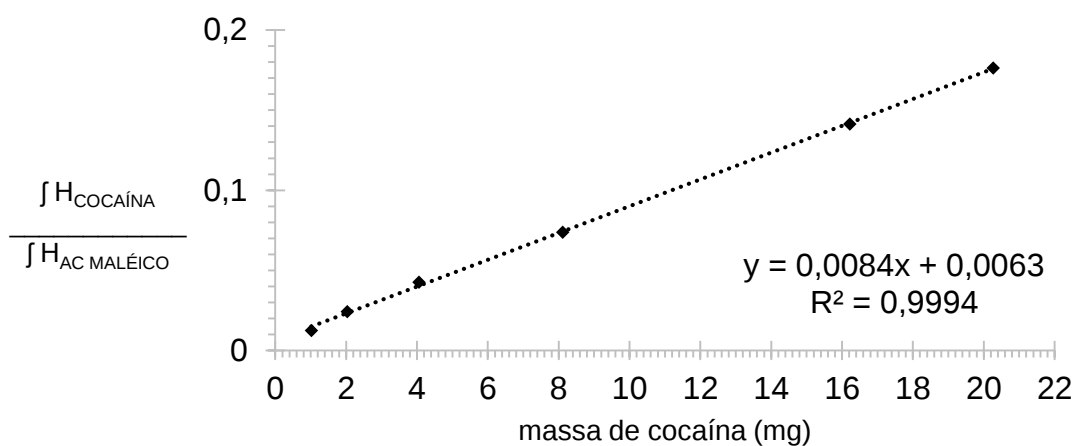


Figura 29. Curva analítica da cocaína

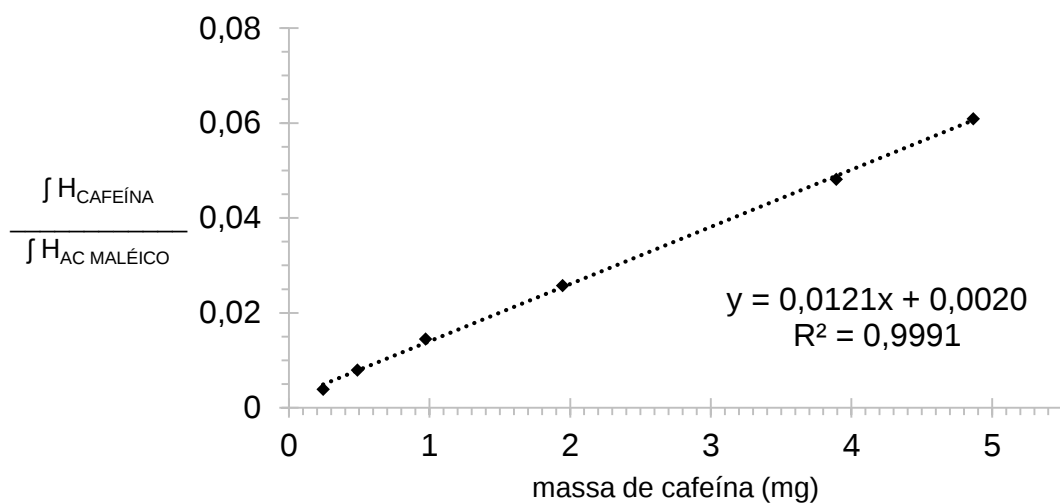


Figura 30. Curva analítica da cafeína.

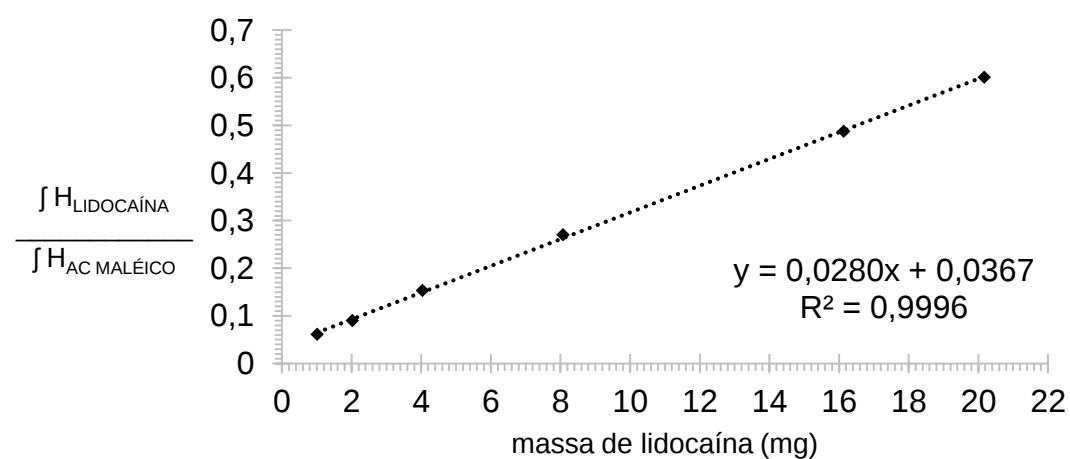


Figura 31. Curva analítica da lidocaína.

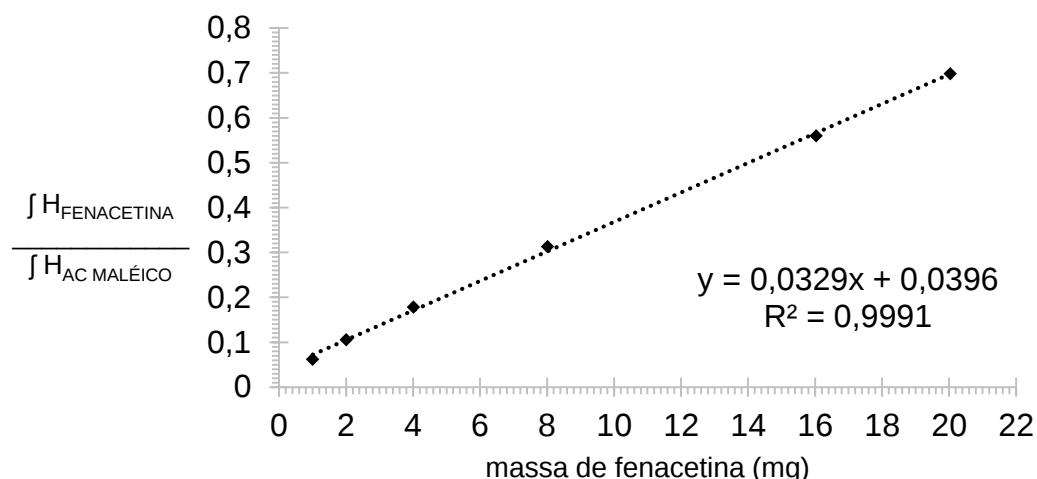


Figura 32. Curva analítica da fenacetina.

c) Limite de Quantificação (LQ)

Normalmente, não há um consenso na forma de determinar os limites de quantificação e detecção, podendo serem obtidos a partir de metodologias visuais, avaliação da relação S/N ou por parâmetros curva analítica (estatística).

A avaliação dos limites pela curva analítica é o método estatístico mais utilizado e é baseado nos parâmetros: desvio padrão e inclinação da curva. As equações são as seguintes:³⁶

$$LD = 3S/\alpha \quad LQ = 10S/\alpha$$

onde S é o desvio padrão do branco ou do coeficiente linear e α é a inclinação da curva analítica.

A determinação usada neste trabalho foi a estatística, na qual utilizamos as equações acima. Como o estudo de linearidade é realizado em triplicata pode-se realizar três curvas analíticas da cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina. As curvas analíticas e os valores obtidos para LD e LQ estão dispostos na TABELA 7.

Tabela 7. Estudo de Limite de Detecção e de Quantificação através das curvas analíticas.

Substância	Equações das curvas analíticas		LD (mg)	LQ (mg)
	Pontos	Média dos Pontos		
COCAÍNA	1. $y = 0,0083x + 0,0059$	$y = 0,0084x + 0,0063$	0,30	1,01
	2. $y = 0,0084x + 0,0074$			

	3. $y = 0,0085x + 0,0056$			
CAFEÍNA	1. $y = 0,0123x + 0,0012$			
	2. $y = 0,0124x + 0,0024$	$y = 0,0121x + 0,0020$	0,17	0,55
	3. $y = 0,0115x + 0,0023$			
LIDOCAÍNA	1. $y = 0,0289x + 0,0307$			
	2. $y = 0,0277x + 0,0391$	$y = 0,0280x + 0,0367$	0,51	1,72
	3. $y = 0,0275x + 0,0403$			
FENACETINA	1. $y = 0,0332x + 0,0351$			
	2. $y = 0,0329x + 0,0375$	$y = 0,0329x + 0,0396$	0,54	1,79
	3. $y = 0,0324x + 0,0463$			

Os valores encontrados de LQ para a Lidocaína e Fenacetina não são considerados muito bons visto que representam cerca de 9% da massa da amostra (20,0mg) e isto se deu pelas grandes diferenças de coeficiente linear entre as curvas, mostrando assim que mesmo com R^2 alto (Lidocaína) não garante bons limites de quantificação.

d) Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão foram obtidas através da análise de espectros de hidrogênio em três níveis de concentração: baixo, médio e alto. Os valores usados para avaliar ambas figuras de mérito foram as concentrações dos pontos 2, 4 e 6, usados na linearidade, porém esses pontos foram analisados em 3 dias consecutivos conforme as TABELAS 8-10.

Tabela 8. Estudo de exatidão para cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina em nível alto de concentração (obs. Concentração em 550µL de metanol comercial).

Concentrações (mg/µL) em nível alto				
	Cocaína	Cafeína	Lidocaína	Fenacetina
Dia 1	0,0371	0,0097	0,0365	0,0367
Dia 2	0,0367	0,0091	0,0365	0,0365
Dia 3	0,0371	0,0095	0,0376	0,0358
Concentração esperada	0,0366	0,0096	0,0369	0,0365
EXATIDÃO(%)	101,00	98,26	99,91	99,54
PRECISÃO(%)	0,62	3,24	1,72	1,30

Tabela 9. Estudo de exatidão para cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina em nível médio de concentração (obs. Concentração em 550µL de metanol comercial).

Concentrações (mg/µL) em nível médio				
	Cocaína	Cafeína	Lidocaína	Fenacetina
Dia 1	0,0149	0,0038	0,0147	0,0146
Dia 2	0,0147	0,0036	0,0147	0,0148
Dia 3	0,0148	0,0038	0,0150	0,0143
Concentração esperada	0,0146	0,0038	0,0148	0,0146
EXATIDÃO(%)	101,37	98,25	100	99,77
PRECISÃO(%)	0,68	3,09	1,17	1,72

Tabela 10. Estudo de exatidão para cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina em nível baixo de concentração (obs. Concentração em 550µL de metanol comercial).

Concentrações (mg/µL) em nível baixo				
	Cocaína	Cafeína	Lidocaína	Fenacetina
Dia 1	0,0039	0,0010	0,0039	0,0037
Dia 2	0,0037	0,0015	0,0033	0,0040
Dia 3	0,0037	0,0007	0,0043	0,0040
Concentração esperada	0,0037	0,0010	0,0037	0,0037
EXATIDÃO(%)	101,80	106,67	85,59	105,41
PRECISÃO(%)	3,07	37,88	13,13	4,44

A exatidão foi calculada pela seguinte equação:

$$EXATIDÃO = \frac{MÉDIA DIAS}{CONCENTRAÇÃO ESPERADA} \times 100$$

A precisão foi calculada por:

$$PRECISÃO = \frac{DESVPAD DIAS}{MÉDIA DIAS} \times 100$$

onde MÉDIA DIAS é a média das concentrações obtidas durante os 3 dias, CONCENTRAÇÃO ESPERADA é a concentração correspondente a massa total dissolvida e DESVAPD é o desvio padrão relativo das concentrações dos dias.

Com exceção à cafeína em nível baixo, nota-se que a metodologia é precisa e exata. Segundo a UNODC (2009)³⁴, isto se dá, pois atende aos requisitos das figuras

de mérito. Para a exatidão os resultados não devem variar mais do que 20% (para mais ou para menos) para as concentrações em nível médio e baixo e 15% (para mais ou para menos) para o nível alto quando comparados com o valor teórico. Já para a precisão os resultados também não devem ser maiores que 20% para as menores concentrações e 15% para as maiores.

Vale salientar que os valores para exatidão maiores que 100%, como 101,00% indica tendência positiva, de por exemplo 1,00%, e aqueles valores menores que 100%, como 98,26%, indica tendência negativa, de por exemplo 1,74%.

➤ QUANTIFICAÇÃO

A quantificação foi realizada em 29 apreensões de cocaína, realizadas na cidade de Vitória. As massas de ácido maleico se demonstraram muito grandes em relação as massas dos adulterantes, conforme a FIGURA 33. A mesma figura demonstra as integrais realizadas para a quantificação da cocaína, fenacetina e ácido maléico sendo essas feitas em prolongamentos de 5x a largura do sinal, para cada lado. A mesma metodologia de integração foi utilizada para todos os espectros das apreensões e para os seus sinais de cocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina e ácido maléico.

A FIGURA 33 possui dois sinais na região de 8,0 à 8,1 ppm, sendo esses correspondentes à cocaína base e ao cloridrato de cocaína, da esquerda para a direita no espectro, respectivamente. Esta afirmativa é baseada nas diferenças entre os espectros da literatura, onde demonstram que os hidrogênios H_{1a} da forma base livre, possui um deslocamento maior. Não foi possível comprovar experimentalmente devido a limitações de materiais.

Para realizar a quantificação da cocaína, as porcentagens de massa das duas formas de cocaína foram somadas.

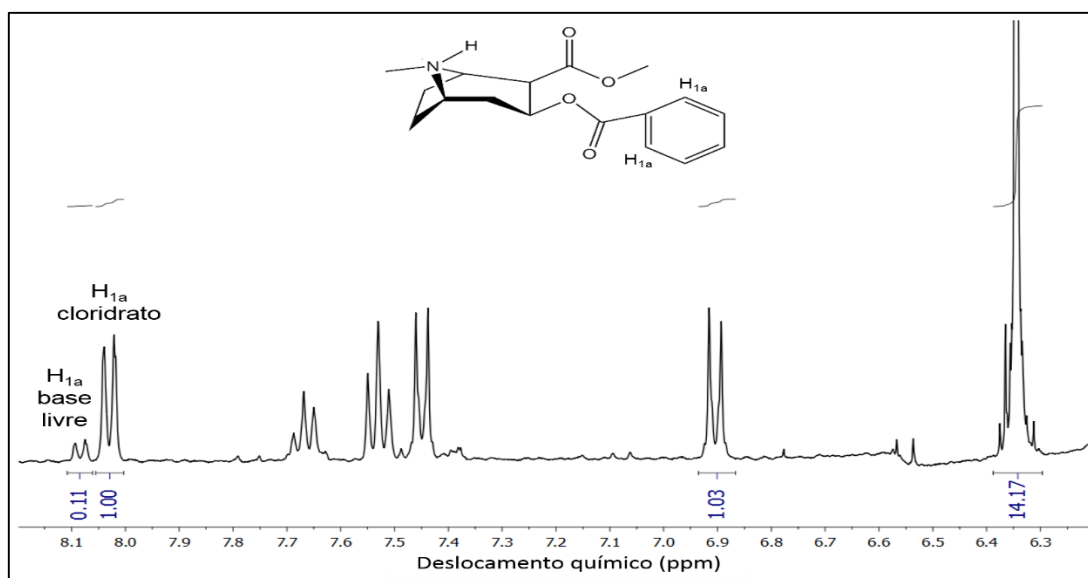


Figura 33. Ampliação da região de ^1H aromáticos para a apreensão 20.

A TABELA 11 representa os resultados das porcentagens encontradas em todas as apreensões e os espectros correspondentes se encontram no ANEXO 2.

Tabela 11. Porcentagem, em massa, de cocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina nas apreensões.

%, em massa, na apreensão				
Apreensão	Cocaína	Cafeína	Lidocaína	Fenacetina
1	12,61	0	0	4,70
2	31,97	0	0	22,82
3	17,00	0	0	0
4	15,61	37,48	4,74	15,48
5	22,52	0	0	0
6	20,01	0	0	0
7	17,00	0	0	6,83
8	36,77	0	0	0
9	5,58	0	0	17,91
10	10,69	0	0	0
11	26,84	0	0	12,63
12	21,70	0	0	0
13	19,99	0	0	0
14	35,74	2,27	0	0
15	13,25	0	1,54	1,36
16	39,12	2,53	0	0
17	21,04	0	0	0
18	26,42	0	0	0
19	15,93	0,52	0	0

20	22,40	0	0	11,08
21	15,68	0	0	2,52
22	38,91	33,97	0	0
23	14,73	0	0	0
24	25,05	0	0	0
25	12,09	0	0	0
26	27,02	18,00	0	0
27	42,60	0	0	13,61
28	16,65	33,30	37,52	0
29	98,58	0	0	0

Os resultados, acima, demonstram que na cidade de Vitória, as amostras de cocaína comercializadas possuem baixa pureza, a porcentagem média de cocaína é de aproximadamente 24%, porém, isso não é devido aos principais adulterantes (caféina, lidocaína e fenacetina). Os espectros das apreensões não demonstravam sinais de outras substâncias como adulterantes, induzindo-nos acreditar que devem estar sendo usados diluentes que não possuem sinal de hidrogênio, como os carbonatos.

Todas as quantificações de cocaína se mostraram acima do limite de quantificação que foi de 1,01mg o que corresponderia à uma porcentagem de aproximadamente 5% das massas utilizadas (20,0mg).

5. CONCLUSÃO

Com a otimização dos parâmetros conseguiu-se estabelecer uma metodologia rápida e eficaz para a identificação da cocaína e seus adulterantes.

As apreensões de cocaína se mostraram bem diversificadas de modo que os adulterantes podem exercer papel chave na identificação da rota do tráfico.

Quando foi realizada a validação do método, conseguiu-se pelas figuras de mérito determinar que os resultados obtidos são fidedignos e correspondem à realidade das amostras.

A cafeína não pode ser quantificada acima de 5,0mg em uma solução de 550 μ L devido a sua baixa solubilidade em metanol, o que pode acarretar em um erro de quantificação.

PROPOSTAS FUTURAS

- Obter espectros de mais apreensões de cocaína, diversificando anos e locais de apreensão para tentar estabelecer redes de distribuição de drogas;
- Realizar outras metodologias de remoção de água do metanol para avaliar a melhor para a *No-D NMR*;
- Avaliar a *No-D NMR* para a cocaína e seus adulterantes em outro solvente;
- Comparar os resultados deste trabalho com outras metodologias usadas nos laboratórios forenses (CG-MS e IV);
- Utilizar a *No-D NMR* para avaliar outras drogas, como as *Designer Drug* (novas drogas sintéticas);
- Estudar a cocaína juntamente com outros adulterantes e diluentes como: levamisol, ácido bórico, entre outros.
- Avaliar se a identificação e a quantificação de cocaína podem ser realizadas em Espectrômetros de Ressonância de bancada (80MHz), que não utilizam solvente deuterado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DOREA, L. E.; STUMVOLL, V. P.; QUINTELA, V.; TOCCHETTO, D.; **Criminalística**. 5ª Ed. Campinas/SP: Millenium Editora, 2012. 334 p.
2. ESPINDULA, A.; VELHO, J. A.; GEISER, G. C. **Ciências Forenses: Uma introdução às principais áreas da criminalística moderna**. 2ª Ed. Campinas/SP: Millenium Editora, 2012. 396 p.
3. SMITH, F. P.; SIEGEL, J. A. **Handbook of Forensic Drug Analysis**. United States: Elsevier Academic Press, 2005. 562 p.
4. OLIVEIRA, M. F.; ALVES, J. Q.; ANDRADE, J. F. de; SACZK, A. A.; OKUMURA, L. L. Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. *Ecletica Quim*, **34 (3)**, 77-83, 2009.
5. ROMÃO, W. R.; SCHWAB, N. V.; BUENO, M. I. M. S.; SPARRAPAN, R.; EBERLIN, M. N.; MARTINY, A.; SABINO, B. D.; MALDANER, A. O. Química Forense: Perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. *Quim. Nova*, **34 (10)**, 1717-1728, 2011.
6. MAGALHÃES, E. J. **Desenvolvimento de Métodos para Quantificação de Drogas em Matrizes de Interesse Forense**. Tese de Doutorado. Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. 126 p.
7. BRASIL, Câmara dos Deputados. **Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas-SISNAD**. 2ª Ed. Brasília: Editora Câmara, 2012. 43 p.
8. 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)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química da Universidade de Brasília, Brasília (GO), 2011. 156 p.
9. CASALE, J. F.; KLEIN, R. F. X. Illicit production of cocaine. *Forensic Sci. Rev.*, **5(2)**, 95-107, 1993.
10. FLORIANI, G. **Desenvolvimento e validação de método por Clae para análise de cocaína, seus produtos de degradação e adulterantes**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012. 80 p.
11. ZACCA, J. J.; BOTELHO, E. D.; VIEIRA, M. L.; ALMEIDA, F. L. A.; FERREIRA,

L. S.; MALDANER, A. O. Brazilian Federal Police drug chemical profiling – The PeQui Project. *Sci. Justice*, **54**, 300-306, 2014.

12. COSTA, R. A. R. **Determinação do grau de pureza de amostras de crack apreendidas no Estado da Paraíba por RMNq-¹H e CLAE-DAD**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), 2012, 120 p.

13. UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2013**. Vienna (Austria): United Nations publication, 2013. 151 p.

14. PAGANO, B.; LAURI, I.; TITO, S. D.; PERSICO, G.; CHINI, M. G.; MALMENDAL, A.; NOVELLINO, E.; RANDAZZO, A. Use of NMR in profiling of cocaine seizures. *Forensic Sci. Int.*, **231**, 120-124, 2013.

15. MALDANER, A. O.; BOTELHO, E. D.; ZACCA, J. J.; VIEIRA, M. L. Gerenciamento de ações voltadas para obtenção de Perfis Químicos de Drogas – Projeto PeQui da Polícia Federal. In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis – SC. Cd-rom de resumos.

16. GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear – Fundamentos, Métodos e Aplicações**. 2^a Ed. Lisboa (Portugal): Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1012 p.

17. NASCIMENTO, C. J.; JUNIOR, C. B. Ressonância Magnética Nuclear: *Gradus Primus. Biotecnologia cienc. desenvolv.*, **21**, 53-61, 2001.

18. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7^a Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. (tradução de ALENCASTRO, R. B. de *Spectrometric identification of organic compounds* (7th ed).

19. CLARIDGE, T. D. W. **NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2^a Ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier, 2009. 399 p.

20. HOYE, T. R.; EKLOV, B. M.; RYBA, T. D.; VOLOSHIN, M.; YAO, L. J. No-D NMR (No-Deuterium Proton NMR) Spectroscopy: A simple yet powerful method for analyzing reaction and reagent solutions. *Org. Lett.*, **6** (6), 953-956, 2004.

21. HOYE, T. R.; EKLOV, B. M.; VOLOSHIN, M. No-D NMR Spectroscopy as a convenient method for titrating organolithium (RLi), RMgX, and LDA solutions. *Org. Lett.*, **6** (15), 2567-2570, 2004.

22. HOYE, T. R.; EKLOV, B. M.; RYBA, T. D.; ASPAAS, A. W. Reaction Titration: A convenient method for titrating reactive hydride agents (Red-Al, LiAlH₄, DIBALH, L-

Selectride, NaH, and KH) by No-D NMR. *Org. Lett.*, **7 (11)**, 2205-2208, 2005.

23. MALZ, F. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis, chapter 2: Quantitative NMR in the Solution State NMR**, (Eds: HOLZGRABE, U.; WAWER, I.; DIEHL, B.). Amsterdam (Netherlands): Elsevier, 2008. 501 p.

24. RUNDLÖF, T.; MATHIASSEN, M.; BEKIROGLU, S.; HAKKARAINEN, B.; BOWDEN, T.; ARVIDSSON, T. Survey and qualification of internal standards for quantification by ^1H NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 645-651, 2010.

25. BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy. *Trends Anal. Chem.*, **35**, 5-26, 2012.

26. BEKIROGLU, S.; MYRBERG, O.; ÖSTMAN, K.; EK, M.; ARVIDSSON, T.; RUNDLÖF, T.; HAKKARAINEN, B. Validation of quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in grapefruit seed extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 958-961, 2008.

27. PAULI, G. F.; GÖDECKE, T.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of an Analytical Method – an Update. *J. Nat. Prod.*, **75 (4)**, 834-851, 2012.

28. MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**, 813-823, 2005.

29. SOININEN, P. **Quantitative ^1H NMR Spectroscopy – Chemical and Biological Applications**. Doctoral dissertation. Department of Biosciences of University of Kuopio, Kuopio (Finland), 2008. 128 p.

30. AL-DEEN, T. S. **Validation of Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) Spectroscopy as a Primary Ratio Analytical Method for Assessing the Purity of Organic Compounds: A Metrological Approach**. Doctoral dissertation. Analytical Department of School of Chemical Sciences of The University of New South Wales, Sydney (Australia), 2002. 332 p.

31. SHAO, G.; KAUTZ, R.; PENG, S.; Cui, G.; GIESE, R. W. Calibration by NMR for quantitative analysis: *p*-Toluenesulfonic acid as a reference substance. *J. Chromatogr. A.*, **1138**, 305-308, 2007.

32. ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. 5th ed. Amsterdam: Butterworth Heinemann, 2003.

33. HOLMES, D. **Basic Practical NMR Concepts**. Handout from the University of Illinois's NMR service facility, Illinois (EUA), 2004. 41 p.

34. UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **Guidance for the**

Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drug in Seized Materials and Biological Specimens. Vienna (Austria): United Nations publication, 2009. 76 p.

35. KOCK, F. V. C. **Monitoramento do Biosorvente Quitosona por Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT) em Emulsões de Petróleo.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES0, Vitória (ES), 2013, 107 p.

36. JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS C. H.; BOTTOLI, C. B. G.; RIBANI, M.; MELO, L. F. C. M. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quim. Nova*, **27 (5)**, 771-780, 2004.

ANEXO 1

Tabela 12. Valores da razão entre d1 e Aq utilizados para a avaliação do Tr.

d1:Aq	1xT1 (s)	2xT1 (s)	3xT1 (s)	4xT1 (s)	5xT1 (s)	6xT1 (s)	7xT1 (s)	8xT1 (s)	9xT1 (s)
1:9	0,334:3,006	0,668:6,012	1,002:9,018	1,336:12,024	1,670:15,030	2,004:18,036	2,338:21,042	2,672:24,048	3,006:27,054
2:8	0,668:2,672	1,336:5,344	2,004:8,016	2,672:10,688	3,340:13,360	4,008:16,032	4,676:18,704	5,344:21,376	6,012:24,048
3:7	1,002:2,338	2,004:4,676	3,006:7,014	4,008:9,352	5,010:11,690	6,012:14,028	7,014:16,366	8,016:18,704	9,018:21,042
4:6	1,366:2,004	2,672:4,008	4,008:6,012	5,344:8,016	6,680:10,200	8,016:12,024	9,352:14,028	10,688:16,032	12,024:18,036
5:5	1,670:1,670	3,340:3,340	5,010:5,010	6,680:6,680	8,350:8,350	10,020:10,020	11,690:11,690	13,360:13,360	15,030:15,030
6:4	2,004:1,366	4,008:2,672	6,012:4,008	8,016:5,344	10,200:6,680	12,024:8,016	14,028:9,352	16,032:10,688	18,036:12,024
7:3	2,338:1,002	4,676:2,004	7,014:3,006	9,352:4,008	11,690:5,010	14,028:6,012	16,366:7,014	18,704:8,016	21,042:9,018
8:2	2,672:0,668	5,344:1,336	8,016:2,004	10,688:2,672	13,360:3,340	16,032:4,008	18,704:4,676	21,376:5,344	24,048:6,012
9:1	3,006:0,334	6,012:0,688	9,018:1,002	12,024:1,336	15,030:1,670	18,036:2,004	21,042:2,338	24,048:2,672	27,054:3,006

ANEXO 2

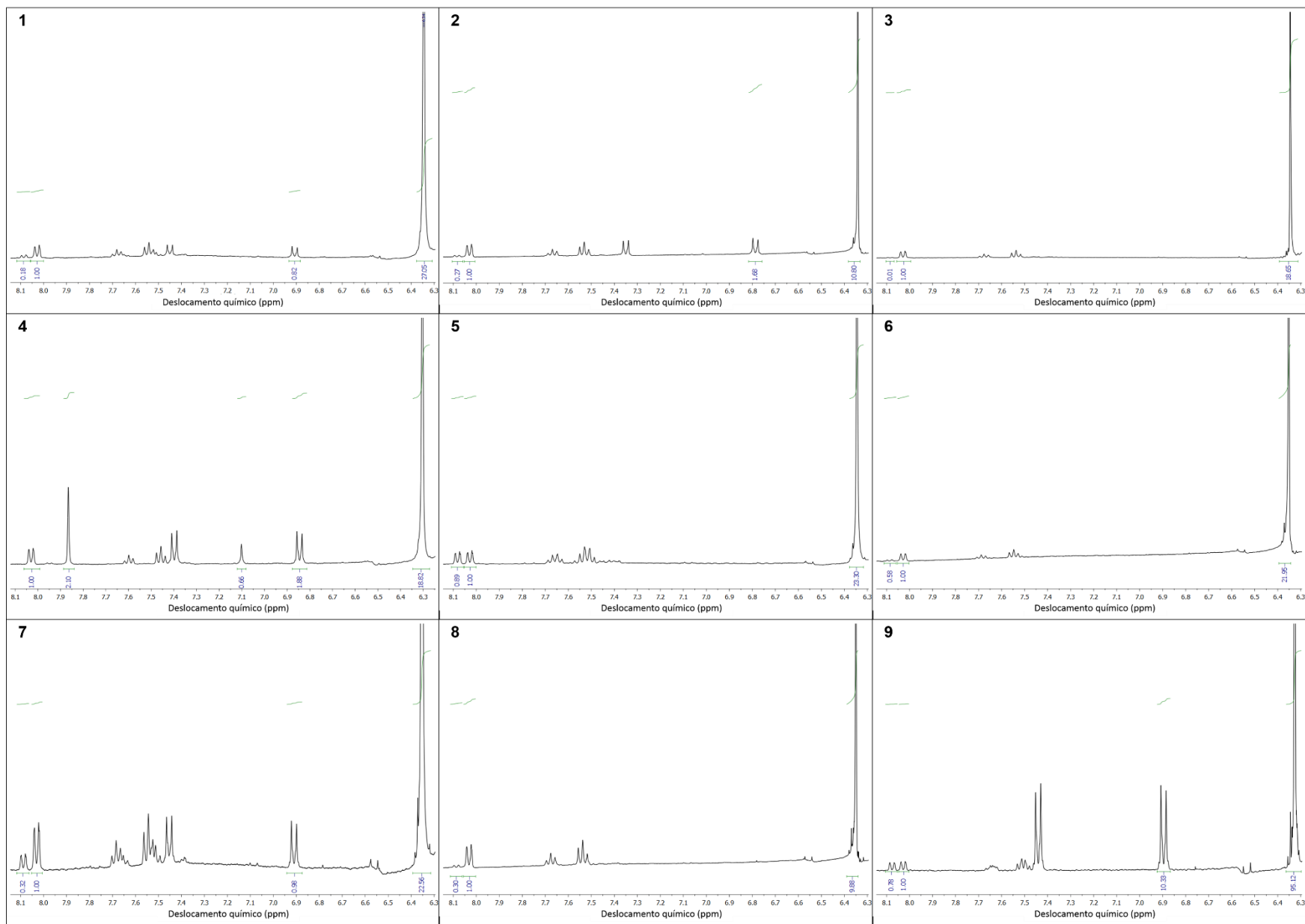


Figura 34. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões de 1-9.

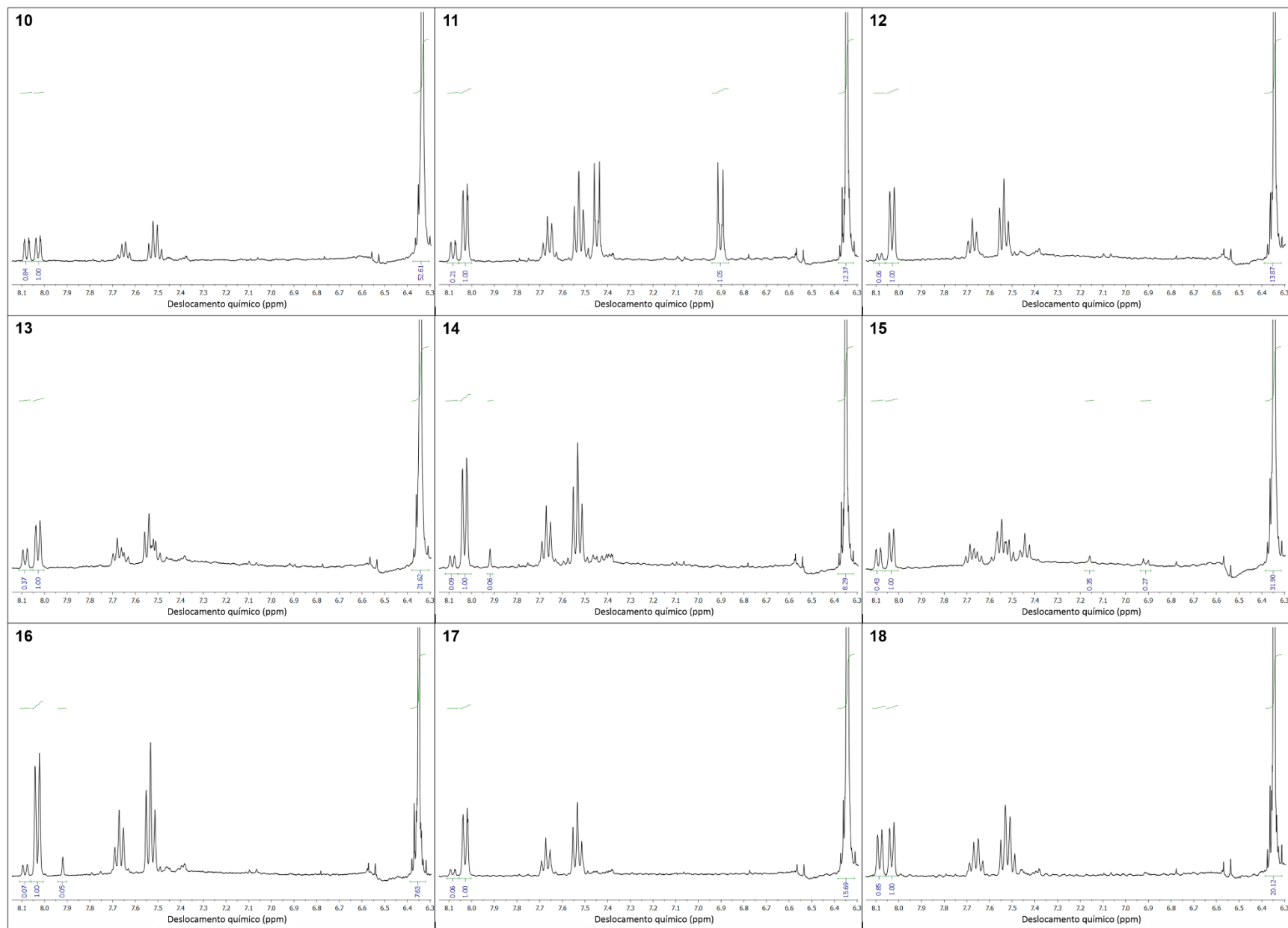


Figura 35. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões de 10-18.

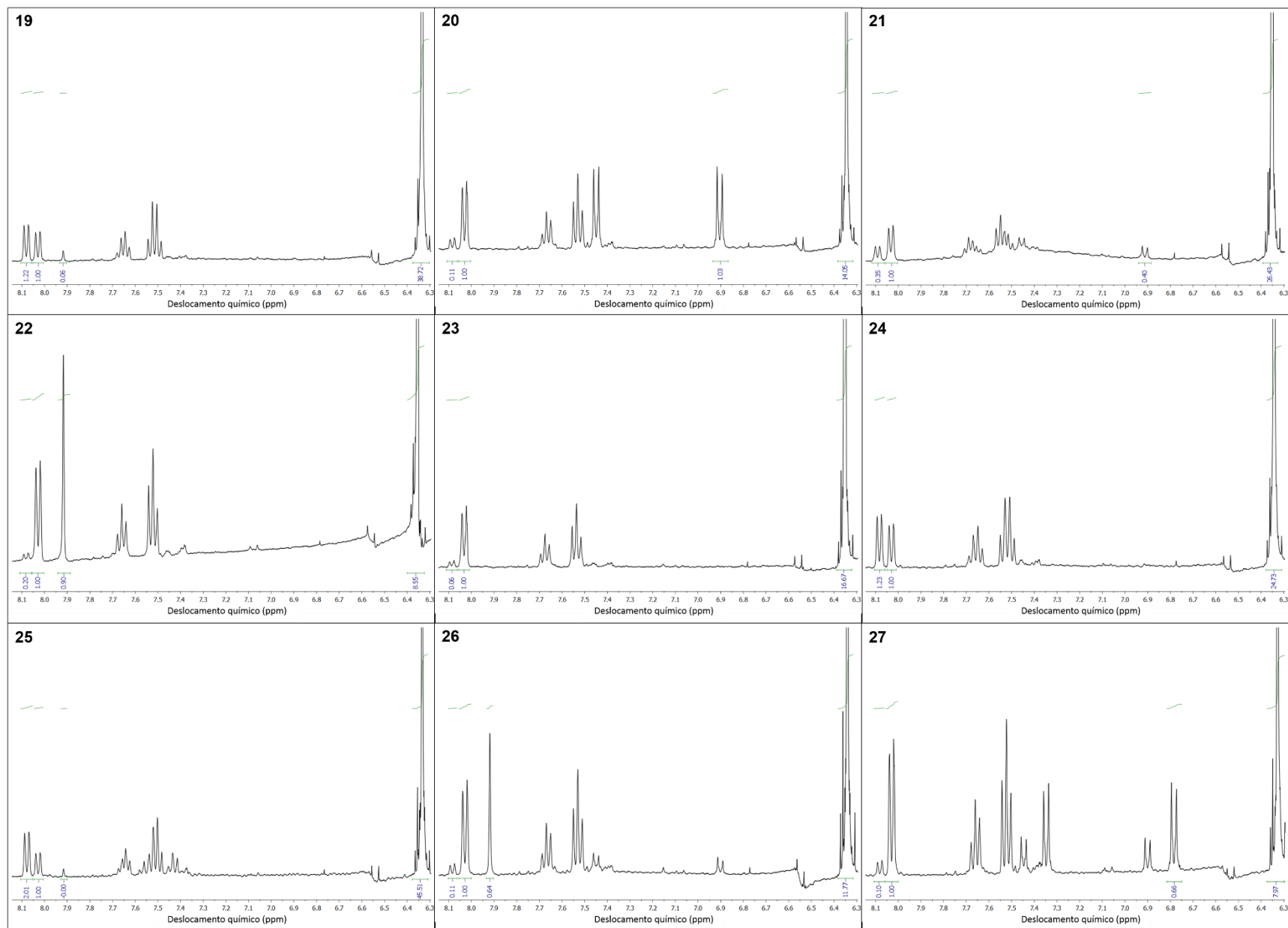


Figura 36. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões de 19-27.

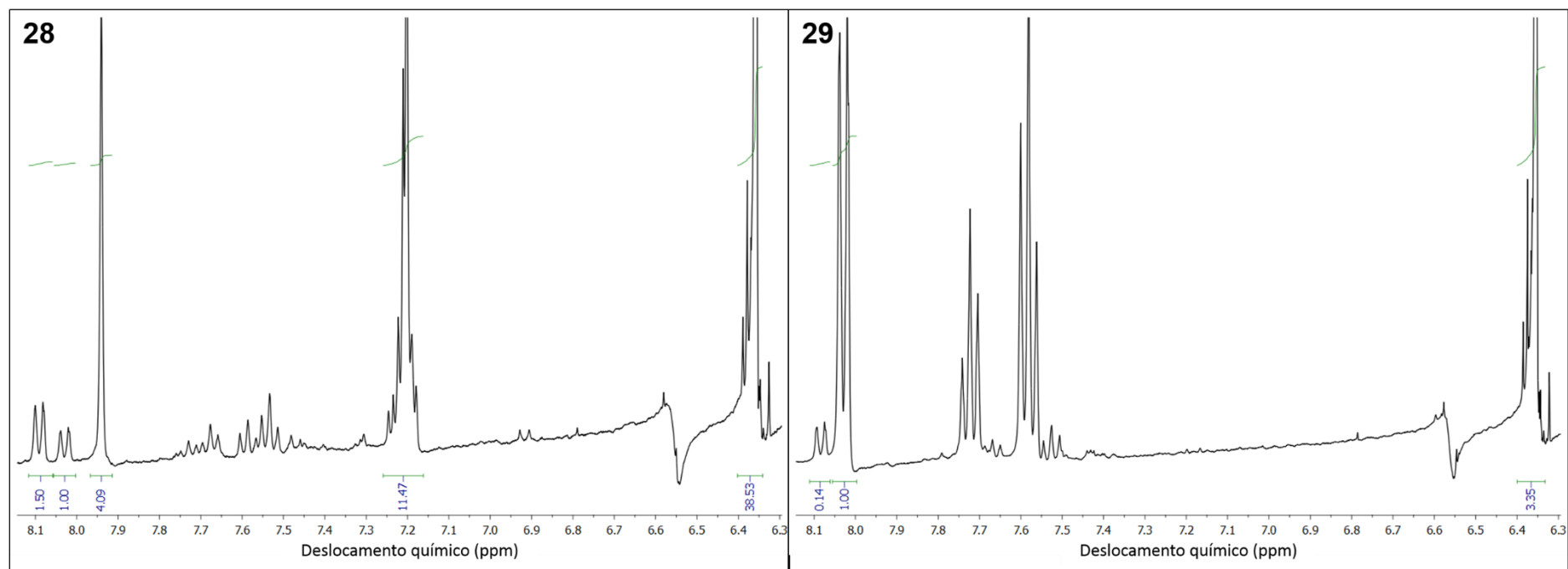


Figura 37. Expansão da região de ^1H aromáticos das apreensões 28 e 29.

