

Melina Heller

DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS E MÃOS USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ELETROFORESE CAPILAR POR DETECÇÃO UV

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química,
Departamento de Química,
Universidade Federal
de Santa Catarina,
como requisito para a obtenção do
grau de Doutor em Química.
Orientador: Prof. Dr. Gustavo
Amadeu Mücke

Florianópolis, SC – Brasil,
2014

Heller, Melina

DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS E MÃOS
USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS E ELETROFORESE CAPILAR POR DETECÇÃO UV / Melina
Heller ; orientador, Gustavo Amadeu Micke - Florianópolis,
SC, 2014.
171 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Métodos de separação. 3. Cocaína. 4.
Cédulas monetárias. 5. Matrizes biológicas. I. Micke,
Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Melina Heller

DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS E MÃOS USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ELETROFORESE CAPILAR POR DETECÇÃO UV

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 07 de março de 2014.

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.
Coordenador do Programa

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo A. Micke,
Orientador, UFSC

Prof. Dr. Marcone A. L.
de Oliveira, Relator, UFJF

Prof. Dr. Fernando G. Tonin,
USP

Prof. Dr. Almir Spinelli,
UFSC

Profa. Dra. Cristiane L. Jost,
UFSC

Prof. Dr. Daniel L. G. Borges,
UFSC

“Feliz aquele cujo conhecimento é
livre de ilusões e superstições.”

Sidarta Gautama

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus por ser muito meu amigo, me ajudar muito e sempre me dar força nos momentos mais difíceis, de frustração e de decepção.

Aos meus pais, Helio (in memoriam) e Vali, e ao meu irmão, Leonardo, pela paciência e compreensão, por me amarem tanto e me apoiarem sempre.

Ao meu orientador, Professor Gustavo Micke pela orientação, ensinamentos e confiança.

Aos colegas “labequianos” que já foram, que estão e que vão continuar pela ajuda e amizade durante o meu tempo de pós-graduação.

A todos os amigos conquistados nestes anos de UFSC, que não vou citar por medo de esquecer alguém, pelo afeto, carinho e companheirismo.

Ao Prof. Faruk Nome por ter disponibilizado o equipamento de LC-MS/MS pertencente ao INCT Catálise para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo e colega Thiago Caon que realizou os experimentos de permeação, no laboratório de Virologia Aplicada, e a Prof^a. Dra. Claudia Simões por ter permitido a realização dos experimentos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro recebido.

RESUMO

Esta tese de doutorado foi motivada pela preocupação com os riscos à saúde de pessoas que diariamente estão em contato com grandes volumes de dinheiro contaminado com cocaína, fato que se estendeu à população em geral ao longo deste trabalho. Sendo assim, foram desenvolvidos dois métodos analíticos para a determinação de cocaína em cédulas monetárias, o primeiro utilizou a técnica de eletroforese capilar com detecção UV (CE-UV) para a análise das cédulas monetárias circulantes na cidade de Florianópolis/SC; o segundo método desenvolvido foi utilizando a técnica de LC-MS/MS para a determinação de cocaína em 60 cédulas monetárias provenientes das cidades de Florianópolis/SC, São Paulo/SP, Rio de Janeiro/RJ, Juiz de Fora/MG, Fortaleza/CE e Baltimore/USA. Ambos os métodos apresentaram bons parâmetros de validação, tais como: linearidade, $r = 0,9997$ (CE-UV) e $0,9998$ (LC-MSMS); LD = $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (CE-UV) e $0,22 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (LC-MSMS); LQ = $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ (CE-UV) e $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (LC-MSMS); precisão instrumental (área do pico, $n = 10$), CV = $0,3\%$ (CE-UV) e CV = $5,9\%$ (LC-MSMS); precisão intra-ensaio (área do pico, $n = 6$), CV = $3,0\%$ (CE-UV) e CV $\leq 6,5\%$ (LC-MSMS); precisão intermediária (área do pico), CV $\leq 4,5\%$ (CE-UV) e CV $\leq 8,5\%$ (LC-MSMS). Além destes parâmetros, foram avaliados a conformidade do sistema, seletividade, robustez, exatidão e efeito de matriz e todos se mostraram satisfatórios. O método por CE-UV tem a vantagem de usar um procedimento de preparo de amostra simples que consiste na extração com acetonitrila e sonicação e, além disso, esta metodologia permitiu a determinação de cocaína em menos de 2,5 min. De 30 notas obtidas diretamente da circulação em geral, a cocaína foi detectada em 28 amostras (93%). Em ensaios preliminares ao desenvolvimento do método por LC-MSMS foram identificadas a presença de lidocaína e cafeína nas cédulas monetárias que passaram a ser também objetos do estudo. Este método tem a vantagem de usar água como solvente extrator o que é bastante adequado pela sua atoxicidade, baixo custo e por não provocar danos nas marcas de segurança das notas. Entre as cinco cidades brasileiras, as cidades que apresentaram a menor e a maior quantidade média de cocaína por nota foram Fortaleza ($14,6 \text{ } \mu\text{g/nota}$) e Rio de Janeiro ($120,3 \text{ } \mu\text{g/nota}$), respectivamente. A cidade que apresentou as menores quantidades de cafeína e lidocaína também foi Fortaleza, sendo que foram detectados $2,0 \text{ } \mu\text{g/nota}$ de lidocaína e $19,7 \text{ } \mu\text{g/nota}$ de cafeína nas amostras desta cidade. Em

contrapartida, a cidade em que foram encontradas as maiores quantidades médias de cafeína e lidocaína por nota foi São Paulo 39,7 µg de lidocaína e 210,9 µg de cafeína. O método desenvolvido para a determinação de cocaína em cédulas monetárias utilizando LC-MS/MS foi aplicado na análise de urina e das mãos, sendo que a cocaína foi extraída das mãos pela simples submersão em um recipiente com água por 5 min. Dos 98 extratos de mãos, 90 eram da população em geral e 8 de bancários cujas urinas também foram analisadas. Foi detectada cocaína em 49% das amostras e nas mãos dos bancários foi encontrada quantidade muito semelhante à da população em geral, logo não se encontrou cocaína ou um de seus metabólitos nas amostras de urina desses participantes. Nesta tese também foi desenvolvido um estudo para demonstrar que a cocaína extraída de uma cédula monetária permeia pela pele, fato comprovado pelos cálculos dos parâmetros de permeabilidade: fluxo constante, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade. Entretanto, este fato não oferece riscos a pessoas que manuseiam um grande volume de dinheiro diariamente, pois a quantidade de cocaína passada das notas de dinheiro para as mãos é tão pequena, que mesmo que seja permeada, não trará prejuízos à saúde da pessoa.

Palavras-chave: cocaína, cédulas monetárias, matrizes biológicas, eletroforese capilar, LC-MS/MS.

ABSTRACT

This thesis was motivated by concern for the health risks of people who are in daily contact with large volumes of money contaminated with cocaine, a fact that has spread to the population in general throughout this work. Thus, two analytical methods for determination of cocaine in banknotes were developed. The first used capillary electrophoresis with UV detection (CE - UV) for the analysis of banknotes in circulation at Florianópolis/SC. The second method was developed using the technique of LC-MS/MS for the determination of cocaine in 60 banknotes from Florianópolis/SC, Sao Paulo/SP, Rio de Janeiro/RJ, Juiz de Fora/MG, Fortaleza/CE and Baltimore/USA. Both methods showed good validation parameters, such as linearity $r = 0.9997$ (CE-UV) and 0.9998 (LC-MSMS); LD = 0.2 mg L^{-1} (CE-UV) and $0.22 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (LC-MSMS); LQ = 0.8 mg L^{-1} (CE-UV) and $0.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (LC-MSMS); instrumental precision (peak area, $n = 10$), CV = 0.3% (CE - UV) and CV = 5.9% (LC - MSMS); Intra-assay precision (peak area, $n = 6$) CV = 3.0% (CE - UV) and CV $\leq 6.5 \%$ (LC - MSMS); intermediate precision (peak area), CV $\leq 4.5 \%$ (CE - UV) and CV $\leq 8.5 \%$ (LC - MSMS). Besides these parameters, these methods were evaluated to system suitability, selectivity, robustness, accuracy and matrix effects and they all showed satisfactory results. The method by CE - UV has the advantage of using a simple procedure for sample preparation that consists of extracting with acetonitrile and sonication, and furthermore, this methodology allowed the determination of cocaine in less than 2.5 min. From 30 banknotes obtained directly from the general circulation, cocaine was detected in 28 samples (93 %). In preliminary development of LC - MSMS method it was found the presence of lidocaine and caffeine in banknotes that also began to be objects of the study. This method has the advantage of using water as extracting solvent that is quite suitable for their low toxicity, low cost and do not cause damage to the security features of the notes. Among the five Brazilian cities, the cities that had the lowest and the highest average amount of cocaine per note were Fortaleza ($14.6 \text{ } \mu\text{g/note}$) and Rio de Janeiro ($120.3 \text{ } \mu\text{g/note}$), respectively. The city that had the lowest amounts of caffeine and lidocaine was also Fortaleza, and $2.0 \text{ } \mu\text{g/note}$ lidocaine and $19.7 \text{ } \mu\text{g/note}$ caffeine were detected in the samples of this city. In contrast, the city where the highest average amounts of caffeine and lidocaine were found per note was Sao Paulo with $39.7 \text{ } \mu\text{g}$ of lidocaine and $210.9 \text{ } \mu\text{g}$ of caffeine, respectively. The method developed for

the determination of cocaine in banknotes using LC-MS/MS was applied to the analysis of urine and hands, and cocaine was extracted by simple immersion of the hands in a container with water for 5 min. From 98 extracts of hands, 90 were from the general population and 8 from bank employees whose urines were also analyzed. Cocaine was detected in 49 % of the samples and the quantity of bank employees hands it was very similar to the general population, because of this cocaine or its metabolites were not found in urine of these subjects. In this thesis, a study was also designed to demonstrate that cocaine extracted from a monetary banknote permeates the skin, checked by calculations of the permeability parameters: constant flux, lag time and permeability coefficient. However, this fact does not present risks to persons who handle a large volume of money every day, because the amount of cocaine passed from the notes into the hands is so small that even if it is permeated, will not bring harm to the health of the person.

Keywords: cocaine, banknotes, biological matrices, capillary electrophoresis, LC-MS/MS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN - Acetonitrila
- APCI - Ionização química a pressão atmosférica (do inglês, “atmospheric pressure chemical ionization”)
- API – Ionização à pressão atmosférica (do inglês, “atmospheric pressure ionization”)
- BE - benzoilecgonina
- BGE - eletrólito de corrida (do inglês “background electrolyte”)
- CAD Gas™ - gás de colisão
- CE - energia de colisão (do inglês “Collision Energy”)
- CE – Eletroforese Capilar (do inglês, “Capillary Electrophoresis”)
- CE-UV – Eletroforese capilar com detecção ultravioleta
- CEBRID – Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas
- CE-ECL - *Capillary Electrophoresis with Electrochemiluminescence*
- CEP - potencial de entrada na cela de colisão (do inglês “Entrance Potential”)
- CGE - Eletroforese Capilar em Gel (do inglês “capillary gel electrophoresis”)
- CHES - 2-(N-ciclo-hexilamino)etanossulfônico
- CIEF - Focalização Isoelétrica Capilar (do inglês “capillary isoelectric focusing”)
- CITP - Isotacoforese Capilar (do inglês “capillary isotachophoresis”)
- CSEI - *Cation Selective Exhaustive Injecion*
- CSEI-MEKC - *Cation Selective Exhaustive Injecion - Micellar Electrokinetic Chromatography*
- CV - coeficiente de variação
- CXP - potencial de saída da cela de colisão (do inglês “Collision Cell Exit Potential”)
- CZE - Eletroforese Capilar de Zona (do inglês “capillary zone electrophoresis”)
- CZE-ESI/ToF-MS - *Capillary Zone Electrophoresis with Electrospray Ionization/Time-of-flight Mass Spectrometry*
- D.E. – diâmetro externo
- D.I. – diâmetro interno
- DP - potencial de orifício (do inglês “Declustering Potencial”)
- EI - Ionização eletrônica (do inglês, “electronic ionization”)
- EMD - dispersão por eletromigração (do inglês “electromigration dispersion”)

EP - potencial de entrada (do inglês “Entrance Potencial”)
EPI - *Enhanced Product Ion*
ESI – Ionização por *electrospray* (do inglês “electrospray ionization”)
EtOH – Etanol
FASS - *Field Amplified Sample Stacking*
FEO - Fluxo Eletrosmótico
FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês “fourier transform infrared spectroscopy”)
GABA – ácido gama-aminobutírico
GC – Cromatografia a gás (do inglês “gas chromatography”)
GC-MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (do inglês “gas chromatography mass spectrometry”)
GC-MS/MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (do inglês “gas chromatography mass spectrometry/mass spectrometry”)
GC-NPD – Cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo (do inglês “gas chromatography nitrogen-phosphorous detection”)
GC-PCI-MS – *Gas chromatography - positive chemical ionization - mass spectrometry*
GLORIA - *Gold-Labeled Optically-Read Rapid Immunoassay*
GREAFMUSP - Grupo Interdisciplinar de Estudos de Álcool e Drogas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GS1 - gás nebulizante
GS2 - gás secante
HIBA – ácido 2 - hidroxiiisobutírico
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “high performance liquid chromatography”)
HPLC-FL - *HPLC with fluorescence detection*
HPLC-TOF-MS - *HPLC with time-of-flight-MS*
ICH - *International Conference on Harmonization*
IDA - Aquisição Dependente da Informação (do inglês “Information Dependent Acquisition”)
IMS – espectrometria de mobilidade iônica (do inglês “ion-mobility spectrometry”)
LC - Cromatografia líquida (do inglês “liquid chromatography”)
LC-APCI-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização química a pressão atmosférica (do inglês “liquid chromatography tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization”)

LC-ESI/MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* (do inglês “liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization”)

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês “liquid chromatography coupled to mass spectrometry”)

LC-TOF-MS - *Liquid Chromatography/Time-of-flight Mass Spectrometry*

LD – limite de detecção

m/z – razão massa/carga

MALDI - Ionização por desadsorção laser, assistida por matriz (do inglês, “matrix assisted laser desorption”)

mAU – miliunidades de Absorbância

MEKC - Cromatografia Eletrocínética Micelar (do inglês “micellar electrokinetic chromatography”)

MeOH – Metanol

MPA – megapascal

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês, “multiple reaction monitoring”)

MS – Espectrometria de massas (do inglês “mass spectrometry”)

MS/MS – Espectrometria de massas em *tandem*

NIR – Infravermelho Próximo (do inglês “near infra-red”)

ONU – Organização das Nações Unidas

p - parâmetro *p* bi-caudal

PBS - *phosphate buffered saline*

DAD – Detector de arranjo de diodos

PI – padrão interno

pKa – logaritmo negativo da constante de dissociação do ácido fraco

PPG – polipropilenoglicol

Q1 – primeiro quadrupolo

Q3 – terceiro quadrupolo

r – coeficiente de correlação

r – raio hidratado

R² - coeficiente de determinação

R_s - resolução

RSD - estimativa do desvio padrão relativo (do inglês “relative standard deviation”)

s - desvio padrão do intercepto

S - inclinação da curva analítica

S/R - relação sinal/ruído

SDS – dodecilsulfato de sódio (do inglês “sodium dodecyl sulfate”)

SENAD – Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas

SIM - Monitoramento de Íons Seleccionados (do inglês “selected-ion monitoring”)

SiOH - silanol

SNC – sistema nervoso central

SPE - extração em fase sólida (do inglês “solid phase extraction”)

SPME – micro-extração em fase sólida (do inglês “solid phase micro extraction”)

SRM - Monitoramento de Reações Seleccionadas (do inglês, “selected reaction monitoring”)

TD-MS² - dessorção térmica acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (do inglês “thermal desorption tandem mass spectrometry”)

TEA – trietanolamina

T_L - tempos de latência

t_m – tempo de migração

TOF - Tempo de voo (do inglês “time-of-flight”)

torr – unidade de pressão equivalente a 133,32 pascal

t_R - tempo de retenção

TRIS - tris(hidroximetil)aminometano

UNODC – Agência das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês “United Nations Office on Drugs and Crime”)

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês “ultra performance liquid chromatography”)

UV - Vis – Ultravioleta – Visível

v_e - velocidade eletroforética

v_{osm} - velocidade do FEO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Erythroxylum coca</i> L., a planta coca. Fonte: www.anthropogen.com, acessado em 05 de abril de 2012, às 22h 58min.	31
Figura 1.2. Principais produtos de biotransformação da cocaína.	37
Figura 1.3. Produtos da hidrólise da cocaína.	38
Figura 1.4. Processo de refino da cocaína e seus subprodutos.	41
Figura 1.5. Distribuição dos usuários de cocaína ao redor do mundo. Adaptado de World Drug Report 2013.	43
Figura 1.6. Uso de cocaína durante a vida, nos últimos 12 meses e nos últimos 30 dias entre estudantes universitários brasileiros, em 2009... ..	44
Figura 3.1. Curvas de mobilidade efetiva versus pH para a cocaína, lidocaína e TRIS.	56
Figura 3.2. Otimização da composição do eletrólito de corrida utilizando o software Peakmaster 5.1®, fixando-se a concentração de TRIS em 60 mmol L ⁻¹ e variando-se a concentração de HIBA de 5 a 40 mmol L ⁻¹ . ..	57
Figura 3.3. Comparação entre o eletroferograma simulado (A) e o experimental (B) de um extrato de nota de dinheiro sob as condições otimizadas. Legenda dos picos: 1 – propranolol (P.I.), 2 – cocaína, 3 – lidocaína. Condições experimentais: ver Seção 3.2.	58
Figura 3.4. Variação do tempo de injeção do padrão de cocaína 1 mg L ⁻¹ , sob pressão de 50 mbar. Condições experimentais: ver Seção 3.2. ..	60
Figura 3.5. Comparação entre as curvas de adição de padrão de cocaína em 3 extratos de notas com a curva de calibração externa para verificar o efeito da matriz no método.	61

- Figura 3.6. Ilustração da seletividade do método: (A) extrato de nota de dinheiro livre do analito de interesse; (B) extrato de nota de dinheiro adicionado de 4 mg L⁻¹ de padrão de cocaína. Legenda dos picos: 1 – propranolol (P.I.), 2 – cocaína.....62
- Figura 3.7. Eletroferograma de um extrato de nota de dinheiro usando o método desenvolvido por CE-UV (A) e o cromatograma da fração coletada no equipamento de eletroforese capilar e injetada no LC-MS/MS para a confirmação da presença de cocaína (B).65
- Figura 4.1. Estruturas dos analitos investigados neste estudo.....79
- Figura 4.2. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da cocaína em ESI positivo.....85
- Figura 4.3. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da lidocaína em ESI positivo.86
- Figura 4.4. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da cafeína em ESI positivo.86
- Figura 4.5. Cromatograma dos analitos após a otimização da composição da fase móvel e das melhores condições de operação do MS em modo MRM positivo.....88
- Figura 4.6. Definição do tempo de extração.90
- Figura 4.7. Definição do solvente extrator para extrair a cocaína das cédulas monetárias.....91
- Figura 4.8. Comportamento da extração da cocaína em função da lavagem ou não da nota entre cada procedimento de extração.93
- Figura 4.9. Gráfico hipotético do aumento da quantidade de cocaína no extrato em função do volume de água.....95

- Figura 4.10. Efeito da diluição do extrato da nota em função do volume de água. 96
- Figura 4.11. Extração da cocaína em função do volume de água (previsto *versus* obtido). 97
- Figura 4.12. Variação da concentração de cocaína em função do pH e do nº de injeções no experimento para verificar a sua hidrólise..... 101
- Figura 4.13. Acompanhamento da hidrólise da cocaína em benzoilecgonina a partir do pH 7,65. 102
- Figura 6.1. Respresentação esquemática das camadas da pele. Adaptado de ERENO, 2011..... 142
- Figura 6.2. Representação esquemática da célula de difusão de Franz (Caon, 2009). A: compartimento doador. B: compartimento receptor. C: tecido. D: suporte esmerilhado. E: compartimento para circulação da água com controle da temperatura (37°C). F: barra magnética. G: cânula de amostragem. 145
- Figura 6.3. Cromatogramas das quantidades de cocaína permeada pela pele de orelha de suíno. Os mesmos foram ordenados em ordem crescente em relação aos tempos de permeação. Condições experimentais: ver Seção 6.3.3. 150
- Figura 6.4. Perfil de permeação da cocaína em solução através da pele de orelha de porco (concentração de cocaína nas duas soluções 400 µg L⁻¹). Cada ponto representa a média ± desvio padrão (n = 4). 151
- Figura 6.5. Quantidade (%) de cocaína retida na epiderme, derme e após 6 horas de experimento. Cada ponto representa a média ± desvio padrão (n = 4)..... 153

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Dados relativos à linearidade do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 3.2.	66
Tabela 3.2. Dados relativos à conformidade do sistema e aos limites de detecção e quantificação. Condições experimentais: ver Seção 3.2.....	67
Tabela 3.3. Dados relativos à precisão do método para a determinação de cocaína por CE-UV. Condições experimentais: ver Seção 3.2.	69
Tabela 3.4. Comparação entre os métodos utilizando CE-UV e LC-MS/MS para atestar a exatidão do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 3.2.	70
Tabela 3.5. Quantidade de cocaína em cédulas brasileiras determinadas pelo método CE-UV.	71
Tabela 3.6. Concentração de cocaína determinada nos extratos de cédulas brasileiras pelo método CE-UV.	73
Tabela 4.1. Algumas propriedades físicas dos solventes polares mais comumente usados como aditivos na ionização por electrospray.	80
Tabela 4.2. Energias otimizadas para análise em MRM de cocaína, lidocaína e cafeína em notas de dinheiro.	81
Tabela 4.3. Fragmentos majoritários de cocaína, lidocaína e cafeína gerados pelo modo MRM.	82
Tabela 4.4. Variáveis e níveis que compuseram o planejamento fatorial 2^4 com ponto central.	82
Tabela 4.5. Resultados do planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central visando a sensibilidade ótima para a cocaína.	84

Tabela 4.6. Escolha da composição da fase móvel para a separação de cocaína, lidocaína e cafeína.....	87
Tabela 4.7. Comportamento da extração da cocaína em função do número de extrações.....	94
Tabela 4.8. Soluções utilizadas no experimento para verificar a hidrólise da cocaína.....	100
Tabela 4.9. Comparação entre as curvas de adição de padrão de cocaína em três extratos de notas com a curva de calibração externa para verificar o efeito de matriz no método. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.	103
Tabela 4.10. Dados relativos à linearidade do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.....	104
Tabela 4.11. Dados relativos à conformidade do sistema. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.....	105
Tabela 4.12. Limites de detecção e quantificação do método proposto, em $\mu\text{g L}^{-1}$. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.....	106
Tabela 4.13. Dados relativos à precisão do método para a determinação de cocaína, lidocaína e cafeína por LC-MS/MS. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.....	108
Tabela 4.14. Exatidão do método proposto para determinação de cocaína, lidocaína e cafeína. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.	109
Tabela 4.15. Dados relativos à linearidade das curvas de calibração utilizadas na avaliação da robustez do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.....	110
Tabela 4.16. Resultado do teste t-pareado utilizado na comparação da linearidade como parâmetro da avaliação da robustez. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.....	111

Tabela 4.17. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de cocaína em μg por nota.....	114
Tabela 4.18. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de lidocaína em μg por nota.	116
Tabela 4.19. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de cafeína em μg por nota.	118
Tabela 5.1. Estimativa para a detecção de cocaína e/ou seus metabólitos em matrizes biológicas (Janicka, Kot-Wasik e Namieśnik, 2010).....	125
Tabela 5.2. Íons monitorados na ionização por electrospray da cocaína e seus metabólitos utilizando o escaneamento do tipo MRM.	129
Tabela 5.3. Dados relativos à linearidade da curva analítica utilizada na quantificação de cocaína nas amostras. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.....	134
Tabela 5.4. Quantificação de cocaína nos extratos da mão esquerda. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.....	137
Tabela 5.5. Quantificação de cocaína nos extratos da mão direita. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.....	138
Tabela 5.6. Dados relativos à linearidade das curvas analíticas utilizadas na avaliação do efeito da matriz urina. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.....	140
Tabela 6.1. Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade da cocaína através da pele da orelha de porco, após quantificação por LC-MS/MS. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão ($n = 4$).....	152

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 3-1.....	55
------------------	----

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA	29
1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A COCAÍNA.....	31
1.1 Origem e história da cocaína	31
1.2 Efeitos da cocaína no corpo humano	34
1.3 Das folhas ao pó	39
1.4 Estatísticas sobre o consumo de cocaína.....	41
2 ANÁLISE DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS – REVISÃO DA LITERATURA	45
2.1 Extração	45
2.2 Técnicas e desempenhos analíticos	47
3 ANÁLISE DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO UV	51
3.1 Objetivos	51
3.1.1 Objetivo geral	51
3.1.2 Objetivos específicos	51
3.2 Materiais e métodos	51
3.2.1 Instrumentação.....	51
3.2.2 Reagentes e soluções	52
3.2.3 Separação por CE	52
3.2.4 Curvas de calibração.....	53

3.2.5	Procedência e preparo das amostras	53
3.2.6	Método comparativo utilizando LC-MS/MS	53
3.3	Resultados e discussão	54
3.3.1	Desenvolvimento do método	54
3.3.1.1	Composição do eletrólito de corrida	54
3.3.1.2	Aumentando a detectabilidade do método	58
3.3.2	Validação do método	60
3.3.2.1	Avaliação do efeito de matriz	60
3.3.2.2	Seletividade.....	61
3.3.2.3	Linearidade	65
3.3.2.4	Conformidade do sistema e limites de detecção e quantificação	66
3.3.2.5	Precisão.....	68
3.3.2.6	Exatidão	69
3.3.3	Análise das cédulas monetárias	71
3.4	Conclusão	74
4	ANÁLISE DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS UTILIZANDO LC-MS/MS	75
4.1	Objetivos.....	75
4.1.1	Objetivo geral	75
4.1.2	Objetivos específicos	75
4.2	Materiais e métodos.....	75
4.2.1	Instrumentação	75
4.2.2	Reagentes e soluções	76
4.2.3	Separação por LC-MS/MS	77
4.2.4	Curvas de calibração.....	77
4.2.5	Procedência e preparo das amostras	78
4.3	Resultados e discussão	78

4.3.1	Caracterização e ionização dos analitos no MS	78
4.3.2	Otimização cromatográfica.....	87
4.3.3	Estudo da extração da cocaína das notas	89
4.3.3.1	Efeito do tempo	89
4.3.3.2	Escolha do solvente mais adequado para a extração	90
4.3.3.3	Extração sequencial.....	92
4.3.3.4	Extração exaustiva	93
4.3.3.5	Efeito do volume de solvente.....	94
4.3.3.6	Conclusões	97
4.3.4	Estudo da hidrólise da cocaína no extrato.....	99
4.3.5	Desempenho analítico do método.....	102
4.3.5.1	Efeito de matriz e seletividade	103
4.3.5.2	Linearidade	103
4.3.5.3	Conformidade do sistema e limites de detecção e quantificação.....	104
4.3.5.4	Precisão	107
4.3.5.5	Exatidão	109
4.3.5.6	Robustez.....	110
4.3.6	Análise das cédulas monetárias	111
4.3.6.1	Florianópolis/SC	112
4.3.6.2	Juiz de Fora/MG.....	112
4.3.6.3	Rio de Janeiro/RJ	113
4.3.6.4	São Paulo/SP	113
4.3.6.5	Fortaleza/CE	113
4.3.6.6	Baltimore/USA.....	113
4.4	Conclusão	120
5	APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS UTILIZANDO LC- MS/MS NA ANÁLISE DE URINA E DA PELE DAS MÃOS.....	121
5.1	Revisão da literatura.....	121

5.2	Objetivos.....	131
5.2.1	Objetivo geral	131
5.2.2	Objetivos específicos	132
5.3	Materiais e métodos.....	132
5.3.1	Instrumentação	132
5.3.2	Reagentes e soluções	133
5.3.3	Separação por LC-MS/MS	133
5.3.4	Preparo das amostras	134
5.3.5	Curvas de calibração.....	134
5.4	Resultados e discussão.....	135
5.4.1	Método analítico aplicado	135
5.4.2	Seleção das amostras	135
5.4.3	Extração da cocaína das mãos	135
5.4.4	Análise dos extratos das mãos	136
5.4.5	Análise das amostras de urina dos bancários.....	138
5.4.6	Estudo do efeito da matriz urina no método	139
5.5	Conclusão	140
6	AVALIAÇÃO DA PERMEÇÃO DE COCAÍNA PELA PELE DA ORELHA DE SUÍNOS.....	142
6.1	Justificativa	142
6.2	Introdução	142
6.2.1	Avaliação da permeação/retenção cutânea	142
6.2.2	Câmara de Franz.....	144
6.3	Metodologia	146
6.3.1	Avaliação ex vivo da permeabilidade de cocaína através da pele de orelha suína	146
6.3.1.1	Obtenção da pele de orelha	146

6.3.1.2	Experimentos de permeação cutânea	147
6.3.1.3	Avaliação da retenção cutânea pela cocaína	148
6.3.2	Instrumentação e condições operacionais do LC-MS/MS	148
6.3.3	Análise das amostras por LC-MS/MS	149
6.4	Resultados e discussão	149
6.4.1	Experimentos de permeação cutânea	149
6.4.2	Avaliação da retenção cutânea da cocaína	152
6.5	Conclusão	154
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	155
8	CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS	158

JUSTIFICATIVA

No *ranking* mundial, a cocaína possui o segundo lugar na classificação das drogas que mais causam malefícios à saúde, perdendo somente para a heroína e é a mais relevante em termos de violência relacionada ao tráfico. A partir destas duas informações é possível relacionar outros danos associados ao consumo de cocaína, tais como, maior demanda em termos de tratamentos, casos de *overdose* e morte, complicações no estado de saúde dos usuários devido ao uso de outras drogas concomitantemente com a cocaína, além de adulterantes adicionados a fim de aumentar o volume. Em outras palavras, o consumo de cocaína tornou-se um problema de saúde pública.

A cocaína é uma das drogas ilícitas mais comumente utilizadas no mundo. A demanda por esta droga não faz distinção de classe social, racial ou econômica. Drogas geram criminalidade, violência urbana e outros problemas sociais que afetam as comunidades. Em algumas regiões, o uso de drogas ilícitas é contribuinte para a rápida propagação de doenças infecciosas como AIDS e hepatite (Bohannon, 2007).

Nos últimos anos, os cientistas têm se esforçado para obter uma análise quantitativa do uso de drogas ilícitas. No entanto, as informações tradicionalmente avaliadas como toneladas de drogas apreendidas, o número de pessoas que procuram tratamento para o vício, a mortalidade relacionada com a droga, e as respostas para questionários sobre drogas de abuso são subjetivas e imprecisas, o que faz os cientistas se voltarem para o meio ambiente e acreditarem que a medição de drogas no dinheiro e no esgoto proporciona informações epidemiológicas objetivas e oportunas sobre o uso dessas drogas (Bohannon, 2007; Zuo *et al.*, 2008).

É sabido, desde meados dos anos 1980, que o papel moeda na América do Norte e na Europa está contaminado com resíduos de cocaína resultantes do tráfico e do consumo, pois muitos usuários de cocaína usam uma nota de dinheiro enrolada (como um canudinho) para inalar a droga. A presença de traços de drogas ilícitas sobre as notas é utilizada com frequência como uma evidência forense para estabelecer uma ligação entre um suspeito e estas drogas (Zuo *et al.*, 2008).

Outros meios têm sido relatados para explicar a presença da cocaína em cédulas monetárias, além delas serem utilizadas diretamente para inalar a droga, incluindo a contaminação devido ao manuseio durante o

tráfico de drogas, a transferência de uma nota contaminada para as outras durante a contagem em instituições financeiras e, também, o contato das notas entre si dentro dos caixas eletrônicos (Carter, Sleeman e Parry, 2003; Di Donato, Martin e De Martinis, 2007). Uma vez que é notório que o consumo e o convívio com drogas ilícitas em geral, incluindo a cocaína, tornou-se um problema de saúde pública, surge o seguinte questionamento: pessoas expostas ao contato com estas cédulas monetárias contaminadas, como por exemplo, bancários e cobradores de ônibus, estão sujeitas a algum tipo de risco a sua saúde?

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é usar a análise de cocaína em algumas matrizes, tais como papel moeda, urina e pele de pessoas que entram em contato diariamente com cédulas monetárias contaminadas com cocaína como parte de um esforço para estudar a epidemiologia da droga.

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A COCAÍNA

1.1 Origem e história da cocaína

A cocaína é um alcaloide tropânico extraído da *Erythroxylon coca* Lamarck, planta comumente chamada coca. Trata-se de um arbusto de cerca de 1,20 m a 1,80 m de altura, amplamente cultivado na América do Sul, em particular no Peru, Colômbia, Equador e Bolívia. As folhas têm formato oval, com 5 a 6 cm de comprimento; o arbusto dá flores pequenas e brancas e produz frutos vermelhos também de formato ovalado (Figura 1.1) (Dewick, 1997).

Figura 1.1. *Erythroxylum coca* L., a planta coca. Fonte: www.anthropogen.com, acessado em 05 de abril de 2012, às 22h 58min.



A folha de coca é usada comprovadamente há mais de 1200 anos e está relacionada com as tradições religiosas daqueles povos, pois eles acreditavam que ela teria sido enviada pelos deuses para matar a fome, fortalecer os fracos e fazê-los esquecer de suas tristezas (Ferreira e Martini, 2001; Chasin e Lima, 2008).

Eles a mascavam para ajudar a suportar a fome, a sede e o cansaço e, ainda hoje, ela é consumida legalmente em alguns países (Peru e Bolívia) sob a forma de chá (a absorção do princípio ativo, por esta via, é muito baixa). Com certeza, os povos andinos fizeram uso de suas propriedades para trabalhar a altas altitudes, onde o ar rarefeito e o frio tornam o trabalho mais difícil. A sua ação farmacológica, quando mascada, é se-

melhante ao estímulo provocado pela ingestão de doses elevadas de cafeína, não sendo, no entanto, acompanhada de euforia (Ferreira e Martini, 2001; Chasin e Lima, 2008).

À época da conquista daquelas terras pelos espanhóis, o seu consumo foi proibido pelas implicações religiosas da planta. Porém, os conquistadores logo perceberam que os escravos andinos não conseguiriam executar as suas penosas tarefas sem poder mascar as folhas de coca; então, passaram a distribuí-la 3 ou 4 vezes ao dia entre os trabalhadores. A estimativa é de que, em média, eram mascadas 60 g de folhas por dia, ou seja, em torno de 200 mg a 300 mg de cocaína (Ferreira e Martini, 2001).

A mais antiga prescrição da coca é datada de 1569, pelo botânico espanhol Dr. Nicholas Monardes, que valorizava o uso da planta no combate à fome e ao cansaço. Em 1786, Lamarck a classificou como *Erythroxylon coca*, em seu livro *Encyclopédie méthodique botanique*. A partir da segunda metade do século XIX, o uso de cocaína com fins terapêuticos, principalmente como tônico contra a fadiga, começou a ser difundido pela Europa. Em 1859 Albert Niemann, um químico alemão, extraiu vários alcalóides das folhas da planta, entre eles a nicotina, a cafeína, a morfina e a cocaína, que representou 80% do total. Após a morte de Niemann em 1862, seu colega Wilhelm Lossen retomou seus trabalhos e apresentou a fórmula química da cocaína: $C_{17}H_{21}NO_4$ (Chasin e Lima, 2008).

No ano de 1863, Ângelo Mariani, um químico da Córsega (ilha no Mar Mediterrâneo pertencente à França), produziu um extrato de folhas de coca com vinho ao qual chamou de “VinMariani”. Em média, um litro de vinho continha entre 150 mg e não mais que 300 mg de cocaína. Assim, dois copos de vinho Mariani continham menos de 50 mg de cocaína, quantidade insuficiente para causar qualquer efeito nocivo em humanos. Essa bebida foi apreciada por pessoas famosas do século XIX, como Thomas Edson, H. G. Wells, Jules Verne e o Papa Leo XVIII, que premiou o químico com uma medalha de ouro (Karch, 1999).

Em 1884, Karl Koller, um oftalmologista alemão, descobriu que o olho humano tornava-se insensível à dor com o uso de cocaína e este foi o primeiro passo para a descoberta da anestesia local (Haas, 1995). Na mesma época, nos Estados Unidos, William S Halsted, que seria conhecido como um dos pais da cirurgia moderna e um dos fundadores da Faculdade de Medicina da Universidade Johns Hopkins, juntamente com seus colegas, também pesquisou a cocaína. Eles obtiveram sucesso no bloqueio da dor, iniciando a era das cirurgias oculares, entre outras; mas

como os testes foram feitos em si mesmos, eles desenvolveram uma intensa dependência que os levou a ter suas carreiras prejudicadas. Assim como Freud tratou seu amigo Ernest von Fleischl Marxow para a dependência de morfina com cocaína, Halsted (erroneamente) utilizou morfina para tratar sua dependência de cocaína, tornando-se, também, dependente do opiáceo até o final de sua vida (Chasin e Lima, 2008).

A Coca-Cola nasceu em 1886, criada por John Styth Pemberton como um tônico sem álcool indicado para o cérebro e os nervos, contendo extrato de noz de cola e 60 mg de cocaína por garrafa de 240 mL. Hoje em dia, a cocaína foi substituída por cafeína, sendo que o alcalóide foi retirado da fórmula em 1906. Ainda assim, continua sendo empregado no seu preparo um extrato de folhas de coca do qual já foi extraída a cocaína (Maia e Juruena, 1996).

No final do século XIX houve um importante aumento no valor comercial da cocaína, e seu uso terapêutico se ampliou e se diversificou. Com a descoberta de uma maneira de sintetizar a cocaína na forma semi-refinada por um químico da indústria farmacêutica Parke Davis e sem leis que regulamentassem a produção e o consumo, a droga passou a ser encontrada em mercados e farmácias. Uma única fábrica, em 1885, oferecia cocaína em 15 diferentes formas, incluindo cigarros, charutos, inalantes, cristais, licores e soluções. Em 1886, a Merck produziu 158.352 libras de cocaína (aproximadamente 71.733 kg) (Bailey, 1996; Karch, 1999).

No início dos anos 20, começaram a ser relatados casos de intoxicações, dependência, tolerância e morte por conta do consumo desses produtos. Os problemas tornaram-se ainda mais frequentes e graves quando, na mesma época, surgiram comercialmente seringas hipodérmicas, facilitando a chegada de uma maior quantidade de cocaína na corrente sanguínea (Karch, 1999).

A partir deste momento, a ideia que as pessoas tinham da cocaína começou a mudar; de um simples tônico sem efeitos colaterais passou a ser uma das drogas mais controladas da história. De 1906 em diante, nos Estados Unidos, todos os produtos contendo cocaína e outros produtos passíveis de provocar dependência, deveriam ter seus ingredientes mencionados nos rótulos das embalagens (Laranjeira e Nicastrí, 1996).

Nas primeiras duas décadas do século XX já existiam regulamentações para o controle do uso e comércio indiscriminado da cocaína, entre elas podemos citar o tratado de Haia (1912), Harrison Act, de 1914, nos EUA e, no Brasil, o Decreto-lei Federal nº 4.292 de 6 de julho de 1921.

Entretanto, foi entre as décadas de 30 e 60 que realmente houve um declínio no uso de cocaína pela população e isto pode ser atribuído ao conhecimento adquirido sobre a dependência e os malefícios provocados ao organismo pela droga (Gawin, Khalsa e Ellinwood, 1994). Outro fator que contribuiu para a diminuição no consumo de cocaína foi o surgimento, na década de 1930, das anfetaminas e outras drogas estimulantes que eram mais baratas e com efeitos mais prolongados que ganharam vários usuários anteriormente adeptos à cocaína (Gawin, Khalsa e Ellinwood, 1994; Haas, 1995).

Na década de 70, nos Estados Unidos aconteceu o surgimento da chamada era *yuppie*, um movimento associado a uma ideologia de consumismo e ascensão social. Os participantes desse movimento escolheram a cocaína como droga de uso recreacional (como beber socialmente) associando-a ao aumento de energia e à capacidade intelectual. Deste momento em diante, começou uma nova epidemia de consumo de cocaína na América (Gawin, Khalsa e Ellinwood, 1994).

Mas, foi a partir dos anos 80, com a droga deixando de ser uma exclusividade das elites econômicas e passando a ser consumida por todas as classes sociais, que o consumo de cocaína se transformou em uma epidemia. Isto se deve, principalmente, ao aperfeiçoamento das organizações criminosas em produzir e distribuir a cocaína, aumentando a oferta e diminuindo o preço no mercado de todos os países americanos e também pela fabricação de produtos mais baratos como o *crack* (Gawin, Khalsa e Ellinwood, 1994).

O uso de cocaína no Brasil, na metade dos anos 80 era um fenômeno quase que exclusivo de um público elitizado com pouca repercussão no sistema de tratamento de usuários de drogas. Com a maior oferta da droga, principalmente com a maior produção nos países andinos, o Brasil passou a sofrer uma epidemia do uso de cocaína que se estende até os dias de hoje (Johanson, 1988).

1.2 Efeitos da cocaína no corpo humano

Desde o aparecimento da AIDS e sua associação com o uso de drogas injetáveis, entre elas a cocaína, passou-se a observar os problemas clínicos ligados ao consumo desta droga psicoativa, além dos riscos de abuso e dependência que já eram conhecidos.

A cocaína pode ser administrada de diferentes maneiras:

- oral – na forma de chá feito com as folhas de coca ou mascada juntamente com cinzas ou bicarbonato de sódio pelo fato de sua absorção pela mucosa da cavidade oral acontecer apenas em pH alcalino;
- aspirada (“cheirada” ou “cafungada”) – na forma de cocaína em pó;
- injeções intravenosas ou subcutâneas e através da mucosa genital – na forma de cocaína em pó dissolvido em água;
- fumada – na forma de pasta de coca, *crack* ou merla (fumado em pequenos cachimbos de fabricação caseira ou através da inalação do seu vapor).

Cada uma das maneiras de administração apresenta diferenças tanto na quantidade e qualidade de efeitos esperados quanto nos riscos de complicações associadas. Quanto maior e mais rápido o início e duração dos efeitos maior é a chance do indivíduo se tornar dependente. O uso do *crack* gera uma dependência mais rápida que o uso intravenoso (Nassif Filho *et al.*, 1999; Romano, Ribeiro e Marques, 2002; Nida, 2004).

Após o uso, ela se distribui pelo organismo relativamente rápido. Por ser uma substância lipossolúvel, ela se acumula nas células adiposas e no sistema nervoso central (SNC). Ela atravessa prontamente a barreira placentária apresentando níveis no recém-nascido iguais aos da mãe (Johanson, 1988; Gold, 1993).

A absorção também depende da maneira como a cocaína é consumida. Por via oral a absorção é lenta e incompleta, necessitando mais de 1 hora sendo que 75% da droga absorvida é rapidamente metabolizada no fígado. Apenas 25% da droga ingerida alcança o cérebro, e isso requer um longo período de tempo. Por isso não existe sentimento de “rush” (efeito imediato, intenso e prazeroso) comum em todas as formas. Pela via inalatória a absorção acontece pelas membranas nasofaríngeas, mas por se tratar de uma substância vasoconstritora, limita sua própria absorção. Quando injetada, a cocaína cruza todas as barreiras de absorção e alcança a corrente sanguínea imediatamente. Produz um rápido, poderoso e breve efeito. Ao ser fumada a absorção é rápida e quase completa, porém, uma porção significativa é perdida quando a cocaína é aquecida. A velocidade de absorção pode ser comparada com a via endovenosa (Nassif Filho *et al.*, 1999; Romano, Ribeiro e Marques, 2002; Carrera, Meijler e Janda, 2004; Nida, 2004; Goodman e Gilman, 2005).

O efeito agudo da cocaína pode ser atribuído principalmente a um bloqueio da recaptção da dopamina. O aumento da dopamina produz um aumento da neurotransmissão e do número e sensibilidade dos receptores

dopaminérgicos. Com o uso crônico, existe uma redução na concentração da dopamina com o efeito final de uma diminuição na quantidade do neurotransmissor. A cocaína também afeta outros sistemas de neurotransmissão, como os que utilizam noradrenalina, serotonina, endorfinas, GABA (ácido gama-aminobutírico) e acetilcolina. As ações da cocaína nas vias dopaminérgicas são essenciais para a atividade reforçadora da droga. A dopamina aumenta a atividade psicomotora, induz comportamentos estereotipados e diminui o consumo de alimentos. A dopamina está envolvida nos centros límbicos responsáveis pelo prazer, incluindo aqueles relacionados com alimentação e atividade sexual. Com o uso constante de cocaína desenvolve-se a tolerância, que pode ser devido a esta hipotética diminuição da inibição da recaptura de dopamina, diminuição da liberação de catecolaminas ou mudanças na sensibilidade dos receptores catecolaminérgicos (Johanson, 1988; Gold, 1993; Laranjeira e Nicastri, 1996). Entre as alterações agudas provocadas pelo consumo de cocaína estão: aumento das percepções sensoriais, diminuição do apetite, aumento da autoconfiança, euforia que evolui para disforia, aumento da ansiedade e da suspeição, diminuição do cansaço e da necessidade de sono, entre outros (Gold, 1993; Goodman e Gilman, 2005).

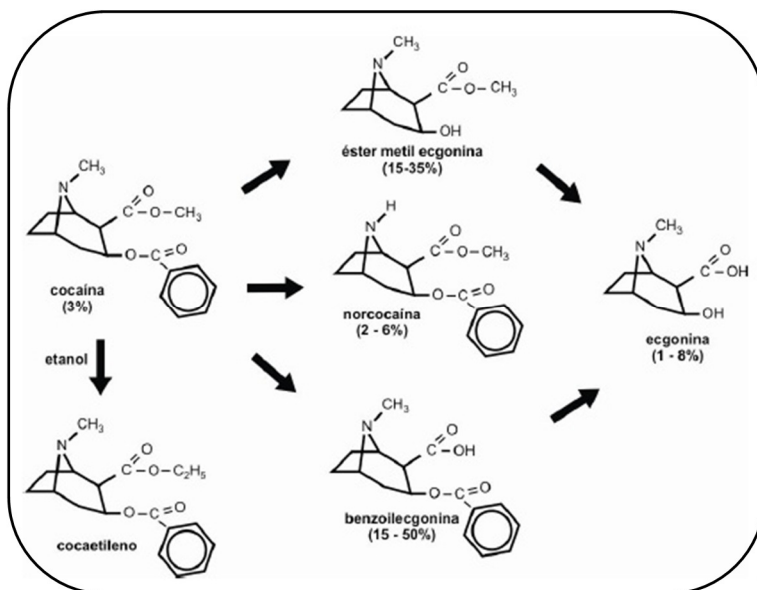
As complicações clínicas ocorrem em diversos órgãos (principalmente SNC e sistema cardiocirculatório). A cocaína possui efeito inotrópico positivo cardíaco (aumento da força de contração do coração), elevando a pressão arterial e a frequência cardíaca, reduzindo a circulação coronariana; dessa forma, a doença cardíaca associada ao consumo de cocaína inclui infarto agudo do miocárdio. Tem sido descritas trombozes arteriais e venosas profundas associadas ao consumo de cocaína, bem como miocardiopatia dilatada, miocardite e edema pulmonar (Goodman e Gilman, 2005).

Além dos problemas causados pela ação da própria droga e dos adulterantes, boa parte das consequências clínicas do consumo deve-se a via de administração utilizada. Do ponto de vista clínico, o uso intravenoso é o que tem maior potencial mórbido, devido à possibilidade de transmissão de micro-organismos, entre eles o vírus da hepatite e o HIV. A via pulmonar acarreta lesões orais e respiratórias, além de frequente desnutrição. A via nasal tem como complicações mais frequentes, prejuízos locais na mucosa com ulcerações e sangramentos (Silva e Odo, 1999).

O metabolismo da cocaína é promovido pela ação das colinesterases hepáticas e plasmáticas, cujas atividades variam podendo refletir em

oscilação na intensidade da resposta farmacológica e toxicológica da cocaína (por exemplo, em um idoso ou em um feto durante a gestação). A eliminação da cocaína é controlada pela sua biotransformação, sendo apenas pequenas quantidades excretadas inalteradas na urina (3%). A Figura 1.2 apresenta os principais metabólitos encontrados na urina que são: benzoilecgonina (15 a 50%), metil-éster ecgonina (15 a 35%), ecgonina (1 a 8%) e norcocaína, (2 a 6%). A desmetilação da cocaína para formar norcocaína ocorre através do sistema oxidase de função mista hepática (Nassif Filho *et al.*, 1999; Silva e Odo, 1999; Romano, Ribeiro e Marques, 2002; Nida, 2004).

Figura 1.2. Principais produtos de biotransformação da cocaína.



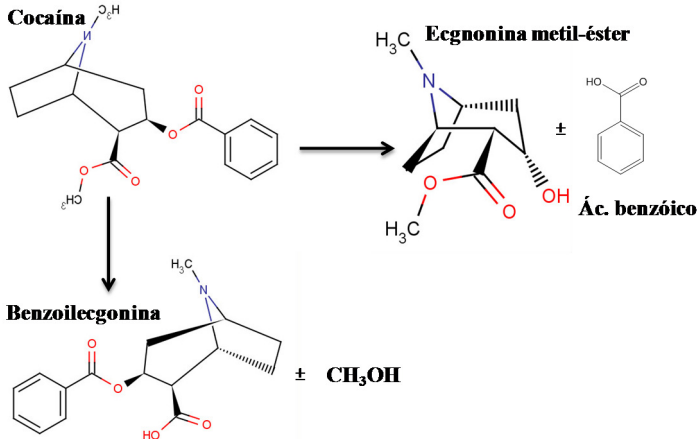
A eliminação metabólica da cocaína *in vivo* é predominantemente obtida a partir da hidrólise dos seus grupos benzoil e metil-éster (Figura 1.3). A hidrólise via benzoil, que converte a cocaína em ecgonina metil-éster e ácido benzoico é a mais bem caracterizada e exige a mediação de esterases hepáticas ou plasmáticas. A hidrólise via metil-éster, a qual produz benzoilecgonina e metanol, pode ser catalisada por uma enzima do fígado humano, a carboxilesterase, mas também se acredita que ocorra

espontaneamente sob condições fisiológicas (pH 7,4; 37 °C) (Li *et al.*, 1999).

Um estudo proposto por Li & Zhao, em 1999, demonstrou que a partir de pH 7,0 o grupo metil-éster se torna muito mais lábil do que o benzoil, por isso, se forma muito mais benzoilecgonina do que ecgonina metil-éster. Atribui-se a hidrólise do grupo metil-éster a uma catálise ácida intramolecular promovida pelo átomo de nitrogênio do anel tropano, que faz com que o grupo metil-éster da cocaína seja muito mais lábil do que o do grupo benzoil sob condições neutras.

O tempo de meia-vida para a cocaína é de 30 a 90 minutos (a meia-vida é curta, pois é rapidamente metabolizada no fígado), 3 a 4 horas para a metil éster ecgonina e de 4 a 7 horas para a benzoilecgonina. A eliminação da cocaína e benzoilecgonina é maior se o pH urinário for ácido, enquanto que para o metabólito (norcocaína) a eliminação é preferencial se o pH for alcalino (Nassif Filho *et al.*, 1999; Silva e Odo, 1999; Romano, Ribeiro e Marques, 2002; Nida, 2004).

Figura 1.3. Produtos da hidrólise da cocaína.



1.3 Das folhas ao pó

O monitoramento da produção de cocaína em diferentes países se dá através da comparação do manejo das folhas de coca e pela quantidade de cocaína que pode ser extraída das folhas. Por exemplo, a folha de coca é comercializada na Colômbia como folha de planta fresca, imediatamente após a colheita, enquanto no Peru e na Bolívia, os agricultores secam as folhas de coca espalhando-as pelo chão e expondo-as ao sol antes de vender. O resultado é uma folha com teor de umidade muito baixo, o que torna mais fácil o transporte e permite um melhor armazenamento das folhas. O teor de umidade das folhas, tanto frescas quanto secas, varia consideravelmente, dependendo das propriedades biológicas da folha, bem como de fatores ambientais tais como a umidade do ar. Uma folha de coca fresca colhida no início da manhã, por exemplo, terá um teor de umidade diferente das folhas colhidas a partir do meio-dia. Folhas de coca secas ao sol que secaram após uma forte chuva e a baixa altitude terão uma umidade diferente das secas na época da seca em uma altitude elevada (Dewick, 1997; Silva e Odo, 1999; Unodc, 2011).

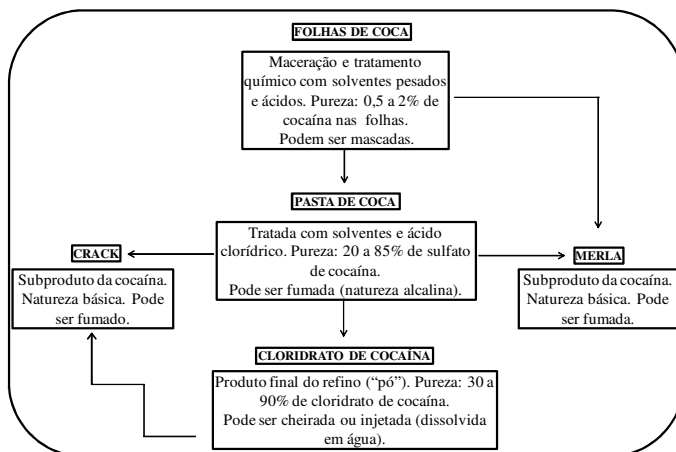
Embora as diferenças não importem muito para os agricultores que vendem as folhas de coca, elas são importantes do ponto de vista científico. Isto significa que os cientistas estão interessados na quantidade de matéria seca das plantas e qual a proporção de matéria seca que corresponde à cocaína. O teor de água das folhas não é de interesse neste contexto e tem de ser retirado do cálculo. Como qualquer outra planta viva, as folhas frescas de coca consistem principalmente de água (~ 70%). Um quilo de folhas frescas de coca perde mais da metade de seu peso através da secagem ao sol. Mesmo secas ao sol, as folhas contêm umidade residual. Quando a secagem ocorre num forno em um laboratório, as folhas secas ao sol ainda perdem outro terço do seu peso. Apenas uma pequena proporção (em torno de 0,5%) da matéria seca da planta é, na verdade cocaína. Assim, ao comparar a produção de folha de coca, o peso seco em estufa equivalente a folha de coca é o mais adequado (Dewick, 1997; Silva e Odo, 1999; Unodc, 2011).

No entanto, atualmente, não há informação suficiente sobre o teor de umidade de folhas de coca cultivadas em diferentes regiões. Portanto, uma comparação direta entre as folhas frescas de coca da Colômbia com as secas ao sol na Bolívia e no Peru é inviável, pois não é possível converter os valores obtidos no forno de secagem em equivalentes (Unodc, 2011).

O processo de extração da cocaína é iniciado colocando-se as folhas e solventes orgânicos em recipientes, onde após um período de maceração o extrato orgânico é separado das folhas e evaporado. O resíduo obtido, denominado pasta de coca, contém cocaína juntamente com outros alcaloides e óleos essenciais. A droga pode ser obtida também por meio da secagem das folhas, digestão com ácido sulfúrico e posterior extração, após precipitação com bicarbonato de sódio. A pasta de coca é tratada com ácido clorídrico para formação de cloridrato de cocaína, que corresponde à forma usual de tráfico. Entretanto ela é frequentemente “diluída” com a adição de produtos que procuram mimetizar sua ação farmacológica, cor ou sabor. São utilizados com essa finalidade outros anestésicos locais (lidocaína, procaína), além de substâncias como cafeína, efedrina, quinina, estricnina, manitol, sacarose, heroína, pó de mármore, talco, entre outros. A partir do cloridrato é possível obter cocaína na forma de base, que é volátil e quimicamente mais estável (Weiss, Mirin e Bartel, 1994; Silva e Odo, 1999). A Figura 1.4 representa as diferentes formas de preparo da droga a partir das folhas e da pasta de coca.

As complicações clínicas provocadas pelo uso de cocaína são decorrentes dos efeitos da própria droga e da ação de outras substâncias (adulterantes) sobre o organismo do usuário. É estimado que a cocaína vendida nas ruas possua menos que 10% de cocaína pura; os adulterantes mais comumente usados são o talco, a cafeína, o açúcar e o sal, além de outras drogas como a lidocaína (Weiss, Mirin e Bartel, 1994).

Figura 1.4. Processo de refino da cocaína e seus subprodutos.



1.4 Estatísticas sobre o consumo de cocaína

De acordo com o relatório da agência da ONU sobre Drogas e Crime (UNODC), divulgado em 26 de junho de 2013, estima-se que entre 0,37% da população mundial, na faixa etária de 15 a 64 anos (cerca de 17 milhões de pessoas) consumiram cocaína pelo menos uma vez ao ano, em 2012. Ainda de acordo com o relatório, a área global de cultivo de coca totalizou 155.600 hectares em 2011. As estimativas das quantidades de cocaína manufaturadas, expressas em quantidades de cocaína pura, variou de 776 a 1.051 toneladas em 2011. As maiores quantidades de cocaína apreendidas no mundo continuam a ser relatadas na Colômbia (200 toneladas) e nos Estados Unidos (94 toneladas). No entanto, tem havido uma indicação de que, nos últimos anos o mercado de cocaína vem mudando para várias regiões que não tenham sido previamente associadas com qualquer tráfico ou uso (Unodc, 2013).

Aumentos significativos nas apreensões foram observados na Ásia, Oceania e Américas Central e do Sul e no Caribe. Na América Central, a intensificação da concorrência no tráfico de cocaína levou a crescentes níveis de violência (Unodc, 2013).

O uso de cocaína nem sempre é liderado pelo poder econômico. Existem exemplos de países ricos com baixas taxas de uso e vice-versa.

Alguns países asiáticos com mercados consumidores potencialmente grandes registraram um aumento nas apreensões de cocaína desde 2008. Indiscutivelmente, partes do leste e sudeste da Ásia oferecem um maior risco de expansão ao consumo de cocaína. As apreensões em Hong Kong, China, aumentaram dramaticamente, para quase 600 kg em 2010 e ultrapassou 800 kg em 2011. Isto pode ser atribuído a vários fatores, frequentemente ligados ao glamour associado à sua utilização e à emergência a classes mais abastadas da sociedade (Unodc, 2013).

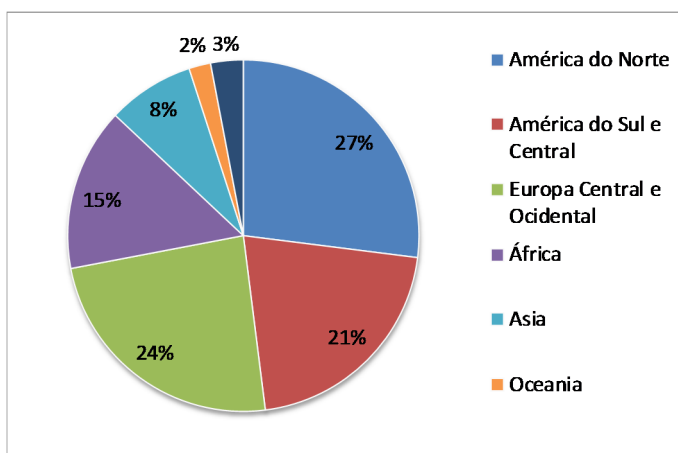
Na América do Norte, as apreensões e o uso vem diminuindo consideravelmente desde 2006 (com exceção de uma recuperação nas apreensões em 2011). Entre 2006 e 2011, o consumo de cocaína entre a população em geral nos Estados Unidos caiu 40%, o que é parcialmente ligado a uma menor produção na Colômbia, à intervenção policial e à violência inter-cartel. Enquanto, anteriormente, América do Norte e Europa Central/Ocidental dominaram o mercado de cocaína, hoje eles respondem por aproximadamente metade dos usuários de todo o mundo, um reflexo do fato de que o uso parece ter se estabilizado na Europa e declinado na América do Norte. A taxa de uso anual entre a população adulta na Europa Ocidental e Central diminuiu de 1,3% em 2010 para 1,2% em 2011 e de 1,6% para 1,5% na América do Norte (Unodc, 2013).

Na Oceania, por outro lado, apreensões de cocaína alcançaram novos máximos em 2010 e 2011 (1,9 e 1,8 toneladas, respectivamente, acima dos 290 kg apreendidos em 2009). A taxa de uso anual de cocaína na Austrália para a população maior de 14 anos de idade mais do que dobrou, passando de 1,0% em 2004 para 2,1% da população adulta em 2010, esse número é maior do que a média europeia e ultrapassa as taxas de uso correspondentes nos Estados Unidos (Unodc, 2013).

Os indicadores globais disponíveis para o mercado de cocaína sugerem que, a nível global, a disponibilidade de cocaína tem diminuído ou, pelo menos, estabilizou-se no últimos anos. Mais recentemente, há indícios de que emerge o consumo de cocaína em países anteriormente não associados a este fenômeno, e não se pode excluir que os indicadores disponíveis ainda não refletem completamente a extensão da demanda e da oferta global de cocaína. Em qualquer caso, é evidente que as regiões

como a Ásia e África, que juntos representam a maioria do mundo em população, e que o uso de cocaína tem sido, até recentemente, relativamente baixo e continua a ser, em grande parte limitado a certas sub-regiões, abrigam o potencial para uma significativa expansão do mercado de cocaína impulsionada pela demanda (Figura 1.5) (Unodc, 2013).

Figura 1.5. Distribuição dos usuários de cocaína ao redor do mundo. Adaptado de World Drug Report 2013.

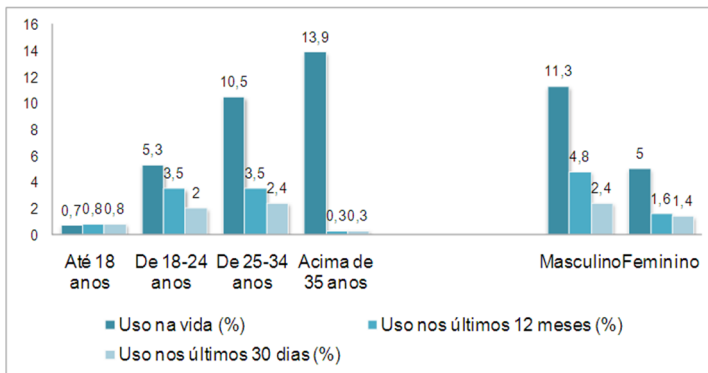


Segundo uma pesquisa realizada pelo Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) nas 108 maiores cidades do país; em 2005, no Brasil o uso de qualquer droga durante a vida (exceto tabaco e álcool) foi de 22,8%. A mesma pesquisa mostrou que o uso de cocaína durante a vida foi de 2,9% da população pesquisada, índice próximo ao da Alemanha (3,2%), porém inferior ao dos EUA, com 14,2%, e do Chile com 5,3%. A região Sudeste foi aquela onde se verificaram as maiores porcentagens (3,7%) e a menor, no Norte com aproximadamente 1%. Dados da pesquisa mostraram que o uso de cocaína durante a vida, segundo sexo e faixa etária dos 878 entrevistados em 18 cidades da região Sul com mais de 200 mil habitantes é superior

na população masculina principalmente na faixa etária de 25 – 34 anos (5,4%), enquanto que para o sexo feminino na mesma faixa etária o índice é de 1,4%, quatro vezes menor (Carlini, 2006).

Em 2009, a Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SE-NAD), órgão do governo federal responsável por coordenar a implementação das políticas nacionais sobre drogas e álcool em parceria com o Grupo Interdisciplinar de Estudos de Álcool e Drogas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (GREAFMUSP) realizou uma pesquisa nacional entre estudantes universitários brasileiros; através dela constatou-se que o uso anual de cocaína foi de 3% entre os estudantes de 18 a 35 anos (Figura 1.6), sendo observado que o uso de cocaína entre as mulheres foi muito menor do que entre os homens. A princípio este dado pode ser considerado irrelevante, mas a pesquisa concluiu que quase 49% dos universitários entrevistados já utilizaram algum tipo de droga ilícita pelo menos uma vez na vida e que o uso de drogas, álcool e tabaco nessa população específica é mais frequente do que na população em geral.

Figura 1.6. Uso de cocaína durante a vida, nos últimos 12 meses e nos últimos 30 dias entre estudantes universitários brasileiros, em 2009.



2 ANÁLISE DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS – REVISÃO DA LITERATURA

Existem vários trabalhos reportados na literatura a respeito da determinação de cocaína e outras drogas em diversas matrizes que serviram de base para a realização deste trabalho. De um modo geral, existem duas considerações a serem feitas quando se trata da análise de drogas em cédulas monetárias: 1) o uso da cromatografia a gás e da líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* que possibilitou o desenvolvimento de metodologias quantitativas muito sensíveis, seletivas e reprodutíveis; 2) a aplicação de técnicas de *screening*, como a espectrometria de mobilidade iônica (IMS, do inglês “ion-mobility spectrometry”) ou a dessorção térmica acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (TD-MS², do inglês “thermal desorption tandem mass spectrometry”), que contribuíram muito para a redução do tempo total de análise e do preparo de amostra (Armenta e De La Guardia, 2008).

2.1 Extração

Vários métodos têm sido reportados para extrair a cocaína das notas de dinheiro, entre elas a desorção térmica, a extração com solventes até amostragens com sistema a vácuo; sendo que este último é um método semi-quantitativo devido à baixa eficiência na remoção, embora presente as vantagens de evitar o manuseio das amostras e inibir a possibilidade de contaminação durante o transporte para o laboratório (Sleeman *et al.*, 1999).

Entre todos os trabalhos relatados na literatura, a técnica de extração mais empregada é a extração com solventes, pois a cocaína é bastante solúvel em solventes orgânicos e soluções aquosas ácidas diluídas. Na análise de notas de dólares americanos, os solventes já utilizados foram clorofórmio (Song, Zhang e Kohlhof, 1996), acetonitrila (Jenkins, 2001) e etanol (Marie Lafitte, 2002), juntamente com procedimentos de agitação por vórtex e centrifugação, seguidos de evaporação sob aquecimento e fluxo de nitrogênio. Metanol foi utilizado em dois trabalhos semelhantes realizados em notas de euro (Esteve-Turrillas *et al.*, 2005; Bones, Macka e Paull, 2007). No entanto, deve ser observado que o uso de solventes orgânicos como extratores pode provocar a destruição das notas, uma vez que, removem a tinta, causam danos às marcas de segurança e às marcas holográficas; mesmo o metanol, solta a folha metálica

usada para diferenciar notas falsas de verdadeiras (Jenkins, 2001; Esteve-Turrillas *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2008).

A extração sólido-líquido seguido da extração líquido-líquido também foi utilizada para a determinação de cocaína em dólares canadenses, sendo que primeiro foi efetuada uma extração com etanol, seguida de extração com $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, adição de NaOH, seguida de nova extração com CHCl_3 . Esse procedimento foi acompanhado de evaporação e redissolução em acetato de etila e mostrou-se muito laborioso e demorado além da % de recuperação ter sido muito baixa (~35,6%) (Hudson, 1989).

Ácidos diluídos também têm sido utilizados como extratores de cocaína das notas. A. Negrusz *et al.* utilizaram ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na extração da droga de dólares americanos (Negrusz, Perry e Moore, 1998). Ácido acético $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ foi o solvente extrator no trabalho com notas chinesas, sendo que 15 min após a imersão as notas foram lavadas com a mesma solução ácida para remover qualquer resquício da droga e os dois volumes foram agregados (Xu *et al.*, 2006). Segundo Heimback & Bower, as melhores condições para a determinação de cocaína em notas é: 1 min de extração com 5 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, seguido por 2 mL de NH_4OH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, SPE e 2 mL de metanol como eluente (Heimback e Bower, 2002).

Em 2006, foi realizado por Nicholls & Puckett um estudo comparativo entre uma técnica destrutiva combinada com SPE e uma não destrutiva baseada em solventes orgânicos. A partir dos resultados obtidos neste estudo, a extração baseada no uso de solventes orgânicos foi selecionada para determinar a quantidade de cocaína em várias notas. A principal vantagem da técnica não destrutiva foi o fato das recuperações serem quantitativamente comparáveis (Armenta e De La Guardia, 2008).

Recentemente, Wimmer & Schneider desenvolveram uma metodologia para a identificação de drogas de abuso, entre elas cocaína, heroína e metanfetamina em notas de euro. Para a extração das drogas, foram utilizados os mesmos procedimentos citados anteriormente com metanol como solvente extrator, agitação, centrifugação e evaporação; sendo que o solvente utilizado na redissolução foi uma mistura de metanol e acetato de amônio 5 mmol L^{-1} , 80:20 (v/v), seguida de filtração com membrana de nylon (Wimmer e Schneider, 2011).

2.2 Técnicas e desempenhos analíticos

A técnica analítica mais comumente utilizada para a determinação de cocaína em cédulas monetárias é a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, do inglês “gas chromatography mass spectrometry”). No entanto, na literatura são encontrados trabalhos com outros tipos de detectores como o de nitrogênio e fósforo (GC-NPD, do inglês “gas chromatography nitrogen-phosphorous detection”) (Keil *et al.*, 2007).

D. Song e colaboradores (1996) desenvolveram um método bastante sensível, utilizando GC-PCI-MS (do inglês, “gas chromatography - positive chemical ionization - mass spectrometry”), pelo qual obtiveram um limite de detecção de 0,5 ng/mL (Song, Zhang e Kohlhof, 1996). Atualmente, aliada a GC-MS está à cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (GC-MS/MS, do inglês “gas chromatography mass spectrometry/mass spectrometry”). Nestas técnicas, tanto a ionização por impacto de elétrons quanto a ionização química podem ser utilizadas satisfatoriamente, com a vantagem de que a GC-MS/MS, por ser mais sensível, pode fornecer limites de detecção menores.

Um estudo relatado por A. Jenkins (2001), utilizando GC-MS, com 10 notas de 1 dólar coletadas em 5 diferentes cidades dos Estados Unidos, mostrou que 92% das notas continham, em média, 1,37 µg de cocaína por nota (Jenkins, 2001).

Esteve-Turrillas *et al.* (2005) desenvolveram uma metodologia por GC-MS/MS que resultou em um limite de detecção de 0,15 ng por nota e recuperações de 101 ± 2 e $98 \pm 3\%$ foram obtidas em amostras fortificadas com 100 e 10 µg, respectivamente. Neste trabalho das 16 amostras analisadas, todas se mostraram contaminadas numa faixa de 1,25 a 889 µg, podendo inferir-se que as notas com baixas concentrações foram contaminadas indiretamente, enquanto que as com altas concentrações foram diretamente contaminadas (Esteve-Turrillas *et al.*, 2005).

Em 2008, Y. Zuo e colaboradores publicaram um estudo empregando água como solvente extrator e ultrassom, seguido de *cleanup* utilizando SPE, antes da injeção no equipamento de GC. Por este procedimento, obtiveram um limite de quantificação de 2,00 ng/mL e cocaína foi detectada em 67% das notas em circulação coletadas na região de amostragem, em quantidades que variam de 12 ng a 49,4 µg por nota (Zuo *et al.*, 2008).

A primeira utilização de LC-MS para a quantificação de cocaína em notas foi relatada por Jordan & Donnelly em 1995 (Armenta e De La Guardia, 2008). Esses autores utilizaram IMS como uma ferramenta de triagem para detectar cocaína na moeda dos EUA e, em casos positivos, ela foi quantificada usando LC-MS ou GC-MS utilizando um padrão interno deuterado.

A técnica de LC-MS/MS foi utilizada com sucesso na análise de resíduos de cocaína em cédulas monetárias irlandesas. Para a separação da cocaína de outras substâncias presentes nas notas, foi utilizado um gradiente linear de acetato de amônio (pH 4,5) e metanol como fase móvel. Duas diferentes colunas foram investigadas para a separação (Zorbax Rapid Resolution HT Eclipse XDB-C₁₈ 50,0 x 2,1 mm de diâmetro interno, 1,8 µm tamanho da partícula e Phenomenex Onyx monolítico C₁₈ 100,0 x 3,0 mm d.i.). A partir deste estudo, foi determinado que a coluna monolítica de 10 cm forneceu o melhor desempenho para a aplicação proposta, pois resultou em uma melhor eficiência em taxas aceitáveis de fluxo de fase móvel e baixas pressões. A repetibilidade, determinada através da injeção de seis repetições de uma solução padrão 0,10 mg/L, foi de 3,7%. Enquanto que a reprodutibilidade (4,9%) foi medida utilizando seis soluções 0,5 mg/L de analito preparadas individualmente. O LD e o LQ foram de 4 pg/nota e 14 pg/nota, respectivamente. Este procedimento rendeu valores de recuperação de 87 ± 8%. O tempo de eluição da cocaína nestas condições foi de 10 min (Bones, Macka e Paull, 2007).

Proposta por Wimmer & Schneider (2011), outra metodologia também fez uso de LC-MS/MS e foi aplicada na quantificação simultânea de 10 drogas de abuso, incluindo cocaína e benzoilecgonina. A separação foi realizada em uma coluna BEH C₁₈ (1,7 µm, 2,1 x 100 mm, Waters). Foi utilizado um gradiente linear composto do solvente A (95:5 H₂O/acetonitrila + ácido fórmico a 0,5%) e do solvente B (acetonitrila + ácido fórmico a 0,5%). A fase móvel inicial continha 97,5% do solvente A. O tempo total da corrida foi de 6 min. Os resíduos foram monitorados e quantificados através do modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Cocaína foi encontrada em todas as notas (no total 64 notas foram analisadas) e nelas também foi detectada benzoilecgonina que pode ser explicada pela hidrólise da cocaína na superfície das notas. Neste estudo foi encontrado um valor médio por nota de 106 ng de cocaína e 43 ng para a benzoilecgonina, respectivamente (Wimmer e Schneider, 2011).

O único método reportado na literatura utilizando eletroforese capilar é com detecção por eletroquimioluminescência para a determinação de cocaína em cédulas monetárias chinesas e foi proposto por Y. Xu e colaboradores em 2006. Para aumentar a sensibilidade do método foi empregada uma técnica de pré-concentração *on-line* denominada Field Amplified Sample Stacking (FASS) e sob as condições otimizadas foi obtido um limite de detecção de 60 nmol L⁻¹. Apesar da aplicabilidade do método e do curto tempo de análise (6 min), deve ser observada a sua falta de especificidade quando comparado com metodologias que usam a espectrometria de massas como sistema de detecção (Xu *et al.*, 2006).

GLORIA (gold-labeled, optically-read, rapid immunoassay) tem sido empregada com sucesso na detecção de substâncias controladas e diferencia-se das demais por não ser um método de separação. A técnica se baseia num processo de detecção que utiliza ensaios imunológicos e é realizada em apenas 3 min e fornece um limite de detecção de ng. No que diz respeito à especificidade da técnica, compostos fluorescentes de outras drogas, resíduos de aditivos alimentícios e de medicamentos podem interferir fornecendo resultados falso-positivos (Armenta e De La Guardia, 2008).

A TD-MS² é a segunda metodologia mais comumente utilizada para a análise de cocaína em cédulas monetárias. A TD consiste em inserir a cédula entre duas placas metálicas e aquecê-la por 1 segundo (a 285 °C); o material volátil é liberado em uma região de ionização química à pressão atmosférica (APCI). Em fase gasosa, são monitoradas transições de íon-precursor/íon-fragmento e a presença de um composto é indicada por uma elevação na resposta das transições correspondentes. O limite de detecção depende da quantidade de droga desorvida da nota, mas normalmente é abaixo de 1 ng. Embora seja uma técnica rápida e sensível na detecção de drogas neste tipo de matriz e capaz de distinguir o dinheiro que circula entre a população em geral do dinheiro do tráfico, ela não pode ser considerada uma técnica quantitativa porque a quantificação exata não é possível devido à dificuldade de comparar as respostas de soluções com aquelas aprisionadas dentro da matriz das cédulas monetárias (Carter, Sleeman e Parry, 2003; Ebejer *et al.*, 2005; Dixon *et al.*, 2006; Ebejer *et al.*, 2007; Keil *et al.*, 2007).

A técnica de IMS também tem sido usada para a determinação de drogas de abuso em cédulas monetárias devido à versatilidade, robustez, portabilidade e pouca necessidade de manutenção. Ela permite a análise de uma grande quantidade de notas através de um sistema de vácuo

ou a análise de notas individuais através da coleta dos resíduos feito com um cotonete tipo *swab* ou pela inserção da própria nota na unidade de vaporização do IMS, sendo que a inserção da nota resulta em análises 1000 vezes mais sensíveis que a amostragem a vácuo. Esta técnica revela traços de substâncias controladas recolhidas em um papel filtro, aquecidos até a vaporização e ionizados por elétrons emitidos por uma fonte de ^{63}Ni . O tempo que os íons “flutuam” na presença de um campo elétrico até colidirem com o detector é medido, e as substâncias são identificadas pelo seu tempo de flutuação. No entanto, o método sofre dos mesmos inconvenientes da TD-MS², ou seja, é difícil a obtenção de resultados precisos e quantitativos (Lawrence, 1987; Armenta e De La Guardia, 2008; Kolomiets e Pervukhin, 2009).

Em resumo, a cocaína é uma das drogas ilícitas mais usadas estando intimamente ligada ao dinheiro em circulação em todo o mundo, seja através da troca, do armazenamento ou do uso. A utilização de diferentes técnicas isoladas ou em conjunto possibilitam o desenvolvimento de metodologias quantitativas ou semi-quantitativas, ou seja, hoje em dia há disponível um conjunto de procedimentos analíticos que, dependendo da necessidade, permitirá aos cientistas selecionar entre a detecção de cocaína de um modo rápido (TD-MS², TD-IMS ou imunoensaio) ou a quantificação deste analito com exatidão e precisão (GC-MS, LC-MS e CE).

3 ANÁLISE DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO UV

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste capítulo é o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de cocaína em cédulas monetárias em circulação na cidade de Florianópolis/SC utilizando a técnica de eletroforese capilar com detecção UV.

3.1.2 Objetivos específicos

- ❖ Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de cocaína utilizando eletroforese capilar com detector de arranjo de diodos.
- ❖ Utilizar *softwares* de simulação para auxiliar na otimização das condições analíticas de separação, tais como: componentes do eletrólito de corrida, força iônica do eletrólito de corrida, voltagem de separação, entre outras.
- ❖ Validar a metodologia proposta fazendo testes de adição e recuperação e determinar os parâmetros de validação do método, como por exemplo, limites de detecção e quantificação; precisão instrumental, intra e interensaio; entre outros.
- ❖ Avaliar a exatidão do método proposto com outro desenvolvido com a técnica de LC-MS/MS, sendo este último tomado como referência, por ser esta técnica considerada como inequívoca e mais sensível do que a CE.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Instrumentação

O método desenvolvido por eletroforese capilar foi efetuado em um equipamento da marca Agilent Technologies modelo 7100 (Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de arranjo de diodos. A cocaína e a lidocaína foram detectadas em 200 nm e o propranolol (padrão interno) em 215 nm, respectivamente. A temperatura do capilar foi mantida

em 20 °C durante todos os experimentos. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o programa HP Chemstation, versão B.04.03.

Para a otimização da composição do eletrólito de corrida foi utilizado o software Peakmaster 5.1[®] que pode ser baixado gratuitamente do site <http://web.natur.cuni.cz/~gas/>. Por este programa é possível obter características do eletrólito de corrida como: pH, força iônica, condutividade, capacidade tamponante e a melhor proporção entre os constituintes do eletrólito. Também é possível se obter características eletroforéticas dos analitos, tais como: tendências de dispersão, mobilidade efetiva, entre outras.

3.2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Cocaína (1.000 mg L⁻¹ em acetonitrila) foi adquirida de Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, EUA). Cloridrato de propranolol (padrão interno – P.I.), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido 2 - hidroxibutanoico (HIBA) foram adquiridos da Sigma - Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Água desionizada (Milli - Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, EUA) foi utilizada para preparar o eletrólito de corrida (BGE, do inglês “background electrolyte”. Acetonitrila (grau HPLC) foi adquirida de Tedia Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.2.3 Separação por CE

As análises eletroforéticas foram realizadas em um capilar de sílica fundida (48,5 centímetros x 75 µm D.I. x 375 µm D.E.) com revestimento externo de poliimida, o qual foi obtido de Polymicro (Phoenix, AZ, EUA). Antes da primeira utilização, os capilares foram condicionados com NaOH 1 mol L⁻¹ e água desionizada durante 40 min, respectivamente. Diariamente, os capilares foram condicionados com NaOH 1 mol L⁻¹, água desionizada e BGE, durante 5 min, consecutivamente. A composição do eletrólito de corrida otimizado foi composta de 20 mmol L⁻¹ HIBA e 60 mmol L⁻¹ de TRIS, pH 8,4. O capilar foi lavado por 30 s com BGE entre todas as corridas. As soluções padrão e amostras foram introduzidas a partir da extremidade do capilar mais afastada do detector (comprimento até o detector = 40 cm) e injetadas hidrodinamicamente a 50 mbar durante 10 s (50 mbar = 4996,2 Pa). A separação foi realizada aplicando-se uma voltagem positiva de 25 kV.

3.2.4 Curvas de calibração

Para as análises de CE, uma solução de trabalho com o padrão de cocaína foi preparada por diluição da solução estoque 1.000 mg L^{-1} até 10 mg L^{-1} , em acetonitrila. A solução estoque de cloridrato de propranolol (P.I.) foi preparada por dissolução de 20 mg do padrão em 10 mL de acetonitrila. A concentração adicionada de P.I. às amostras e padrões de cocaína foi $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. As curvas de calibração foram obtidas após a preparação de padrões individuais em concentrações cuja faixa de aplicação foi de 0,8 a 8 mg L^{-1} . Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração, à temperatura de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5 Procedência e preparo das amostras

Este estudo analisou 46 cédulas monetárias brasileiras de R\$ 2,00, coletadas na cidade de Florianópolis, no Estado de Santa Catarina, sendo que 30 foram obtidas diretamente da circulação em geral e 16 de caixas eletrônicos. Todas as notas constituem um grupo de amostragem de dinheiro circulante e elas não foram adicionadas de padrão de cocaína. As amostras foram colocadas num tubo de ensaio (uma nota em cada tubo), contendo 10 mL de acetonitrila e a extração de cocaína foi realizada por ultrassom durante 8 min. Este procedimento foi baseado no trabalho relatado por A. Jenkins em 2001, sendo que esta pesquisadora utilizou 5 mL de acetonitrila e não usou ultrassom e sim um agitador do tipo vortex, no qual as amostras permaneceram por 2 horas. Antes da injeção no equipamento de CE, tanto as amostras quanto os padrões foram colocados em *vials* numa proporção de 9:1 (extrato de nota e/ou padrão: P.I.).

3.2.6 Método comparativo utilizando LC-MS/MS

A comparação entre o método proposto por CE-UV e outro método utilizando LC-MS/MS foi feita pela análise de 10 extratos de notas escolhidos aleatoriamente a partir das amostras que continham cocaína acima do limite de quantificação do método. Essas amostras foram injetadas, em duplicata, no mesmo dia em ambos os instrumentos, tendo em conta que, antes da injeção no LC-MS/MS, os extratos das notas foram diluídos 100 vezes com água desionizada. As curvas analíticas foram preparadas também em água desionizada na faixa de aplicação de 10 a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, preparadas e injetadas em duplicata.

O método usando LC-MS/MS foi realizado em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL). Foi utilizada uma coluna cromatográfica da marca Phenomenex modelo Synergi Polar-RP com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2 mm e tamanho da partícula igual a 4 μm ; equipada com uma pré – coluna da mesma marca modelo Polar-RP (4x2,0 mm). Foi utilizado o modo isocrático de eluição e os experimentos foram realizados utilizando uma fase móvel constituída de 50% de solvente A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%) e 50% de solvente B (metanol:H₂O (95:5 v/v)). A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 350 $\mu\text{L min}^{-1}$. Em todas as corridas, o volume injetado foi de 10 μL e a temperatura da coluna foi ajustada em 40 °C.

O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas triploquadrupolar API 3200™, Applied Biosystems/MDS Sciex, (Sciex, Concord, CA) equipado com cela de colisão LINAC® e fonte de ionização Turbo V™ operada no modo TurboIonSpray®. Os experimentos foram realizados usando a fonte no modo de ionização positivo. Foi aplicado o modo de escaneamento de massas Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês “Multiple Reaction Monitoring”) para a realização das análises quantitativas. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software* Analyst versão 1.5.1.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Desenvolvimento do método

3.3.1.1 Composição do eletrólito de corrida

A cocaína é uma base fraca (pKa 8,6) e, partindo-se deste princípio, optou-se por escolher como co-íon o TRIS, pois o seu pKa é 8,15 e em torno deste valor de pH a cocaína já encontra-se ionizada mais que 50%. Além de proporcionar uma boa capacidade tamponante ao eletrólito, o TRIS apresenta outras características atrativas, incluindo a baixa absorção de radiação UV no mesmo comprimento de onda da cocaína e μ_{eff} semelhante a do analito, o que minimiza o alargamento das bandas causadas pela dispersão por eletromigração (EMD, do inglês “electromigration dispersion”). HIBA foi escolhido como contra-íon, devido à baixa absorção no UV. Além disso, como o TRIS, o HIBA é um sólido, que permite a preparação do eletrólito ser realizada pesando-se as quantidades requeridas de ambos, o que facilita o processo.

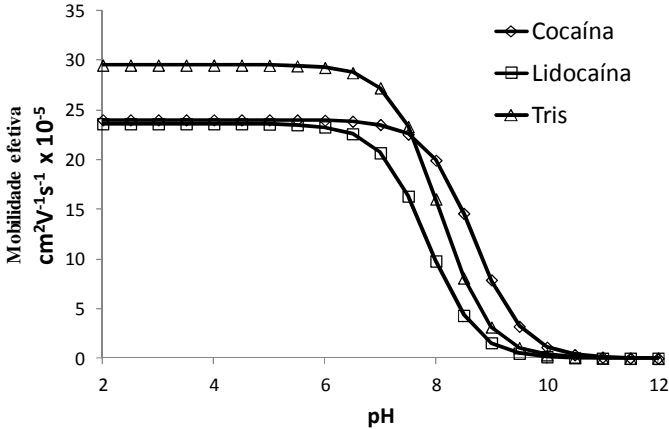
A lidocaína é utilizada como um aditivo na adulteração da cocaína (Barat e Abdel-Rahman, 1996) e, em testes preliminares, verificou-se a sua presença nos extratos das notas. A lidocaína tem características estruturais similares às da cocaína e pode comprometer a seletividade do método. Assim, ela foi considerada relevante tanto na construção das curvas de mobilidade efetiva *versus* pH como na simulação da composição do eletrólito de corrida com o *software* Peakmaster®, embora ela não tenha sido considerada para fins de validação do método nem para a quantificação.

Com a escolha do co- e do contra-íon acertada, partiu-se para a escolha do pH mais adequado para a separação. Para isso foram construídas curvas de mobilidade efetiva *versus* pH para a cocaína, lidocaína e TRIS. As curvas foram obtidas utilizando-se a Equação 3-1, onde $\mu_{\text{eff,A-}}$ é a mobilidade efetiva e $\mu_{\text{act,A-}}$ é a mobilidade iônica.

$$\text{Equação 3-1} \quad \mu_{\text{eff,A-}} = \frac{\mu_{\text{act,A-}}}{1 + 10^{pK_a - \text{pH}}}$$

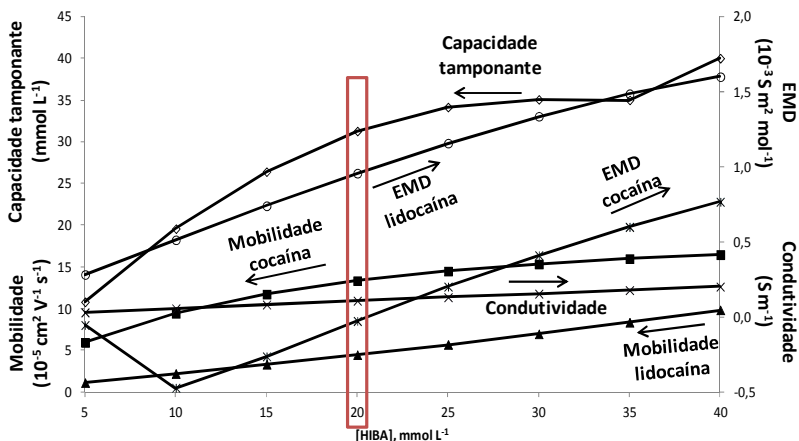
A Figura 3.1 mostra o intervalo de pH (6,0-10,0) que proporcionaria a separação mais eficaz dos analitos, considerando-se que tanto a escolha do co-íon, como a do contra-íon do eletrólito de corrida destinou-se a alcançar uma boa capacidade tamponante, reduzir o efeito Joule, a dispersão por eletromigração e a adsorção dos analitos no capilar. Observa-se que no pH escolhido, em torno de 8,0 existe uma boa diferença entre as mobilidades efetivas dos analitos o que colabora para que não ocorra a co-migração deles, também neste valor de pH, o TRIS fornece a sua máxima capacidade tamponante; porém, os analitos estão na forma catiônica e a parede do capilar está com forte carga negativa. Assim, o uso de uma base que contém um grupo amino, tal como TRIS, pode ser aplicado a fim de reduzir a adsorção das substâncias de interesse no capilar. Finalmente, o pH do eletrólito fornece um alto fluxo eletrosmótico positivo (em direção ao cátodo), fazendo com que os analitos migrem no modo co-eletrosmótico. Assim, o tempo de migração dos analitos diminui, bem como o tempo total de análise.

Figura 3.1. Curvas de mobilidade efetiva versus pH para a cocaína, lidocaína e TRIS.



As concentrações de TRIS e HIBA foram otimizadas usando o *software* Peakmaster 5.1[®]. Para isso, a concentração de TRIS foi fixada em 60 mmol L⁻¹ e a concentração de HIBA foi variada de 5 a 40 mmol L⁻¹. A mobilidade do fluxo eletrosmótico foi obtida experimentalmente para a simulação. Os parâmetros EMD, condutividade e capacidade tampicante foram avaliados e os resultados obtidos são mostrados na Figura 3.2. De acordo com a análise das curvas de cada parâmetro, a composição ótima do eletrólito foi 60 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HIBA, pH 8,4. Com esta composição, a EMD para a cocaína ficou em torno de zero ($0,03 \times 10^{-3} \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$), o que gera alta simetria de pico; a capacidade tampicante foi de 31 mmol L⁻¹, o que torna o método robusto; e a condutividade baixa ($0,106 \text{ S m}^{-1}$), o que minimiza o efeito Joule.

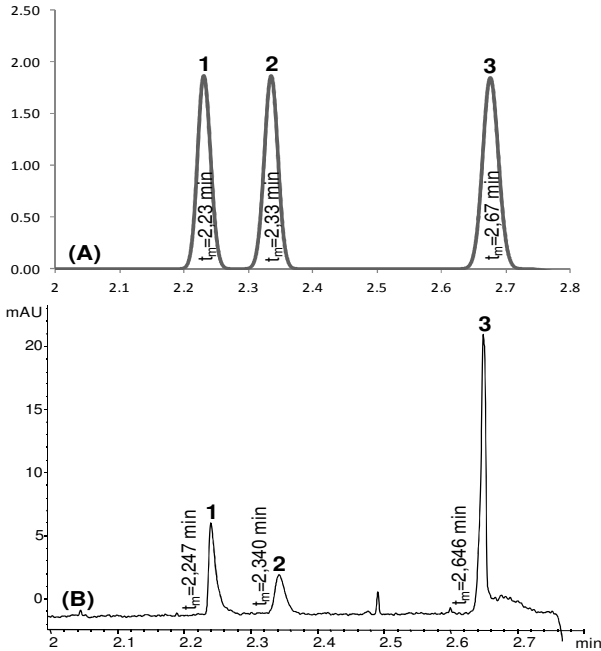
Figura 3.2. Otimização da composição do eletrólito de corrida utilizando o software Peakmaster 5.1®, fixando-se a concentração de TRIS em 60 mmol L⁻¹ e variando-se a concentração de HIBA de 5 a 40 mmol L⁻¹.



A Figura 3.3A mostra o eletroferograma simulado com a composição do eletrólito otimizado e a Figura 3.3B mostra o eletroferograma experimental de um extrato de cédula monetária. Uma boa correlação pode ser observada entre os dois eletroferogramas, mostrando que a simulação foi uma ferramenta importante no desenvolvimento do método, pois ela permite visualizar e otimizar diversos tipos de separações sem o uso de amostras, reagentes e padrões.

Propranolol foi selecionado como padrão interno para este método por suas características químicas: possui um grupo amino, pKa 9,45 (Wan *et al.*, 2002), o que permite um alto grau de ionização, logo alta μ_{eff} , no pH do eletrólito (8,4) o que contribui para a rapidez da separação; devido às suas propriedades cromóforas, como os dois anéis benzênicos presentes em sua estrutura, absorve radiação UV, assim como a cocaína, permitindo que o método seja desenvolvido com detecção direta.

Figura 3.3. Comparação entre o eletroferograma simulado (A) e o experimental (B) de um extrato de nota de dinheiro sob as condições otimizadas. Legenda dos picos: 1 – propranolol (P.I.), 2 – cocaína, 3 – lidocaína. Condições experimentais: ver Seção 3.2.



3.3.1.2 Aumentando a detectabilidade do método

Estratégias de pré-concentração on-line devem ser consideradas quando se propõe metodologias para a análise em níveis traço, como o caso de cocaína em cédulas monetárias.

Neste trabalho, aliou-se o preparo de amostra com um modo de pré-concentração on-line que utiliza acetonitrila; em outras palavras, todos os padrões de cocaína necessários para a validação do método, o padrão interno, as amostras, assim como as diluições foram feitas com acetonitrila. O efeito global é um aumento da sensibilidade de cerca de 20 vezes (Shihabi, 2000). Por sua baixa condutividade, a acetonitrila por si

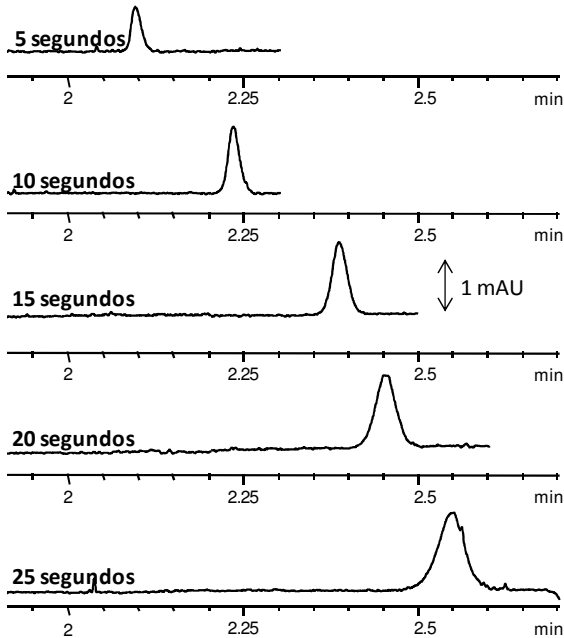
só, já provoca o empilhamento dos íons, quando o *plug* da amostra entra em contato com o *plug* do eletrólito aquoso.

Na tentativa de pré-concentrar a amostra dentro do capilar, o tempo de injeção foi variado entre 5 e 25 segundos sob a pressão de 50 mbar. Observou-se que, à medida que o tamanho do *plug* da amostra aumentou, o efeito de descontinuidade do *plug* tornou-se mais significativo, aumentando a concentração do analito naquela seção de área. No entanto, a partir do tempo de injeção de 15 segundos o pico da cocaína começou a sofrer um significativo alargamento da banda e também um aumento no tempo de migração devido à diferença entre a viscosidade e a condutividade do *plug* da amostra (cujo solvente era acetonitrila) e o eletrólito de corrida que era uma solução aquosa (Figura 3.4).

Portanto, optou-se pelo tempo de injeção de 10 segundos, mantendo-se uma boa eficiência de pico e uma boa relação sinal-ruído, sendo que este tempo de injeção é mais do que o triplo do que se costuma injetar em trabalhos rotineiros (3 segundos).

O empilhamento provocado pela acetonitrila é favorecido por um longo capilar e uma elevada força iônica do eletrólito de corrida, que favorece a injeção de um *plug* de amostra maior sem comprometer a eficiência. Portanto, foi utilizada a voltagem de + 25 kV (que gerou uma corrente elétrica baixa: 22 μ A), capilar com 48 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo e eletrólito de corrida composto por 20 mmol L⁻¹ de HIBA e 60 mmol L⁻¹ de TRIS, o que resultou numa força iônica de 20 mmol L⁻¹. Mantidas estas condições houve um aumento significativo na eficiência e na simetria do pico da cocaína, o que pode ser relacionado a um ganho real na detectabilidade.

Figura 3.4. Variação do tempo de injeção do padrão de cocaína 1 mg L⁻¹, sob pressão de 50 mbar. Condições experimentais: ver Seção 3.2.



3.3.2 Validação do método

Para avaliar o método proposto para a determinação de cocaína em cédulas monetárias, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, repetibilidade (instrumental e intra-ensaio), precisão intermediária, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e exatidão. A metodologia empregada na avaliação destes parâmetros foi baseada na padronização para produtos farmacêuticos proposta pelo ICH (“International Conference on Harmonization”).

3.3.2.1 Avaliação do efeito de matriz

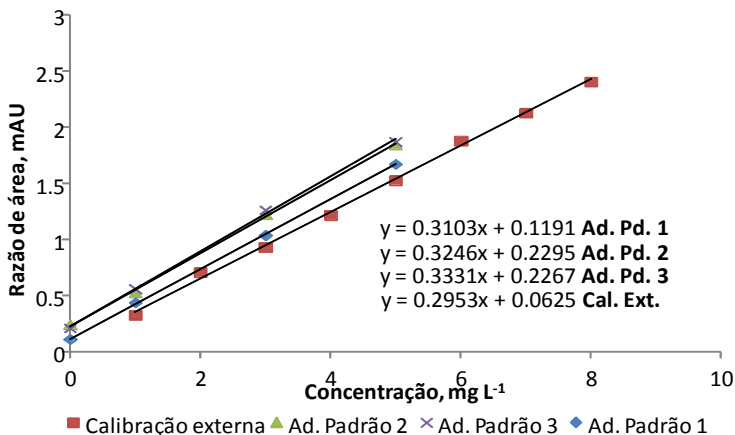
Para avaliar se as demais substâncias, que provavelmente também são extraídas das cédulas com a acetonitrila, provocariam

alguma influência na detecção da cocaína foi realizado um estudo do efeito de matriz, através do método de adição de padrão.

Durante as análises dos extratos das cédulas, verificou-se que algumas provenientes dos caixas eletrônicos eram muito novas e não apresentavam cocaína ou esta se encontrava abaixo do limite de detecção. Então, realizou-se o experimento de adição de padrão com essas cédulas.

O estudo consistiu na construção de três curvas de calibração feitas com três extratos de notas diferentes, em quais a cocaína foi detectada acima do limite de quantificação, adicionados do padrão de cocaína que foram comparadas com uma curva de calibração sem a presença da amostra. A Figura 3.5 apresenta as quatro curvas de calibração e como elas se mostraram paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da cocaína nos extratos das notas. Portanto, o método é seletivo e permite que a cocaína possa ser quantificada nos extratos pelo método de calibração externa.

Figura 3.5. Comparação entre as curvas de adição de padrão de cocaína em 3 extratos de notas com a curva de calibração externa para verificar o efeito da matriz no método.

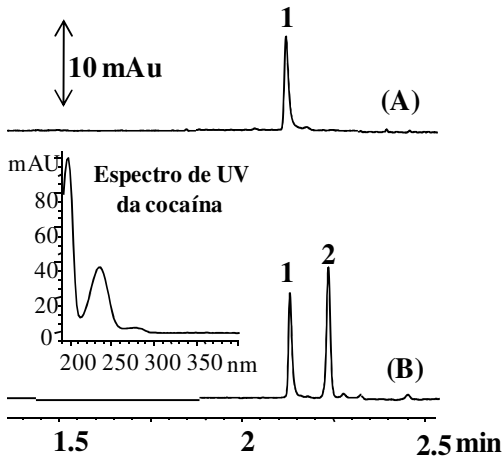


3.3.2.2 Seletividade

Como a proposta deste trabalho é o desenvolvimento de um método utilizando eletroforese capilar com detecção UV, precisa ser citado

que uma das maneiras de atestar a seletividade é feita através do uso de detectores como o de arranjo de diodos, presente no equipamento utilizado, que comparam o espectro do pico com o de um padrão e isto serve como uma indicação da presença do composto puro. Tendo isso em mente, foi observado no espectro de UV da cocaína (inserido na Figura 3.6) que ele possui duas bandas de absorção no UV (200 e 230 nm) e, portanto, foi escolhido o comprimento de onda de 200 nm para a realização da determinação da cocaína por ser o de mínima variação da absortividade molar do analito, o que maximiza o sinal detectado.

Figura 3.6. Ilustração da seletividade do método: (A) extrato de nota de dinheiro livre do analito de interesse; (B) extrato de nota de dinheiro adicionado de 4 mg L⁻¹ de padrão de cocaína. Legenda dos picos: 1 – propranolol (P.I.), 2 – cocaína.



Em qualquer método de análise é essencial identificar corretamente o composto de interesse. Esta necessidade é ainda mais importante quando se trata de análise toxicológica, autenticidade e abuso de drogas porque os resultados são cruciais para a tomada de decisões seguras.

A fim de demonstrar que o composto detectado nos extratos das cédulas monetárias é, de fato, a cocaína, e, portanto garantir a seletividade do método por CE-UV, uma análise ortogonal foi realizada, na qual o pico analisado foi recolhido no equipamento de CE e injetado no equipamento de LC-MS/MS.

A LC-MS/MS é uma técnica de separação com um sensível sistema de detecção usado para aumentar a confiabilidade na identificação. Os pontos que são observados numa análise LC-MS/MS são o tempo de retenção na coluna cromatográfica, a razão massa/carga do íon precursor, o espectro de massa dos fragmentos das moléculas geradas na cela de colisão, o uso de padrão de referência e a abundância de sinal (Rivier, 2003; Stoev e Stoyanov, 2007; Zeng *et al.*, 2011). Utilizando este conjunto de informações analíticas sobre a molécula, a droga é identificada com um elevado grau de confiança.

A LC-MS/MS pode ser utilizada conjuntamente com outra técnica de separação que utiliza menos informações sobre o analito, por exemplo, a eletroforese capilar (com detecção por UV), pois na CE-UV, os dados utilizados na identificação são o tempo de migração e o espectro de UV (este último é obtido quando a molécula tem grupos cromóforos na sua estrutura química), por essas razões, a identidade da molécula por CE-UV geralmente é confirmada com a adição de um padrão.

Uma vez que a molécula de interesse é separada da matriz da amostra por CE-UV é possível a coleta de uma fração da solução de dentro do capilar contendo o pico do analito através da aplicação de pressão ou de voltagem. Este volume coletado (\sim nL) pode ser reservado e analisado por uma outra técnica (Helmja *et al.*, 2009). As características de CE-UV aliadas à elevada sensibilidade da LC-MS/MS permitem a hifenização off-line das duas técnicas para confirmar a identidade das moléculas separadas por CE-UV.

Ao contrário de outros modos de hifenização, a seletividade ortogonal que pode ser conseguida através da hifenização off-line de CE-UV-LC-MS/MS permite uma complementação entre duas técnicas de separação com diferentes mecanismos de separação, o que contribui para um maior rigor na identificação.

Neste experimento, foi utilizado o padrão de cocaína na concentração de 5 mg L^{-1} e cinco extratos de cédulas monetárias em circulação. Foram utilizadas as mesmas condições experimentais e instrumentais descritas na Seção 3.2 deste Capítulo em relação à análise por CE-UV, com exceção ao tempo de injeção, que foi de 30 segundos a 50 mbar.

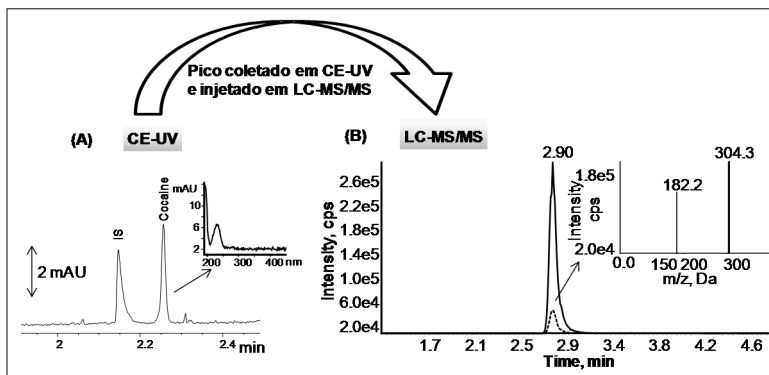
O pico da cocaína foi recolhido em um *vial* contendo $50 \mu\text{L}$ de solução de HIBA 10 mmol L^{-1} , colocado na extremidade mais afastada do detector (*outlet*), pausando-se a corrida a 5% antes e depois do tempo necessário para a saída do pico do capilar. Este *vial* foi utilizado direta-

mente na injeção no equipamento de LC-MS/MS. Aplicaram-se as mesmas condições experimentais e instrumentais descritas na Seção 3.2.6 deste Capítulo, com exceção ao modo de escaneamento de massas empregado que foi o Q1 Multiple Ions.

O procedimento foi realizado off-line e a vantagem é que não é necessário que o eletrólito de corrida utilizado na eletroforese capilar seja compatível com a fonte de ionização do espectrômetro de massa. Assim, é possível explorar toda a versatilidade da eletroforese capilar, sem ter que alterar os aditivos normalmente utilizados no eletrólito de corrida, tais como surfactantes, ciclodextrina e sais que não podem ser utilizados com uma fonte *electrospray* (Smith *et al.*, 1988; Maxwell e Chen, 2008).

A Figura 3.7A mostra o eletroferograma do extrato de uma cédula monetária obtido por CE-UV e a Figura 3.7B mostra o cromatograma da fração recolhida no equipamento de eletroforese capilar e o espectro de massa da cocaína obtida por LC-MS/MS. Esta informação aumenta grandemente a confiabilidade do resultado, pois uma separação ortogonal é obtida. Assim, em uma das dimensões, a separação deve-se à mobilidade eletroforética da substância de interesse; enquanto que, na outra, é devido à partição do analito com a fase estacionária. Além disso, na primeira dimensão o espectro UV é adquirido e na segunda o espectro de massas é obtido, tornando a identificação muito mais confiável.

Figura 3.7. Eletroferograma de um extrato de nota de dinheiro usando o método desenvolvido por CE-UV (A) e o cromatograma da fração coletada no equipamento de eletroforese capilar e injetada no LC-MS/MS para a confirmação da presença de cocaína (B).



3.3.2.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração deve ser determinada, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas dessa substância. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva de calibração (Ribani *et al.*, 2004).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva de calibração a partir de um conjunto de dados experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como método dos mínimos quadrados. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos dados experimentais, o coeficiente de correlação r , pois um valor de r o mais próximo de 1,0 é considerado evidência de que existe um ajuste ideal dos dados usados na construção da curva de regressão linear, obtida por meio do método dos mínimos quadrados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa

podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2001; Chui, Zucchini e Lichtig, 2001).

Neste trabalho, a linearidade foi avaliada considerando o coeficiente de correlação (r) e também se aplicando o teste de hipótese de linearidade *a priori* (Tabela 3.1). O teste foi realizado por meio da comparação entre o $F_{\text{calculado}}$ e o $F_{\text{crítico}}$ e, neste caso, o $F_{\text{calculado}}$ foi maior do que o $F_{\text{crítico}}$ indicando que a regressão é significativa para o modelo linear aplicado. Outro teste F foi realizado para verificar a falta de ajuste e os resultados não mostram falta de ajuste com o modelo linear aplicado, uma vez que $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3.1. Dados relativos à linearidade do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 3.2.

Parâmetro	Valor
Linearidade - faixa de aplicação (mg L ⁻¹) ^a	0,8 - 8,0
Linearidade – inclinação (L mg ⁻¹) ^a	0,320 ± 0,003
Linearidade – intercepto ^a	-0,003 ± 0,015
Linearidade - coeficiente de correlação (r) ^a	0,9997
F para a regressão ^b	3181,3
F para a falta de ajuste ^c	0,00014

^a Cada ponto da curva preparado em duplicata e injetado em duplicata.

Curvas de calibração com correção da área com padrão interno.

^b $F_{\text{crítico}} = 4,6$; ^c $F_{\text{crítico}} = 3,6$

3.3.2.4 Conformidade do sistema e limites de detecção e quantificação

O sistema a ser utilizado deve ser avaliado através de testes de conformidade do sistema a fim de que se possa confiar nos dados obtidos. Alguns parâmetros utilizados nesta avaliação são: fator de retenção, repetitividade, resolução, fator de alargamento e número de pratos, sendo

que pelo menos dois destes itens são considerados necessários para garantir a qualidade da análise como um todo (Ribani *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a conformidade do sistema foi avaliada através dos parâmetros descritos na Tabela 3.2 e de acordo com os dados obtidos o método desenvolvido apresentou bons resultados de eficiência com número de pratos maiores que 35000 para a cocaína, boa simetria do pico e resolução adequada entre o analito e o padrão interno.

Tabela 3.2. Dados relativos à conformidade do sistema e aos limites de detecção e quantificação. Condições experimentais: ver Seção 3.2.

Parâmetro	Valor
Número de pratos ^a	35851
Simetria de pico ^b	0,99
Fator de assimetria de pico ^b	0,60
Fator de cauda de pico ^b	0,78
Resolução (cocaína : propranolol) ^c	1,0
Limite de detecção para o padrão (mg L ⁻¹)	0,2
<u>Limite de quantificação para o padrão (mg L⁻¹)</u>	<u>0,8</u>

^aNúmero de pratos calculado de acordo com a equação $N=16(t_R/w)^2$, onde t_R = tempo de retenção e w =largura do pico na linha de base. Concentração de cocaína 4 mg L⁻¹.

^bSimetria de pico obtida do software HP Chemstation®, versão B.04.03. Fator de assimetria calculado usando a distância a partir do centro do pico para a cauda do pico dividido pela distância do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 10% da altura máxima do pico. Fator de cauda foi calculado usando a distância da cauda frontal do pico para a cauda do pico dividido por duas vezes a distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 5 % da altura máxima do pico.

^cResolução calculada de acordo com a equação $R_s = 2 \frac{t_{Rb} - t_{Ra}}{w_a + w_b}$, onde t_{Rb} e t_{Ra} são os tempos de retenção de dois picos adjacentes e w_a e w_b são as larguras dos picos na linha de base. Concentração de cocaína 4 mg L⁻¹ e de propranolol 2 mg L⁻¹, respectivamente.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida, utilizando um determinado método analítico (Faria, Souza e Oliveira, 2008). O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método da relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo que neste trabalho optou-se por utilizar este último método. Portanto, o LD e o LQ foram calculados com base nas equações $LD = (3 \times s)/S$; $LQ = (10 \times s)/S$, respectivamente, onde s é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da curva analítica. Os limites de detecção e quantificação utilizando o método de CE - UV se mostraram adequados para a determinação de cocaína nas cédulas monetárias (Tabela 3.2).

3.3.2.5 Precisão

A precisão representa a discrepância dos resultados entre experimentos independentes realizados com uma mesma amostra ou padrões, sob as condições do método proposto. Na prática, em validação de métodos, a precisão é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês “relative standard deviation”), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, um CV de até 20% é aceito, dependendo da complexidade da amostra. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Ribani *et al.*, 2004). Neste trabalho foram avaliadas a precisão instrumental, a precisão intra-ensaio e a precisão intermediária (Tabela 3.3).

A precisão instrumental foi determinada por meio da injeção do mesmo extrato de uma nota 10 vezes, consecutivamente, e os valores de CV para o tempo de migração da cocaína e razão da área do pico usando o padrão interno foram de 2,2 e 0,3%, respectivamente. A precisão intra-ensaio foi determinada por meio da preparação de 6 repetições de um padrão de cocaína, a uma concentração de 1 mg L^{-1} , adicionado do padrão

interno, e injetadas no mesmo dia. Os valores de CV% para o tempo de migração da cocaína e razão da área do pico usando o padrão interno foram de 2,2 e 3,0%, respectivamente. A precisão intermediária foi verificada através da preparação diária de três padrões de cocaína nas concentrações de 1, 2 e 3 mg L⁻¹, adicionados do padrão interno, e injetados em duplicata em três dias consecutivos. Para a razão de área do pico, o CV obtido para as três concentrações foi de 0,3; 4,5 e 3,4%, respectivamente.

Tabela 3.3. Dados relativos à precisão do método para a determinação de cocaína por CE-UV. Condições experimentais: ver Seção 3.2.

Parâmetro	CV%
Precisão instrumental; área do pico; n = 10	0,3
Precisão instrumental; tempo de migração; n = 10	2,2
Precisão intra-ensaio; área do pico; n = 6	3,0
Precisão intra-ensaio; tempo de migração; n = 6	2,2
Precisão intermediária; área do pico; (1 mg L ⁻¹); n = 3	0,3
Precisão intermediária; área do pico; (2 mg L ⁻¹); n = 3	4,5
Precisão intermediária; área do pico; (3 mg L ⁻¹); n = 3	3,4
Precisão intermediária; tempo de migração; (1 mg L ⁻¹); n = 9	0,4
Precisão intermediária; tempo de migração; (2 mg L ⁻¹); n = 9	1,5
Precisão intermediária; tempo de migração; (3 mg L ⁻¹); n = 9	1,2

3.3.2.6 Exatidão

A exatidão representa o nível de conformidade entre resultados individuais obtidos e um valor de referência. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos baseados em propriedades físicas diferentes; ensaios de recuperação e adição de padrão. Neste trabalho, a exatidão foi obtida através de ensaios de recuperação e, também, através da comparação do método utilizando CE-UV com outro utilizando LC-MS/MS.

Para a comparação entre as metodologias, dez extratos de notas escolhidos aleatoriamente a partir das amostras que continham cocaína acima do limite de quantificação foram injetados, em duplicata, no mesmo dia em ambos os instrumentos, levando-se em consideração que, antes da injeção no LC-MS/MS, os extratos foram diluídos 100 vezes com água desionizada. Foi realizado um teste t-pareado com os resultados obtidos e encontrou-se um valor para o parâmetro p bi-caudal de 0,576, como o valor de p foi maior que 0,05 e o $t_{\text{calculado}}$ (0,580) foi menor que o $t_{\text{crítico}}$ (2,26), pode-se dizer que não houve diferença significativa entre as metodologias CE-UV e LC-MS/MS, em um intervalo de confiança de 95%, os resultados são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Comparação entre os métodos utilizando CE-UV e LC-MS/MS para atestar a exatidão do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 3.2.

Amostra	Cocaína ($\mu\text{g}/\text{nota}$)	
	CE-UV	LC-MS/MS
2 ^a	25,4 \pm 2,7	23,3 \pm 0,5
11 ^a	19,2 \pm 0,4	20,7 \pm 0,2
12 ^a	23,5 \pm 0,5	26,9 \pm 0,3
18 ^a	113,9 \pm 1,5	129,8 \pm 0,3
21 ^a	178,3 \pm 2,6	173,9 \pm 3,4
8 ^b	11,4 \pm 1,2	9,0 \pm 0,7
9 ^b	13,2 \pm 1,4	11,5 \pm 1,2
12 ^b	9,3 \pm 0,7	7,8 \pm 0,4
13 ^b	18,2 \pm 1,2	14,8 \pm 1,8
14 ^b	12,0 \pm 0,6	13,4 \pm 1,0

^a cédulas monetárias obtidas da circulação em geral

^b cédulas monetárias obtidas nos caixas eletrônicos

Os ensaios de recuperação da cocaína nos extratos foram realizados através da adição do padrão de cocaína em três níveis de concentra-

ção diferentes (1, 3 e 5 mg L⁻¹) a três extratos de notas diferentes, resultando em percentuais de recuperação médio de 101, 112 e 109% para as três concentrações adicionadas.

3.3.3 Análise das cédulas monetárias

O método proposto utilizando CE-UV foi aplicado na determinação de cocaína em 46 cédulas monetárias brasileiras: 30 obtidas diretamente da circulação em geral e 16 a partir de caixas eletrônicos, os resultados são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Quantidade de cocaína em cédulas brasileiras determinadas pelo método CE-UV.

Amostra	Cocaína (µg/nota)	Amostra	Cocaína (µg/nota)
1*	74,8 ± 1,6	23*	28,5 ± 0,8
2*	25,4 ± 2,7	24*	15,6 ± 0,7
3*	225,4 ± 20,8	25*	17,7 ± 0,1
4*	63,3 ± 3,8	26*	18,5 ± 0,5
5*	45,7 ± 1,8	27*	56,2 ± 0,1
6*	776,0 ± 39,9	28*	90,0 ± 0,9
7*	34,6 ± 2,8	29*	2761,9 ± 135,7
8*	43,6 ± 1,5	30*	918,6 ± 33,6
9*	413,1 ± 4,8	1**	14,3 ± 0,4
10*	11,5 ± 2,4	2**	264,8 ± 24,0
11*	19,2 ± 0,4	3**	15,8 ± 1,4
12*	23,5 ± 0,5	4**	10,8 ± 0,4
14*	14,1 ± 0,3	5**	14,2 ± 0,8
15*	53,2 ± 0,3	6**	22,8 ± 1,0
16*	24,3 ± 0,9	7**	9,1 ± 0,9
17*	38,4 ± 0,9	8**	11,4 ± 1,2
18*	113,9 ± 1,5	9**	13,2 ± 1,4
20*	230,5 ± 8,5	12**	9,3 ± 0,7
21*	178,3 ± 2,6	13**	18,2 ± 1,2
22*	70,6 ± 1,1	14**	12,0 ± 0,6

*notas obtidas da circulação em geral

**notas obtidas em caixas eletrônicos

No grupo de notas provenientes da circulação em geral, a cocaína foi detectada em 28 amostras (93%) em quantidades que variam de 11,5 a 2761,9 μg por nota. Em relação ao grupo de notas coletadas em caixas eletrônicas, estas eram praticamente novas, tendo sido pouco manuseadas ou contaminadas com outras notas, o que explica os baixos valores encontrados: de 16 notas, duas tiveram resultados negativos para a presença de cocaína (abaixo do LD), duas continham apenas vestígios da droga (abaixo do LQ) e doze apresentaram níveis de cocaína acima do LQ, que variaram de 9,1 a 264,8 μg por nota.

Sobre as quantidades de cocaína em cédulas monetárias, algumas pesquisas relatadas na literatura demonstraram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Na análise de notas de euro, Esteve-Turrillas *et al.* (2005), desenvolveram um método não destrutivo para a determinação de cocaína em notas por CG-MS/MS. Os resultados obtidos na análise de 16 notas de Euro de diferentes denominações mostraram contaminação em todas as notas entre 1,25 e 889 μg por nota. Em outro estudo, Wimmer e Schneider (2011), desenvolveram e validaram um método para a quantificação simultânea de drogas ilícitas em notas de Euro, usando LC-MS/MS. Os autores determinaram uma quantidade média por nota de 106 ng de cocaína. Estes valores descritos em notas de euro são muito baixos em comparação com os encontrados pelo presente método utilizando CE-UV em cédulas brasileiras.

O LD obtido para este método não é muito baixo em comparação com o relatado por estudos anteriores usando GC-MS ou LC-MS/MS ou a metodologia proposta por Y. Xu *et al.* (2006) usando CE-ECL (do inglês “Capillary Electrophoresis with Electrochemiluminescence”). No entanto, o valor de 0,2 mg L^{-1} parece ser aceitável para a determinação da cocaína em extratos de notas brasileiras, uma vez que as quantidades encontradas nas notas são muito mais elevadas do que este valor de LD (Tabela 3.6).

Tabela 3.6. Concentração de cocaína determinada nos extratos de cédulas brasileiras pelo método CE-UV.

Amostra	Cocaína no extrato (mg L⁻¹)	Amostra	Cocaína no extrato (mg L⁻¹)
1*	7,48 ± 0,16	23*	2,85 ± 0,08
2*	2,54 ± 0,27	24*	1,56 ± 0,07
3*	22,54 ± 2,08	25*	1,77 ± 0,01
4*	6,33 ± 0,38	26*	1,85 ± 0,05
5*	4,57 ± 0,18	27*	5,62 ± 0,01
6*	77,60 ± 3,99	28*	9,00 ± 0,09
7*	3,46 ± 0,28	29*	276,19 ± 13,57
8*	4,36 ± 0,15	30*	91,86 ± 3,36
9*	41,31 ± 0,48	1**	1,43 ± 0,04
10*	1,15 ± 0,24	2**	26,48 ± 2,40
11*	1,92 ± 0,04	3**	1,58 ± 0,14
12*	2,35 ± 0,05	4**	1,08 ± 0,04
14*	1,41 ± 0,03	5**	1,38 ± 0,08
15*	5,32 ± 0,03	6**	2,28 ± 0,10
16*	2,43 ± 0,10	7**	0,91 ± 0,09
17*	3,84 ± 0,09	8**	1,14 ± 0,12
18*	11,39 ± 0,15	9**	1,32 ± 0,14
20*	23,05 ± 0,85	12**	0,93 ± 0,07
21*	17,82 ± 0,26	13**	1,82 ± 0,11
22*	7,06 ± 0,11	14**	1,20 ± 0,06

*notas obtidas da circulação em geral

**notas obtidas em caixas eletrônicos

3.4 Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método utilizando eletroforese capilar com detecção UV (CE-UV) para a determinação de cocaína em cédulas monetárias circulantes na cidade de Florianópolis/SC. Este método apresentou bons parâmetros de validação. Em relação à exatidão, nenhuma diferença significativa foi encontrada na comparação do método proposto com o método por LC-MS/MS. O método proposto tem a vantagem de usar um procedimento de preparo de amostra simples que consiste na extração com acetonitrila e sonicação e, além disso, esta metodologia permite a determinação de cocaína em menos de 2,5 minutos, aumentando a frequência analítica com menores custos associados a reagentes e solventes.

Embora não seja possível diferenciar entre as notas que estão diretamente ligadas ao consumo e venda de cocaína daquelas que sofreram contaminação cruzada, este método permitiu identificar diferenças quantitativas entre notas relativamente novas e outras muito utilizadas. De 30 notas obtidas diretamente da circulação em geral, a cocaína foi detectada em 28 amostras (93%). Em relação ao grupo de notas coletadas em caixas eletrônicas, estas eram praticamente novas, o que explica os baixos valores encontrados. Os resultados deste estudo destacam a EC como uma alternativa ao GC ou LC na determinação de cocaína em cédulas monetárias.

4 ANÁLISE DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS UTILIZANDO LC-MS/MS

4.1 Objetivos

4.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste capítulo é o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de cocaína em cédulas monetárias utilizando a técnica de LC-MS/MS.

4.1.2 Objetivos específicos

- ❖ Estudar a eficiência da extração da cocaína das notas para garantir uma extração exaustiva.
- ❖ Caracterizar a cocaína nos modos MS e MS/MS em um espectrômetro de massas triploquadrupolar com ionização por *electrospray* no modo positivo para determinar as condições de fragmentação dos íons que se deseja analisar através do monitoramento de reações múltiplas (MRM).
- ❖ Verificar o comportamento do analito em colunas de fase reversa C₁₈ empregando diferentes solventes e/ou tampões.
- ❖ Otimizar os parâmetros instrumentais do LC-MS/MS na busca de uma metodologia rápida e eficiente capaz de detectar e quantificar a cocaína.
- ❖ Avaliar o efeito de matriz na resposta do analito.
- ❖ Validar a metodologia proposta fazendo testes de adição e recuperação e determinar as figuras de mérito do método, como por exemplo, limites de detecção e quantificação; precisão instrumental, intra e interensaio; entre outros.
- ❖ Aplicar o método desenvolvido em cédulas monetárias em circulação em diferentes cidades brasileiras.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Instrumentação

O método desenvolvido por LC-MS/MS foi realizado em um sistema composto de um espectrômetro de massas triploquadrupolar API

3200™, Applied Biosystems/MDS Sciex, (Sciex, Concord, CA) equipado com cela de colisão LINAC®, fonte de ionização Turbo V™ operada no modo TurbolonSpray® (*electrospray*), gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). O espectrômetro de massas foi acoplado a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) equipado com bomba quaternária, sistema degaseificador, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 108 frascos de amostra de 2,0 mL e forno para coluna analítica. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software* Analyst versão 1.5.1.

O espectrômetro de massas foi calibrado nos modos de íons positivos e negativos com uma solução padrão de calibração de polipropilenoglicol (PPG), infundida sob fluxo de 10,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ com o capilar posicionado em relação ao contra-eletrodo nas posições 5 e 10 mm nas direções horizontal e vertical, respectivamente. Ar sintético foi utilizado como gás nebulizante (GS1), gás secante (GS2) e gás de exaustão (Exhaust Gas) na fonte Turbo V™. Nitrogênio foi empregado como cortina de gás de dessolvatação (Curtain Gas™) e como gás de colisão (CAD Gas™) na célula LINAC®.

Os compostos foram caracterizados no triploquadrupolo nos modos MS (Q1 Scan) e MS/MS (*Product Ion Scan*). Os parâmetros potencial de orifício (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP) foram otimizados para operação do espectrômetro de massas no modo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês “Multiple Reaction Monitoring”) para a realização das análises quantitativas.

4.2.2 Reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados em soluções de trabalho, assim como, os padrões usados nas metodologias foram de grau analítico e de alto grau de pureza. Água desionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) foi utilizada no preparo de todas as soluções aquosas necessárias. Cocaína (1000 mg L^{-1} em acetonitrila) foi adquirida de Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, EUA). Os solventes orgânicos utilizados foram metanol e acetonitrila (grau HPLC) adqui-

ridos da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Ácido fórmico foi utilizado como aditivo da fase móvel e obtido da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

Os padrões de cafeína e lidocaína foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), sendo que soluções estoque destes padrões, na concentração de 1000 mg L^{-1} (aproximadamente), foram preparadas dissolvendo-se 10 mg de cada padrão em 10 mL de acetonitrila.

4.2.3 Separação por LC-MS/MS

Os experimentos foram realizados usando a fonte *electrospray* no modo de ionização positivo e alguns parâmetros otimizados para a fonte de ionização e para a cela de colisão foram: tensão do capilar, 5500 V; temperatura da fonte, $450 \text{ }^\circ\text{C}$; gás nebulizante, 40 psi; gás secante, 45 psi; gás de colisão (CAD GasTM), médio; cortina de gás de dessolvatação, 10 psi.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica da marca Phenomenex modelo Synergi Polar-RP com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2 mm e tamanho da partícula igual a $4 \text{ }\mu\text{m}$; equipada com uma pré-coluna da mesma marca modelo Polar-RP ($4 \times 2,0 \text{ mm}$). A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software* Analyst versão 1.5.1.

Foi aplicado o modo isocrático de eluição e os experimentos foram realizados utilizando uma fase móvel constituída de 50% de solvente A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%) e 50% de solvente B (metanol:H₂O (95:5 v/v)). A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em $200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Em todas as corridas, o volume injetado foi de $10 \text{ }\mu\text{L}$ e a temperatura da coluna foi ajustada em $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.4 Curvas de calibração

Paras as análises no LC-MS/MS, soluções com os padrões analíticos foram preparadas diluindo-se mil vezes, em acetonitrila, as soluções estoque com concentração de 1000 mg L^{-1} (cocaína), 1160 mg L^{-1} (lidocaína) e 1480 mg L^{-1} (cafeína). As curvas de calibração foram obtidas após a preparação de uma solução de trabalho contendo os três analitos na concentração de $20,0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ (cocaína), $23,2 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ (lidocaína) e $29,6 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ (cafeína). Com esta solução mista, foram preparados sete padrões individuais, em água desionizada, nas concentrações cuja faixa de aplicação foi de $0,5$ a $12 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, $0,6$ a $14 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e $0,7$ a $18 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, para a

cocaína, lidocaína e cafeína, respectivamente. A solução de trabalho, assim como, os pontos das curvas de calibração foram preparados sempre no mesmo dia em que seriam utilizados. As soluções estoque foram armazenadas sob refrigeração, à temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.5 Procedência e preparo das amostras

Este estudo analisou 55 cédulas monetárias brasileiras de R\$ 2,00, coletadas nas cidades de Florianópolis/SC (15 notas), Juiz de Fora/MG (12 notas), Rio de Janeiro/RJ (11 notas), São Paulo/SP (7 notas) e Fortaleza/CE (10 notas). Também foram analisadas 5 notas de um dólar americano provenientes da cidade de Baltimore/USA. Todas as notas constituem um grupo de amostragem de dinheiro circulante e elas não foram adicionadas dos padrões.

Procedimento de extração escolhido: todas as notas utilizadas neste trabalho, tanto para fins de validação do método quanto para a sua aplicação (quantificação), foram submetidas ao procedimento de submersão total em 400 mL de água desionizada, sob agitação magnética constante por 15 min. Durante as análises cromatográficas, foi injetada água a cada dez corridas para evitar a contaminação da coluna ou do injetor do LC.

4.3 Resultados e discussão

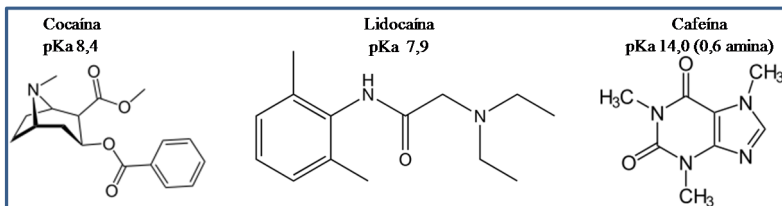
4.3.1 Caracterização e ionização dos analitos no MS

Inicialmente, é preciso ressaltar que o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um método analítico quantitativo utilizando LC-MS/MS para a determinação somente de cocaína em notas de dinheiro; porém, em análises preliminares também foi constatada a presença de cafeína e lidocaína nas notas, o que não é surpreendente, pois essas substâncias são comumente utilizadas para a adulteração da cocaína. Portanto, esses dois compostos passaram a ser parte do objeto de estudo. No entanto, as condições de ionização no MS, tais como temperatura da fonte, vazão dos gases, entre outras foram otimizadas considerando-se o melhor sinal para a cocaína.

Primeiramente, foi preciso escolher o modo de ionização (positivo ou negativo) a ser utilizado. Normalmente, compostos com caráter básico, como os analitos, apresentam maior intensidade de sinal quando analisados com a polaridade positiva aplicada ao capilar da fonte ESI,

por esse motivo o modo de ionização positivo foi escolhido. A Figura 4.1 apresenta as estruturas dos compostos avaliados neste estudo.

Figura 4.1. Estruturas dos analitos investigados neste estudo.



Um fator importante é o solvente utilizado na diluição do padrão para a infusão, pois dependendo do solvente um composto pode ionizar mais ou menos e isto está diretamente relacionado à qualidade da informação fornecida sobre a molécula pelo espectro de massa. É sabido que, independente do modo de ionização, substâncias que apresentam um caráter ácido-base (como ácido fórmico, ácido acético, hidróxido de amônio ou carbonato de amônio) participam dos processos de ionização das substâncias, pois alteram o pH da solução em que se encontram os analitos favorecendo a protonação ou a desprotonação dependendo da quantidade de sítios ionizáveis do composto de interesse.

Normalmente, as substâncias ionizam em ambos os modos de ionização e em diferentes faixas de pH. Entretanto, a adição de ácidos fracos favorece a ionização no modo positivo, assim como, o uso de soluções tampão de amônio pode aumentar a intensidade de sinal dos compostos quando analisados no modo de ionização negativo. Assim, é possível dizer que a utilização de aditivos é fundamental para a estabilidade do sinal na fonte de ionização, pois a intensidade dos sinais obtidos para os compostos sem aditivos é sempre menor do que aquelas obtidas com o uso de aditivos, independente da composição de solventes utilizada.

As propriedades dos solventes orgânicos podem influenciar a formação do *aerossol* de diferentes modos: 1) a tensão superficial da fase líquida afeta o potencial aplicado ao capilar; 2) a condutividade da solução implica na corrente elétrica do *aerossol*; 3) a viscosidade afeta o tamanho da gota formada. Outras propriedades como o momento dipolar de cada solvente, são parâmetros que afetam a intensidade do sinal no

electrospray (Tabela 4.1). Por possuir menor viscosidade, as gotas carregadas formadas com acetonitrila possuem diâmetros menores que as produzidas em metanol e, desta forma favorecem um processo de dessolvação mais eficiente. Por isso, a acetonitrila foi escolhida como solvente orgânico a ser utilizado na infusão dos padrões.

Tabela 4.1. Algumas propriedades físicas dos solventes polares mais comumente usados como aditivos na ionização por *electrospray*.

	Metanol	Acetonitrila
Tensão Superficial (N m^{-1})	0,0226	0,030
Constante Dielétrica	32,70 (25°C)	37,50 (20°C)
Momento Dipolar (D)	1,70	3,92
Viscosidade (cP)	0,60	0,34

Em resumo, o uso de soluções mistas de água e um solvente orgânico permite unir a elevada constante dielétrica da água com a baixa tensão superficial do solvente, fazendo com que a composição da solução seja de fundamental importância na intensidade do sinal obtido na fonte de ionização. No entanto, cabe ressaltar que o melhor solvente para a ionização não necessariamente é o melhor para a separação cromatográfica dos analitos.

Pelos motivos expostos acima a ionização em modo positivo da cocaína, da lidocaína e da cafeína foi obtida pela infusão direta no MS de soluções preparadas com a mistura de acetonitrila/solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (50/50, v/v), na concentração de 1 mg L^{-1} .

A intensidade do sinal dos íons precursores $[M+H^+]$ foi monitorada através dos espectros de massa adquiridos no modo de escaneamento Q1 MS com tempo de varredura de 3 segundos. A aquisição dos espectros foi feita com o modo "Multiple Channel Acquisition" (MCA) quando dez ciclos de espectros de massas foram acumulados.

Depois de identificados os íons precursores no modo Q1 MS e com a intensidade do sinal dos analitos estabilizada, foram feitos experimentos no MS com o objetivo de estabelecer as melhores energias de ionização e fragmentação para estes compostos. O deslocamento dos íons pelos setores que compõem o espectrômetro de massas é feito através de diferenças de potencial, entre elas estão:

- potencial de desagregação (DP, do inglês “Declustering Potential”);
- potencial de entrada (EP, do inglês “Entrance Potential”);
- potencial de entrada na cela de colisão (CEP, do inglês “Entrance Potential”);
- energia de colisão (CE, do inglês “Collision Energy”);
- potencial de saída da cela de colisão (CXP, do inglês “Collision Cell Exit Potential”).

Essas energias podem ser otimizadas manual ou automaticamente através de uma varredura num determinado intervalo pré-estabelecido pelo equipamento. Tanto a DP quanto a EP são responsáveis pela chegada do íon precursor ao triploquadrupolo. Quanto às energias relativas à cela de colisão, a CEP é a responsável pela entrada dos íons precursores na cela de colisão, a CE é a energia necessária para a fragmentação do íon precursor e a CXP é a responsável pela saída dos fragmentos da cela de colisão e sua chegada até o segundo analisador de massa.

Em se tratando de análises quantitativas o modo de varredura de massas mais adequado é o modo MRM por ser mais sensível e seletivo. Neste modo, o terceiro quadrupolo trabalha com o monitoramento de um ou mais íons produto de m/z específica provenientes da fragmentação de um íon precursor de interesse.

No MS utilizado neste trabalho (QTrap 3200), no momento em que se escolhe a opção MRM, através da ferramenta *Compound Optimization*, as energias DP, EP, CEP, CE e CXP são otimizadas, assim como, são gerados de dois a quatro fragmentos, sendo que um é o fragmento majoritário, utilizado para a quantificação, e os demais são fragmentos utilizados na identificação do composto. Na Tabela 4.2 são apresentadas as energias otimizadas para a operação do espectrômetro de massa no modo MRM e na Tabela 4.3 os íons produtos gerados, sendo que neste estudo optou-se por trabalhar com dois fragmentos.

Tabela 4.2. Energias otimizadas para análise em MRM de cocaína, lidocaína e cafeína em notas de dinheiro.

	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Cocaína	46	4,5	16	29 (ÍQ e ÍC)*	4
Lidocaína	31	6,5	15,8	45 (ÍQ) 65 (ÍC)	4
Cafeína	41	7,5	14,5	31 (ÍQ) 27 (ÍC)	4

*ÍC = íon produto confirmação; ÍQ = íon produto quantificação.

Tabela 4.3. Fragmentos majoritários de cocaína, lidocaína e cafeína gerados pelo modo MRM.

	Íon precursor [M+H] ⁺	Íon produto quantificação	Íon produto confirmação
Cocaína	304,2	182,1	105,1
Lidocaína	235,2	86,0	58,0
Cafeína	195,2	110,0	138,0

Após a identificação dos íons precursores e dos íons produtos e de suas respectivas energias de ionização, o método MRM foi finalizado. Então, partiu-se para a otimização de outros parâmetros da fonte de ionização que também influem diretamente na sensibilidade do método analítico proposto, pois afetam diretamente a formação dos íons pseudomoleculares.

Esses parâmetros são a temperatura da fonte, a voltagem aplicada ao capilar e a vazão do gás nebulizante (GS1) e do gás secante (GS2). A fim de otimizar esses parâmetros, realizou-se um planejamento fatorial completo 2⁴ com ponto central, escolhendo-se como fator de resposta a inclinação da curva de calibração, uma vez que, a sensibilidade é definida como o *slope* da curva de calibração (Ribani *et al.*, 2004). Neste tipo de planejamento, são realizados 16 experimentos com cinco repetições do ponto central. A Tabela 4.4 apresenta as variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial, sendo que os intervalos foram escolhidos com base na faixa operacional estipulada pelo fabricante do MS descrita no manual do equipamento para um fluxo de fase móvel de 200 µL min⁻¹.

Tabela 4.4. Variáveis e níveis que compuseram o planejamento fatorial 2⁴ com ponto central.

Fatores	(-)	(0)	(+)
X ₁ - GS1	40	50	60
X ₂ - GS2	45	55	65
X ₃ - TEM (°C)	350	400	450
X ₄ - Voltagem do capilar (V)	4500	5000	5500

Cabe ressaltar que este planejamento foi realizado após a separação cromatográfica ter sido otimizada (parte que será descrita na seção 5.3.1.2); porém, para fins de continuidade do texto ele é aqui descrito. Também é importante esclarecer que estes experimentos visaram encontrar os melhores parâmetros para a cocaína; portanto foi construída uma curva de calibração em água desionizada a partir da diluição da solução estoque 1 mg L^{-1} do padrão, com 4 níveis de concentração (0,5; 4,0; 8,0 e $12,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Esta curva de calibração foi injetada em duplicata em cada um dos 21 experimentos ao total.

Os resultados mostrados na Tabela 4.5 mostram que a melhor sensibilidade é alcançada quando se utiliza a menor vazão do gás de nebulização e do gás secante e maior temperatura da fonte, esses resultados correspondem ao conjunto de valores obtidos com os ensaios 5 e 13. Comparando-se, unicamente, esses dois experimentos se conclui que os três fatores acima são os que mais influenciam na sensibilidade da cocaína, enquanto que a aplicação da maior ou da menor voltagem ao capilar não afeta consideravelmente esse resultado, pois ambos experimentos forneceram os maiores *slopes* que, por sinal, foram muito próximos. Então, optou-se por utilizar o conjunto de resultados obtidos com o ensaio 13, pois além do coeficiente angular ser o segundo maior, com esses valores também foi obtida a melhor linearidade avaliada através do coeficiente de determinação das curvas (R^2).

Tabela 4.5. Resultados do planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central visando a sensibilidade ótima para a cocaína.

Ensaio	X₁	X₂	X₃	X₄	Resposta	R²
1	-1	-1	-1	-1	35669	0,9928
2	1	-1	-1	-1	31014	0,9997
3	-1	1	-1	-1	37319	0,9983
4	1	1	-1	-1	31643	0,9991
5	-1	-1	1	-1	42295	0,9993
6	1	-1	1	-1	35544	0,9988
7	-1	1	1	-1	40466	0,9999
8	1	1	1	-1	32334	0,9949
9	-1	-1	-1	1	36764	0,9987
10	1	-1	-1	1	35720	0,9996
11	-1	1	-1	1	37050	0,9999
12	1	1	-1	1	33879	0,9999
13	-1	-1	1	1	41087	0,9999
14	1	-1	1	1	37119	0,9991
15	-1	1	1	1	39407	0,9999
16	1	1	1	1	37069	0,9997
17	0	0	0	0	34209	0,9979
18	0	0	0	0	34301	0,9979
19	0	0	0	0	34302	0,9987
20	0	0	0	0	34231	0,9966
21	0	0	0	0	34520	0,9988

Após a avaliação de todos os parâmetros responsáveis pela ionização dos analitos na fonte e na cela de colisão foi adicionado ao modo MRM uma ferramenta chamada Aquisição Dependente da Informação (IDA, do inglês Information Dependent Acquisition) que possibilita o acoplamento de mais de um modo de varredura de massas, além da obtenção do espectro de massa simultaneamente com o cromatograma, isto

é, durante a corrida cromatográfica é possível “cliquear” no pico e visualizar o espectro de massa. Neste experimento foi utilizado o modo de escaneamento de massas Enhanced Product Ion (EPI). Nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 são apresentados os espectros de massa de cada composto e as estruturas sugeridas para os íons produto observados.

Figura 4.2. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da cocaína em ESI positivo.

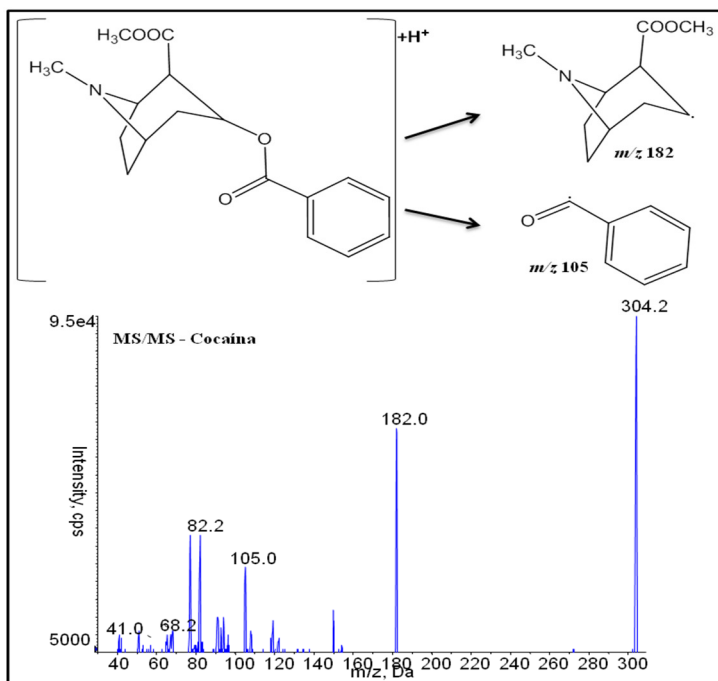


Figura 4.3. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da lidocaína em ESI positivo.

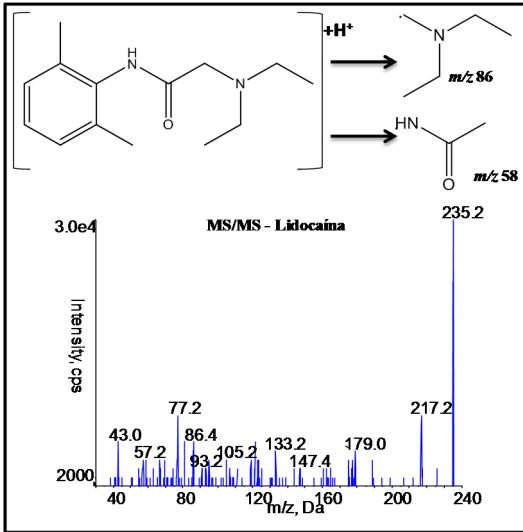
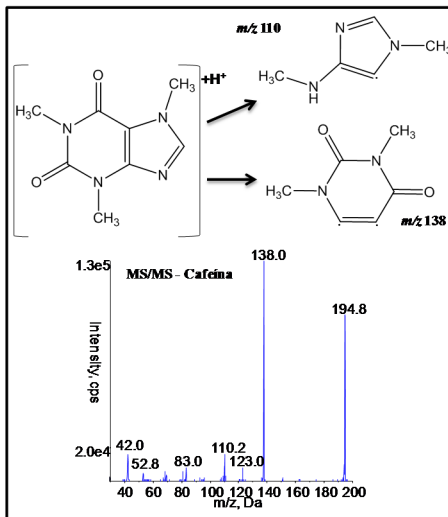


Figura 4.4. Espectro de massas MS/MS e estrutura sugerida para os fragmentos gerados da cafeína em ESI positivo.



4.3.2 Otimização cromatográfica

Para a separação cromatográfica dos analitos foi escolhida uma coluna cromatográfica de fase reversa que possui grupos fenilas espalhados ao longo de sua fase estacionária, pois a presença desses grupos diminui a interação dos analitos de caráter básico como a cocaína, a lidocaína e a cafeína com os grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária o que favoreceria o alargamento dos picos e a baixa eficiência. Uma alternativa adequada para a análise de compostos com caráter básico por fase reversa seria o emprego de tampões com pH alto. No entanto, o aumento do pH da fase móvel com o uso de hidróxido de amônio ou outro aditivo faz com que o pH se aproxime do limite recomendado para as colunas de fase reversa, o que faz com que a vida útil da coluna diminua consideravelmente.

Foram testados os seguintes solventes e soluções como constituintes da fase móvel: acetonitrila e metanol (solvente A) e solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (solvente B), em diferentes combinações utilizando o mesmo modo de eluição isocrático. O modo de eluição por gradiente linear não foi testado por se tratar de apenas três analitos e porque se desejava um método rápido. A Tabela 4.6 apresenta as combinações testadas.

Tabela 4.6. Escolha da composição da fase móvel para a separação de cocaína, lidocaína e cafeína.

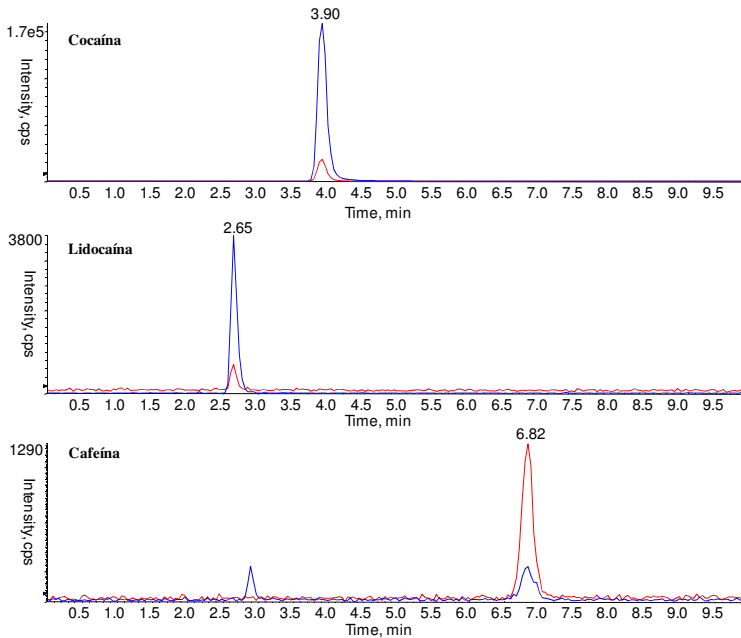
% Solvente A	% Solvente B	% Solvente A	% Solvente B
25	75	40	60
30	70	50	50
35	65	60	40

Apesar de ser usado como detector um espectrômetro de massas operado no modo MRM, que analisa cada íon separadamente através da seleção das razões de massa/carga individuais, para escolher qual combinação seria utilizada no desenvolvimento do trabalho optou-se pela composição que resultasse na melhor resolução em linha de base dos analitos.

A melhor composição para a fase móvel foi obtida com as proporções de 50% de solvente A (metanol:H₂O (95:5 v/v)) e 50% de solvente B (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%). Os testes realizados com o

uso de acetonitrila não foram satisfatórios, pois resultaram em picos com baixa simetria e deformados. O uso de ácido fórmico como aditivo na fase móvel se mostrou relevante, uma vez que ele garantiu a boa ionização dos analitos na fonte amplificando seu sinal. A Figura 4.5 apresenta o cromatograma dos analitos realizado com uma nota de dinheiro extraída em 100 mL de água desionizada sob agitação por 10 min e posteriormente diluída cinco vezes, nas condições otimizadas tanto para a cromatografia quanto para a análise por MS, sendo que a separação dos três compostos foi realizada em menos de 8 minutos, com 1 min de pré-condicionamento da coluna entre corridas.

Figura 4.5. Cromatograma dos analitos após a otimização da composição da fase móvel e das melhores condições de operação do MS em modo MRM positivo.



4.3.3 Estudo da extração da cocaína das notas

Como relatado na revisão da literatura apresentada no capítulo 2, vários métodos têm sido reportados para extrair a cocaína das notas de dinheiro e, em todos os trabalhos relatados na literatura, a técnica de extração mais empregada é a extração com solventes, pois a cocaína é bastante solúvel em solventes orgânicos e soluções aquosas ácidas diluídas. Entretanto, no presente trabalho buscou-se além de um preparo de amostra que não fosse laborioso, com muitas etapas, alternativas ao uso de solventes orgânicos, pois os mesmos são tóxicos e o volume necessário é relativamente grande. Além disso, o contato do papel moeda com estes solventes provoca danos nas marcas de segurança das notas, por exemplo, na marca d'água, o que acaba inutilizando a nota e isto é considerado crime de dano qualificado, previsto no artigo 163, parágrafo único, inciso III, do Código Penal Brasileiro. A seguir são descritos alguns experimentos realizados para verificar as variáveis que influenciaram na extração da cocaína das notas.

4.3.3.1 Efeito do tempo

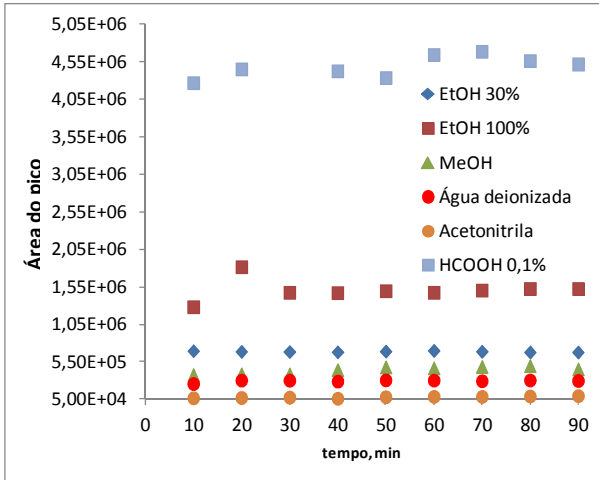
Objetivo: determinar a influência do tempo na extração da cocaína das notas.

Experimento: 1 nota colocada em um recipiente plástico contendo 100 mL de solvente extrator, sob agitação magnética constante. Foram retiradas alíquotas para injeção no LC-MS/MS a cada 10 min durante 90 min. Foram testados como solventes extratores acetonitrila, metanol, solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, água desionizada, etanol 100% e mistura etanol : água 30 :: 70 (v/v). O experimento foi realizado com duas notas para cada solvente.

Resultado: A Figura 4.6 apresenta a variação da área do pico da cocaína em função do tempo e pode ser observado que, independente do solvente, a extração parece não depender do tempo em que o solvente fica em contato com a nota, pois a área atinge um determinado valor logo aos 10 minutos de extração e se mantém praticamente constante ao longo dos 90 minutos de duração do experimento. Portanto, concluiu-se que 10 min são suficientes para extrair a cocaína das notas. A grande diferença nas áreas obtidas deve-se ao fato de que uma nota é diferente da outra, isto é, enquanto uma nota pode ter tido um contato direto com a droga, o que resulta em uma quantidade maior para ser extraída, outra nota pode ter

sofrido uma contaminação cruzada, resultando em uma quantidade extraída menor.

Figura 4.6. Definição do tempo de extração.



4.3.3.2 Escolha do solvente mais adequado para a extração

Objetivo: determinar qual o melhor solvente extrator da cocaína das notas.

Experimento 1: 1 nota colocada em um tubo de centrífuga com tampa contendo 10 mL do solvente testado, sob agitação constante em mesa agitadora. Foram retiradas alíquotas para injeção no LC-MS/MS a cada 5 min durante 15 min. Após os 15 min iniciais, a nota foi transferida para outro tubo contendo outros 10 mL do mesmo solvente, coletaram-se as alíquotas no mesmo intervalo de tempo e, novamente, após os 15 min a nota foi transferida para um terceiro tubo e repetiu-se o mesmo procedimento. Foram testados como solventes extratores acetonitrila, metanol, solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, água e etanol. O experimento foi realizado com duas notas para cada solvente.

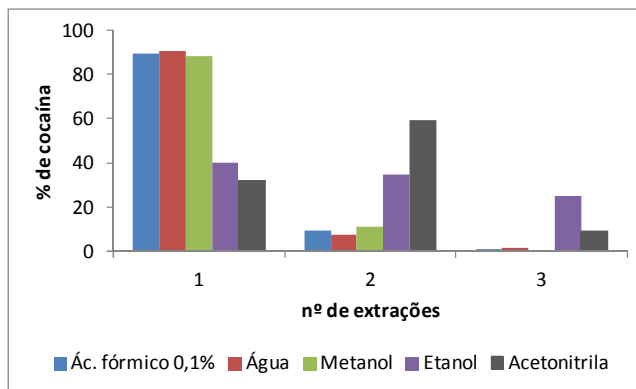
Experimento 2: foi empregado o mesmo procedimento do Experimento 1, porém utilizando-se 100 mL de solvente teste e substituindo-se os tubos por recipientes plásticos.

Resultado: para avaliar o resultado dos dois experimentos, foi considerado que a soma das áreas do pico da cocaína nas três extrações é o máximo que pode ser extraído por cada solvente e, então, calculou-se a porcentagem relativa a esse máximo em função das duas extrações sucessivas. Considerando-se que a única diferença entre os testes é o volume de solvente empregado, percebeu-se que o volume utilizado no experimento 1 (10 mL) é insuficiente para recobrir ou embeber a nota completamente, pois a nota precisa ser enrolada para caber dentro dos tubos e isto implica diretamente na quantidade extraída, o resultado obtido com o experimento 2 é apresentado na Figura 4.7.

Entre os cinco solventes testados, os solventes mais apolares parecem extrair uma certa quantidade a cada etapa, o que leva a descartá-los, uma vez que, a acetonitrila, por exemplo, é tóxica, tem um custo mais elevado e, por ser necessário mais extrações, elevaria ainda mais o custo por análise e geraria mais resíduos. Por esta razão, além de não ter apresentado um bom perfil de extração, o etanol também foi descartado como solvente extrator.

Os mais polares (água, solução de ác. fórmico e metanol) extraem a maior parte da cocaína presente nas notas já na primeira etapa, mas por também ser um solvente orgânico tóxico, o metanol foi descartado como extrator. Enfim, entre a água e o ác. fórmico 0,1%, ambos apresentaram praticamente os mesmos percentuais de extração nas três etapas empregadas.

Figura 4.7. Definição do solvente extrator para extrair a cocaína das células monetárias.



4.3.3.3 Extração sequencial

Objetivo: verificar se a extração sequencial é a melhor opção para a extração quantitativa da cocaína das notas.

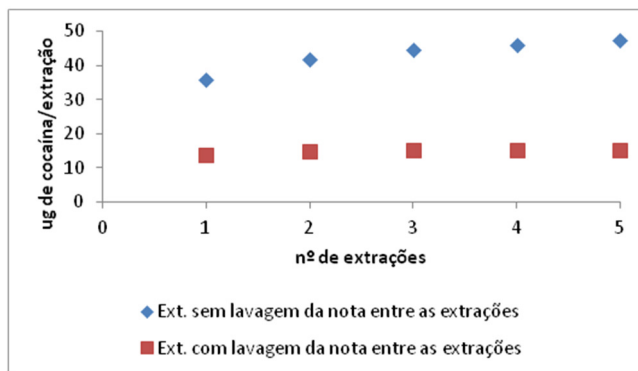
Experimento:

nota A - colocada em um recipiente plástico contendo 100 mL de água desionizada, sob agitação magnética constante. Após 15 min retirou-se uma alíquota (1 mL) para injeção no LC-MS/MS. Antes da aplicação do procedimento de extração pela segunda vez, lavou-se o recipiente e a barra magnética em água corrente e ambos foram secos com papel absorvente e a nota foi colocada em um funil de Büchner e “seca” a vácuo. O procedimento de lavagem do recipiente e da barra magnética, assim como, a “secagem” da nota foi realizado cinco vezes.

nota B - colocada em um béquer contendo 100 mL de água desionizada, sob agitação magnética constante. Após 15 min retirou-se a primeira alíquota (1 mL) para injeção no LC-MS/MS. A nota foi retirada do 1º béquer e, sem passar pelo funil de Büchner ou por qualquer outro procedimento de “lavagem e secagem”, foi colocada em um 2º béquer com outros 100 mL de água e, novamente, após 15 min retirou-se a segunda alíquota. Esse procedimento foi repetido mais três vezes, totalizando cinco extrações em sequência.

Resultado: em uma tentativa de encontrar um modo de extração quantitativo, neste experimento comparou-se a extração de uma nota colocada em um funil de Büchner entre as extrações com outra extração em que a nota foi transferida diretamente de um recipiente para outro sem ser lavada e seca entre as extrações (Figura 4.8). A análise do experimento com a nota A permitiu inferir que se a nota for lavada e seca entre as extrações, a quantidade de cocaína extraída praticamente não aumenta e que, portanto não seria necessário fazer uma extração sequencial para se obter uma extração quantitativa. No entanto, o experimento com a nota B apresentou o comportamento observado normalmente quando a extração sequencial é realizada, ou seja, a quantidade de analito extraída aumenta com o nº de extrações. Por outro lado, não se lavando e secando a nota sempre estará se levando para o novo volume de solvente uma quantidade do extrato anterior o que acarretará em um acúmulo de analito em cada novo volume levando a uma quantificação maior do que a real no extrato da nota como um todo. Entretanto, existe o fato de que quando a nota é lavada e seca entre as extrações não há como se comprovar que neste procedimento não há perda de analito.

Figura 4.8. Comportamento da extração da cocaína em função da lavagem ou não da nota entre cada procedimento de extração.



4.3.3.4 Extração exaustiva

Objetivo: verificar se a cocaína permanece adsorvida na superfície ou nas entranhas da nota durante o procedimento de extração.

Experimento: 1 nota colocada em um recipiente plástico contendo 100 mL de água desionizada, sob agitação magnética constante. Após 15 min retirou-se uma alíquota (1 mL) para injeção no LC-MS/MS. Antes da aplicação do procedimento de extração pela segunda vez, lavou-se o recipiente, a barra magnética e a nota em água corrente e os mesmos foram secos com papel absorvente para garantir que a nota não estaria levando para o novo volume de solvente uma quantidade do extrato anterior o que acarretaria em um acúmulo de analito em cada novo volume. Então, a nota foi colocada no recipiente contendo outros 100 mL de água, sob agitação magnética constante por mais 10 min e retirou-se a segunda alíquota. O procedimento de lavagem do recipiente e da barra magnética, assim como, a “lavagem e a secagem” da nota foi realizado dez vezes. Foi feito um branco do recipiente plástico e da barra magnética com 100 mL de água e agitação por 10 min e não foi detectada cocaína nesta alíquota. Entre as duplicatas de injeção das alíquotas, sempre foi injetada água desionizada nas mesmas condições cromatográficas para garantir que não houvesse contaminação do analito na coluna ou no equipamento antes da injeção de uma nova amostra.

Resultado: os dados mostram que se considerado que toda a cocaína extraída da nota for a soma das quantidades oriundas de cada extração,

pode-se perceber pelos dados da Tabela 4.7, que na primeira extração 88% da cocaína presente na nota é retirada. Com as próximas extrações é extraída uma quantidade muito pequena quando comparada à primeira e, entre a quinta e a décima extração, a quantidade extraída da nota é praticamente a mesma.

Sendo assim, para esta extração ser considerada quantitativa, cabe ressaltar que deve-se considerar que no primeiro procedimento de extração foi retirada toda a cocaína que encontra-se superficialmente adsorvida na nota. Em seguida, deve-se acumular em um recipiente único cada volume de 100 mL utilizado nas extrações posteriores entre a primeira e a quarta lavagem atribuindo que a área da cocaína encontrada neste volume total corresponde à cocaína que se encontra ligada à nota internamente, por exemplo, às moléculas de celulose que compõem o papel.

Tabela 4.7. Comportamento da extração da cocaína em função do número de extrações.

Extrações	µg de cocaína/extração	% de extração
1 ^a	13,66	87,75
2 ^a	14,87	95,52
3 ^a	15,08	96,89
4 ^a	15,15	97,35
5 ^a	15,24	97,92
6 ^a	15,31	98,38
7 ^a	15,37	98,73
8 ^a	15,45	99,25
9 ^a	15,52	99,69
10 ^a	15,56	100,00

4.3.3.5 Efeito do volume de solvente

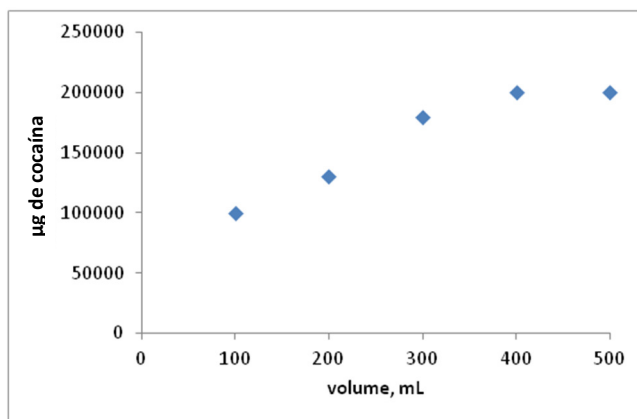
Objetivo: verificar se existe um volume de solvente ideal para extrair toda a cocaína presente na nota.

Experimento: 1 nota colocada em um recipiente plástico contendo 100 mL de água desionizada, sob agitação magnética constante. Após 15 min

retirou-se a primeira alíquota (1 mL) para injeção no LC-MS/MS. Adicionou-se ao recipiente mais 100 mL de água e, novamente, após 15 min retirou-se a segunda alíquota. Esse procedimento foi repetido mais três vezes até que o volume de 500 mL foi atingido.

Resultado: se a extração quantitativa depende do volume de água em que se coloca a nota, seria observado um perfil como apresentado na Figura 4.9, no qual mais cocaína é extraída da nota à medida que a nota se encontra em meio a uma maior quantidade de solvente e, se existe um volume apropriado, a partir da injeção da alíquota correspondente a esse volume, seria observado um patamar mostrando que a concentração de cocaína no extrato tornou-se constante, uma vez que a massa de cocaína extraída não aumentaria mais.

Figura 4.9. Gráfico hipotético do aumento da quantidade de cocaína no extrato em função do volume de água.

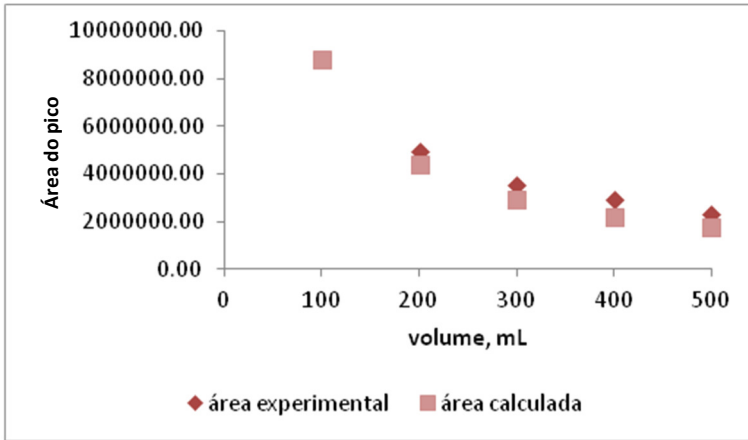


Mas, o que se observou de fato é apresentado na Figura 4.10, ou seja, o decaimento da área da cocaína no extrato à medida que foi se aumentando o volume de água no recipiente contendo a nota, sendo que o perfil demonstrado pelo gráfico experimental é praticamente igual ao perfil previsto estimando-se as áreas pela regra $C_1V_1=C_2V_2$ a partir da área obtida pela injeção da 1ª alíquota, perfis estes que correspondem a efeitos provocados pela diluição do extrato.

A princípio, esta informação leva a acreditar que o volume ideal para a extração pode ser os 100 mL iniciais ou algum valor abaixo e que

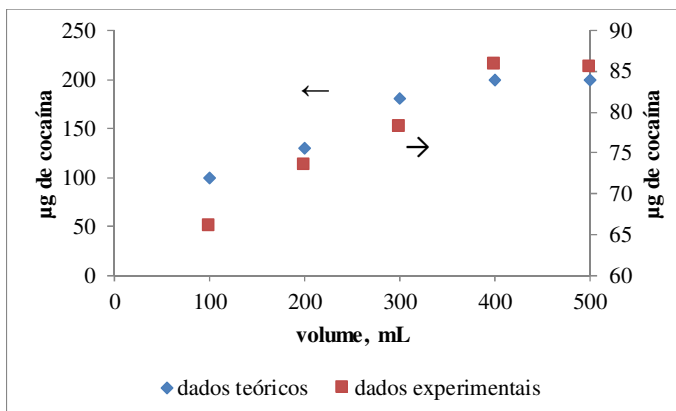
acima desse volume o que ocorre é a diluição do extrato; porém, na prática, volumes menores a 100 mL não são suficientes para recobrir ou embeber a nota adequadamente.

Figura 4.10. Efeito da diluição do extrato da nota em função do volume de água.



Entretanto, observando-se o gráfico da massa de cocaína extraída a cada adição de 100 mL ao extrato (Figura 4.11) constata-se que o perfil experimental condiz com o previsto, pois, assim como teoricamente, a massa de cocaína deveria aumentar à medida que o volume do extrato é incrementado (não se considerando diluição e sim que a extração é dependente do volume), experimentalmente observa-se que a massa de cocaína extraída da nota também aumenta no extrato até atingir um valor constante e, a princípio, 400 mL de água são suficientes para extrair a cocaína das notas. Sendo assim, experimentalmente, o efeito do aumento do volume de solvente influencia na extração. O efeito da diluição do extrato, apresentado na Figura 4.10, em função da diminuição da área da cocaína com o aumento do volume de água no extrato da nota não implica no fato de que a massa de cocaína extraída continue aumentando até que fique constante.

Figura 4.11. Extração da cocaína em função do volume de água (previsto *versus* obtido).



4.3.3.6 Conclusões

A seguir são apresentadas as conclusões retiradas dos experimentos realizados para verificar as variáveis que influenciaram na extração da cocaína das notas e, com base nesses experimentos, foi definido como procedimento de extração o que se mostrou mais exaustivo e, portanto, mais quantitativo. Ressalta-se que com estes resultados não se pretende contradizer outros trabalhos já realizados com a mesma matriz e que estes são fruto dos experimentos realizados em laboratório com os meios considerados adequados para a sua realização pelos motivos expostos anteriormente:

- ✓ O tempo de 10 minutos é suficiente para a extração da cocaína das notas, pois a quantidade extraída se manteve constante ao longo de pelo menos 90 minutos de duração do experimento.
- ✓ Entre os solventes testados, os solventes mais apolares (acetoni-trila e etanol) necessitaram de mais etapas para a extração, enquanto que os mais polares (água, solução de ác. fórmico e metanol) extraíram a maior parte da cocaína presente nas notas já na primeira etapa, mas por também ser um solvente orgânico tóxico, o metanol foi descartado como extrator. Portanto, escolheu-se a água como solvente extrator devido ao baixo custo e a atoxicidade.

- ✓ Os experimentos com a extração sequencial da cocaína das notas não geraram resultados confiáveis e, portanto, este método de extração não foi considerado adequado. Afirma-se isto porque este tipo de extração pode ser considerado de duas maneiras: 1^a) lava-se e seca-se a nota entre a troca de recipientes contendo um volume pré-definido de solvente, porém não há como se comprovar que neste procedimento não há perda de analito; 2^a) não se lavando e secando a nota sempre estará se levando para o novo volume de solvente uma quantidade do extrato anterior o que acarretará em um acúmulo de analito em cada novo volume levando a uma quantificação maior que a real no extrato da nota como um todo.
- ✓ Os dados gerados pelo experimento visando a extração exaustiva apontaram que a maior parte da cocaína presente na nota é extraída na primeira etapa da extração e que com as próximas extrações uma quantidade muito pequena quando comparada à primeira é retirada. Como entre a quinta e a décima etapa, a quantidade extraída da nota não variou, inferiu-se que o volume de solvente influenciaria na extração. Uma vez que este experimento foi realizado colocando-se a nota em um volume de 100 mL a cada etapa de extração por dez vezes, o que resultaria em um volume total de 1,0 L, e que a partir do quinto volume não se observou variação na quantidade extraída, considerou-se que o volume de 400 mL de água seria adequado para uma extração quantitativa. Este valor foi considerado plausível, uma vez que, com os experimentos realizados colocando a nota em 100 mL de solvente sempre foi necessário diluir a amostra pelo menos cinco vezes antes da injeção no LC.
- ✓ Uma vez que a quantidade de cocaína encontrada nas notas é suficientemente alta para ser detectada por LC-MS/MS não se achou relevante o uso de cartuchos de extração em fase sólida para pré-concentrar o analito, mesmo utilizando-se um volume de solvente que pode ser considerado grande.
- ✓ Na prática percebeu-se que volumes menores do que 100 mL de solvente (sendo este valor o mínimo) não são suficientes para embeber ou envolver as notas por completo e solvatar qualquer analito de interesse presente no papel.
- ✓ Também, na prática, observou-se que o uso das notas enroladas em tubos de centrífuga ou de ensaio não são garantia de uma

extração quantitativa, pois a superfície da nota não consegue ter contato adequado com o solvente extrator. Concluiu-se que a maneira mais adequada para proceder a extração é com a nota aberta.

- ✓ Testou-se a extração da cocaína das notas com cotonetes e não se considerou os dados obtidos confiáveis, pois o procedimento, na prática, não retira a droga da superfície do papel e sim a transfere de uma parte da nota para outra. Para se obter resultados confiáveis usando este procedimento, seria necessário uma grande quantidade de cotonetes por nota o que tornaria a análise inviável pelo custo e tempo despendidos no preparo da amostra. Além de não ser um procedimento inédito.
- ✓ Procedimento de extração escolhido: todas as notas utilizadas neste trabalho, tanto para fins de validação do método quanto para a sua aplicação (quantificação) foram submetidas ao procedimento de submersão total em 400 mL de água desionizada, sob agitação magnética constante por 15 min. Durante as análises cromatográficas foi injetada água a cada dez corridas para evitar a contaminação da coluna ou do injetor do LC.

4.3.4 Estudo da hidrólise da cocaína no extrato

O conjunto de algumas condições experimentais otimizadas neste trabalho para a análise de cocaína em cédulas monetárias fez surgir a ideia de que a cocaína presente nas amostras e nos padrões poderia hidrolisar, pois essas condições remetem às condições fisiológicas em que a cocaína é metabolizada.

Essa preocupação surgiu porque sabe-se que o tempo de meia-vida da cocaína *in vivo* é curto (30 a 90 minutos, pois é rapidamente metabolizada pelo fígado) e que a eliminação metabólica da cocaína é predominantemente obtida a partir da hidrólise de seus grupos benzoil e metil-éster (Figura 1.3). No entanto, a hidrólise via metil-éster, o qual produz benzoilecgonina e metanol, pode ser catalisada por uma enzima do fígado humano, mas também se acredita que ocorra espontaneamente sob condições fisiológicas (pH 7,4; 37 °C) e alguns pesquisadores atribuem a instabilidade do grupo metil-éster da cocaína a substâncias alcalinas provenientes da manipulação da droga (Li *et al.*, 1999).

Para sanar essa dúvida foi conduzido um experimento em que se monitorou a concentração de cocaína em cinco valores de pH ao longo

de um intervalo entre a 1ª e a 13ª injeção, sendo que esse intervalo corresponde ao tempo de 143 minutos entre a primeira e a última injeção. O experimento foi realizado pela adição de cocaína na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ a cinco *vials* contendo 1,0 mL de cinco soluções diferentes, como mostra a Tabela 4.8.

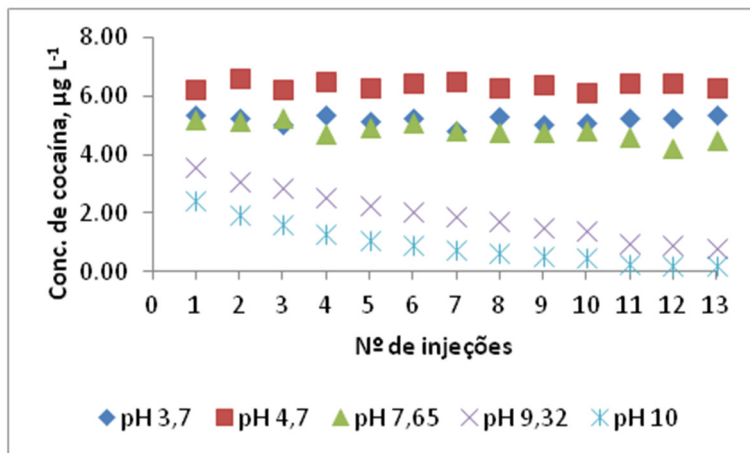
A medida foi realizada pela quantificação da cocaína adicionada à cada uma das cinco soluções ao longo das treze injeções em uma curva analítica que apresentou os seguintes parâmetros: faixa de aplicação, 0,5 a $10 \mu\text{g L}^{-1}$; $R^2 = 0,9997$; eq. da reta, $y = 40761x - 2075,2$.

Tabela 4.8. Soluções utilizadas no experimento para verificar a hidrólise da cocaína.

Solução	pH
Ác. fórmico/hidróxido de amônio	3,67
Ác. acético/hidróxido de amônio	4,69
Ác. acético/hidróxido de amônio	7,65
Sol. de ác. acético pH 4.7 ajustado até o valor estipulado com NH_4OH	9,32 e 10,0

O experimento mostrou que a concentração de cocaína nas soluções com pH 3,7, 4,7 e 7,65 (Figura 4.12) não variou significativamente ao longo de todo o experimento, o que possibilitou dar continuidade ao trabalho com as condições experimentais pré-estabelecidas, uma vez que, não haveria a perda do analito devido ao solvente extrator escolhido (água desionizada, pH $\sim 7,0$), temperatura do forno da coluna, 30°C , nem ao tempo de extração e de corrida cromatográfica, 15 e 10 minutos, respectivamente; além disso, por se ter um número grande de amostras, muitos pontos para a validação do método, todos injetados pelo menos duas vezes, havia uma preocupação com o tempo que o analito permaneceria dentro do amostrador até o momento de ser analisado, o que se mostrou irrelevante pelos dados do experimento.

Figura 4.12. Variação da concentração de cocaína em função do pH e do nº de injeções no experimento para verificar a sua hidrólise.

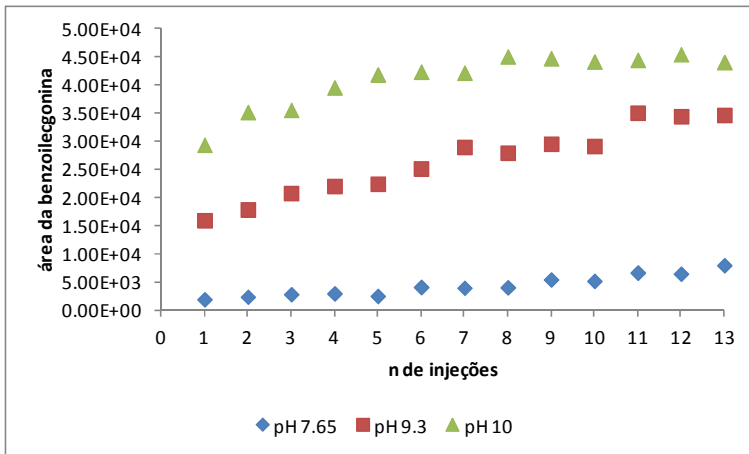


Pelo gráfico da Figura 4.12 pode ser observado que no pH acima de 9,0 ocorre o decaimento considerável da concentração da cocaína o que poderia ser esperado, pois as constantes de velocidade de hidrólise dos grupos metil-éster e benzoil aumentam em pH acima de 6,9 como esperado para hidrólises alcalinas, como foi demonstrado por (Li *et al.*, 1999).

Como citado anteriormente acredita-se que a hidrólise via metil-éster pode ocorrer espontaneamente e ser favorecida por condições alcalinas. Para verificar se a diminuição da concentração da cocaína foi devido à formação do produto dessa rota de hidrólise ou da via hidrólise do grupo benzoil, no mesmo método MRM utilizado para a detecção da cocaína e da lidocaína foram acrescentadas duas transições de massa correspondentes à benzoilecgonina (290,0 → 167,9 e 290,0 → 105,0) e outras duas transições correspondentes à ecgonina metil-éster (199,9 → 181,9 e 199,9 → 81,9), essas transições e as energias correspondentes às suas ionizações e fragmentações foram retiradas do trabalho publicado por (Jeanville, Estapé e De Jeanville, 2003), pois o laboratório não possuía os padrões analíticos desses compostos, uma vez que o seu custo é muito elevado.

As transições de massa correspondentes à ecgonina metil-éster não foram detectadas em nenhuma das cinco soluções avaliadas. No entanto, a partir da solução com pH 7,65 a área referente ao pico da benzoilecgonina foi aumentando gradativamente, mas no pH acima de 9,0 a área aumentou consideravelmente como apresentado na Figura 4.13, o que corrobora com as informações já apresentadas na literatura das razões pelas quais a benzoilecgonina é o metabólito majoritário da cocaína.

Figura 4.13. Acompanhamento da hidrólise da cocaína em benzoilecgonina a partir do pH 7,65.



4.3.5 Desempenho analítico do método

Para avaliar o método proposto para a determinação de cocaína, lidocaína e cafeína em cédulas monetárias, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: seletividade, linearidade, repetibilidade (instrumental e intra-ensaio), precisão intermediária, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e exatidão. A metodologia empregada na avaliação destes parâmetros foi baseada na padronização para produtos farmacêuticos proposta pelo ICH (“International Conference on Harmonization”).

4.3.5.1 Efeito de matriz e seletividade

O método de adição de padrão foi aplicado para os estudos de efeito de matriz. Neste caso, foram feitas três curvas de calibração com adição de padrão de cocaína em três extratos de notas diferentes e comparadas com uma curva de calibração sem a presença da amostra. Compararam-se então as quatro curvas de calibração e como elas se mostraram paralelas (Tabela 4.9), pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da cocaína nos extratos das notas, portanto o método é seletivo e permite que a cocaína possa ser quantificada nos extratos pelo método de calibração externa.

Tabela 4.9. Comparação entre as curvas de adição de padrão de cocaína em três extratos de notas com a curva de calibração externa para verificar o efeito de matriz no método. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

	Calibração Externa	Ad. Padrão Nota 1	Ad. Padrão Nota 2	Ad. Padrão Nota 3	CV %
Cocaína	$y = 35384x + 3844,8$	$y = 33121x + 20210$	$y = 35444x + 22573$	$y = 30901x + 12151$	6,4
Lidocaína	$y = 21984x + 2713$	$y = 20578x + 140,94$	$y = 21477x + 2106,8$	$y = 20362x + 1661,3$	3,6
Cafeína	$y = 4670x + 1370,2$	$y = 4491,6x + 1812,6$	$y = 4534,1x + 5052,6$	$y = 4335,2x + 1807$	3,1

4.3.5.2 Linearidade

Neste trabalho, a linearidade foi avaliada considerando o coeficiente de correlação (r) e também se aplicando o teste de hipótese de linearidade *a priori* (Tabela 4.10). O teste foi realizado por meio da comparação entre o $F_{\text{calculado}}$ e o $F_{\text{crítico}}$ e, neste caso, o $F_{\text{calculado}}$ foi maior do que o $F_{\text{crítico}}$ indicando que a regressão é significativa para o modelo linear aplicado. Outro teste F foi realizado para verificar a falta de ajuste e os resultados não mostraram falta de ajuste com o modelo linear aplicado, uma vez que $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$, com intervalo de confiança de 95%. Esses resultados se aplicam aos três analitos de interesse. A Tabela 4.10 apresenta as faixas de aplicação em que foram construídas as curvas

analíticas os valores dos coeficientes angulares e lineares, os coeficientes de correlação e os testes estatísticos.

Tabela 4.10. Dados relativos à linearidade do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

Parâmetro	Cocaína	Lidocaína	Cafeína
Linearidade –			
Faixa de aplicação ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	0,5 - 12	0,6 - 14	0,7 - 18
Linearidade –	35489	25140	6622
Inclinação ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$) ^a	± 356	± 597	± 84
Linearidade –	2884	1448	415
Intercepto ^a	± 2569	± 4309	± 610
Linearidade –			
Coefficiente de correlação (r) ^a	0,9998	0,9986	0,9996
F para a regressão ^b	735,4	892,7	1380
F para a falta de ajuste ^c	0,000211	0,00114	0,000327

^a Cada ponto da curva preparado em duplicata e injetado em duplicata.

^b $F_{\text{crítico}} = 4,75$; ^c $F_{\text{crítico}} = 3,97$.

4.3.5.3 Conformidade do sistema e limites de detecção e quantificação

A conformidade do sistema foi avaliada através dos parâmetros descritos na Tabela 4.11 e, de acordo, com os dados obtidos o método desenvolvido apresentou bons resultados para o fator de separação e para a resolução da cocaína em relação à lidocaína e à cafeína. Os parâmetros que monitoram a deformação e o alargamento dos picos também apresentaram bons resultados. No entanto, os fatores de retenção da cocaína e da lidocaína não se mostraram muito adequados e isto pode ser o motivo da baixa eficiência apresentada pelos picos, expresso pelo baixo número de pratos.

Tabela 4.11. Dados relativos à conformidade do sistema. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

Parâmetro	Cocaína	Lidocaína	Cafeína
Número de pratos ($N \text{ m}^{-1}$) ^a	9143	8173	16119
Fator de assimetria de pico ^b	1,44	1,67	1,19
Fator de cauda de pico ^b	1,14	1,35	1,02
Fator de retenção ^c	0,88	0,30	2,30
Fator de separação (cocaína, lidocaína) ^d	2,95	--	--
Fator de separação (cocaína, cafeína) ^d	2,60	--	--
Resolução (cocaína, lidocaína) ^e	3,32	--	--
Resolução (cocaína, cafeína) ^e	6,00	--	--

^a Número de pratos calculado de acordo com a equação $N=16(t_R/w)^2$. Concentração de cocaína $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, lidocaína $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e cafeína $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

^b Fator de assimetria calculado usando a distância a partir do centro do pico para a cauda do pico dividido pela distância do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 10% da altura máxima do pico. Fator de cauda foi calculado usando a distância da cauda frontal do pico para a cauda do pico dividido por duas vezes a distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 5 % da altura máxima do pico.

^c Fator de retenção (k) calculado de acordo com a equação $k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$, onde t_R é o tempo de retenção e t_0 é o tempo de retenção de um composto não retido. Concentração de cocaína $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, lidocaína $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e cafeína $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

^d Fator de separação (α) calculado de acordo com a equação $\alpha = \frac{k_B}{k_A}$, onde k_A e k_B é o fator de retenção de dois analitos vizinhos. Concentração de cocaína $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, lidocaína $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e cafeína $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

^e Resolução calculada de acordo com a equação $R_s = 2 \frac{t_{Rb} - t_{Ra}}{w_a + w_b}$, onde t_{Rb} e t_{Ra} são os tempos de retenção de dois picos adjacentes e w_a e w_b são as larguras dos picos na linha de base. Concentração de cocaína $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, lidocaína $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e cafeína $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

No presente trabalho, tanto o LD quanto o LQ foram calculados de duas maneiras a fim de comparação. Uma delas foi o método da relação sinal/ruído e a outra foi o método baseado em parâmetros da curva de calibração, sendo que neste último caso foram aplicadas as equações $LD = 3 \times s/S$; $LQ = 10 \times s/S$, respectivamente, onde s é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da curva de calibração.

Resolveu-se fazer essas comparações porque o *software* Analyst, utilizado no tratamento dos dados, possui uma ferramenta que possibilita se obter a relação sinal/ruído dos analitos automaticamente.

O LD obtido pelos dois métodos foi muito baixo (Tabela 4.12), mas considerou-se como parâmetro validado o LD proveniente dos dados da curva analítica (LD^b , na Tabela 4.12), pois essas concentrações realmente foram detectadas pelo método proposto enquanto que as oriundas da relação sinal/ruído não. No entanto, os valores obtidos para o LQ pelos dois métodos não se mostraram condizentes com o observado experimentalmente porque os valores pela relação sinal/ruído não foram detectados (à exceção da cafeína) e os valores obtidos a partir das curvas de calibração foram maiores que o valor mínimo possível de ser quantificado pelo método. Portanto, considerou-se como parâmetro validado para o LQ (LQ^c , na Tabela 4.12), o menor ponto das curvas analíticas para os três analitos.

Tabela 4.12. Limites de detecção e quantificação do método proposto, em $\mu\text{g L}^{-1}$. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

	S/R	LD ^a	LQ ^a	LD ^b	LQ ^b	LQ ^c
Cocaína	50,2	0,03	0,10	0,22	0,74	0,5
Lidocaína	110,1	0,01	0,05	0,51	1,71	0,6
Cafeína	10,8	0,14	0,46	0,28	0,92	0,7

^a calculados pela relação sinal/ruído com $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ para cocaína, lidocaína e cafeína, respectivamente.

^b calculados com base na nas equações $LD = 3 \times s/S$; $LQ = 10 \times s/S$.

^c definido como o menor ponto da curva de calibração para cada analito.

4.3.5.4 Precisão

Neste trabalho foram avaliadas a precisão instrumental, a precisão intra-ensaio e a precisão intermediária (Tabela 4.13). A precisão instrumental foi determinada por meio da injeção do mesmo extrato de uma nota 10 vezes, consecutivamente, e os valores de CV para o tempo de retenção e para a área do pico da cocaína foi de 1,4 e 5,9%, para a lidocaína 0,6 e 4,6%, e para a cafeína 2,8 e 4,0%, respectivamente.

A precisão intra-ensaio foi determinada por meio da preparação de três repetições dos padrões, em três níveis de concentração: 0,5, 6,0 e 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cocaína; 0,6, 7,0 e 14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a lidocaína; 0,7, 9,0 e 18,0, $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cafeína; injetadas no mesmo dia. Os valores de CV para o tempo de retenção não foram maiores que 0,4%, 0,3% e 0,2% para a cocaína, para a lidocaína e para a cafeína, respectivamente; enquanto que o CV para a área do pico foi menor que 6,5%, 8,5% e 4,1% para a cocaína, para a lidocaína e para a cafeína, respectivamente, considerando-se os três níveis de concentração.

A precisão intermediária foi verificada através da preparação diária de três repetições dos padrões, nos mesmos níveis de concentração utilizados para verificar a precisão intra-ensaio, injetados em duplicata em três dias consecutivos. Os valores de CV para o tempo de retenção não foram maiores que 1,5%, 0,6% e 1,6% para a cocaína, para a lidocaína e para a cafeína, respectivamente; enquanto que o CV para a área do pico foi menor que 8,5%, 9,6% e 8,3% para a cocaína, para a lidocaína e para a cafeína, respectivamente, considerando-se os três níveis de concentração em triplicata ($n=9$).

Tabela 4.13. Dados relativos à precisão do método para a determinação de cocaína, lidocaína e cafeína por LC-MS/MS. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

Parâmetro	Cocaína	Lidocaína	Cafeína
Precisão instrumental (CV %); área do pico; n = 10	5.9	4.6	4
Precisão instrumental (CV %); tempo de retenção; n = 10	1.4	0.6	2.8
Precisão intra-ensaio (CV %); área do pico; (conc.1) ^a ; n = 3	6.4	3.4	2.1
Precisão intra-ensaio (CV %); tempo de retenção; (conc.1) ^a ; n = 3	0.4	0.1	0.2
Precisão intra-ensaio (CV %); área do pico; (conc.2) ^b ; n = 3	6.5	8.5	4.1
Precisão intra-ensaio (CV %); tempo de retenção; (conc.2) ^b ; n = 3	0.2	0.2	0.1
Precisão intra-ensaio (CV %); área do pico; (conc.3) ^c ; n = 3	5.3	2.7	1.2
Precisão intra-ensaio (CV %); tempo de retenção; (conc.3) ^c ; n = 3	0.3	0.3	0.1
Precisão intermediária (CV %); área do pico; (conc.1) ^a ; n = 9	8.5	7.5	8.3
Precisão intermediária (CV %); tempo de retenção; (conc.1) ^a ; n = 9	1.5	0.6	1.6
Precisão intermediária (CV %); área do pico; (conc.2) ^b ; n = 9	5.7	9.6	5.1
Precisão intermediária (CV %); tempo de retenção; (conc.2) ^b ; n = 9	0.3	0.4	0.3
Precisão intermediária (CV %); área do pico; (conc.3) ^c ; n = 9	3.9	7.9	3.7
Precisão intermediária (CV %); tempo de retenção; (conc.3) ^c ; n = 9	0.3	0.4	0.4

^a Conc. 1 = 0,5 µg L⁻¹ para a cocaína; 0,6 µg L⁻¹ para a lidocaína; 0,7 µg L⁻¹ para a cafeína.

^b Conc. 2 = 6,0 µg L⁻¹ para a cocaína; 7,0 µg L⁻¹ para a lidocaína; 9,0 µg L⁻¹ para a cafeína.

^c Conc. 3 = 12,0 µg L⁻¹ para a cocaína; 14,0 µg L⁻¹ para a lidocaína; 18,0 µg L⁻¹ para a cafeína.

4.3.5.5 Exatidão

A exatidão foi obtida através de ensaios de recuperação e os experimentos foram realizados através da adição dos padrões de cocaína, lidocaína e cafeína em três níveis de concentração diferentes: 2,0, 6,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cocaína; 2,0, 7,0 e 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a lidocaína; 3,0, 9,0 e 15,0, $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cafeína, a três extratos de notas diferentes, resultando em percentuais de recuperação médio de 95,6%, 95,1% e 97,3% para a cocaína, para a lidocaína e para a cafeína, respectivamente, considerando-se os três níveis de concentração (Tabela 4.14).

Tabela 4.14. Exatidão do método proposto para determinação de cocaína, lidocaína e cafeína. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

Cocaína	
Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% de recuperação
2,0	98,4
6,0	94,5
10,0	93,8
Lidocaína	
Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% de recuperação
2,0	96,4
7,0	93,7
12,0	95,2
Cafeína	
Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% de recuperação
3,0	97,2
9,0	98,9
15,0	95,7

4.3.5.6 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Em HPLC, costuma-se avaliar este parâmetro variando o conteúdo de um dos componentes da fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$. Se estas mudanças não diminuïrem a precisão, a seletividade e a exatidão do método, pode se dizer que o método é robusto.

No presente trabalho, optou-se por avaliar a robustez de um modo diferente, através da observação da sensibilidade e da linearidade de uma mesma curva de calibração analisada em duas colunas Synergi Polar-RP com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2 mm e tamanho da partícula igual a 4 μm disponíveis no laboratório, sendo que a comparação sempre foi feita entre a coluna utilizada em todo o trabalho (coluna 1) em relação a outra (coluna 2). A curva foi realizada somente com o padrão de cocaína e composta por cinco pontos na faixa de aplicação de 0,5; 2; 4; 6; 8 $\mu\text{g L}^{-1}$, injetados em duplicata.

A Tabela 4.15 apresenta os dados obtidos neste experimento, incluindo a avaliação da linearidade de cada curva através do teste F para a regressão e para a falta de ajuste. Como pode ser observado, para as duas curvas, o $F_{\text{calculado}}$ foi maior do que o $F_{\text{crítico}}$ indicando que a regressão é significativa para o modelo linear aplicado. O teste F realizado para verificar a falta de ajuste mostrou que os dados se encontram ajustados ao modelo aplicado, uma vez que $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.15. Dados relativos à linearidade das curvas de calibração utilizadas na avaliação da robustez do método proposto. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

Coluna	Eq. da Reta	R ²	F ^a	F ^b
1	$y = 36919x - 1596$	0,9993	1948	0,000369
2	$y = 36037x - 751$	0,9991	1028	0,000478

^a $F_{\text{crítico}}$ para a regressão = 5,32; ^b $F_{\text{crítico}}$ para a falta de ajuste = 5,41.

Uma vez que as curvas independentes não apresentaram discrepâncias em relação à sua própria linearidade, passou-se a avaliação da robustez por meio da sensibilidade, realizada através da comparação dos coeficientes angulares das equações de reta obtidos os quais apresentaram um coeficiente de variação (CV) de 1,71% entre si, valor que pode ser considerado baixo levando-se em conta que a curva foi analisada em colunas do mesmo tipo, mas que foram utilizadas em análises de matrizes bem diferentes com outras fases móveis e condições experimentais diversas. Sendo assim, no quesito sensibilidade como parâmetro de avaliação da robustez, o método proposto foi aprovado.

Para atestar a robustez por meio da linearidade, foi realizado um teste t-pareado com as médias das áreas das curvas de calibração e os valores para o parâmetro p bi-caudal, $t_{\text{calculado}}$ e $t_{\text{crítico}}$ são apresentados na Tabela 4.16.

O teste resultou em valores de p bi-caudal maiores que 0,05 e o $t_{\text{calculado}}$ menor que o $t_{\text{crítico}}$ na comparação das áreas da curva obtida na coluna 1 com as da coluna 2. Sendo assim, pode-se dizer que não houve diferença significativa quanto à linearidade para a curva corrida nas duas colunas cromatográficas diferentes, com um intervalo de confiança de 95%, e com base nesse resultado conclui-se que o método proposto para a determinação de cocaína em cédulas monetárias pode ser considerado robusto também pelo parâmetro de linearidade.

Tabela 4.16. Resultado do teste t-pareado utilizado na comparação da linearidade como parâmetro da avaliação da robustez. Condições experimentais: ver Seção 4.2.1.

Coluna	p bi-caudal	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{crítico}}$
1 → 2	0,150	1,78	2,78

4.3.6 Análise das cédulas monetárias

Este estudo analisou 55 cédulas monetárias brasileiras de R\$ 2,00, coletadas nas cidades de Florianópolis/SC (15 notas), Juiz de Fora/MG (12 notas), Rio de Janeiro/RJ (11 notas), São Paulo/SP (7 notas) e Fortaleza/CE (10 notas). Também foram analisadas 5 notas de um dólar

americano provenientes da cidade de Baltimore/USA. Todas as notas constituem um grupo de amostragem de dinheiro circulante e elas não foram adicionadas de nenhum dos padrões.

Do total de 60 notas, a cocaína e a cafeína foram encontradas em 98,3% das notas e a lidocaína em 70% das amostras. Os analitos foram identificados pela comparação do tempo de retenção dos picos nas amostras com o dos padrões e também pelo perfil de fragmentação dos espectros de massa gerados pelas amostras.

Em 50% das notas contaminadas com cocaína foram encontradas também quantidades de benzoilecgonina que não foram quantificadas devido ao alto custo do padrão analítico. A presença da benzoilecgonina é explicada pela hidrólise da cocaína na superfície do papel.

A quantidade significativamente alta de cocaína encontrada na maioria das notas foi correlacionada a uma possível exposição direta à droga durante a sua negociação ou consumo. Wimmer & Schneider em outro estudo sobre drogas em cédulas monetárias também utilizando LC-MS/MS estipularam o valor de 7 nmol/nota como limite entre contaminação cruzada e dinheiro do tráfico/uso de cocaína (Wimmer e Schneider, 2011). Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, apenas três notas apresentaram cocaína abaixo do limite: JF2, 0,7 nmol/nota; JF4, 6,1 nmol/nota; FO4, 5,5 nmol/nota.

Os resultados são apresentados a seguir de acordo com as cidades em que as notas foram coletadas e após essa discussão são apresentadas as Tabelas 4.17, 4.18 e 4.19 que correspondem aos valores das concentrações nos extratos e a correspondente quantidade em massa de cocaína em µg/nota para a cocaína, lidocaína e cafeína, respectivamente.

4.3.6.1 Florianópolis/SC

Cocaína e cafeína foram detectadas em todas as 15 notas analisadas. Lidocaína foi encontrada em 11 notas do total. A quantidade de cocaína detectada em cada nota variou de 6,47 a 1238,37 µg por nota. A cafeína encontrada em cada nota ficou na faixa de 6,90 a 237,81 µg por nota, enquanto que a lidocaína variou de 0,84 a 36,67 µg por nota.

4.3.6.2 Juiz de Fora/MG

Desta cidade foram analisadas 12 notas. Em duas delas não foi detectada lidocaína enquanto que nas outras este analito variou de 0,46 a 17,17

μg por nota. Cocaína e cafeína foram detectadas em todas as 12 notas analisadas. A quantidade de cocaína detectada em cada nota variou de 0,21 μg por nota a 22,82 mg por nota. A cafeína encontrada em cada nota ficou na faixa de 25,87 a 59,86 μg por nota.

4.3.6.3 Rio de Janeiro/RJ

Cocaína, cafeína e lidocaína foram detectadas em todas as 11 notas analisadas. A quantidade de cocaína detectada em cada nota variou de 4,46 a 610,56 μg por nota. A cafeína encontrada em cada nota ficou na faixa de 43,49 a 192,96 μg por nota, enquanto que a lidocaína variou de 2,30 a 31,14 μg por nota.

4.3.6.4 São Paulo/SP

Desta cidade foram analisadas 7 notas e também neste conjunto de amostras foram detectados os três analitos. A lidocaína ficou na faixa de 1,59 a 175,48 μg por nota. A quantidade de cocaína detectada em cada nota variou de 4,94 a 372,27 μg por nota. A cafeína encontrada em cada nota ficou na faixa de 49,35 a 789,72 μg por nota.

4.3.6.5 Fortaleza/CE

Das dez notas analisadas da cidade de Fortaleza, apenas duas notas apresentaram lidocaína e a quantidade encontrada foi de 0,58 e 3,50 μg por nota. Uma nota não apresentou a presença de cocaína e cafeína. Nas nove notas restantes, a quantidade de cocaína detectada em cada nota variou de 1,68 a 45,65 μg por nota. A cafeína encontrada em cada nota ficou na faixa de 11,63 a 38,73 μg por nota.

4.3.6.6 Baltimore/USA

Dos cinco dólares americanos, apenas uma nota apresentou lidocaína e a quantidade encontrada foi de 1,86 μg por nota enquanto que em todas as cinco notas foram detectadas cocaína e cafeína. A quantidade de cocaína detectada em cada nota variou de 2,54 a 26,54 μg por nota. A cafeína encontrada em cada nota ficou na faixa de 12,81 a 16,37 μg por nota.

Tabela 4.17. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de cocaína em μg por nota.

Amostra	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)		μg cocaína/nota		
Floripa 1	104,08	± 5,31	41,63	± 2,13	
Floripa 2	612,77	± 68,65	245,11	± 27,46	
Floripa 3	164,06	± 10,40	65,63	± 4,16	
Floripa 4	336,71	± 43,25	134,68	± 17,30	
Floripa 5	3095,93	± 176,40	1238,37	± 70,56	
Floripa 6	96,31	± 1,97	38,52	± 0,79	
Floripa 7	150,40	± 8,59	60,16	± 3,44	
Floripa 8	16,18	± 2,13	6,47	± 0,85	
Floripa 9	40,19	± 2,74	16,07	± 1,09	
Floripa 10	125,59	± 17,06	50,24	± 6,82	
Floripa 11	223,33	± 43,99	89,33	± 17,60	
Floripa 12	208,48	± 37,00	83,39	± 14,80	
Floripa 13	297,05	± 17,55	118,82	± 7,02	
Floripa 14	60,67	± 17,11	24,27	± 6,84	
Floripa 15	188,06	± 46,33	75,22	± 18,53	
Juiz de Fora 1	32,59	± 2,90	13,04	± 1,16	
Juiz de Fora 2	0,52	± 1,38	0,21	± 0,55	
Juiz de Fora 3	149,99	± 15,86	59,99	± 6,35	
Juiz de Fora 4	4,62	± 0,99	1,85	± 0,40	
Juiz de Fora 5	42,43	± 9,26	16,97	± 3,70	
Juiz de Fora 6	13,04	± 4,14	5,21	± 1,66	
Juiz de Fora 7	85,50	± 14,50	34,20	± 5,80	
Juiz de Fora 8	168,29	± 0,07	67,32	± 0,03	
Juiz de Fora 9	7120,84	± 597,74	2848,34	± 239,10	
Juiz de Fora 10	57051,81	± 7770,62	22820,72	± 3108,25	
Juiz de Fora 11	9093,28	± 1315,03	3637,31	± 526,01	
Juiz de Fora 12	153,45	± 3,20	61,38	± 1,28	

Continua

Tabela 4.17. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de cocaína em μg por nota (continuação).

Rio de Janeiro1	52,77	±	1,96	21,11	±	0,79
Rio de Janeiro2	11,15	±	1,42	4,46	±	0,57
Rio de Janeiro3	1526,40	±	147,56	610,56	±	59,02
Rio de Janeiro4	47,94	±	6,19	19,18	±	2,48
Rio de Janeiro5	75,40	±	2,05	30,16	±	0,82
Rio de Janeiro6	174,54	±	32,45	69,82	±	12,98
Rio de Janeiro7	786,94	±	30,41	314,77	±	12,16
Rio de Janeiro8	425,77	±	26,52	170,31	±	10,61
Rio de Janeiro9	62,87	±	5,65	25,15	±	2,26
Rio de Janeiro10	116,17	±	4,92	46,47	±	1,97
Rio de Janeiro11	29,48	±	0,21	11,79	±	0,08
São Paulo 1	930,69	±	88,49	372,27	±	35,39
São Paulo 2	46,26	±	8,38	18,51	±	3,35
São Paulo 3	81,56	±	0,24	32,62	±	0,09
São Paulo 4	391,94	±	27,10	156,78	±	10,84
São Paulo 5	12,35	±	1,32	4,94	±	0,53
São Paulo 6	153,60	±	25,10	61,44	±	10,04
São Paulo 7	47,02	±	1,01	18,81	±	0,40
Fortaleza 1	61,91	±	4,15	24,76	±	1,66
Fortaleza 2	20,37	±	3,89	8,15	±	1,55
Fortaleza 3	15,10	±	3,49	6,04	±	1,40
Fortaleza 4	4,19	±	1,49	1,68	±	0,60
Fortaleza 5			<LD			<LD
Fortaleza 6	114,13	±	10,83	45,65	±	4,33
Fortaleza 7	48,79	±	6,83	19,51	±	2,73
Fortaleza 8	10,04	±	1,28	4,02	±	0,51
Fortaleza 9	24,63	±	1,16	9,85	±	0,46
Fortaleza 10	29,84	±	1,45	11,94	±	0,58
Dolar 1	11,70	±	1,52	4,68	±	0,61
Dolar 2	66,36	±	2,59	26,54	±	1,04
Dolar 3	23,00	±	2,16	9,20	±	0,86
Dolar 4	6,36	±	0,58	2,54	±	0,23
Dolar 5	11,71	±	0,68	4,68	±	0,27

Tabela 4.18. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de lidocaína em μg por nota.

Amostra	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	μg lidocaína/nota
Floripa 1	2,09 \pm 0,25	0,84 \pm 0,10
Floripa 2	<LD	<LD
Floripa 3	<LD	<LD
Floripa 4	40,23 \pm 2,00	16,09 \pm 0,80
Floripa 5	91,67 \pm 6,95	36,67 \pm 2,78
Floripa 6	5,74 \pm 0,58	2,30 \pm 0,23
Floripa 7	<LD	<LD
Floripa 8	<LD	<LD
Floripa 9	60,41 \pm 7,95	24,16 \pm 3,18
Floripa 10	24,42 \pm 2,60	9,77 \pm 1,04
Floripa 11	68,66 \pm 12,63	27,46 \pm 5,05
Floripa 12	16,05 \pm 1,80	6,42 \pm 0,72
Floripa 13	8,86 \pm 2,87	3,54 \pm 1,15
Floripa 14	26,00 \pm 3,10	10,40 \pm 1,24
Floripa 15	5,19 \pm 1,92	2,08 \pm 0,77
Juiz de Fora 1	14,84 \pm 2,61	5,94 \pm 1,04
Juiz de Fora 2	21,99 \pm 6,29	8,79 \pm 2,52
Juiz de Fora 3	<LD	<LD
Juiz de Fora 4	5,53 \pm 2,34	2,21 \pm 0,94
Juiz de Fora 5	10,67 \pm 1,92	4,27 \pm 0,77
Juiz de Fora 6	1,14 \pm 0,52	0,46 \pm 0,21
Juiz de Fora 7	8,54 \pm 1,92	3,42 \pm 0,77
Juiz de Fora 8	<LD	<LD
Juiz de Fora 9	14,98 \pm 3,01	5,99 \pm 1,20
Juiz de Fora 10	11,87 \pm 1,89	4,75 \pm 0,76
Juiz de Fora 11	23,30 \pm 3,41	9,32 \pm 1,36
Juiz de Fora 12	42,94 \pm 16,36	17,17 \pm 6,55

Continua

Tabela 4.18. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de lidocaína em μg por nota (continuação).

Rio de Janeiro1	13,66 \pm 0,48	5,46 \pm 0,19
Rio de Janeiro2	31,83 \pm 2,06	12,73 \pm 0,82
Rio de Janeiro3	49,51 \pm 6,97	19,81 \pm 2,79
Rio de Janeiro4	29,39 \pm 0,52	11,76 \pm 0,21
Rio de Janeiro5	11,05 \pm 3,67	4,42 \pm 1,47
Rio de Janeiro6	57,80 \pm 7,26	23,12 \pm 2,91
Rio de Janeiro7	77,86 \pm 3,84	31,14 \pm 1,53
Rio de Janeiro8	59,79 \pm 8,71	23,92 \pm 3,48
Rio de Janeiro9	5,76 \pm 0,81	2,30 \pm 0,32
Rio de Janeiro10	10,80 \pm 2,66	4,32 \pm 1,07
Rio de Janeiro11	20,02 \pm 3,44	8,01 \pm 1,37
São Paulo 1	438,70 \pm 3,44	175,48 \pm 1,38
São Paulo 2	11,98 \pm 3,03	4,79 \pm 1,21
São Paulo 3	59,85 \pm 2,17	23,94 \pm 0,87
São Paulo 4	95,98 \pm 5,18	38,39 \pm 2,07
São Paulo 5	29,41 \pm 2,73	11,76 \pm 1,09
São Paulo 6	54,85 \pm 3,77	21,94 \pm 1,51
São Paulo 7	3,99 \pm 0,78	1,59 \pm 0,31
Fortaleza 1	<LD	<LD
Fortaleza 2	<LD	<LD
Fortaleza 3	<LD	<LD
Fortaleza 4	<LD	<LD
Fortaleza 5	<LD	<LD
Fortaleza 6	8,75 \pm 1,01	3,50 \pm 0,40
Fortaleza 7	<LD	<LD
Fortaleza 8	1,46 \pm 1,10	0,58 \pm 0,44
Fortaleza 9	<LD	<LD
Fortaleza 10	<LD	<LD
Dolar 1	4,64 \pm 0,62	1,86 \pm 0,25
Dolar 2	<LD	<LD
Dolar 3	<LD	<LD
Dolar 4	<LD	<LD
Dolar 5	<LD	<LD

Tabela 4.19. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de cafeína em μg por nota.

Amostra	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)		μg cafeína/nota	
Floripa 1	156,56	\pm 0,49	62,62	\pm 0,20
Floripa 2	214,38	\pm 35,96	85,75	\pm 14,38
Floripa 3	120,77	\pm 30,17	48,31	\pm 12,07
Floripa 4	329,71	\pm 9,85	131,88	\pm 3,94
Floripa 5	420,64	\pm 8,72	168,26	\pm 3,49
Floripa 6	132,94	\pm 4,28	53,18	\pm 1,71
Floripa 7	80,69	\pm 1,82	32,28	\pm 0,73
Floripa 8	17,26	\pm 2,53	6,90	\pm 1,01
Floripa 9	91,68	\pm 11,43	36,67	\pm 4,57
Floripa 10	175,12	\pm 3,45	70,05	\pm 1,38
Floripa 11	594,53	\pm 32,45	237,81	\pm 12,98
Floripa 12	56,49	\pm 3,38	22,60	\pm 1,35
Floripa 13	96,73	\pm 8,93	38,69	\pm 3,57
Floripa 14	95,61	\pm 6,31	38,25	\pm 2,52
Floripa 15	97,36	\pm 1,72	38,94	\pm 0,69
Juiz de Fora 1	64,67	\pm 15,39	25,87	\pm 6,16
Juiz de Fora 2	97,05	\pm 18,38	38,82	\pm 7,35
Juiz de Fora 3	89,65	\pm 12,60	35,86	\pm 5,04
Juiz de Fora 4	100,92	\pm 3,92	40,37	\pm 1,57
Juiz de Fora 5	109,04	\pm 12,67	43,61	\pm 5,07
Juiz de Fora 6	82,34	\pm 4,35	32,94	\pm 1,74
Juiz de Fora 7	92,37	\pm 13,73	36,95	\pm 5,49
Juiz de Fora 8	117,58	\pm 11,55	47,03	\pm 4,62
Juiz de Fora 9	135,48	\pm 33,98	54,19	\pm 13,59
Juiz de Fora 10	86,95	\pm 6,83	34,78	\pm 2,73
Juiz de Fora 11	119,92	\pm 5,85	47,97	\pm 2,34
Juiz de Fora 12	149,65	\pm 30,47	59,86	\pm 12,19

Continua

Tabela 4.19. Concentração nos extratos das cédulas monetárias de R\$ 2,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) e quantidade de cafeína em μg por nota (continuação).

Rio de Janeiro1	139,73	\pm 13,45	55,89	\pm 5,38
Rio de Janeiro2	260,76	\pm 14,65	104,30	\pm 5,86
Rio de Janeiro3	276,43	\pm 11,55	110,57	\pm 4,62
Rio de Janeiro4	302,90	\pm 10,87	121,16	\pm 4,35
Rio de Janeiro5	118,43	\pm 0,14	47,37	\pm 0,06
Rio de Janeiro6	457,39	\pm 26,82	182,96	\pm 10,73
Rio de Janeiro7	482,40	\pm 45,82	192,96	\pm 18,33
Rio de Janeiro8	351,73	\pm 43,46	140,69	\pm 17,38
Rio de Janeiro9	108,72	\pm 1,42	43,49	\pm 0,57
Rio de Janeiro10	138,08	\pm 6,91	55,23	\pm 2,76
Rio de Janeiro11	141,79	\pm 6,15	56,72	\pm 2,46
São Paulo 1	1973,80	\pm 20,99	789,52	\pm 8,39
São Paulo 2	123,37	\pm 3,24	49,35	\pm 1,30
São Paulo 3	365,24	\pm 8,04	146,10	\pm 3,22
São Paulo 4	358,34	\pm 18,98	143,34	\pm 7,59
São Paulo 5	152,20	\pm 0,30	60,88	\pm 0,12
São Paulo 6	495,53	\pm 20,80	198,21	\pm 8,32
São Paulo 7	222,50	\pm 15,19	89,00	\pm 6,07
Fortaleza 1	35,95	\pm 1,20	14,38	\pm 0,48
Fortaleza 2	36,48	\pm 2,26	14,59	\pm 0,90
Fortaleza 3	29,07	\pm 0,13	11,63	\pm 0,05
Fortaleza 4		<LD		<LD
Fortaleza 5	47,46	1,26	18,98	\pm 0,51
Fortaleza 6	96,83	\pm 13,28	38,73	\pm 5,31
Fortaleza 7	41,63	\pm 2,18	16,65	\pm 0,87
Fortaleza 8	81,43	\pm 4,27	32,57	\pm 1,71
Fortaleza 9	32,80	\pm 3,10	13,12	\pm 1,24
Fortaleza 10	41,90	\pm 4,80	16,76	\pm 1,92
Dolar 1	37,33	\pm 0,46	14,93	\pm 0,18
Dolar 2	38,08	\pm 3,60	15,23	\pm 1,44
Dolar 3	32,02	\pm 1,36	12,81	\pm 0,54
Dolar 4	40,20	\pm 5,40	16,08	\pm 2,16
Dolar 5	40,94	\pm 10,97	16,37	\pm 4,39

4.4 Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método utilizando a técnica de LC-MS/MS para a determinação de cocaína em 60 cédulas monetárias. Durante os ensaios preliminares foram identificadas a presença de lidocaína e cafeína que passaram a ser também objetos do estudo. Este método apresentou bons parâmetros de validação para os três analitos, em relação às figuras de mérito de linearidade, sensibilidade, conformidade do sistema, precisão, exatidão e robustez.

O método proposto tem a vantagem de usar um procedimento de preparo de amostra simples que consiste na submersão da nota em 400 mL de água desionizada por 15 min sob agitação magnética constante. O uso de água é bastante adequado pela sua atoxicidade, baixo custo e por não provocar danos nas marcas de segurança das notas e não compromete a eficiência da extração. Foram realizados experimentos que comprovam que a cocaína não hidrolisa nas condições experimentais utilizadas.

As menores quantidades de cocaína, lidocaína e cafeína foram encontradas nas notas de dólares. Mas fazendo uma comparação entre as notas provenientes das cinco cidades brasileiras, excluindo-se as notas em que foi detectado mais de 1,0 mg de cocaína, as cidades que apresentaram a menor e a maior quantidade média de cocaína por nota foram Fortaleza (14,6 $\mu\text{g}/\text{nota}$) e Rio de Janeiro (120,3 $\mu\text{g}/\text{nota}$), respectivamente. A cidade que apresentou as menores quantidades de cafeína e lidocaína também foi Fortaleza, sendo que foram detectados 2,0 $\mu\text{g}/\text{nota}$ de lidocaína e 19,7 $\mu\text{g}/\text{nota}$ de cafeína nas amostras desta cidade. Em contrapartida, a cidade em que foram encontradas as maiores quantidades médias de cafeína e lidocaína por nota foi São Paulo 39,7 μg de lidocaína e 210,9 μg de cafeína.

Finalmente, como colocado na Revisão da Literatura (Cap. 2), muitos trabalhos visando a determinação de cocaína em cédulas monetárias já foram realizados por diversas técnicas ao redor do mundo, mas é preciso ter em mente que a contaminação maior ou menor das notas está diretamente relacionada ao problema do uso de drogas de abuso de cada país ou cidade e isto explica os diferentes níveis de cocaína encontrados nos trabalhos já publicados.

5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA EM CÉDULAS MONETÁRIAS UTILIZANDO LC-MS/MS NA ANÁLISE DE URINA E DA PELE DAS MÃOS

5.1 Revisão da literatura

Partindo do princípio de que a cocaína pode ser absorvida pelas mucosas e é detectada no suor, e também, que esta droga é encontrada em toda nota de dinheiro em circulação, seja proveniente do tráfico ou por contaminações cruzadas, levanta-se a questão: é possível que a cocaína permeie pela pele de pessoas que estão em contato direto com um grande número de notas diariamente? Em caso afirmativo, será que a quantidade absorvida pode ser detectada no organismo?

A análise de drogas de abuso em matrizes biológicas como sangue, urina, cabelo, suor e saliva, em geral, é bem documentada, seja em revistas de âmbito forense, analítico, farmacêutico ou médico. No entanto, até o presente momento não foi estudada a contaminação de terceiros via cédulas monetárias e esse é o foco deste projeto e sua fundamentação teórica se baseará em trabalhos reportados na literatura que estudaram amostras de suor e urina provenientes de usuários de drogas ou de pessoas que se contaminaram por um contato direto com esses usuários, como no caso de bebês que são amamentados por mães viciadas.

Ao longo dos anos, foram concebidas estratégias para distinguir o uso de cocaína da exposição passiva à droga, entre eles a análise de metabólitos, como a benzoilecgonina (BE). Um estudo realizado por Smith & Kidwell, em 1996, comparou as concentrações de cocaína e benzoilecgonina (BE) encontradas no cabelo, saliva, pele e urina de mães usuárias da droga, seus filhos e outros adultos que viviam no mesmo ambiente, no total foram analisadas amostras de 58 adultos e 26 crianças, com idades entre 1 e 14 anos. As amostras de *swabs*, saliva e urina foram analisadas através de imunoenaios específicos, enquanto que as amostras de cabelo foram analisadas por GC-MS. Os adultos apresentaram concentrações médias de 2,4 ng cocaína/mg cabelo e 0,39 ng BE/mg cabelo. Em comparação, as concentrações encontradas nas crianças foram de 2,4 ng cocaína/mg de cabelo e 0,74 ng BE/mg de cabelo. Nenhuma das amostras de urina das crianças deu resultado positivo acima de 300 ng BE/mL. Em contraste, 3/16 amostras de urina de adultos deram positivo,

mesmo daqueles participantes de programas de reabilitação. Benzoi-lecgonina foi detectada na saliva de apenas um adulto e uma criança. Os *swabs* utilizados para a coleta nas testas continham quantidades mensuráveis de cocaína para a maioria das crianças (19/26) e adultos (15/17), assim como para a BE, crianças (7/26) e adultos (7/17) (Smith e Kidwell, 1996).

Uma amostra biológica é caracterizada por possuir uma composição de matriz muito complexa, concentração muito baixa de analitos (por exemplo, pg/mg de cabelo e ng/mL de sangue e urina), grande possibilidade de interferências e limitado acesso a materiais de referência. Estes problemas podem ser superados pela escolha adequada de procedimentos de preparo de amostra (Marchi *et al.*, 2010).

A presença de efeitos de matriz também demonstra ser dependente do fluido biológico analisado. A composição da matriz, característica de cada fluido, pode interferir de maneiras diferentes. As principais interferências na urina provem de componentes hidrofílicos inorgânicos, mais provavelmente sais. A saliva apresenta mais interferência que a urina e os componentes da matriz são de natureza hidrofílica e hidrofóbica, incluindo proteínas e aminoácidos. Finalmente, para o plasma, os componentes da matriz também tem uma ampla faixa de polaridade, mas as suas concentrações são mais elevadas do que aqueles da saliva (Gosetti *et al.*, 2010).

Propriedades físico-químicas da cocaína e seus metabólitos (por exemplo, o carácter apolar da cocaína ou a hidrofobicidade da benzoi-lecgonina) exigem abordagens diferentes na fase de isolamento. Por conseguinte, a otimização cuidadosa do preparo de amostra é essencial para a obtenção de baixos limites de detecção e confiáveis dados qualitativos e quantitativos (Janicka, Kot-Wasik e Namieśnik, 2010; Brettell, Butler e Almirall, 2011).

Em análise de drogas, as regras para a amostragem de material biológico são complicadas, de modo que a amostragem pode ser o elo mais fraco de todo o procedimento analítico. Tendo em conta a distribuição farmacocinética e a excreção de substâncias psicoativas a partir de um organismo, o material mais valioso é a urina por causa de sua ampla janela de detecção. O problema da identificação se um indivíduo estava sob a influência de uma droga no local de um evento pode ser resolvido pela coleta de amostras de urina, no local e/ou após um curto período de tempo. Além disso, algumas drogas ilícitas (como a cocaína em si) são metabolizadas muito rapidamente para ser medida em exames de rotina

de urina. Quando a urina é testada para a presença de cocaína é a benzoilecgonina que é medida. Esse metabólito tem uma meia-vida biológica de 5-8 h, tempo que é muito mais longo que o da cocaína (0,5-1,5 h). O tempo geralmente aceito para que a urina esteja livre de benzoilecgonina a partir da urina é de 3-5 dias (Janicka, Kot-Wasik e Namieśnik, 2010; Brettell, Butler e Almirall, 2011).

O período de tempo para o qual um resultado positivo pode indicar o uso de drogas depende de vários fatores, incluindo a frequência de utilização e a quantidade de droga, a taxa metabólica, a taxa de excreção, a meia-vida da droga e a idade, o peso, a atividade e a dieta do usuário. Existem várias amostras biológicas que podem ser obtidas de forma não-invasiva (cabelo, saliva e unhas). Esse tipo de coleta de amostra não requer instalações especiais e vigilância rigorosa das atividades privadas do suspeito para evitar a adulteração (Janicka, Kot-Wasik e Namieśnik, 2010; Brettell, Butler e Almirall, 2011).

A saliva é cada vez mais utilizada em testes de drogas por estar prontamente disponível e ser obtida de modo não-invasivo, além de diminuir a possibilidade de adulteração da amostra em comparação com a coleta de urina em que a privacidade é necessária (Drummer, 2008). A saliva pode ser analisada no local de apreensão dos suspeitos através de imunoensaios. No entanto, drogas que são de natureza básica como a cocaína acumulam concentrações mais elevadas no fluido oral que no soro do sangue, enquanto que uma droga ácida como o metabólito benzoilecgonina, quando detectada imunologicamente, apresenta uma concentração muito menor (Drummer, 2005; Cognard, Bouchonnet e Staub, 2006).

Comparada com a urina, as drogas são encontradas na saliva na forma original. A saliva tem uma janela de detecção semelhante a do sangue, tendo a vantagem de oferecer uma rigorosa afirmação da presença de drogas no momento do exame. Infelizmente, circunstâncias econômicas limitam o amplo uso da saliva nas análises toxicológicas nos locais dos eventos, o que prolonga o tempo de testes de *screening*. Além disso, outra dificuldade é que um nível de corte não foi definido com precisão analítica para métodos de uso geral (Sergi *et al.*, 2010).

Os fluidos corporais (por exemplo, sangue e urina) são geralmente recolhidos para exame laboratorial. No plasma, a concentração de droga tóxica é diretamente proporcional à condição clínica do indivíduo. Quando só sangue é coletado, a sua complicada composição de ma-

triz pode interromper ou até mesmo impossibilitar os testes toxicológicos. Da mesma forma, testes com plasma são relativamente caros. A coleta só de urina reduz o tempo de triagem, mas alonga a janela de detecção de drogas de abuso, tornando-se difícil definir se a pessoa examinada estava sob a influência da droga no momento de um evento (Janicka, Kot-Wasik e Namieśnik, 2010).

Um dos pontos cruciais em amostragem biológica é a possibilidade de estender a janela de tempo de detecção a partir de horas ou dias, como no sangue e na urina, a semanas ou meses, como em unhas e cabelos. Para avaliar a exposição crônica às drogas de abuso, tanto de seres humanos vivos como mortos, o cabelo é a matriz escolhida. Os dentes de leite foram propostos como uma matriz para medir o conteúdo cumulativo do uso de drogas no monitoramento da exposição (Pellegrini *et al.*, 2006). A Tabela 5.1 indica a possibilidade de detecção estimada de cocaína em diferentes amostras biológicas em função do tempo. Muitos autores têm observado que a cocaína se degrada em benzoilecgonina em soluções padrão e amostras de urina, sendo recomendado o seu congelamento imediato para evitar esta degradação. Quando o material investigado pode ser armazenado apenas a 4 °C, a satisfatória estabilidade da cocaína é assegurada durante 90 dias pela acidificação das amostras de urina para pH = 5,0. O armazenamento de urina em pH = 5,0 e a 25 °C durante mais de 60 dias cria o risco de degradação significativa da cocaína presente na amostra (Janicka, Kot-Wasik e Namieśnik, 2010).

Em laboratórios de análises forenses são utilizados métodos alternativos que se baseiam em análises imunológicas de amostras de urina (Moeller, Lee e Kissack, 2008), saliva (Wille *et al.*, 2009) e em soro sanguíneo (Toennes *et al.*, 2005). As vantagens dos imunoensaios incluem rapidez, portabilidade e grande frequência analítica. Atualmente estão disponíveis várias formas de imunoensaios, entre eles o imunoensaio de fluorescência polarizada e o radioimunoensaio. As principais desvantagens desta técnica são resultados falso-positivos seja pela reação cruzada dos anticorpos com uma droga da mesma classe estrutural ou devido a insuficientes limites de detecção.

Em imunoensaios para a análise de cocaína geralmente se aplicam anticorpos criados contra a benzoilecgonina, um dos dois principais metabólitos da cocaína no sangue humano (Jones, Holmgren e Kugelberg, 2008). Eles sinalizam a presença de cocaína fracamente, por exemplo, quando 300 ng/mL de benzoilecgonina são detectados, seria

possível detectar a cocaína em concentrações que variam de 10.000 a 80.000 ng/mL (Matthew *et al.*, 2009).

Tabela 5.1. Estimativa para a detecção de cocaína e/ou seus metabólitos em matrizes biológicas (Janicka, Kot-Wasik e Namieśnik, 2010).

Matriz	Tempo para a detecção	Descrição
Urina	+ de 3 dias	A análise de urina é o ensaio preferido em comparação com outros tipos de testes porque é o mais barato e não invasivo e pode ser feito em casa.
Saliva	+ de 10 h	Este procedimento é de curta duração, que pode detectar drogas que foram utilizadas recentemente.
San-gue	+ de 10 h	Este é um teste caro para a detecção de cocaína no corpo humano.
Cabelo	meses	Amostras de cabelo são as mais eficazes para o teor de cocaína no corpo humano quando se refere a um longo período de exposição. Qualquer substância que entra no corpo humano deposita um resíduo no fio do cabelo, que torna fácil detectar a sua presença.

Um consumo recente de cocaína pode escapar à análise imunológica, pois caso pouco tempo tenha decorrido entre o consumo e a análise, não haverá tempo suficiente para a biotransformação da cocaína em benzoilecgonina. Assim, como dito anteriormente, outras partes do corpo podem ser usadas para a análise de drogas, como o cabelo, suor, saliva e pele que são formas menos invasivas de amostragem que a obtenção de soro sanguíneo. Esses tipos de matrizes contêm cocaína e metilecgonina, mas apenas traços de benzoilecgonina, devido possivelmente à sua estrutura zwitteriônica que dificulta a sua excreção pelo suor ou pelos folículos pilosos (Kacinko *et al.*, 2005; Musshoff e Madea, 2007; Tsanaclis e Wicks, 2008).

Muitas técnicas analíticas para análise de cocaína e seus metabólitos tem sido reportadas na literatura. Entre elas podem ser citadas,

HPLC e GC. No entanto, a CE também tem sido aplicada com sucesso na determinação de drogas ilícitas.

Na maioria dos laboratórios a técnica analítica mais utilizada em sua análise é GC-MS. Uma análise por GC-MS do suor coletado de *patches* de celulose utilizados durante sete dias por pessoas observadas resultou em um limite de detecção de 2,5 ng por *patch* para a cocaína e seus produtos de degradação ecgonina-metil-éster, benzoilecgonina e anidroecgonina-metil-éster (Brunet *et al.*, 2008) e um limite de quantificação de 5 ng para cada composto por *patch* (Brunet *et al.*, 2010).

Diferentes propriedades estruturais da cocaína e seus metabólitos não tornam difícil a detecção só para as análises imunológicas; para GC-MS, os metabólitos polares necessitam frequentemente de derivatização para a quantificação exata. Silanização por BSTFA-TMCS como utilizado para a atropina e a escopolamina foi aplicada à cocaína, benzoilecgonina e ecgonina-metil-éster (Fernandez *et al.*, 2004). Vários passos de silanização ou derivatização utilizando vários reagentes de acordo com a natureza química dos metabólitos foram bem sucedidos para a detecção de metil ecgonidina e de mais de 13 metabólitos da cocaína no sangue e urina humanos (Paul *et al.*, 2005).

Entretanto, eles exigiram uma tediosa preparação de amostra. Uma grande variedade de metabólitos de cocaína foram derivatizados simultaneamente por uma mistura de anidrido pentafluoropropiônico (PFPA) e 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol (PFPOH). PFPA reage com grupos hidroxil alcoólico e (fenólico) e grupos amino secundários, para formar pentafluoropropionil (-COC₂F₅) ésteres e amidas, respectivamente, enquanto que PFPOH reage com grupos carboxil para produzir pentaf (-C₃H₂F₅) ésteres (Cardona *et al.*, 2006). A derivatização da benzoilecgonina por uma mistura de PFPA e PFPOH (2:1) permitiu um limite de detecção de 20 ng/mL (Jones, Holmgren e Kugelberg, 2008). Um estudo realizado nas estradas do Estado de São Paulo, em 2009, visou demonstrar a prevalência do uso de drogas por motoristas de caminhão. As amostras de urina foram testadas para anfetaminas, cocaína e canabinóides por imunoensaio e a confirmação foi realizada através de GC-MS. Dos 488 condutores analisados, 456 (93,4%) forneceram amostras de urina e 9,3% deles (n = 42) atestaram positivo para drogas. As anfetaminas foram as drogas mais encontradas (n=26), o que representa 61,9% das amostras positivas. Dez casos confirmaram a presença de cocaína (23,8%) e cinco de canabinóides (11,9%) (Leyton *et al.*, 2012).

O fato dos laudos que utilizam GC-MS como técnica confirmatória da presença de drogas servirem de provas criminais bem estabelecidas e aprovadas em diversos tribunais de justiça, parece ter atrasado a introdução do HPLC-MS para a análise de cocaína e seus metabólitos em amostras de drogas e em fluidos corporais humanos. Além disso, um equipamento de HPLC-MS é mais dispendioso em ambos, compra e manutenção, que um GC-MS; no entanto, em uma revisão de 2003 (Thieme e Sachs, 2003), a introdução do LC-MS para a triagem de drogas em toxicologia forense já foi altamente recomendada.

A técnica de HPLC tem sido amplamente aplicada para a análise confirmatória de drogas de abuso em laboratórios de ciência forense, pois oferece boa seletividade e limite de detecção sem necessidade de derivatização. Entretanto, a baixa absorção na região do UV dos metabólitos polares da cocaína limita a utilidade deste tipo de detector.

A cocaína, a benzoilecgonina e a ecgonina-metil-éster são compostos básicos, hidrofílicos, com valores de pKa maiores que 8. Consequentemente, tampão, sais ou agentes de emparelhamento de íons e fase móvel com solventes orgânicos são necessários para assegurar a retenção adequada em uma fase estacionária C18 típica. A fase móvel normalmente deve conter acetato de amônio ou ácido fórmico com água, acetonitrila e/ou metanol (Jeanville *et al.*, 2000; Hows *et al.*, 2004; Moore, Coulter e Crompton, 2007; Hill, Cairns e Schaffer, 2008; Hoelzle *et al.*, 2008; Shamsipur e Fattahi, 2011). Os métodos referenciados foram desenvolvidos em colunas de 150 mm, mas os analitos também podem ser separados utilizando colunas de 30 mm (Johansen e Bhatia, 2007).

Resultados satisfatórios foram obtidos com HPLC com detecção por UV na determinação simultânea de cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e outras drogas ilícitas em plasma. Após a extração em fase sólida, a separação foi realizada numa coluna RP8 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm tamanho da partícula) usando eluição por gradiente com acetonitrila-fosfato pH 6,53. A resposta do detector foi linear a concentrações na faixa de 0,1-10 µg/mL no plasma. A recuperação da extração média a partir do plasma foi de 60% para benzoilecgonina e 89% e 94% para cocaetileno e cocaína, respectivamente (Fernandez *et al.*, 2006).

HPLC com detector de fluorescência (HPLC-FL, do inglês “HPLC with fluorescence detection”) pode ser indicada para a análise de cocaína devido à fluorescência natural do alcaloide (comprimento de onda de excitação de 230 nm e comprimento de onda de emissão 315 nm) e atinge limites de detecção de 1 ng/mL (0,2 ng injetado) para a cocaína e

seus metabolitos. FL apresenta como vantagem, aliado ao baixo custo da instrumentação, um procedimento de preparo de amostra mais simples uma vez que esta técnica não necessita de uma etapa de derivatização (Tagliaro *et al.*, 2000; Mercolini *et al.*, 2008).

Hoje em dia, MS e MS/MS são frequentemente escolhidos para a detecção com HPLC, devido à sua versatilidade, sensibilidade, especificidade e simples preparo de amostras, mesmo quando matrizes complexas são analisadas. LC-MS é particularmente útil na análise de metabolitos de cocaína que não podem ser analisados por GC-MS, como a cocaína-N-óxido que se decompõe no injetor do GC (Lin *et al.*, 2003; Berghaus, Ramaekers e Drummer, 2007). O composto já foi medido diretamente em plasma de rato e em plasma humano por LC-ESI-MS/MS. Do mesmo modo, anidroecgonina-metil-éster de N-óxido, que é formado durante a queima do *crack*, foi analisada em sangue total, soro e amostras de urina de usuários de *crack* (Fandino *et al.*, 2002).

Atualmente, quando se utiliza a técnica de LC-MS, o monitoramento de íons selecionados (SIM, do inglês “selected-ion monitoring”) é o modo de escaneamento preferido para a detecção da cocaína em materiais biológicos, assim como, o modo de ionização por *electrospray* (ESI) e aquisição no modo positivo. Os íons monitorados frequentemente são: m/z 304, 212, 182. Esta técnica tem uma sensibilidade suficiente para determinar cocaína em mecônio (as primeiras fezes de uma criança recém-nascida, de cor geralmente preta, que contém compostos absorvidos do líquido amniótico, durante a fase intra-uterina) atingindo o limite de detecção de 5 ng/g (Pichini *et al.*, 2003; Madej, 2010).

A análise quantitativa de cocaína e metabolitos em sangue e urina com mínimo preparo de amostra foi realizada utilizando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês “multiple-reaction monitoring”) em que duas transições selecionadas para cada analito (um íon pai e dois íons filhos) foram controladas (Tabela 5.2) (Mortier *et al.*, 2002; Scheidweiler e Huestis, 2004; Badoud *et al.*, 2010; Chiuminatto *et al.*, 2010; Wang, Feng e Chen, 2010). LC-MS/MS utilizando MRM como forma de aquisição de dados resulta em excelente sensibilidade e não se faz necessária a completa separação dos analitos (Johansen e Bhatia, 2007).

Tabela 5.2. Íons monitorados na ionização por electrospray da cocaína e seus metabólitos utilizando o escaneamento do tipo MRM.

Composto	Transição 1 m/z	Transição 2 m/z
Cocaína	304.0 → 182.0	304.0 → 81.8
Benzoilecgonina	290.0 → 168.0	290.0 → 104.9
Ecgonina metil éster	200.0 → 182.2	200.0 → 81.9
Ecgonina	186.0 → 168.0	186.0 → 82.0
Norcocaína	318.0 → 196.0	318.0 → 81.8
Cocaetileno	290.0 → 168.0	290.0 → 135.9

A exatidão de massas fornecida pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador de massas do tipo tempo de voo (HPLC-TOF-MS, “HPLC with time-of-flight-MS”) aumenta a confiança na identificação porque limita o número de possíveis compostos candidatos – quanto melhor a precisão e a exatidão de massa, menor o número de compostos teoricamente possíveis para uma dada massa. No entanto, desvantagens como custo extremamente elevado do equipamento e falta de pessoal qualificado para a sua operação limitam a utilização desta técnica (Mortier *et al.*, 2002; Badoud *et al.*, 2010).

Cocaína e seus metabólitos já foram analisados no cabelo por LC-APCI-MS/MS (Scheidweiler e Huestis, 2004; Baumgartner *et al.*, 2012; Lendoiro *et al.*, 2012). Cocaína e seus produtos de degradação foram encontrados em fluidos *post-mortem* por LC-MS/MS (Duer, Spitz e Mcfarland, 2006; Drummer, 2007). Nos últimos anos, muitas metodologias analíticas para a cocaína e seus metabólitos foram publicadas por LC-MS e várias matrizes biológicas foram investigadas. A sensibilidade e a especificidade da LC-MS foram comprovadas pelas análises dos metabólitos de cocaína presentes em excreções humanas em águas superficiais e águas residuais, todos os métodos utilizam como sistema de detecção a espectrometria de massas em *tandem* após a separação por HPLC ou UPLC (Gheorghe *et al.*, 2008; Kasprzyk-Hordern, Dinsdale e Guwy, 2008; Bijlsma *et al.*, 2009).

A eletroforese capilar (CE) é uma ferramenta eficaz para a determinação de drogas ilícitas em matrizes complexas. A CE oferece uma boa resolução, tempos de análise curtos, alta seletividade em massa quando acoplada com o MS, determinação simultânea de drogas sem a necessidade de derivatização e baixo consumo de reagentes. Alterações

na composição do eletrólito de corrida resultam em seletividades diferentes. Nos últimos anos, eletroforese capilar de zona (CZE) ganhou popularidade como uma ferramenta analítica para toxicologia (Tagliaro *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011; Botello *et al.*, 2012).

Apesar do elevado potencial de separação da CE, a sensibilidade continua a ser um problema para a maioria das aplicações toxicológicas. Para minimizar esta desvantagem, técnicas de pré-concentração on-line da amostra como *Cation Selective Exhaustive Injecion* (CSEI) estão disponíveis e são exploradas em muitos métodos de análise.

Estudos utilizando CSEI-MEKC (*Cation Selective Exhaustive Injecion - Micellar Electrokinetic Chromatography*) foram realizados para a determinação de cocaína e seus metabólitos (benzoilecgonina, norcocaína e cocaetilenos) na urina. As condições otimizadas foram as seguintes: o eletrólito de corrida foi composto por 100 mmol L⁻¹ ácido fosfórico (pH 1,8), SDS 75 mmol L⁻¹ com 10% de 2-propanol e 10% tetrahidrofurano, foi utilizado o modo de injeção eletrocínético (15 kV durante 900 s). Os autores relataram um incremento de 1000 vezes no limite de detecção pela introdução da injeção eletrocínética no procedimento de pré-concentração on-line empregado (Su *et al.*, 2008).

Um método utilizando CZE-ESI/TOF-MS foi proposto para a determinação de drogas ilícitas no sangue. O método foi desenvolvido, validado e aplicado em amostras reais para a determinação de metilenedioxianfetamina, metanfetamina, metadona, cocaína, benzoilecgonina, codeína, morfina e 6-acetil morfina. As separações foram realizadas em um capilar de sílica fundida, usando formiato de amônio 25 mmol L⁻¹ (pH 9,5) como eletrólito de corrida. As drogas de abuso foram identificadas por determinação da massa exata e por correspondência dos padrões isotópicos. Os limites de detecção calculados foram na faixa de 2-10 ng mL⁻¹, enquanto que os limites de quantificação variaram de 10 a 30 ng mL⁻¹. Os coeficientes de variação percentual, testados a 40 e 800 ng mL⁻¹ em matriz biológica, foram inferiores a 3% para os tempos de migração e abaixo de 15% em relação às áreas dos picos. As amostras de sangue foram extraídas por meio de um procedimento de extração líquido-líquido e injetadas sob condições da técnica de pré-concentração on-line *Field-Amplified Sample Stacking*. Com pequenas melhorias, a mesma metodologia foi aplicada com sucesso também para a análise de drogas ilícitas em amostras de cabelo (Gottardo *et al.*, 2008). Também, usando CZE-ESI/TOF-MS a análise de opiáceos, anfetaminas, cocaína e metabólitos (no total de nove compostos), foi realizada em 20 min, com limite

de detecção menor do que o ponto de corte adotado em análises de cabelo (ou seja 0,1 ng/mg) (Gottardo *et al.*, 2007).

Alnajjar *et al.* desenvolveram um método para a análise de 19 drogas de abuso diferentes na urina, a saber, 6-monoacetilmorfina, anfetamina, cocaetileno, cocaína, codeína, efedrina, fentanil, heroína, metadona, metanfetaminas, metaqualona, morfina, noscapina, oxicodona, papaverina, tebaína, psilocina, difenidramina e feniramina. Os autores utilizaram como eletrólito de corrida 20 mM de beta ciclodextrina, 5% de acetonitrila e 20% de isopropanol em tampão fosfato 100 mM (pH 6,0), obtendo a separação de linha de base de todos os compostos. Infelizmente, a seletividade do sistema era limitada pelo uso de detecção no UV a 214 nm, comprimento de onda em que muitos compostos endógenos absorvem. No entanto, a fim de evitar interferências da matriz, a etapa pré-analítica foi bastante sofisticada, composta de um sistema automatizado de extração em fase sólida sequencial, utilizando como coletor um cartucho C₁₈ (5 cm comprimento e 4,6 mm diâmetro interno) que, em conjunto com a limpeza da amostra, forneceu um efeito de pré-concentração permitindo, com o uso de injeção eletrocínica, a obtenção de limites de detecção da ordem de 5-30 ng/mL (Alnajjar *et al.*, 2007).

Concluindo, a confirmação de resultados positivos nem sempre é possível devido ao elevado custo do equipamento e da falta de pessoal qualificado. No entanto, quando tal confirmação é necessária, a técnica mais comum é HPLC com diferentes modos de detecção, pois pode ser aplicada a amostras com vários analitos, devido ao seu poder de resolução. LC-TOF-MS e LC-ESI-MS/MS são excelentes técnicas cromatográficas de confirmação para cocaína e seus metabólitos. Em relação a GC-MS, HPLC reduz o preparo de amostra, eliminando o passo da derivatização. A sensibilidade é mais elevada em LC-TOF-MS e LC-ESI-MS/MS, mas exatidão de massa, só é possível com LC-TOF-MS, o que aumenta a confiança na identificação. A segunda técnica mais empregada é a GC, mas a necessidade de derivatização de compostos não-voláteis é um sério inconveniente, que pode ser evitado com SPME aplicada à etapa de preparação da amostra.

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste capítulo foi tentar demonstrar que a cocaína está presente nas mãos de qualquer pessoa, independente de ser

usuária da droga ou não, ou ainda de ser uma pessoa que manipule um grande volume de dinheiro diariamente. Para cumprir essa finalidade, o método para determinação de cocaína em cédulas monetárias utilizando a técnica de LC-MS/MS foi aplicado na análise de urina e da pele das mãos.

5.2.2 Objetivos específicos

- ❖ Analisar a pele das mãos de pessoas que manipulam um grande volume de notas de dinheiro diariamente e comparar os resultados com os de pessoas que manipulam com dinheiro eventualmente.
- ❖ Utilizar um procedimento de preparo de amostra simples, rápido e acessível.
- ❖ Analisar a urina de pessoas que manipulam um grande volume de notas de dinheiro diariamente à procura de metabólitos da cocaína.
- ❖ Tentar correlacionar a quantidade de cocaína encontrada nas mãos com a manipulação de notas de dinheiro.

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Instrumentação

O método desenvolvido por LC-MS/MS foi realizado em um sistema composto de um espectrômetro de massas triploquadrupolar API 3200™, Applied Biosystems/MDS Sciex, (Sciex, Concord, CA) equipado com cela de colisão LINAC®, fonte de ionização Turbo V™ operada no modo TurbolonSpray® (*electrospray*), gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). O espectrômetro de massas foi acoplado a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) equipado com bomba quaternária, sistema degaseificador, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 108 frascos de amostra de 2,0 mL e forno para coluna analítica. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software* Analyst versão 1.5.1.

O espectrômetro de massas foi calibrado nos modos de íons positivos e negativos com uma solução padrão de calibração de polipropilenoglicol (PPG), infundida sob fluxo de 10,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ com o capilar posicionado em relação ao contra-eletrodo nas posições 5 e 10 mm nas direções horizontal e vertical, respectivamente. Ar sintético foi utilizado

como gás nebulizante (GS1), gás secante (GS2) e gás de exaustão (Exhaust Gas) na fonte Turbo V™. Nitrogênio foi empregado como cortina de gás de dessolvatação (Curtain Gas™) e como gás de colisão (CAD Gas™) na célula LINAC®.

Os compostos foram caracterizados no triploquadrupolo nos modos MS (Q1 Scan) e MS/MS (*Product Ion Scan*). Os parâmetros potencial de orifício (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP) foram otimizados para operação do espectrômetro de massas no modo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês “Multiple Reaction Monitoring”) para a realização das análises quantitativas.

5.3.2 Reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados em soluções de trabalho, assim como, os padrões usados nas metodologias foram de grau analítico e de alto grau de pureza. Água desionizada (Milli-Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) foi utilizada no preparo de todas as soluções aquosas necessárias. Cocaína (1000 mg L⁻¹ em acetonitrila) foi adquirida de Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, EUA). Os solventes orgânicos utilizados foram metanol e acetonitrila (grau HPLC) adquiridos da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Ácido fórmico foi utilizado como aditivo da fase móvel e obtido da Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

5.3.3 Separação por LC-MS/MS

Os experimentos foram realizados usando a fonte *electrospray* no modo de ionização positivo e alguns parâmetros otimizados para a fonte de ionização e para a cela de colisão foram: tensão do capilar, 5500 V; temperatura da fonte, 450 °C; gás nebulizante, 40 psi; gás secante, 45 psi; gás de colisão (CAD Gas™), médio; cortina de gás de dessolvatação, 10 psi.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica da marca Phenomenex modelo Synergi Polar-RP com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2 mm e tamanho da partícula igual a 4 µm; equipada com uma pré – coluna da mesma marca modelo Polar-RP (4x2,0 mm).

Foi utilizado o modo isocrático de eluição e os experimentos foram realizados utilizando uma fase móvel constituída de 50% de solvente

A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%) e 50% de solvente B (metanol:H₂O (95:5 v/v)). A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. Em todas as corridas, o volume injetado foi de 10 μL e a temperatura da coluna foi ajustada em 30 °C.

5.3.4 Preparo das amostras

As amostras, que de agora em diante serão chamadas de extratos das mãos, foram preparadas pela imersão total de ambas as mãos (esquerda e direita) em recipientes plásticos contendo 400 mL de água desionizada por 5 minutos. Foi recomendado aos participantes do experimento que esfregassem bem os dedos entre si e na palma das mãos para garantir a melhor liberação possível de todas as substâncias que estivessem presentes. Foram recolhidas alíquotas de 1,0 mL destes extratos e injetados sem diluição diretamente no LC-MS/MS. As amostras de urina foram diluídas 1:1 com água desionizada e injetadas diretamente no LC-MS/MS.

5.3.5 Curvas de calibração

Paras as análises no LC-MS/MS, soluções com o padrão analítico de cocaína foi preparada diluindo-se mil vezes, em acetonitrila, a solução estoque com concentração de 1000 mg L^{-1} . As curvas de calibração foram obtidas após a preparação de uma solução de trabalho na concentração de 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e foram preparados sete padrões individuais, em água desionizada, nas concentrações cuja faixa de aplicação foi de 0,5 a 12 $\mu\text{g L}^{-1}$. A solução de trabalho, assim como, os pontos das curvas de calibração foram preparados sempre no mesmo dia em que seriam utilizados. As soluções estoque foram armazenadas sob refrigeração, à temperatura de -5 °C. A curva de calibração, assim como, as amostras foram injetadas em duplicata. A curva mostrou bons parâmetros de linearidade e os testes estatísticos aplicados para verificar a falta de ajuste e a regressão se mostraram satisfatórios (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Dados relativos à linearidade da curva analítica utilizada na quantificação de cocaína nas amostras. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.

Eq. da Reta	R ²	F ^a	F ^b
$y = 22675x - 3862$	0,9929	1172	0,003011

^a F_{crítico} para a regressão = 4,75; ^b F_{crítico} para a falta de ajuste = 3,97.

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Método analítico aplicado

Na análise das amostras de urina e dos extratos das mãos, foi aplicado o método desenvolvido e validado para a determinação de cocaína em cédulas monetárias utilizando LC-MS/MS já devidamente discutido no Capítulo 4, por isso, não serão repetidas as mesmas informações por ser redundante.

5.4.2 Seleção das amostras

Ao todo foram analisadas 98 mãos, totalizando 49 voluntários. Destes, 4 eram bancários e os demais 45 foram escolhidos aleatoriamente entre os alunos e funcionários do Departamento de Química da UFSC.

As pessoas foram orientadas a ficar o maior tempo possível sem lavar as mãos antes do experimento e como o grupo de amostragem é muito heterogêneo não se obteve um dado preciso desse tempo, pois variou muito de pessoa para pessoa.

Não foi questionado aos participantes do grupo da UFSC se eram usuários de cocaína ou não porque, para o estudo, o importante era verificar a presença ou não da droga nas mãos independente do motivo, mas foi dado enfoque principal ao fato de a pessoa ter manipulado cédulas monetárias antes do experimento. Entretanto, ao grupo do banco foi levantada a questão e os participantes garantiram não ser consumidores de cocaína. Portanto, os resultados provenientes deste grupo podem ser relacionados à manipulação do dinheiro ao longo do dia de trabalho, pois a amostragem com esses participantes foi realizada após o fechamento da agência bancária.

5.4.3 Extração da cocaína das mãos

Um dos objetivos deste trabalho foi utilizar um procedimento de preparo de amostra simples, rápido e acessível.

Testou-se a extração da cocaína das mãos com cotonetes e os mesmos motivos que levaram a não aplicá-los nas notas foram os responsáveis por não aplicá-los nas mãos, ou seja, não é um procedimento inédito e também é necessário mais que um cotonete por amostra o que tornaria a análise inviável pelo custo e tempo despendidos no seu preparo. Embora, existam vários trabalhos reportados na literatura utilizando cotonetes do tipo *swab* para a retirada da cocaína da pele, na prática, esses métodos são aplicados na triagem de usuários de drogas

que se encontram filiados a algum programa de reabilitação.

No Capítulo anterior foi demonstrado que 400 mL de água são suficientes para extrair a cocaína das notas de dinheiro sem prejuízo da eficiência da extração ou risco de hidrólise do analito. Com isso em mente, optou-se por aplicar o mesmo procedimento para extrair a cocaína das mãos. No entanto, também foram testados os volumes de 200 e 300 mL de água, porém essas quantidades não se mostraram suficientes para recobrir as mãos por inteiro.

5.4.4 Análise dos extratos das mãos

Dos 98 extratos, foi encontrada cocaína em 27 amostras acima do limite de quantificação ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Em 21 amostras foi detectada cocaína abaixo do LQ e em 50 amostras o resultado foi negativo para cocaína. Lembrando que o limite de detecção do método é $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$.

Alguns fatores podem ter contribuído para esse resultado:

i) talvez o volume de água tenha sido demasiado para o grupo de amostras que ficou abaixo do LQ, se para essas amostras se tivesse utilizado um volume menor certamente a concentração seria quantificável dentro da faixa de aplicação utilizada ($0,5$ a $12 \mu\text{g L}^{-1}$);

ii) acredita-se que o grupo amostral que não apresentou cocaína nas mãos não tenha tido contato com algum tipo de fonte de contaminação (dinheiro ou a própria droga) ou tenha lavado as mãos no dia do experimento, pois não se pode atribuir ao procedimento de extração o fato da não detecção do analito, uma vez que, foi detectada cocaína em 49% das amostras;

iii) talvez a quantidade de analito neste conjunto de amostras fosse tão baixo que ficou adsorvido na própria gordura inerente à oleosidade natural da pele.

Entre as 27 amostras que apresentaram cocaína acima do LQ, 20 corresponderam ao par de mãos (direita e esquerda) que pertenciam a mesma pessoa e nas 7 restantes a droga foi encontrada somente na mão esquerda ou direita. As Tabelas 5.4 e 5.5 apresentam os resultados da análise dos extratos das mãos esquerda e direita, respectivamente.

Os extratos das mãos dos 4 bancários resultaram positivos para a cocaína, mas o analito não foi encontrado em maiores quantidades que pessoas que manipulam notas de dinheiro eventualmente, como era esperado. As amostras correspondentes a esse grupo amostral são designadas pela letra B nas Tabelas 5.4 e 5.5 e um dos bancários apresentou cocaína apenas na mão esquerda.

Os extratos da mão 9 apresentaram um valor muito alto de cocaína 109,62 e 148,39 μg por mão para a esquerda e para a direita, respectivamente. Espera-se, na melhor das hipóteses, poder-se atribuir este resultado ao fato do voluntário ter esfregado uma nota de dinheiro bastante contaminada nas mãos antes de participar do experimento.

Tabela 5.4. Quantificação de cocaína nos extratos da mão esquerda. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.

Mão	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)		$\mu\text{g}/\text{mão}$	
4	0,84 \pm	0,006	0,34 \pm	0,003
6	0,66 \pm	0,003	0,26 \pm	0,001
8	4,94 \pm	0,054	1,98 \pm	0,022
9	274,04 \pm	5,234	109,62 \pm	2,094
10	0,66 \pm	0,019	0,26 \pm	0,007
12	0,59 \pm	0,001	0,24 \pm	0,001
21	0,73 \pm	0,010	0,29 \pm	0,004
13	0,73 \pm	0,177	0,29 \pm	0,071
14	4,51 \pm	1,433	1,80 \pm	0,573
17	1,38 \pm	0,326	0,55 \pm	0,130
B1	0,67 \pm	0,119	0,27 \pm	0,048
B2	1,56 \pm	0,093	0,62 \pm	0,037
B3	3,73 \pm	0,383	1,49 \pm	0,153
B4	5,06 \pm	0,351	2,02 \pm	0,140

Tabela 5.5. Quantificação de cocaína nos extratos da mão direita. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.

Mão	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$\mu\text{g}/\text{mão}$
4	0,81 \pm 0,051	0,32 \pm 0,020
6	0,81 \pm 0,017	0,32 \pm 0,007
8	14,48 \pm 0,405	5,79 \pm 0,162
9	148,39 \pm 2,879	59,35 \pm 1,152
10	0,58 \pm 0,017	0,23 \pm 0,007
14	4,56 \pm 1,547	1,82 \pm 0,619
16	0,65 \pm 0,193	0,26 \pm 0,077
17	1,38 \pm 0,272	0,55 \pm 0,109
B2	1,44 \pm 0,048	0,57 \pm 0,019
B3	3,58 \pm 0,030	1,43 \pm 0,012
B4	3,72 \pm 0,230	1,49 \pm 0,092
26	5,17 \pm 0,079	2,07 \pm 0,032
27	0,83 \pm 0,048	0,33 \pm 0,019

5.4.5 Análise das amostras de urina dos bancários

Uma vez que a quantidade de cocaína encontrada nos extratos das mãos dos bancários foi muito semelhante à encontrada nas amostras da população em geral e numa concentração baixa, não mais que $3,72 \mu\text{g L}^{-1}$, era natural não se encontrar cocaína ou um de seus metabólitos nestas amostras de urina. Neste estudo, se procurou por benzoilecgonina e éster-metil-ecgonina e nenhum dos dois foi detectado.

Uma conclusão semelhante foi apresentada por M. A. Elsohly, em um experimento realizado em 1991, com duas notas de 1 dolar que foram imersas em cocaína em pó cujo excesso foi retirado. Essas notas foram dadas para uma pessoa que foi instruída a manuseá-las muitas vezes ao longo do dia, não lhe foi permitido lavar as mãos, mas por outro lado deveria realizar suas funções normais. Foram coletadas amostras de urina e testadas por imunoensaios e a concentração de benzoilecgonina foi

determinada semiquantitativamente. Após 8h e 30 min do início do manuseio do dinheiro o resultado foi negativo para a benzoilecgonina. Enquanto que resultados positivos foram obtidos com as amostras entre 12,5 e 21 horas após o início do manuseio. Tomando como concentração de corte o valor de $300 \mu\text{g L}^{-1}$, o indivíduo não sofreria nenhuma restrição, pois o valor máximo de benzoilecgonina encontrado na sua urina foi $72 \mu\text{g L}^{-1}$ (Elsohly, 1991).

5.4.6 Estudo do efeito da matriz urina no método

Para avaliar o efeito de matriz da urina no método, foi realizado um experimento de superposição de matriz. Este procedimento consiste em adições do padrão em várias concentrações a uma matriz semelhante a que se deseja analisar, que não contenha o analito de interesse. Este teste serve para verificar se a matriz pode interferir na extração, separação ou detecção do analito a ser determinado.

O experimento foi realizado através da construção de uma curva analítica em água com o padrão de cocaína com o dobro da concentração desejada e os pontos da curva foram diluídos 1:1 com a urina de um voluntário que comprovadamente não é usuário da droga. A curva resultante foi composta de sete pontos cuja concentração final, após a diluição com a matriz urina, foi 0,5; 2; 4; 6; 8; 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A Tabela 5.6 apresenta os dados da curva de superposição de matriz e também da curva de calibração externa, feita em água, usada para a comparação. Como pode ser observado, as duas curvas apresentaram bons parâmetros de linearidade e não apresentaram falte de ajuste e a regressão para ambas se mostrou significativa. No entanto, o teste t-pareado aplicado na comparação da média das áreas obtidas com as duas curvas mostrou que existe uma diferença significativa entre a curva em água e a curva em urina, pois o parâmetro p bi-caudal foi menor que 0,05 (0,01) e o $t_{\text{calculado}}$ (3,83) foi maior que o $t_{\text{crítico}}$ (2,57), considerando um intervalo de confiança de 95%. Sendo assim, conclui-se que existe um efeito interferente da urina na quantificação de cocaína pelo método proposto.

Tabela 5.6. Dados relativos à linearidade das curvas analíticas utilizadas na avaliação do efeito da matriz urina. Condições experimentais: ver Seção 5.2.3.

Curva	Eq. da Reta	R ²	F ^a	F ^b
Externa	$y = 22902x - 6068$	0,9956	1278	0,002115
Super	$y = 26851x - 2664$	0,9995	1907	0,000235

^a F_{crítico} para a regressão = 4,96; ^b F_{crítico} para a falta de ajuste = 4,53.

5.5 Conclusão

Na análise das amostras de urina e dos extratos das mãos, foi aplicado o método desenvolvido e validado para a determinação de cocaína em cédulas monetárias utilizando LC-MS/MS.

Um dos objetivos deste trabalho foi utilizar um procedimento de preparo de amostra simples, rápido e acessível e, assim, foi aplicado o mesmo procedimento para extrair a cocaína das notas de dinheiro na extração da cocaína das mãos.

Dos 98 extratos, foi encontrada cocaína em 27 amostras acima do limite de quantificação ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Em 21 amostras foi detectada cocaína abaixo do LQ e em 50 amostras o resultado foi negativo para cocaína. Acredita-se que o grupo amostral que não apresentou cocaína nas mãos não tenha tido contato com algum tipo de fonte de contaminação (dinheiro ou a própria droga) ou tenha lavado as mãos no dia do experimento, pois não se pode atribuir ao procedimento de extração o fato da não detecção do analito, uma vez que, foi detectada cocaína em 49% das amostras.

Os extratos das mãos dos 4 bancários resultaram positivo para a cocaína, no entanto a quantidade de cocaína encontrada nos extratos das mãos dos bancários foi muito semelhante à encontrada nas amostras da população em geral e em baixa concentração, logo não se encontrou cocaína ou um de seus metabólitos nas amostras de urina desses participantes.

Foi avaliado o efeito da matriz urina no método através do experimento de superposição de matriz e os resultados apontaram que existe um efeito interferente da urina na quantificação de cocaína pelo

método proposto.

Finalmente, o objetivo principal deste capítulo foi atingido, pois foi possível demonstrar que a cocaína pode estar presente nas mãos de qualquer pessoa, independente de ser usuária da droga ou não, ou ainda de ser uma pessoa que manipule um grande volume de dinheiro diariamente. Por outro lado, esse manuseio não oferece riscos à saúde da população em geral, pois a quantidade de cocaína passada das notas de dinheiro para as mãos é tão pequena, que mesmo que eventualmente seja metabolizada, não trará prejuízos à saúde.

6 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO DE COCAÍNA PELA PELE DA ORELHA DE SUÍNOS

6.1 Justificativa

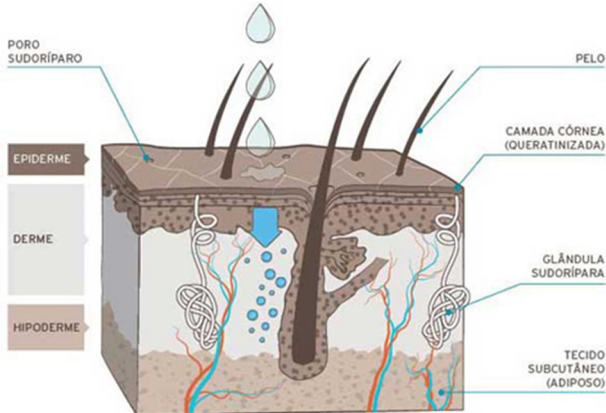
O fato que motivou este estudo foi avaliar se a cocaína extraída de uma cédula monetária permeia pela pele e, se isso ocorre, oferece algum risco a pessoas que manuseiam um grande volume de dinheiro diariamente. Para este estudo foi utilizada a câmara de Franz na avaliação da permeação da cocaína pela pele de orelha suína, simulando o organismo humano.

6.2 Introdução

6.2.1 Avaliação da permeação/retenção cutânea

A pele é constituída de três camadas, do exterior para o interior, epiderme, derme e hipoderme (Figura 6.1).

Figura 6.1. Respresentação esquemática das camadas da pele. Adaptado de ERENO, 2011.



A epiderme é recoberta pela camada córnea, possui espessura média de 0,1 a 0,2 mm, representa a principal barreira à penetração de substâncias. A epiderme é dividida em epiderme morta ou estrato córneo e epiderme viva, sendo esta última subdividida em quatro camadas. O estrato córneo é formado por células achatadas e possui uma estrutura pluri-estratificada hidrofílica-lipofílica de modo que apenas as substâncias que possuem essas propriedades podem atravessá-lo, utilizando a via intercelular (Monteiro-Riviere, 2006).

A derme, segunda camada, possui espessura média de 2 a 4mm e é constituída de uma matriz de proteínas fibrosas, banhada num tecido coloidal amorfo. Executa um papel de sustentação e nutrição e divide-se em duas partes: derme papilar ou tecido conjuntivo frouxo e derme reticular ou tecido conjuntivo denso, constituído por fibras de colágeno e elastina (Monteiro-Riviere, 2006).

A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo contendo células adipócitas que fabricam e estocam lipídeos, sendo responsável pelo isolamento térmico e proteção mecânica contra os choques externos a que se submete o corpo (Monteiro-Riviere, 2006).

Embora a pele represente uma barreira à penetração de substâncias, existem várias formas farmacêuticas de uso tópico que sofrem absorção, inclusive algumas de uso sistêmico. A permeação das camadas que formam a pele ocorre por difusão através de duas vias: a via transepidérmica, que compreende a penetração transcelular (através das células) e a penetração intercelular (entre as células); e a via transanexal (através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e dispositivo pilosebáceo). Se a pele estiver intacta, a principal via de administração são as camadas epidérmicas e não os folículos pilosos, pois sua área superficial é bastante pequena em comparação com a da pele que não contém nenhum desses elementos anatômicos (Moser *et al.*, 2001).

A absorção percutânea corresponde à penetração direta da substância através do estrato córneo, passando os tecidos epidérmicos mais profundos e atingindo a derme que é vascularizada e onde a substância torna-se disponível para a absorção (Moser *et al.*, 2001).

Então a pele constitui uma barreira muito eficaz, mas pode ser atravessada por pequenas quantidades de substâncias lipofílicas capazes de penetrar nas camadas córneas e podendo até chegar a uma absorção sistêmica. Nesse processo, o estrato córneo constitui a principal barreira,

enquanto, a epiderme e a derme se comportam como um gel aquoso e não apresentam função significante de barreira, sendo marcantes seus efeitos reservatórios. É importante conhecer exatamente o grau de penetração, pois para determinados compostos, uma penetração profunda pode provocar intoxicações (Moser *et al.*, 2001).

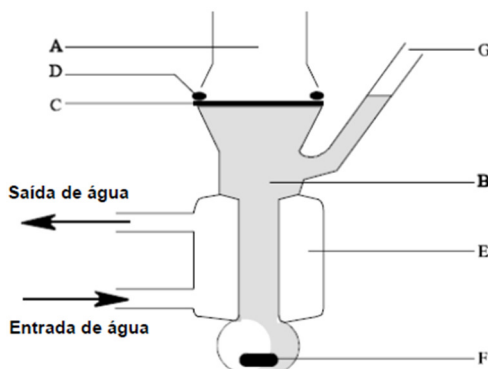
Embora a estrutura básica da pele humana seja similar a de muitos mamíferos, existem várias diferenças, tanto relativas à espessura da epiderme e da derme, quanto aos apêndices. Dentre os modelos animais, a pele de suínos tem sido amplamente utilizada em função da sua similaridade estrutural e funcional com a pele humana, aliada à praticidade de obtenção deste material em abatedouros. Características comuns entre a pele humana e a suína incluem a distribuição esparsa dos pêlos, pigmentação e vascularização, bem como composição lipídica e propriedades biofísicas do estrato córneo (Schmook, Meingassner e Billich, 2001; Hasanovic *et al.*, 2011).

6.2.2 Câmara de Franz

O uso de câmaras de difusão como a célula ou câmara de Franz, equipada com membrana sintética para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas ou transdérmicas, é preconizada pela comunidade farmacêutica em geral. A célula de difusão de Franz tornou-se um método popular de estudo da difusão e permeação de substâncias através da pele. Depois de algum tempo foi também utilizada para determinação da liberação *in vitro* de semi-sólidos (Shah *et al.*, 1989; Shah *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 1992).

A célula de Franz segue o modelo bicompartimental das células de difusão, possuindo dois compartimentos, um contendo o fármaco (compartimento doador) e outro contendo uma solução onde o fármaco é solúvel, separados por uma membrana natural ou sintética (Figura 6.2). No modelo de Franz, a disposição é vertical, mas existem sistemas onde os dois compartimentos estão dispostos lado a lado (Friend, 1992). A amostra é colocada na parte acima da membrana, no compartimento doador. A passagem do fármaco pela membrana para o compartimento receptor é monitorada pela análise de amostras do líquido receptor coletadas em diferentes tempos.

Figura 6.2. Representação esquemática da célula de difusão de Franz (Caon, 2009). A: compartimento doador. B: compartimento receptor. C: tecido. D: suporte esmerilhado. E: compartimento para circulação da água com controle da temperatura (37°C). F: barra magnética. G: cânula de amostragem.



O teste de permeação *in vitro* é realizado em células de difusão de Franz, sendo que a membrana sintética é substituída por um segmento de pele. A taxa de permeação do fármaco é determinada pela quantidade permeada em função do tempo. O fluxo de permeação é calculado como a inclinação na porção linear da curva, sendo expresso em quantidade de fármaco por área em função do tempo (Kou *et al.*, 1993; Moser *et al.*, 2001).

Devem ser feitas algumas observações antes da realização do experimento:

- a solução receptora deve ser escolhida baseada na solubilidade do fármaco, de forma que a condição *sink* seja sempre obedecida, ou seja, não deve ocorrer aumento apreciável da concentração da droga de modo que ocasione redução no seu fluxo de difusão do compartimento doador ao receptor;
- para fármacos hidrofílicos, é comum o uso de soluções salinas; enquanto para substâncias lipofílicas, o uso de aditivos que aumentem a solubilidade pode ser necessário (Skelly *et al.*, 1987).

Outra consideração a ser feita é sobre o uso de pele inteira (epiderme e derme) ou somente epiderme. Estudos mostram que a permeação de substâncias lipofílicas ($\log P > 3$) é significativamente diminuída *in vitro* quando usada membrana contendo a derme (Moser *et al.*, 2001).

6.3 Metodologia

No momento em que foi realizado este experimento, ainda não se sabia que a quantidade de cocaína variava tanto de nota para nota e que essa quantidade não era tão representativa, embora tenha se detectado a quantidade de até quase 23 mg de cocaína em uma nota. Também, ainda não se havia determinado o melhor modo de extração da cocaína das notas nem se havia validado o método utilizando LC-MS/MS aplicado na análise das notas, dos extratos das mãos e na urina. Assim sendo, as condições experimentais foram um pouco diferentes das aplicadas nos capítulos anteriores deste trabalho.

O estudo de permeação na pele foi realizado em uma Câmara de Franz no Laboratório de Virologia Aplicada coordenado pela Prof^a. Dra. Cláudia Maria de Oliveira Simões. O experimento foi realizado pelo doutorando Thiago Caon.

6.3.1 Avaliação ex vivo da permeabilidade de cocaína através da pele de orelha suína

6.3.1.1 Obtenção da pele de orelha

As peles foram obtidas em um matadouro local, situado na cidade de Antônio Carlos (SC), tendo sido armazenadas a 4°C, em tampão Krebs¹, até o seu processamento, que ocorreu, no máximo, em até 6 horas após a morte dos animais. Inicialmente, as orelhas foram lavadas com água destilada, os pêlos foram cortados e selecionaram-se as partes livres de lesões ou manchas.

¹ Solução tampão de Krebs: NaCl 20 mmol L⁻¹; KCl 4,7 mmol L⁻¹; KH₂PO₄ 1,2 mmol L⁻¹; NaHCO₃ 25 mmol L⁻¹; CaCl₂ 2,5 mmol L⁻¹; MgCl₂ 1 mmol L⁻¹; glicose 5,5 mmol L⁻¹; pH 7,4.

Em seguida, procedeu-se à dissecação extraíndo conjuntamente derme e epiderme e descartando a hipoderme (tecido subcutâneo gorduroso subjacente à derme). Após a fragmentação, as amostras dissecadas de pele foram acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -80°C , imersas em tampão de Krebs, até o momento da utilização. O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente (25°C), com adição do tampão de Krebs.

6.3.1.2 Experimentos de permeação cutânea

Para a realização dos experimentos, as câmaras de difusão de Franz (fabricadas pela empresa DIST) foram colocadas em um banho termostaticado, com agitação multiponto (DIST), para estabilização da temperatura (37°C). Uma solução salina denominada PBS (do inglês “phosphate buffered saline”) contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio e fosfato de potássio foi utilizada no compartimento inferior, como solução receptora. Os volumes totais do compartimento doador e receptor foram 2 e 10 mL, respectivamente.

O tecido foi colocado na câmara de Franz evitando-se a formação de bolhas de ar, com a epiderme voltada para o compartimento doador e a derme para o compartimento receptor. Após a disposição do tecido na câmara de Franz, o sistema de agitação foi acionado e 2 mL da solução doadora foi depositado sobre a superfície da epiderme.

Este experimento foi realizado utilizando como soluções doadoras o padrão de cocaína na concentração $400\ \mu\text{g L}^{-1}$ e o extrato de uma nota de dinheiro previamente quantificado ($400\ \mu\text{g L}^{-1}$), sendo que este extrato foi obtido pela imersão da nota em 100 mL de água desionizada sob agitação magnética constante por 10 minutos.

O sistema foi coberto com papel alumínio para evitar a evaporação. Foram coletadas alíquotas de $400\ \mu\text{L}$ da solução receptora pela cânula de amostragem (com reposição da solução) e imediatamente armazenadas a -20°C , até o momento da quantificação por LC-MS/MS. As amostras foram coletadas a cada 1 h (durante 6 h = tempo total do experimento).

6.3.1.3 Avaliação da retenção cutânea pela cocaína

Esta análise foi realizada após o término dos estudos da permeação cutânea.

Anteriormente à retirada da pele, as soluções doadoras contendo a cocaína foram homogeneizadas e transferiu-se 200 μL destas soluções para tubos tipo Eppendorf®, para análise posterior da quantidade retida.

Na sequência, as amostras de pele foram retiradas do equipamento e lavadas com solução tampão PBS : etanol para remover o excesso da superfície da epiderme. Em seguida, separou-se a epiderme e apenas a região central, equivalente à área de permeação, foi delimitada e picoteada. Os fragmentos de derme e epiderme gerados foram pesados em tubos de 15 mL e, após a pesagem, adicionou-se 5 mL de metanol (líquido extrator) em cada tubo. Os tubos foram submetidos à agitação (Vortex®) e sonicados (Branson®), durante 10 minutos (cada um dos processos) para o rompimento das células e aumento da eficiência de extração. As amostras foram filtradas em filtros de membrana 0,45 μm (Millipore®) para a remoção de restos celulares e outros interferentes e permaneceram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da quantificação.

6.3.2 Instrumentação e condições operacionais do LC-MS/MS

As análises utilizando a técnica de LC-MS/MS foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL). Foi utilizada uma coluna cromatográfica da marca Phenomenex modelo Synergi Polar-RP com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2 mm e tamanho da partícula igual a 4 μm ; equipada com uma pré – coluna da mesma marca modelo Polar-RP (4x2,0 mm). Foi utilizado o modo isocrático de eluição e os experimentos foram realizados utilizando uma fase móvel constituída de 50% de solvente A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%) e 50% de solvente B (metanol:H₂O (95:5 v/v)). A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 350 $\mu\text{L min}^{-1}$. Em todas as corridas, o volume injetado foi de 10 μL e a temperatura da coluna foi ajustada em 40 $^{\circ}\text{C}$.

O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas triploquadrupolar API 3200™, Applied Biosystems/MDS Sciex, (Sciex, Concord, CA) equipado com cela de colisão LINAC® e fonte de

ionização Turbo V™ operada no modo TurboIonSpray®. Os experimentos foram realizados usando a fonte *electrospray* no modo de ionização positivo e alguns parâmetros otimizados para a fonte de ionização e para a cela de colisão foram: tensão do capilar, 5500 V; temperatura da fonte, 450 °C; gás nebulizante, 40 psi; gás secante, 45 psi; gás de colisão (CAD Gas™), médio; cortina de gás de dessolvatação, 10 psi. Foi aplicado o modo de escaneamento de massas Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês “Multiple Reaction Monitoring”) para a realização das análises quantitativas. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software* Analyst versão 1.5.1.

6.3.3 Análise das amostras por LC-MS/MS

Paras as análises no LC-MS/MS, soluções com o padrão analítico de cocaína foram preparadas diluindo-se mil vezes, em acetonitrila, a solução estoque com concentração de 1000 mg L⁻¹. A curva de calibração foi obtida após a preparação de uma solução de trabalho na concentração de 100 µg L⁻¹ e foram preparados seis padrões individuais, em água desionizada, nas concentrações cuja faixa de aplicação foi de 1,0 a 50 µg L⁻¹. A solução de trabalho, assim como, os pontos das curvas de calibração foram preparados no mesmo dia em que foram utilizados. As soluções estoque foram armazenadas sob refrigeração, à temperatura de -5 °C. A curva analítica, assim como, as amostras foram injetadas em duplicata, sendo que tanto as amostras referentes ao estudo da permeação quanto as referentes ao estudo da retenção não foram diluídas para a injeção no LC-MS/MS. A curva utilizada na quantificação das amostras resultantes do experimento de permeação cutânea mostrou bons parâmetros de linearidade ($R^2 = 0,9942$) e os testes estatísticos aplicados para verificar a falta de ajuste e a regressão se mostraram satisfatórios.

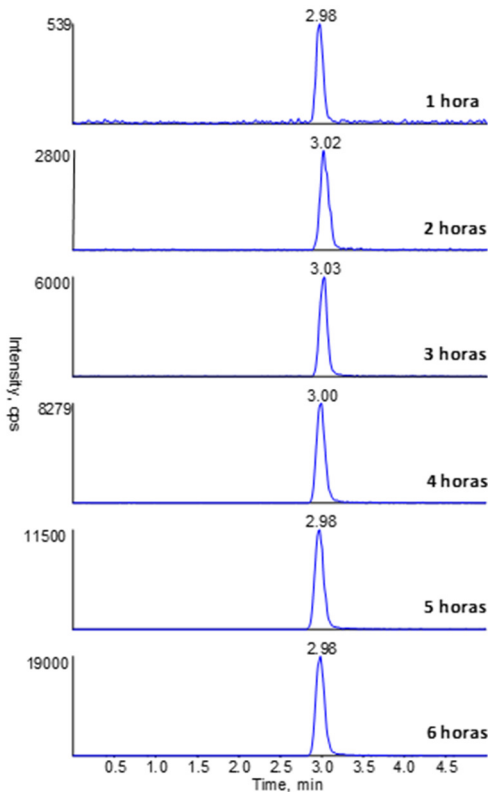
6.4 Resultados e discussão

6.4.1 Experimentos de permeação cutânea

Após a realização dos experimentos *ex vivo*, procedeu-se à quantificação da cocaína nas amostras resultantes por LC-MS/MS. Na Figura 6.3 são apresentados, a fim de ilustração, os cromatogramas referentes às análises das alíquotas coletadas quando a solução doadora foi a solução

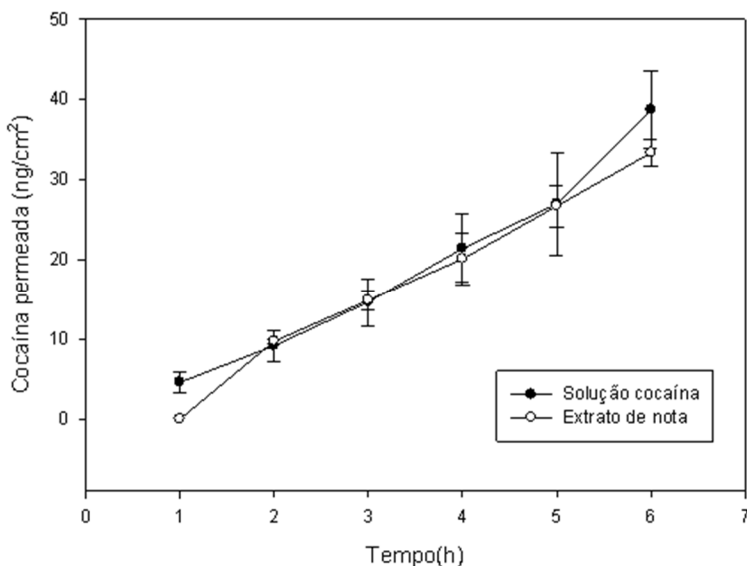
padrão de cocaína $400 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que os resultados quando a solução doadora foi o extrato da nota foram muito semelhantes. Pelos cromatogramas pode ser observado que ao longo do tempo do experimento (6 horas) a concentração de cocaína foi aumentando nas alíquotas de solução receptora. A identificação da cocaína foi feita pelas fragmentações geradas pelo modo MRM, já descrito no Capítulo 4, e também, pelo tempo de retenção do padrão nas condições utilizadas.

Figura 6.3. Cromatogramas das quantidades de cocaína permeada pela pele de orelha de suíno. Os mesmos foram ordenados em ordem crescente relação aos tempos de permeação. Condições experimentais: ver Seção 6.3.3.



Após a obtenção dos cromatogramas e tratamento dos dados, foram calculados os parâmetros de permeabilidade para as duas soluções doadoras testadas, a partir da plotagem da quantidade permeada *versus* tempo (Figura 6.4). A análise final da permeação cutânea da cocaína incluiu os cálculos dos tempos de latência (T_L), dos fluxos constantes (J) e dos coeficientes de permeabilidade (P), através de equações, fundamentadas nas Leis de Fick. As massas das amostras acumuladas no compartimento receptor, em cada intervalo de tempo, foram calculadas considerando-se o volume total da câmara, as concentrações de cocaína nas alíquotas retiradas, bem como a área efetiva de permeação.

Figura 6.4. Perfil de permeação da cocaína em solução através da pele de orelha de porco (concentração de cocaína nas duas soluções 400 $\mu\text{g L}^{-1}$). Cada ponto representa a média \pm desvio padrão ($n = 4$).



Os resultados obtidos para os parâmetros de permeabilidade são descritos na Tabela 6.1. Cada parâmetro proveniente de ambas as soluções doadoras testadas foi comparado entre si pelo teste t-não pareado e diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para os parâmetros de fluxo constante (J) e coeficiente de permeabilidade (P), as duas soluções apresentaram valores muito semelhantes entre si, sendo que J mede a velocidade de permeação da substância de interesse pela pele e P mede o número de moléculas que atravessam a membrana por área na unidade de tempo. Entretanto, o tempo de latência (T_L), que é definido como o tempo necessário para que a passagem de uma substância (através de uma membrana) atinja o equilíbrio, foi diferente para as duas soluções: o T_L para o extrato da nota foi maior do que para a solução do padrão, ou seja, demora mais para a cocaína atingir um estado de equilíbrio estacionário, isto poderia ser atribuído a uma maior retenção da cocaína na derme, influenciado, talvez por outros compostos extraídos da nota que poderiam interferir, retardando a taxa de transferência da cocaína.

Tabela 6.1. Resultados obtidos durante a avaliação da permeabilidade da cocaína através da pele da orelha de porco, após quantificação por LC-MS/MS. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão ($n = 4$).

Parâmetro	Sol. padrão de cocaína	Extrato de nota de di-nheiro
J (ng/cm ² h) ⁱ	6,60 \pm 0,44	6,38 \pm 0,447
T_L (h) ⁱⁱ	0,56 \pm 0,49	0,76 \pm 0,05**
P (cm/h) ⁱⁱⁱ	0,0165 \pm 0,0001	0,0159 \pm 0,0011

ⁱ $p=0,9770$; ⁱⁱ $p=0,0031$; ⁱⁱⁱ $p=0,9770$.

6.4.2 Avaliação da retenção cutânea da cocaína

Ao final da realização dos experimentos de permeação, analisaram-se as quantidades finais retidas na epiderme e na derme.

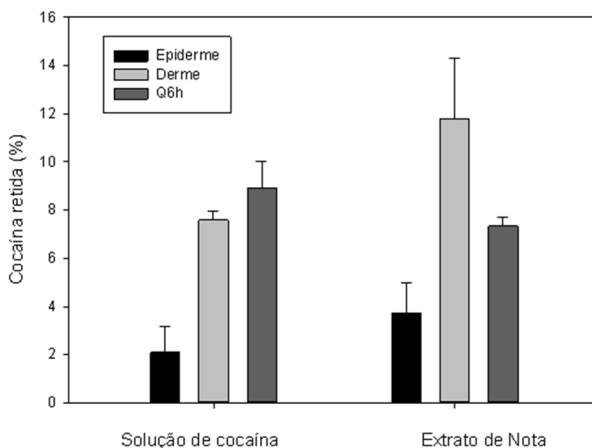
Os resultados da retenção cutânea da cocaína na pele da orelha de porco são apresentados na Figura 6.5, expressos como porcentagem

de cocaína retida na derme, epiderme e quantidade permeada após 6 horas de experimento. Foram comparadas ambas as soluções doadoras testadas e, após a aplicação do teste t-não pareado, diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Como pode ser observado, a cocaína proveniente de ambas as soluções ficaram retida nas duas camadas da pele. Comparando-se os valores de p , pode-se dizer que não houve diferença significativa entre a quantidade permeada na epiderme por ambas as soluções ($p = 0,8264$). Também não houve diferença entre as soluções em relação à quantidade permeada após 6 horas de experimento ($p = 0,1023$).

Como a cocaína é hidrofílica, era esperada uma maior retenção na derme (esta camada é mais hidrofílica), o que foi comprovado. Entretanto, houve uma diferença significativa entre a quantidade de cocaína retida na derme entre a solução padrão de cocaína e o extrato da nota ($p = 0.0108$), este fato também poderia ser atribuído a influência de outros compostos extraídos da nota.

Figura 6.5. Quantidade (%) de cocaína retida na epiderme, derme e após 6 horas de experimento. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão ($n = 4$).



6.5 Conclusão

Enfim, o objetivo principal deste estudo foi atingido, uma vez que foi possível demonstrar que a cocaína extraída de uma cédula monetária permeia pela pele. Entretanto, este fato não oferece riscos a pessoas que manuseiam um grande volume de dinheiro diariamente, pois a quantidade de cocaína passada das notas de dinheiro para as mãos é tão pequena, que mesmo que seja permeada, não trará prejuízos à pessoa.

Foi possível calcular os parâmetros de permeabilidade: fluxo constante, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade para as duas soluções de cocaína testadas e a única diferença entre elas foi em relação ao tempo de latência, que foi maior para o extrato da nota, fato atribuído à maior retenção do analito na derme, comprovado depois pela análise de retenção cutânea.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese de doutorado surgiu do conhecimento de que praticamente todas as notas em circulação no Brasil e no mundo estão contaminadas com cocaína. E este fato levantou vários questionamentos: será que a cocaína sai das notas e vem para as mãos? Será que uma pessoa que manipula um grande volume de cédulas monetárias diariamente fica com uma quantidade de cocaína maior do que uma pessoa que manipula cédulas monetárias eventualmente? Será que a cocaína extraída de uma nota permeia pela pele oferecendo algum risco à saúde das pessoas?

Para responder essas perguntas foram desenvolvidos dois métodos analíticos com duas técnicas de separação que se baseiam em mecanismos e fenômenos diferentes: eletroforese capilar com detecção UV (CE-UV) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MSMS).

Com o método por CE-UV foi possível determinar que do total de 46 cédulas monetárias da cidade de Florianópolis/SC, a cocaína estava presente em 28 amostras (93%), sendo que 30 notas foram obtidas diretamente da circulação em geral. Em relação as 16 cédulas coletadas em caixas eletrônicas, estas eram praticamente novas, o que explica os baixos valores encontrados. Os resultados deste estudo destacam a CE como uma alternativa ao GC ou LC na determinação de cocaína em cédulas monetárias. Embora, o LD obtido para este método não seja muito baixo em comparação com o relatado por estudos anteriores usando GC-MS, LC-MS/MS ou CE-ECL. No entanto, o valor de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ parece ser aceitável para a determinação da cocaína em extratos de notas brasileiras, uma vez que as quantidades encontradas nas notas são muito mais elevadas do que este valor de LD.

O método por LC-MS/MS foi aplicado em 55 cédulas monetárias de cinco cidades brasileiras e em cinco notas de um dólar americano provenientes da cidade de Baltimore/USA. Durante os ensaios preliminares foram identificadas a presença de lidocaína e cafeína nas cédulas que passaram a ser também objetos do estudo. Embora, já exista alguns trabalhos reportados na literatura utilizando a mesma técnica e a mesma matriz, esse método se diferencia porque procurou-se por um meio de extração que fosse rápido, de baixo custo e, principalmente, atóxico e que não danificasse as marcas de segurança das notas e isto foi obtido com

um procedimento de preparo de amostra simples que consiste na submersão da nota em 400 mL de água desionizada por 15 min sob agitação magnética constante. Foram realizados experimentos para comprovar que o uso da água não compromete a eficiência da extração e que a cocaína não hidrolisa nas condições experimentais utilizadas.

As menores quantidades de cocaína, lidocaína e cafeína foram encontradas nas notas de dólares. Mas fazendo uma comparação entre as notas provenientes das cinco cidades brasileiras, excluindo-se as notas em que foi detectado mais de 1,0 mg de cocaína, as cidades que apresentaram a menor e a maior quantidade média de cocaína por nota foram Fortaleza e Rio de Janeiro, respectivamente. A cidade que apresentou as menores quantidades de cafeína e lidocaína também foi Fortaleza. Em contrapartida, a cidade em que foram encontradas as maiores quantidades médias de cafeína e lidocaína por nota foi São Paulo.

Entretanto, o fator primordial que influenciou no desejo de se desenvolver um método para a determinação de cocaína por LC-MSMS foi querer aplicá-lo na análise das mãos da população em geral, mas principalmente nas mãos de pessoas que manipulam uma grande quantidade de notas de dinheiro diariamente, como bancários, taxistas, cobradores de ônibus, caixas de agências lotéricas. Porém, somente 4 bancários aceitaram participar do experimento e, portanto, o grande grupo amostral foi composto basicamente por estudantes do Departamento de Química.

Dos 98 extratos (49 voluntários), foi detectada cocaína em 49% das amostras. Acredita-se que o grupo amostral que não apresentou cocaína nas mãos não tenha tido contato com algum tipo de fonte de contaminação (dinheiro ou a própria droga) ou tenha lavado as mãos no dia do experimento. Os extratos das mãos dos 4 bancários resultaram positivo para a cocaína, no entanto a quantidade de cocaína encontrada nos extratos das mãos dos bancários foi muito semelhante à encontrada nas amostras da população em geral e em baixa concentração.

Através dos experimentos de permeação e retenção cutânea foi possível demonstrar que a cocaína extraída de uma cédula monetária permeia pela pele. Entretanto, este fato não oferece riscos a pessoas que manuseiam um grande volume de dinheiro diariamente, pois a quantidade de cocaína passada das notas de dinheiro para as mãos é tão pequena, que mesmo que seja permeada, não trará prejuízos à pessoa.

Finalmente, o objetivo principal deste trabalho foi atingido, pois foi possível demonstrar que a cocaína pode estar presente nas mãos de qualquer pessoa, independente de ser usuária da droga ou não, ou ainda de ser uma pessoa que manipule um grande volume de dinheiro diariamente. Por outro lado, esse manuseio não oferece riscos à saúde da população em geral, pois a quantidade de cocaína passada das notas de dinheiro para as mãos é tão pequena, que mesmo que eventualmente seja metabolizada, não trará prejuízos à saúde das pessoas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALNAJJAR, A. et al. Development of a capillary electrophoresis method for the screening of human urine for multiple drugs of abuse. **Journal of Chromatography B**, v. 856, n. 1-2, p. 62-7, 2007.

ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Analytical methods to determine cocaine contamination of banknotes from around the world. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 344-351, 2008.

BADOUD, F. et al. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4109-19, 2010.

BAILEY, B. J. **Looking back at a century of cocaine - use and abuse.** **Laryngoscope**. v. 106, p. 681 - 683, 1996.

BARAT, S. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. **Brain Research**, v. 742, n. 1-2, p. 157-62, 1996.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria.** Campinas: Editora da Unicamp 2001.

BAUMGARTNER, M. R. et al. Analysis of drugs of abuse in hair: evaluation of the immunochemical method VMA-T vs. LC-MS/MS or GC-MS. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1-3, p. 56-9, 2012.

BERGHAUS, G.; RAMAEKERS, J. G.; DRUMMER, O. H. Demands on scientific studies in different fields of forensic medicine and forensic sciences. Traffic medicine--impaired driver: alcohol, drugs, diseases. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2-3, p. 233-7, 2007.

BIJLSMA, L. et al. Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 15, p. 3078-89, 2009.

BOHANNON, J. Hard Data on Hard Drugs, Grabbed From the Environment. **Science**, v. 316, p. 42-44, 2007.

BONES, J.; MACKA, M.; PAULL, B. Evaluation of monolithic and sub 2 microm particle packed columns for the rapid screening for illicit drugs-- application to the determination of drug contamination on Irish euro banknotes. **Analyst**, v. 132, n. 3, p. 208-17, 2007.

BOTELLO, I. et al. Investigation of in-line solid-phase extraction capillary electrophoresis for the analysis of drugs of abuse and their metabolites in water samples. **Electrophoresis**, v. 33, n. 3, p. 528-535, 2012.

BRETTELL, T. A.; BUTLER, J. M.; ALMIRALL, J. R. Forensic science. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4539-56, 2011.

BRUNET, B. R. et al. Monitoring pregnant women's illicit opiate and cocaine use with sweat testing. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 32, n. 1, p. 40-9, 2010.

_____. Development and validation of a solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous quantification of methadone, heroin, cocaine and metabolites in sweat. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 1-2, p. 115-27, 2008.

CAON, T. **Padronização do modelo de difusão ex vivo da câmara de Franz para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica e da pele de suínos**. 2009. 125 f (Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARDONA, P. S. et al. Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products. **Forensic Science International**, v. 157, n. 1, p. 46-56, 2006.

CARLINI, E. A. S. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país**. Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo. 2006.

CARRERA, M. R.; MEIJLER, M. M.; JANDA, K. D. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 5019-30, 2004.

CARTER, J. F.; SLEEMAN, R.; PARRY, J. The distribution of controlled drugs on banknotes via counting machines. **Forensic Science International**, v. 132, n. 2, p. 106-12, 2003.

CHASIN, A. A.; LIMA, I. V. D. **Alguns aspectos históricos do uso da coca e da cocaína. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade.** v. 1, p. 33 - 44, 2008.

CHIUMINATTO, U. et al. Automated online solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for determination of forty-two therapeutic drugs and drugs of abuse in human urine. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 13, p. 5636-45, 2010.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, p. 374-380, 2001.

COGNARD, E.; BOUCHONNET, S.; STAUB, C. Validation of a gas chromatography--ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metabolites in saliva. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 925-34, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach** West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 1997.

DI DONATO, E.; MARTIN, C. C. S.; DE MARTINIS, B. S. Determination of cocaine in Brazilian paper currency by capillary gas chromatography/mass spectrometry. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1966-1967, 2007.

DIXON, S. J. et al. Determination of cocaine contamination on banknotes using tandem mass spectrometry and pattern recognition. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, n. 1, p. 54-63, 2006.

DRUMMER, O. H. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 133-42, 2005.

_____. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1495-503, 2007.

_____. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 2, p. 203-6, 2008.

DUER, W. C.; SPITZ, D. J.; MCFARLAND, S. Relationships Between Concentrations of Cocaine and Its Hydrolysates in Peripheral Blood, Heart Blood, Vitreous Humor and Urine. **Journal of Forensic Sciences**, v. 51, n. 2, p. 421-425, 2006.

EBEJER, K. A. et al. Rapid comparison of diacetylmorphine on banknotes by tandem mass spectrometry. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 19, n. 15, p. 2137-43, 2005.

_____. Factors influencing the contamination of UK banknotes with drugs of abuse. **Forensic Science International**, v. 171, n. 2-3, p. 165-70, 2007.

ELSOHLY, M. A. Urinalysis and casual handling of marijuana and cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 15, p. 46, 1991.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A. et al. Validated, non-destructive and environmentally friendly determination of cocaine in euro bank notes. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 2, p. 321-325, 2005.

FANDINO, A. S. et al. Identification of anhydroecgonine methyl ester N-oxide, a new metabolite of anhydroecgonine methyl ester, using electrospray mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 37, n. 5, p. 525-32, 2002.

FARIA, A. F.; SOUZA, M. V. N. D.; OLIVEIRA, M. A. L. D. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 389-396, 2008.

FERNANDEZ, P. et al. Gas chromatographic determination of cocaine and its metabolites in blood and urine from cocaine users in northwestern Spain. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 283-7, 2004.

_____. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. **Forensic Science International**, v. 161, n. 1, p. 31-5, 2006.

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

FRIEND, D. R. In vitro skin permeation techniques. **Journal of Controlled Release**, v. 18, n. 3, p. 235-248, 1992.

GAWIN, F. H.; KHALSA, M. E.; ELLINWOOD, E. Stimulantes. In: INC., A. P. P. (Ed.). **Textbook of substance abuse treatment**, 1994. p.111 - 139.

GHEORGHE, A. et al. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 4, p. 1309-19, 2008.

GOLD, M. S. **Drugs of Abuse: A Comprehensive Series for Clinicians**. New York: Plenum Medical Book Company, 1993.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 11^a ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.

GOSETTI, F. et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3929-3937, 2010.

GOTTARDO, R. et al. Broad-spectrum toxicological analysis of hair based on capillary zone electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1159, n. 1-2, p. 190-7, 2007.

_____. Capillary zone electrophoresis (CZE) coupled to time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) applied to the analysis of illicit and controlled drugs in blood. **Electrophoresis**, v. 29, n. 19, p. 4078-4087, 2008.

HAAS, L. F. Coca shrub (*Erythroxylum coca*). **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 50, p. 25, 1995.

HASANOVIC, A. et al. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of aciclovir. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 76-81, 2011.

HEIMBUCK, C. A.; BOWER, N. W. Teaching Experimental Design Using a GC-MS Analysis of Cocaine on Money: A Cross-Disciplinary Laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 79, n. 10, p. 1254, 2002.

HELMJA, K. et al. Fraction collection in capillary electrophoresis for various stand-alone mass spectrometers. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 17, p. 3666-73, 2009.

HILL, V.; CAIRNS, T.; SCHAFFER, M. Hair analysis for cocaine: factors in laboratory contamination studies and their relevance to proficiency sample preparation and hair testing practices. **Forensic Science International**, v. 176, n. 1, p. 23-33, 2008.

HOELZLE, C. et al. Application of discriminant analysis to differentiate between incorporation of cocaine and its congeners into hair and contamination. **Forensic Science International**, v. 176, n. 1, p. 13-8, 2008.

HOWS, M. E. et al. High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological samples. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 138, n. 1-2, p. 123-32, 2004.

HUDSON, J. C. Analysis of currency for cocaine contamination. **Journal of the Canadian Society of Forensic Science**, v. 22, p. 203-218, 1989.

JANICKA, M.; KOT-WASIK, A.; NAMIEŚNIK, J. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 209-224, 2010.

JEANVILLE, P. M. et al. Rapid confirmation/quantitation of cocaine and benzoylecgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography

and tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 3, p. 257-63, 2000.

JEANVILLE, P. M.; ESTAPÉ, E. S.; DE JEANVILLE, I. T.-N. The effect of liquid chromatography eluents and additives on the positive ion responses of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester using electrospray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 227, n. 2, p. 247-258, 2003.

JENKINS, A. J. Drug contamination of US paper currency. **Forensic Science International**, v. 121, n. 3, p. 189-93, 2001.

JOHANSEN, S. S.; BHATIA, H. M. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 852, n. 1-2, p. 338-44, 2007.

JOHANSON, C. E. Cocaine, a new epidemic. In: (Ed.). **The Encyclopedia of Psychoactive Drugs**. Washington: Burke Pub.Co, p.97, 1988.

JONES, A. W.; HOLMGREN, A.; KUGELBERG, F. C. Concentrations of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in blood samples from apprehended drivers in Sweden. **Forensic Science International**, v. 177, n. 2-3, p. 133-9, 2008.

KACINKO, S. L. et al. Disposition of cocaine and its metabolites in human sweat after controlled cocaine administration. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 2085-94, 2005.

KARCH, S. B. Cocaine: history, use, abuse. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, p. 393 - 397, 1999.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 4, p. 1293-308, 2008.

KEIL, A. et al. Ambient mass spectrometry with a handheld mass spectrometer at high pressure. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 20, p. 7734-9, 2007.

KOLOMIETS, Y. N.; PERVUKHIN, V. V. Effect of UV irradiation on detection of cocaine hydrochloride and crack vapors by IMIS and API-MS methods. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 542-7, 2009.

KOU, J. et al. Effect of Receiver Fluid pH on in Vitro Skin Flux of Weakly Ionizable Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, p. 986-990, 1993.

LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S. Abuso e dependência de álcool e outras drogas. In: ALMEIDA, O. P.; DRATCU, L., *et al* (Ed.). **Manual de Psiquiatria**. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan, p. 97 - 102, 1996.

LAWRENCE, A. H. Detection of drug residues on the hands of subjects by surface sampling and ion mobility spectrometry. **Forensic Science International**, v. 34, n. 1-2, p. 73-83, 1987.

LENDOIRO, E. et al. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS. **Forensic Science International**, v. 217, n. 1-3, p. 207-15, 2012.

LEYTON, V. et al. Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1-3, p. 25-7, 2012.

LI, P. et al. Nonenzymatic Hydrolysis of Cocaine via Intramolecular Acid Catalysis. **Helvetica Chimica Acta**, v. 82, n. 1, p. 85-89, 1999.

LIN, S. N. et al. Detection and time course of cocaine N-oxide and other cocaine metabolites in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 16, p. 4335-40, 2003.

MADEJ, K. A. Analysis of meconium, nails and tears for determination of medicines and drugs of abuse. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 246-259, 2010.

MAIA, C. R. M.; JURUENA, M. F. P. Cocaína: aspectos históricos, farmacológicos e psiquiátricos. **Revista AMRIGS**, v. 40, p. 263 - 273, 1996.

MARCHI, I. et al. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4071-4078, 2010.

MARIE LAFITTE, F. B., LAURENT NOËL, YVAN GAILLARD AND GILBERT PÉPIN. Traces de stupéfiants sur les billets de banque: une comparaison entre les billets en circulation et les billets saisis à l'occasion de trafic de stupéfiant. **Annales de Toxicologie Analytique**, v. 14, p. 95, 2002.

MATTHEW, D. K. et al. Using molecular similarity to highlight the challenges of routine immunoassay-based drug of abuse/toxicology screening in emergency medicine. **BioMed Central Emergency Medicine**, v. 9, n. 1, p. 5, 2009.

MAXWELL, E. J.; CHEN, D. D. Y. Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, n. 1, p. 25-33, 2008.

MENG, L. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. **Forensic Science International**, v. 209, n. 1-3, p. 42-7, 2011.

MERCOLINI, L. et al. Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 456-61, 2008.

MOELLER, K. E.; LEE, K. C.; KISSACK, J. C. Urine drug screening: practical guide for clinicians. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 1, p. 66-76, 2008.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Structure and function of skin. In: RIVIERE, J. E. (Ed.). **Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology**. New York: CRC, 2006. p.1-19.

MOORE, C.; COULTER, C.; CROMPTON, K. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 859, n. 2, p. 208-12, 2007.

MORTIER, K. A. et al. Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 779, n. 2, p. 321-30, 2002.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Analytical pitfalls in hair testing. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1475-94, 2007.

NASSIF FILHO, A. C. et al. Otorhinolaryngological effects of cocaine and/or crack abuse in drug addicts. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 237-41, 1999.

NEGRUSZ, A.; PERRY, J. L.; MOORE, C. M. Detection of cocaine on various denominations of United States currency. **Journal of Forensic Sciences**. v. 43, p. 626-629, 1998.

NIDA. **Cocaine: Abuse and Addiction**. National Institute on Drug Abuse, p.4342. 2004

PAUL, B. D. et al. Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 19, n. 9, p. 677-88, 2005.

PELLEGRINI, M. et al. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for opiates and cocaine in human teeth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 3, p. 662-8, 2006.

PICHINI, S. et al. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. **Journal of Chromatography B**, v. 794, n. 2, p. 281-92, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIVIER, L. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, n. 1–2, p. 69-82, 2003.

ROMANO, M.; RIBEIRO, M.; MARQUES, A. C. P. R. **Abuso e Dependência da Cocaína (Projeto Diretrizes)**. Associação Brasileira de Psiquiatria. 2002.

SCHEIDWEILER, K. B.; HUESTIS, M. A. Simultaneous quantification of opiates, cocaine, and metabolites in hair by LC-APCI-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 15, p. 4358-63, 2004.

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 51-6, 2001.

SERGI, M. et al. Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phencyclidine in oral fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, n. 2, p. 132-137, 2010.

SHAH, V. et al. In Vitro Release of Hydrocortisone from Topical Preparations and Automated Procedure. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 55-59, 1991.

SHAH, V. P. et al. Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 53, n. 1, p. 53-59, 1989.

_____. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies: Sponsored by the American Association of Pharmaceutical Chemists, U.S. Food and Drug Administration, Fédération Internationale Pharmaceutique, Health Protection Branch (Canada) and Association of Official Analytical Chemists. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 82, n. 1–2, p. 1-7, 1992.

SHAMSIPUR, M.; FATTAHI, N. Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction

followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 28, p. 2978-2983, 2011.

SHIHABI, Z. K. Stacking in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 107-17, 2000.

SILVA, O. A.; ODO, S. A. Toxicologia da cocaína. In: LEITE, M. C. A. A., A.F. (Ed.). **Cocaína e crack**. Porto Alegre: Artemed, p. 88-95, 1999.

SKELLY, J. et al. FDA and AAPS Report of the Workshop on Principles and Practices of In Vitro Percutaneous Penetration Studies: Relevance to Bioavailability and Bioequivalence. **Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 3, p. 265-267, 1987.

SLEEMAN, R. et al. Rapid screening of banknotes for the presence of controlled substances by thermal desorption atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. **Analyst**, v. 124, p. 103-108, 1999.

SMITH, F. P.; KIDWELL, D. A. Cocaine in hair, saliva, skin swabs, and urine of cocaine users' children. **Forensic Science International**, v. 83, n. 3, p. 179-89, 1996.

SMITH, R. D. et al. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 436-441, 1988.

SONG, D.; ZHANG, S.; KOHLHOF, K. Determination of a trace amount of cocaine on a bank note by gas chromatography-positive-ion chemical-ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 731, n. 1-2, p. 355-360, 1996.

STOEV, G.; STOYANOV, A. Comparison of the reliability of the identification with diode array detector and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, n. 1-2, p. 302-311, 2007.

SU, H.-L. et al. Determination of cocaine and its metabolites using cation-selective exhaustive injection and sweeping-MEKC. **Electrophoresis**, v. 29, n. 20, p. 4270-4276, 2008.

TAGLIARO, F. et al. Recent advances in the application of CE to forensic sciences: a update over years 2007-2009. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 251-9, 2010.

_____. Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licences. **Forensic Science International**, v. 107, n. 1-3, p. 121-8, 2000.

THIEME, D.; SACHS, H. Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, n. 1–2, p. 171-186, 2003.

TOENNES, S. W. et al. Driving under the influence of drugs -- evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. **Forensic Science International**, v. 152, n. 2-3, p. 149-55, 2005.

TSANACLIS, L.; WICKS, J. F. Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. **Forensic Science International**, v. 176, n. 1, p. 19-22, 2008.

UNODC. **World Drug Report**. United Nations Publication. Viena. 2011

_____. **World Drug Report**. United Nations Publication. New York. 2013

WAN, H. et al. Rapid screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis combined with short-end injection. **Journal of Chromatography A**, v. 979, n. 1-2, p. 369-77, 2002.

WANG, I. T.; FENG, Y. T.; CHEN, C. Y. Determination of 17 illicit drugs in oral fluid using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with three atmospheric pressure ionizations. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 30, p. 3095-105, 2010.

WEISS, R. D.; MIRIN, S. M.; BARTEL, R. L. **Cocaine**. American Psychiatric Press. Washington-DC. 1994

WILLE, S. M. et al. Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography-mass spectrometry. **International Journal of Legal Medicine**, v. 123, n. 6, p. 451-8, 2009.

WIMMER, K.; SCHNEIDER, S. Screening for illicit drugs on Euro banknotes by LC-MS/MS. **Forensic Science International**, v. 206, n. 1-3, p. 172-7, 2011.

XU, Y. et al. Field-amplified sample stacking capillary electrophoresis with electrochemiluminescence applied to the determination of illicit drugs on banknotes. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, n. 1-2, p. 260-266, 2006.

ZENG, J. et al. A new method for chemical identification based on orthogonal parallel liquid chromatography separation and accurate molecular weight confirmation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 13, p. 1749-55, 2011.

ZUO, Y. et al. An accurate and nondestructive GC method for determination of cocaine on US paper currency. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 13, p. 2444-50, 2008.