



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

MARIELLY NASCIMENTO SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE CURVA ANALÍTICA EM CLAE/DAD
PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEROÍNA PARA ENSAIO DE
PROFICIÊNCIA**

BRASÍLIA, 2021



MARIELLY NASCIMENTO SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE CURVA ANALÍTICA EM CLAE/DAD
PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEROÍNA PARA ENSAIO DE
PROFICIÊNCIA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico(a), Faculdade de Ceilândia,
Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Leandro Fernandes Machado

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni

BRASÍLIA, 2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

NS586d Nascimento Silva, Marielly
DESENVOLVIMENTO DE CURVA ANALÍTICA EM CLAE/DAD PARA
QUANTIFICAÇÃO DE HEROÍNA PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA /
Marielly Nascimento Silva; orientador Leandro Fernandes
Machado; co-orientador Paulo Gustavo Barboni. -- Brasília,
2021.
57 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2021.

1. Heroína. 2. HPLC-DAD. 3. Curva de Calibração. 4. Ensaio
de Proficiência. I. Fernandes Machado, Leandro, orient. II.
Barboni, Paulo Gustavo, co-orient. III. Título.

MARIELLY NASCIMENTO SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE CURVA ANALÍTICA EM CLAE/DAD
PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEROÍNA PARA ENSAIO DE
PROFICIÊNCIA**

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Leandro Fernandes Machado
PF – SEPLAB/DPER/INC/DITEC/PF

Co-Orientador Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni
UnB - FCE

Profa. Dra. Vivian da Silva Santos
UnB - FCE

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
UnB - FCE

AGRADECIMENTOS

Dedico essa conquista às minhas mães. À minha mãe Jucileide que sempre se empenhou em dar o melhor para nossa família, com muita garra e perseverança nunca desistiu frente às adversidades, que encarou inúmeros obstáculos e desafios no papel de mãe, você é meu alicerce. À minha segunda mãe Fátima, que sempre me incentivou ao estudo/aprendizado e sempre acreditou em mim desde muito nova, me acolheu com sua família me mostrando que o conhecimento é o verdadeiro caminho, me motivando a ser primeira de uma geração inteira a se formar em uma universidade pública de excelência. Amo vocês.

Aos amigos que a FCE/UnB me proporcionou, e que pretendo levar para sempre, em especial minhas manas do grupo 'farmalindas': Brenda, Laura, Luana e Mariana me lembrando todos os prazos e resultados, sem vocês o processo de graduação teria sido sem graça e mais difícil.

Aos meus amigos próximos que tornaram os dias difíceis mais leves, por todo conselho dado e momentos de descanso/diversão. À vocês: Júlia, Moana, Ana e Deyvid.

Aos meus orientadores. Leandro, que caiu de paraquedas me dando uma oportunidade única de aprendizado. Sou muito grata por toda sapiência que me passou sendo aluna, estagiária e orientanda. Ao Barboni sendo sempre competente e compreensível ao longo de toda a graduação. Muito Obrigado!

À todos do SEPLAB/INC/DITEC/PF, que viabilizaram o acesso à informação teórica e principalmente prática durante meu estágio e formação. Pela prontidão em sanar todas as dúvidas, incluindo a experiência de se trabalhar em um laboratório robusto de âmbito nacional. Pela oportunidade e confiança para realizar este trabalho. Obrigado e até logo!

À Universidade de Brasília, mais precisamente a Faculdade de Ceilândia que me acolheu e fez parte dos anos mais felizes e construtivos da minha vida e a todos os docentes que fizeram parte da minha trajetória.

RESUMO

O resultado de análise de drogas deve ser disseminado e comparado para que autoridades envolvidas no controle de drogas tenham informação efetiva das atividades internacionais de substâncias ilegais. O SEPLAB/INC/DITEC/PF sendo um laboratório de ensaio acreditado pela INMETRO, instituído também como um laboratório forense de esfera nacional, realiza anualmente O ICE – um exercício colaborativo de proficiência internacional instituído pela UNODC com intuito de fomentar a prática adequada de análise de drogas. O objetivo deste trabalho é quantificar a heroína presente na amostra proposta pelo o exercício de proficiência do semestre 1/2021 do ICE/UNODC no SEPLAB/INC/DITEC/PF abordando também a realização e a importância deste exercício no âmbito forense. O *screening* da amostra foi realizado a partir das técnicas mais utilizadas no âmbito forense, como: CG/EM e FTIR. A identificação das substâncias se deu por técnicas com diferentes poderes discriminatórios e a quantificação da heroína foi desempenhada por CLAE-DAD a partir da projeção algébrica na qual a substituição dos valores na equação representativa da curva analítica, permitiu inferir o teor de heroína na amostra. Os resultados obtidos pelo SEPLAB/INC, foram comprovados e comparados com o Relatório Anual ICE 1/2021.

PALAVRAS-CHAVE: heroína, CLAE-DAD, ensaio de proficiência, curva analítica

ABSTRACT

The result of drug analysis must be disseminated and compared so that authorities involved in drug control have effective information on international activities of illegal substances. SEPLAB/INC/DITEC/PF, being a testing laboratory accredited by INMETRO, also established as a national forensic laboratory, annually carries out The ICE - a collaborative exercise of international proficiency instituted by UNODC with the aim of promoting the proper practice of analysis drugs. The objective of this work is to quantify the heroin present in the sample proposed by the proficiency exercise of the semester 1/2021 of the ICE/UNODC at SEPLAB/INC/DITEC/PF, also addressing the realization and importance of this exercise in the forensic scope. The sample screening was performed using the most used techniques in the forensic scope, such as: CG/EM and FTIR. The identification of substances was done by techniques with different discriminatory powers and the heroin quantification was performed by HPLC-DAD from the algebraic projection in which the substitution of values in the representative equation of the analytical curve allowed inferring the heroin content in the sample. The results obtained by SEPLAB/INC were verified and compared with the ICE 1/2021 Annual Report.

KEYWORDS: heroin, HPLC-DAD, proficiency test, analytical curve.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	5
SUMÁRIO	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Garantia da Qualidade e o Exercício Colaborativo Internacional da ONU (ICE/UNODC)	10
1.2 Técnicas instrumentais mais utilizadas no âmbito forense	12
1.3 Heroína e prevalência no Brasil	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	17
4. METODOLOGIA	18
4.1 Materiais e Reagentes	18
4.2 <i>Screening</i> do material questionado.....	21
4.3 Quantificação da heroína	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1 <i>Screening</i> e identificação do material analisado	26
5.2 Quantificação da heroína	33
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	37
8. ANEXOS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de acetilação da morfina para produção de heroína. FONTE: DrugBank	16
Figura 2 – Sinais cromatográficos resultantes da análise de 2021/1/SM-2(CH ₂ CL ₂) em CG/EM.....	27
Figura 3 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com paracetamol.....	28
Figura 4 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com 6-monoacetilmorfina	28
Figura 5 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com cafeína.....	29
Figura 6 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com papaverina.....	29
Figura 7 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com meconina	30
Figura 8 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com accetilcodeína.....	30
Figura 9 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com heroína/diacetilmorfina	31
Figura 10 - Comparação do extrato seco da amostra SM-2 (MeOH) com Heroína.HCl.....	32
Figura 11 - Curva analítica do padrão de heroína.H ₂ O	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de técnicas analíticas. FONTE: Recomendações SWGDRG, 2019.....	14
Tabela 2 - Especificações dos equipamentos utilizados.....	19
Tabela 3 - Especificação dos reagentes e solventes utilizados	20
Tabela 4 - Especificações dos materiais utilizados.....	21
Tabela 5 - Amostragem do material recebido pelo ICE/UNODC. FONTE: Registro geral de análises SEPLAB/INC	22
Tabela 6 - Parâmetros dos métodos 'ESTENDIDO' e 'ESTENDIDO SPLITLESS' em CG/EM. FONTE: Biblioteca SEPLAB/INC/DITEC/PF.....	24
Tabela 7 - Parâmetros do FTIR. FONTE: Biblioteca SEPLAB/INC.....	24
Tabela 8 - Parâmetros do método de quantificação HEROÍNA_C18PLUS.M em CLAE-DAD.	26
Tabela 9 - Pontos teóricos da curva analítica em triplicata (A, B e C).	26
Tabela 10 - Comparação dos tempos de retenção entre os sinais cromatográficos e os padrões analíticos.	33
Tabela 11 - Dados obtidos a partir da média dos pontos da curva analítica (A, B e C)	35
Tabela 12 - Dados da amostra 1/2021/SM-2 e do controle 2020/1/SM-3	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ICE – International Collaborative Exercises

IQAP – International Quality Assurance Programme

MRC – Material de Referência Certificado

SEPLAB-/INC/DITEC/PF – Setor de Perícias de Laboratório do Instituto Nacional de Criminalística da Diretoria Técnica da Polícia Federal

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com Detector de Arranjos de Diodo

FTIR – Infravermelho com Transformada de Fourier

MeOH – Metanol

CH₂Cl₂ – Diclorometano

S.E – Solução Estoque

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

BDCRIM – Biblioteca de Criminalística da Polícia Federal

SISCRIM – Sistema de Criminalística da Polícia Federal

CG – Cromatografia Gasosa

MET – Método de Análise

MUP – Método de Uso ou Preparo

POP – Procedimento Operacional Padrão

ONU – Organization of United Nations

ISO/IEC – International Organization of Standardization/International Electrotechnical Commission

1. INTRODUÇÃO

A verificação periódica dos serviços de análises periciais no âmbito de laboratórios químicos é de fundamental importância para garantir que os resultados apresentados na investigação policial sejam confiáveis, auditáveis e reprodutivos, permitindo, assim, que os direitos individuais sejam respeitados no âmbito da persecução penal. A participação de laboratórios periciais em ensaios interlaboratoriais internacionais é uma das maneiras mais rápidas e transparentes capazes de atender esse tipo de demanda. Nesses ensaios, o laboratório deve aplicar metodologias próprias a fim de identificar e quantificar os princípios ativos presentes em amostras desconhecidas. O SEPLAB/DPER/INC/DITEC/PF tradicionalmente tem participado desses ensaios e os resultados obtidos tem norteado o desenvolvimento de técnicas analíticas que foram implementadas no escopo da acreditação, tais como a quantificação de cocaína, MDMA, anfetaminas e mais recentemente, heroína. As respostas aos exercícios internacionais têm permitido que a instituição esteja alinhada às técnicas e metodologias aplicadas nos laboratórios de países referência no combate ao tráfico de drogas, destacando a instituição como uma referência nacional em análises de substâncias.

1.1 Garantia da Qualidade e o Exercício Colaborativo Internacional da ONU (ICE/UNODC)

O termo “Qualidade” refere-se à confiabilidade, acurácia e pontualidade dos resultados correlacionando cliente e produto. No âmbito forense, busca-se qualidade nas análises e seus resultados. As respostas geradas nas análises relacionadas no escopo de um laboratório forense acreditado são posteriormente relatadas na forma de laudo pericial, geralmente, respondendo as demandas de uma ação penal ou a um inquérito policial a fim de atender a Justiça (GARRIDO, ARAUJO, 2014).

A rápida disseminação de informações internacionais entre laboratórios para as várias autoridades envolvidas no controle de drogas é considerada criticamente importante para o controle efetivo das atividades internacionais de drogas ilegais. Essas informações devem ser confiáveis e comparáveis entre as nações (MULLEN, 2014).

A acreditação fornece aos laboratórios maior confiança em seus

procedimentos, indicando que os dados produzidos são confiáveis para o uso pretendido e comparáveis aos dados de outros laboratórios, além de demonstrar confidencialidade e qualidade das análises (GROCHAU; CATEN; FORTE, 2017).

Em um laboratório acreditado todos os procedimentos e sistemas de garantia da qualidade devem ser meticulosamente documentados em manuais do Sistema de Garantia da Qualidade (SGQ) do laboratório, nele apresenta-se toda a estrutura de funcionamento do laboratório no escopo proposto. São documentados os procedimentos realizados (como executar determinada atividade ou processo), as instruções de trabalho, (como as atividades e operações devem ser realizadas), e os registros da qualidade (documentos comprobatórios do histórico de atividades realizadas) (GARRIDO, ARAUJO, 2014).

No Brasil, O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e sua Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE), é o responsável por avaliar a adesão e atuar na acreditação de instituições públicas ou privadas, na execução de atividades laboratoriais conforme as Boas Práticas de Laboratório e a NBR ISO/IEC 17025 – norma internacional que padroniza os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração (GROCHAU; CATEN; FORTE, 2017).

A ISO/IEC 17025 indica que para a garantia dos resultados o laboratório deve monitorar seu desempenho por meio de comparação de resultados com outros laboratórios na forma de participação em Ensaios de Proficiência. Esses ensaios proporcionam a correção de erros dentro dos processos laboratoriais e também permite que os laboratórios avaliem seu desempenho em relação às suas próprias metas e o desempenho de seus participantes (MULLEN, 2014).

A UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) – gabinete da ONU responsável por assuntos de crimes relacionados a drogas, tendo reconhecimento da importância de um exame de proficiência para padronização de identificação e análise categórica de drogas em laboratórios forenses, criou na década de 1990 um programa gratuito e acessível para que todos os estados-membros tivessem instalações adequadas para teste/análise de drogas – IQAP/ICE (MULLEN, 2014).

Por meio do IQAP/UNODC (International Quality Assurance Programme – Programa Internacional de Garantia da Qualidade) foi então instituído o ICE/UNODC (International Collaborative Exercise – Exercício Colaborativo Internacional). O IQAP incentiva os laboratórios a elevar seu nível de desempenho ensinando a importância

da garantia da qualidade e promovendo seu uso, com o objetivo de harmonizar os padrões de qualidade e estabelecer um programa internacional de proficiência (MULLEN, 2014).

O ICE/UNODC consiste em avaliar/monitorar laboratórios por meio de exercícios/análises de drogas dentro da realidade de recursos disponíveis de cada laboratório-participante. É realizado semestralmente com dois tipos de testes: *Seized Material* (SM) e *Biological Specimens* (BS). Os SM são materiais resultante da apreensão no âmbito do tráfico/mercado ilegal e BS são espécimes biológicas (urinas) adulteradas com substâncias e/ou metabólitos contendo drogas de abuso (MULLEN, 2014).

Os resultados das análises são encaminhados na forma de um formulário de análise, contendo três fases: triagem (*screening*) (Anexo 3), identificação (Anexo 4) e quantificação (Anexo 5). Esses formulários devem conter, além da resposta, a técnica analítica usada para a determinação dos resultados. Fica a critério do laboratório-participante escolher, de acordo com seu recurso/escopo disponível, quais testes irá realizar (SERRANO, 2019).

Ao final das duas rodadas do exercício, é publicado um Relatório Anual com os resultados das performances de cada laboratório participante, de forma codificada e restrita. Os laboratórios-participantes, individualmente, recebem uma avaliação de seu próprio desempenho e são informados sobre o conteúdo e a concentração correta dos materiais dos testes, além de receberem um certificado internacional de competência de análise em SM ou BS, reconhecido como laboratório acreditado com sistema de qualidade bem estruturado (SERRANO,2019).

Aos laboratórios que não obtiverem resultado satisfatório, a UNODC demonstra seu compromisso distribuindo padrões de drogas e publicando métodos analíticos recomendados para as drogas ilícitas mais prevalentes para auxiliar no desenvolvimento de métodos (MULLEN, 2014). Com isso, o retorno fornecido pelo programa ajuda no crescimento individual, de forma que são oferecidos conselhos e assistência a esses laboratórios.

1.2 Técnicas instrumentais mais utilizadas no âmbito forense

A análise química aplicada a drogas de abuso vem sendo utilizada por diversos segmentos no âmbito forense, auxilia a perícia forense, por exemplo, na análise de

rota de tráfico a partir do perfil químico da substância, por meio da quantificação de componentes minoritários de substâncias proscritas extraídas de plantas e na identificação de adulterantes encontrados nas amostras apreendidas (SERRANO, 2019).

A caracterização de amostras suspeitas, graças a química forense, também auxilia na formação de banco de dados, uma vez que essas amostras analisadas, dependendo do seu grau de pureza, podem se tornar amostras de referências para futuras análises (RODRIGUES et al, 2014), ou ainda, na identificação de Novas Substâncias Psicoativas (NPS).

São utilizadas diversas técnicas para diferentes objetivos dentro de uma análise, cabe ao analista decidir qual técnica será mais conveniente de ser empregada para as determinações adequadas. Fatores importantes que devem ser levados em consideração quando se escolhe um método de análise são: (a) a natureza da informação que se busca, (b) a quantidade de amostra disponível e a proporção do constituinte que será determinado e (c) o objetivo a que os resultados irão atender (RODRIGUES et al, 2014).

Dentro dessa realidade, para cada tipo de material existe uma diretriz de análise adequada envolvendo técnicas analíticas que são classificadas de acordo com seu poder discriminatório conforme recomendação periódica da Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG, 2019).

Técnicas classificadas como “Categoria A” têm maior poder de discriminação e aquelas classificadas como “Categoria C” menor, sendo apenas classificadas como indicadores de presença de substâncias, enquanto que técnicas A são confirmatórias, desde que comparadas com banco de dados sistemático (bibliotecas eletrônicas) e, se possível, com padrões analíticos rastreáveis (SWGDRUG, 2019).

Tabela 1 - Classificação de técnicas analíticas. FONTE: Recomendações SWGDRG, 2019.

Categoria A	Categoria B	Categoria C
Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	Cromatografia Gasosa (CG)	Espectrofotometria na região do Ultravioleta/visível (UV-VIS)
Espectrometria de massa (EM)	Cromatografia de íons (CI)	Espectroscopia de Fluorescência

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	Imunoensaio
Espectroscopia de Raman (Raman)	Cromatografia em camada delgada (CD)	Propriedades físico-químicas
Difração de Raio x		Testes colorimétricos e de precipitação

Para a identificação forense de substâncias em amostras desconhecidas questionadas as técnicas mais extensamente utilizadas são: Cromatografia Gasosa - CG e Infravermelho - IV. A técnica de IV é largamente empregada na determinação da pureza e estrutura, sendo uma análise qualitativa de estudo básico estrutural de moléculas. A importância das análises espectrofotométricas no infravermelho consiste na identificação qualitativa de substâncias, puras ou em mistura, e sendo instrumento no estabelecimento de estruturas ((FERREIRA, 2016).).

A cromatografia, por ser um processo de separação, é uma técnica precursora de grande importância para análises acopladas. Essa técnica se adequa a diferentes sistemas tratando-se de uma das técnicas mais utilizadas e de melhor desempenho para isolamento, purificação e identificação de substâncias. Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) combina as vantagens de alta seletividade e eficiência de separação, com alta capacidade de informação estrutural, massa molar e aumento adicional na seletividade permitida (CAVALCANTI, 2016).

A técnica de cromatografia gasosa é amplamente usada na identificação e quantificação de substâncias pela sua robustez e sensibilidade, entretanto exige características típicas do analito, como por exemplo a não degradabilidade estrutural frente a altas temperaturas, visto que nessa técnica os analitos são analisados em fase de vapor. Nesse aspecto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se apresenta como uma interessante alternativa, visto que os analitos podem ser analisados a temperatura ambiente e, dessa forma, apresentando maior versatilidade quanto comparada a cromatografia gasosa, pois não está limitada a amostras voláteis e termicamente estáveis (FERREIRA, 2016). Dessa forma, as análises por CLAE representam uma importante alternativa a análises de moléculas termicamente lábeis, como por exemplo, a heroína (Figura 01).

O desenvolvimento de metodologias aplicando a cromatografia líquida de alta eficiência, baseada na ampla na escolha das fases móvel e estacionária, permite ao

laboratório alternativas modernas para a identificação rápida e eficientes de substâncias de interesse forense (NAHAR; ONDER; SARKER, 2019).

Atualmente, nos laboratórios forenses em todo o mundo, a CLAE tem se mostrado uma técnica relevante para análises de rotina forense, especialmente devido à alta sensibilidade, reprodutibilidade e maior eficiência de separação de diferentes matrizes, permitindo excelentes separações com economia de tempo (NAHAR; ONDER; SARKER, 2019).

A detecção por arranjo de diodos (DAD) é uma das técnicas hífenadas mais utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) (NAHAR; ONDER; SARKER, 2019). Sua detecção se dá por espectrofotometria na região do UV-VIS e seu diferencial é a análise simultânea entre diferentes comprimentos de onda dentro de sua região espectrofotométrica. Isso nos permite avaliar em qual comprimento de onda a detectabilidade de um sinal tem maior absorção, ou ainda, avaliar a detectabilidade dentro de um conjunto de comprimentos de ondas.

1.3 Heroína e prevalência no Brasil

A heroína é um alcalóide semissintético derivado da morfina, que por um processo de acetilação se diferencia pelo grupamento acetil (-OCOCH₃) nas posições O-3 e O-6 (Fig. 1). Também chamada de diacetilmorfina, é 3 vezes mais potente que a morfina e pertence ao grupo dos opiáceos, que são um grupo de substâncias derivadas naturalmente do ópio, que é a seiva bruta da cápsula da papoula (*Papaver somniferum*) (UNODC, 2021).

O uso do ópio é tão antigo quanto a civilização, sendo uma das primeiras drogas a ser documentada com potencial analgésico e depressor do SNC. A heroína é um dos alcaloides opiáceos mais conhecidos em virtude do seu uso como droga de abuso. Seu uso ilícito é um dos principais problemas da sociedade urbana, causando epidemias de abuso principalmente na Europa e na América do Norte (UNODC, 2021).

Num panorama global, existem em média 62 milhões de usuários de opióides (incluindo opiáceos e fármacos opióides não-prescritos) e entre os anos de 2010-2019 esse número duplicou (31 milhões em 2010) se tornando um grande problema para muitos países em diferentes continentes, principalmente EUA e Europa, que sediaram um dos maiores picos de mortes por overdose de heroína em 2015 (UNODC, 2021).

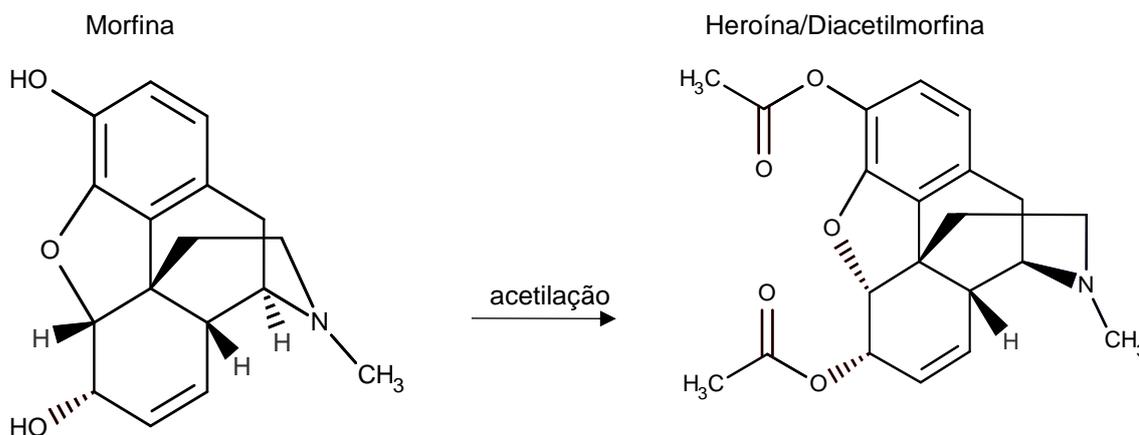


Figura 1 - Processo de acetilação da morfina para produção de heroína. FONTE: DrugBank

O uso de heroína e outros opioides é incomum no Brasil, e os dados são correspondentemente escassos. O alto custo e o acesso limitado por não fazer parte das rotas de tráfico do ópio justificam essa prática ser tão incomum no Brasil (MAIA, DALDEGAN-BUENO, FISCHER, 2021).

Um levantamento realizado pela Fiocruz publicado em 2017 (III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela população brasileira – LNUD), revela os dados sobre prevalência do uso de heroína em 2015, onde 0,3% das pessoas com idades entre 12 – 65 anos (aprox. 460 mil), revelaram que já fizeram uso de heroína ao menos uma vez e 0,1% de pessoas (aprox. 153 mil) teriam usado nos últimos 12 meses (BASTOS et al, 2017).

Com base nos dados do Sistema de Criminalística da Polícia Federal, foi realizada uma busca por laudos de Química Forense dos últimos seis anos (Janeiro/2015 – Outubro/2021) contendo análise de “heroína”. Nessa busca foram achados apenas dois laudos confirmatórios de heroína, uma apreensão de 11kg no estado do Amazonas em 2015 e outra apreensão de 6,13g no Rio Grande do Sul em 2019.

Praticamente não há indícios de uso recorrente de opioides no cenário de uso de drogas no Brasil (MAIA, DALDEGAN-BUENO, FISCHER, 2021). Entretanto, por mais que a prática da heroína seja atípica em território brasileiro, é de importância forense caracterizá-la corretamente, pois trata-se de uma substância de uso proscrito respaldada ilegalmente no Brasil e no mundo.

2. JUSTIFICATIVA

O sistema de qualidade em um laboratório é parte importante e necessária para a confiança de seus resultados. Diante disso, a abordagem da prática laboratorial executando teste de proficiência de âmbito internacional (ICE/UNODC) realizado no SEPLAB/INC/DITEC/PF traz informações relevantes a cerca da importância da participação em testes de proficiência para garantir resultados adequados tratando-se do âmbito criminal/judicial.

Tendo em vista que o objeto em estudo, a heroína/diacetilmorfina, é considerada uma substância entorpecente de uso proscrito no Brasil, constando na lista F1 de substâncias entorpecentes da RDC nº 7 de 27/02/1999 da Anvisa, que atualiza a Portaria nº 344/1998 do Ministério da Saúde, – que dispõe sobre substâncias de controle especial, é de importância para o nível criminatório a análise categórica de sua composição e concentração, ainda que seu uso seja incomum no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver uma curva analítica para quantificação de heroína usando técnica hifenada de CLAE-DAD

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar amostra questionada proposta pelo ensaio de proficiência (ICE/UNODC) usando CLAE-DAD
- Descrever a realização do exercício de proficiência internacional (ICE/UNODC) na área forense no âmbito do SEPLAB/INC/DITEC/PF

4. METODOLOGIA

O propósito do trabalho é a participação do módulo SM (*Seized Material*) do ICE/UNODC. Nesse módulo 4 amostras desconhecidas (Tabela 2) foram encaminhadas para exames qualitativos e quantitativos. A construção da curva de calibração para a quantificação de heroína foi aplicada apenas na amostra 2021/1/SM-2, visto que, após análise qualitativa exploratória via CG/EM e FTIR verificou-se que apenas essa amostra apresentava heroína em sua constituição (dados relatados posteriormente).

As amostras recebidas pelo ICE/UNODC foram previamente identificadas conforme número de dossiê técnico específico. Essa designação faz parte do protocolo de certificação do SEPLAB/INC, o qual é exigido que todas as amostras questionadas recebidas tenham uma nova identificação seguindo as diretrizes da qualidade para rastreabilidade e controle dos registros técnicos. Esse protocolo está descrito conforme o SGQ do SEPLAB no qual é estabelecido o POP-I-SEPLAB-3.

Para assegurar a cadeia de custódia interna, todos os processos do ensaio foram realizados sob supervisão do perito criminal e orientador Dr. Leandro Fernandes Machado.

4.1 Materiais e Reagentes

Os dados sobre os insumos utilizados neste trabalho foram classificados e organizados em tabelas contendo o número de registro, data de verificação/calibração, especificações de modelos de instrumentação analítica utilizado, assim como lote, validade e teor de pureza dos solventes/reagentes usados.

Todos os equipamentos foram calibrados e registrados em planilhas controle, de acordo com as diretrizes exigidas pelo escopo do SGQ do SEPLAB/INC. Os instrumentos possuem MET específicos de uso para análises qualitativas e quantitativas de substâncias questionadas, de acordo com a exigência do SGQ do SEPLAB/INC.

Instrumentação analítica utilizada		
Técnica	Especificações do instrumento	Registro e verificação (SEPLAB/INC/DITEC/PF)
CG/EM	CG Agilent® 8890 acoplado a EM Agilent® 5977B com amostrador automático	CG10 – verificação: 07/2021
FTIR	Espectrofotômetro FT-IR Thermo Nicolet IS10 e acessório ATR, com software Omnic	IV 02 – verificação: 07/2021
CLAE-DAD	Cromatógrafo Líquido da marca Agilent Technologies® modelo 1100 acoplado a detector de arranjos de diodo 1315B, com amostrador automático	CLAE 02 – verificação: 07/2021
Pesagem	Balança microanalítica Metler Toledo® XP 205 (\pm 0,01 mg); capacidade (0,0014g - 220g). legibilidade 0,01mg.	BL-02 – verificação: 07/04/2021

Tabela 2 - Especificações dos equipamentos utilizados

Todos os materiais utilizados foram calibrados e registrados conforme MUP-I-SEPLAB-01, que dispõe do controle e uso de instrumentos e medição incluindo balanças, pipetas e balões volumétricos.

Reagentes e solventes utilizados

Nome/Fórmula estrutural	Especificações dos solventes/reagentes	Registro/Lote/Validade (SEPLAB/INC/DITEC/PF)
CH₂Cl₂ (Diclorometano)	Neon [®] teor > 99,5%	Lote: 49588. Validade: 06/09/2024
MeOH (Metanol)	Neon [®] teor > 99,8%	Lote: 47538. Validade: 25/06/2024
Éter de petróleo	Dinâmica [®]	Lote: 115124. Validade: 09/06/2025
NaOH (Hidróxido de Sódio)	Neon [®] teor > 97,0%	Preparado em: 07/2021 Validade: 6 meses
Água Ultrapura (água MilliQ[®])	Merck [®] Direct-Q 5 Filtro Millipore [®] 0.22µm	Manutenção: 02/2021
Hexilamina	Sigma Aldrich [®] teor > 99%	Lote: S39844 Validade: 08/2017
H₃PO₄ (Ácido fosfórico)	Vetec [®] teor > 85%	Lote: 048666 Validade: 12/2009
2020/1/SM-3	ICE/UNODC amostra especificada no relatório anual SM 1/2020	1462-20
Heroína.HCl	Lipomed [®] pureza 87,92%	Lote: 293B431 Nº: 1571

Tabela 3 - Especificação dos reagentes e solventes utilizados

Materiais utilizados		
Especificações do material		Registro e data da última calibração (SEPLAB/INC/DITEC/PF)
Balões volumétricos	10ml (Pyrex®) 1L (Diogolab®)	10ml (BV-15, BV-16) 1L (BV-55)
Pipetas automáticas volumétricas	P1000uL, P100uL e P10uL (GILSON® Pipetman)	P1000uL (DB52997) Data da última calibração: 04/12/2020 P100uL(DA60598) Data da última calibração: 04/12/2020 P10uL (GD20464) Data da última calibração: 04/12/2020
Filtros para CLAE	Millex® PTFE 0,45µm	Lote: R8KA22668

Tabela 4 - Especificações dos materiais utilizados

4.2 *Screening* do material questionado

Seguindo as diretrizes gerais para realização de identificação de substâncias no âmbito do SEPLAB (POP-I-SEPLAB-19), inicialmente as amostras foram submetidas a um exame físico, constando que todos os materiais apresentavam-se na forma de sólido finamente particulado.

De acordo com formulário de amostragem (FOR-I-SEPLAB-04) foram registradas a pesagem do material recebido e amostragem para as análises, usando balança analítica calibrada.

Descrição	Massa bruta	Nº da amostra no dossiê
1 frasco de vidro âmbar, apresentando etiqueta com os dizeres “2021/1/SM-01”, contendo pó azul.	6.304,96 mg	1462-21-01
1 frasco de vidro âmbar, apresentando etiqueta com os dizeres “2021/1/SM-02”, contendo pó marrom.	6.363,83 mg	1462-21-02
1 frasco de vidro âmbar, apresentando etiqueta com os dizeres “2021/1/SM-03”, contendo pó branco.	6.134,63 mg	1462-21-03
1 frasco de vidro âmbar, apresentando etiqueta com os dizeres 2021/1/SM-04”, contendo pó branco.	5.998,43 mg	1462-21-04

Tabela 5 - Amostragem do material recebido pelo ICE/UNODC. FONTE: Registro geral de análises SEPLAB/INC

4.2.1 Preparação da amostra

A análise qualitativa exploratória foi realizada por meio do uso de três solventes com polaridades diferentes para a extração/solubilização de analitos de interesse forense: MeOH, CH₂Cl₂ e Éter de petróleo. Também foram utilizados dois métodos de análise por CGEM diferentes: Método ‘Split’ e ‘Splitless’ (Tabela 6).

Cada amostra foi fracionada em quantidades iguais e submetida a solubilização com um volume de 2 mL dos diferentes solventes, separadamente. As amostras foram agitadas por 1min. e filtrada com filtros para CLAE.

A solução obtida foi transferida para vials de 2mL de capacidade com tampa de pressão. Cada solução foi analisada por CG/EM, de acordo com os critérios estabelecidos no MET-I-SEPLAB-09, que dispõe sobre as análises qualitativas em CG/EM.

PARÂMETROS CG/EM	MÉTODO ESTENDIDO <i>SPLIT</i>	MÉTODO ESTENDIDO <i>SPLITLESS</i>
FLUXO	0,8mL/min	0,8mL/min
INJETOR	280°C, <i>split</i> (140:1)	280°C, válvula <i>split</i> fechada
FORNO	150°C (2min.) – 40°/min; 315°C (14,87 min.); Total da corrida: 21,0 min.	150°C (2min.) – 40°/min; 15°C (14,87 min.); Total da corrida: 21,0 min.
DETECTOR E.M	Scan (40 – 550 m/z); Solvent Delay; 1,20min.	Scan (40 – 550 m/z); Solvent Delay; 2,05 min.
VOLUME DE INJEÇÃO	0,2 µL	0,2 µL

Tabela 2 - Parâmetros dos métodos 'ESTENDIDO' e 'ESTENDIDO SPLITLESS' em CG/EM. FONTE: Biblioteca SEPLAB/INC/DITEC/PF

As análises em FTIR foram realizadas por meio da transferência da amostra na sua forma direta (ponta de espátula – cerca de 10 mg) ou solubilizada em MeOH (1 mL). Na solubilização em MeOH, o solvente foi evaporado em temperatura ambiente, resultando em um sólido seco.

PARÂMETROS FT-IR
Número de varreduras (SCANS): 16
Janela de coleta: 4.000 cm⁻¹ a 650cm⁻¹
Resolução: 4cm⁻¹

Tabela 3 - Parâmetros do FTIR. FONTE: Biblioteca SEPLAB/INC/DITEC/PF

4.3 Quantificação da heroína

A quantificação foi realizada por técnica de cromatografia por fase reversa com detecção por arranjo de diodos (DAD) (HPLC-RP-DAD). A técnica consiste na separação dos solutos hidrofóbicos em meio da transferência de massa do soluto na solução (meio polar) com a fase estacionária (e suas interações hidrofóbicas). A purificação da heroína ocorre por meio da separação dos compostos presentes na matriz, facilitado pela utilização de uma solução tampão básico, usando detecção espectrofotométrica de sinais em um conjunto de comprimentos de ondas específicos (dados posteriormente relatados). O meio básico tem um papel fundamental, pois a molécula de heroína, inicialmente na forma de sal (heroína.HCl), se altera para forma de base livre, proporcionando a interação hidrofóbica com a coluna e respectiva retenção

A quantificação da heroína foi realizada a partir de uma curva de calibração, cuja a equação da reta proporcionou a estimativa da quantidade de heroína contida no material analisado. Os dados foram analisados por meio de um controle interno do SEPLAB (solução controle 2020/1/SM-3), indicando o desempenho dos resultados. Os dados obtidos são discutidos na Tabela 11. Os padrões analíticos utilizados foram estabelecidos de acordo com as diretrizes de Gestão de Materiais de Referência, que dispõe os procedimentos e critérios para o controle e manejo dos materiais de referência utilizados no SEPLAB/INC/DITEC/PF (POP-I-SEPLAB-15).

4.3.1 Preparação da fase móvel

Foram usadas duas fases móveis, A e B. Para a fase móvel A, foi inserido 30 ml de solução de NaOH [2 mol/L] em um balão volumétrico calibrado de 1L. Em seguida, adicionou-se 10ml de H₃PO₄ concentrado e cerca de 800ml de água Milli-Q®. Por fim, foi adicionado 4,5ml de Hexilamina e o volume restante foi completado com água Milli-Q® para 1L.

4.3.2 Preparação da solução estoque de heroína.H₂O

Em balança analítica, uma massa de 6,58 mg de padrão de Heroína (Material

de Referência Certificado de Heroína.HCl (Anexo 1) foi pesada diretamente em um balão volumétrico calibrado de 10ml.O volume do balão foi ajustado com água Milli-Q® resultando em concentração igual a 0,658mg/ml. O procedimento seguiu o POP-I-SEPLAB-15.

4.3.3 Parâmetros do método de quantificação em CLAE-DAD

Para as análises de quantificação foi utilizado método HEROÍNA_C18PLUS.M, descrito na Tabela 8.

PARÂMETROS CLAE-DAD	MÉTODO HEROÍNA_C18PLUS.M
FLUXO	0,4mL/min
PRESSÃO/TEMPERATURA (max.)	350 bar / 90°C
SOLVENTES	A: 95% (3% NaOH, 1% H ₃ PO ₄ , 4,5 ml Hexilamina); B: 5% (MeOH) em modo isocrático.
DETECTOR DAD	Scan (190nm - 400nm); Sinais específicos: 210nm, 228nm, 240nm.
VOLUME DE INJEÇÃO	5 uL
COLUNA	Zorbax Eclipse PLUS-C18 (21cm x 250nm x 5µm)

Tabela 4 - Parâmetros dos métodos de quantificação HEROÍNA_C18PLUS.M em CLAE-DAD.

4.3.4 Preparo da curva analítica

A curva foi desenvolvida com sete pontos em triplicata (A, B e C). Os pontos da curva foram diluídos usando a solução estoque de padrão de Heroína.HCl de concentração igual a 0,658mg/ml. A diluição foi feita diretamente nos vials, usando pipetas volumétricas automáticas calibradas, descritas na Tabela 4.

Pontos	Volumes _{S.E}	Volume _{H₂O}	[A] mg/ml	[B] mg/ml	[C] mg/ml
1	0,050 ml	0,950 ml	0,0329	0,0329	0,0329
2	0,100 ml	0,900ml	0,0658	0,0658	0,0658
3	0,200 ml	0,800 ml	0,1316	0,1316	0,1316
4	0,250 ml	0,750 ml	0,1645	0,1645	0,1645
5	0,400 ml	0,600 ml	0,2632	0,2632	0,2632
6	0,500 ml	0,500 ml	0,3290	0,3290	0,3290
7	1 ml	-	0,6580	0,6580	0,6580

Tabela 5 - Pontos teóricos da curva analítica em triplicata (A, B e C).

4.3.5 Preparo da amostra e do controle para quantificação

O controle do SEPLAB e a amostra foram preparados em duplicata, (A e B), pesados, em dias diferentes, diretamente em balão volumétrico calibrado de 10ml, com valores iguais. As massas medidas em balança analítica foram A - 11,99 mg e 12,53 mg; B - 9,11 mg e 9,42 mg, respectivamente. O volume dos balões foi ajustado com água Milli-Q®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Screening e identificação do material analisado

Os resultados obtidos foram validados segundo as exigências do SGQ do SEPLAB, o qual exige duas técnicas com poderes discriminatórios diferentes: técnica A –FTIR e EM e técnica B – CG.

A cromatografia gasosa é classificada como técnica tipo B, entretanto, o estabelecimento do tempo de retenção relativo de padrões analíticos comparados aos sinais cromatográficos da amostra e também a comparação de seus espectros de massas com os espectros de massas em banco de dados eletrônicos do equipamento, permite a reclassificação da técnica como tipo A.

Dentre os solventes utilizados, a solução de CH₂Cl₂ obteve melhor resolução nas análises em CG/EM e os sinais cromatográficos com melhor evidência dos picos foram observados no método ‘*Splitless*’.

Os espectros de massas dos sinais cromatográficos da amostra foram obtidos

a partir de buscas em banco de dados eletrônico do SEPLAB/INC. Por meio da comparação *in silico* de espectros do próprio software, foi possível indicar a porcentagem de compatibilidade química das substâncias separadas pela cromatografia. Todas as figuras dos sinais cromatográficos e espectros de massa estão anexadas de forma ampliada no final deste trabalho.

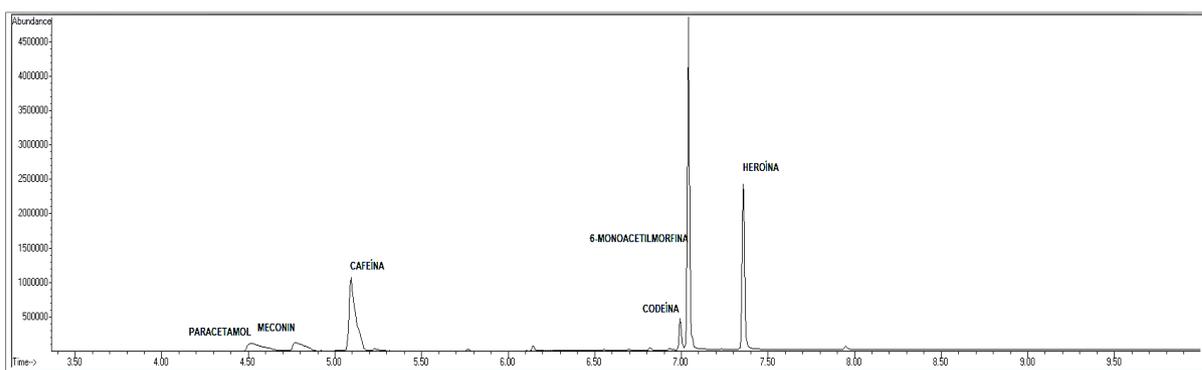


Figura 2 – Sinais cromatográficos resultantes da análise de 2021/1/SM-2(CH₂CL₂) em CG/EM. (Anexo 14)

Os sinais cromatográficos do material analisado comparados com a biblioteca eletrônica de EM do SEPLAB/INC indicaram presença de paracetamol, meconina, cafeína, 6-monoacetilmorfina, heroína(diacetilmorfina) e papaverina (Figura 2). O resultado foi posteriormente confirmado com uso de padrões analíticos para comparação do tempo de retenção.

A figura 3 mostra o espectro de massa gerado para o sinal obtido no tempo de retenção (4,511 min) e a sua comparação com os seus fragmentos de massa do espectro depositado no banco de dados eletrônico, indicando a substância acetoaminofeno (paracetamol). Essa substância apresenta alta importância forense, tendo em vista que seu uso é conhecido e é relacionado a diluição de drogas (ex.: cocaína e heroína) sendo inclusa no grupo denominado de substâncias de corte.

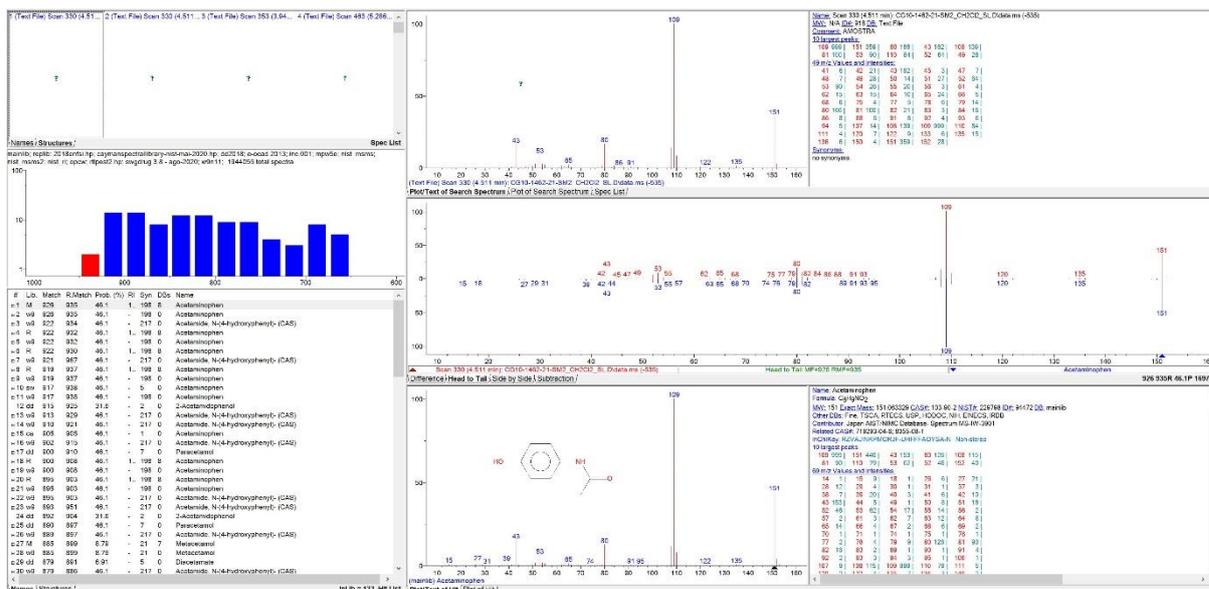


Figura 3 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com paracetamol. (Anexo 7)

Na figura 4, é demonstrado o espectro de massas do sinal cromatográfico correspondente ao tempo de retenção igual à 7,040 min e seus fragmentos, indicando compatibilidade com 6-monoacetilmorfina. Um importante indicador de substância de origem opiácea, mais precisamente da morfina.

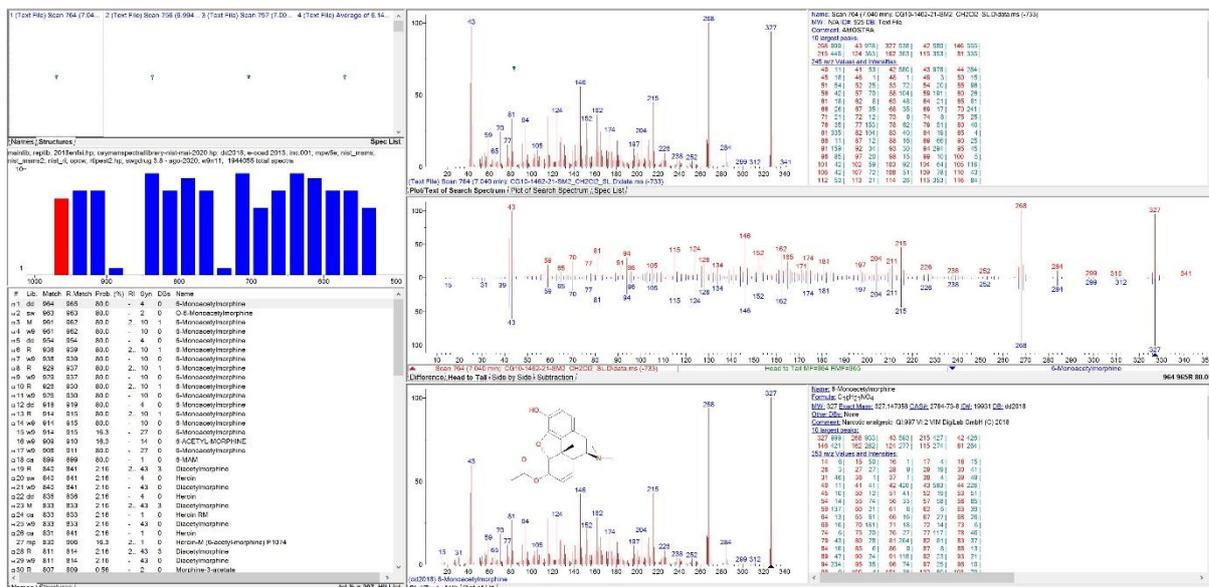


Figura 4 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com 6-monoacetilmorfina (Anexo 9).

A análise do espectro de massas correspondente ao tempo de retenção igual à 5,111 min. é mostrada na figura 5. A comparação com o espectro depositado no

banco de dados eletrônico indica a substância cafeína. A cafeína é uma substância de uso controlado e fiscalizado, tratando-se de uma substância de interesse forense. Seu uso está relacionado com diluição de drogas, assim como o paracetamol citado anteriormente.

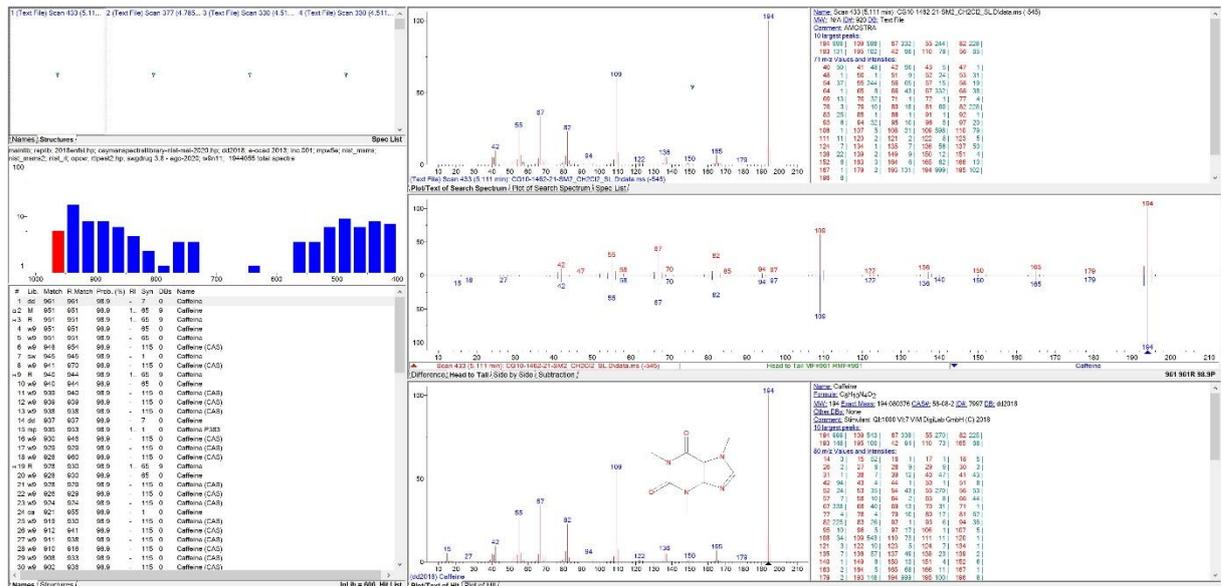


Figura 5 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com cafeína. (Anexo 8)

A figura 6, mostra a comparação do espectro de massas e o resultado de sua comparação com o banco de dados eletrônico para o tempo de retenção 7,950 min., indicando compatibilidade com a substância papaverina. A papaverina é alcaloide opíceo, indicando que a substância provém do ópio.

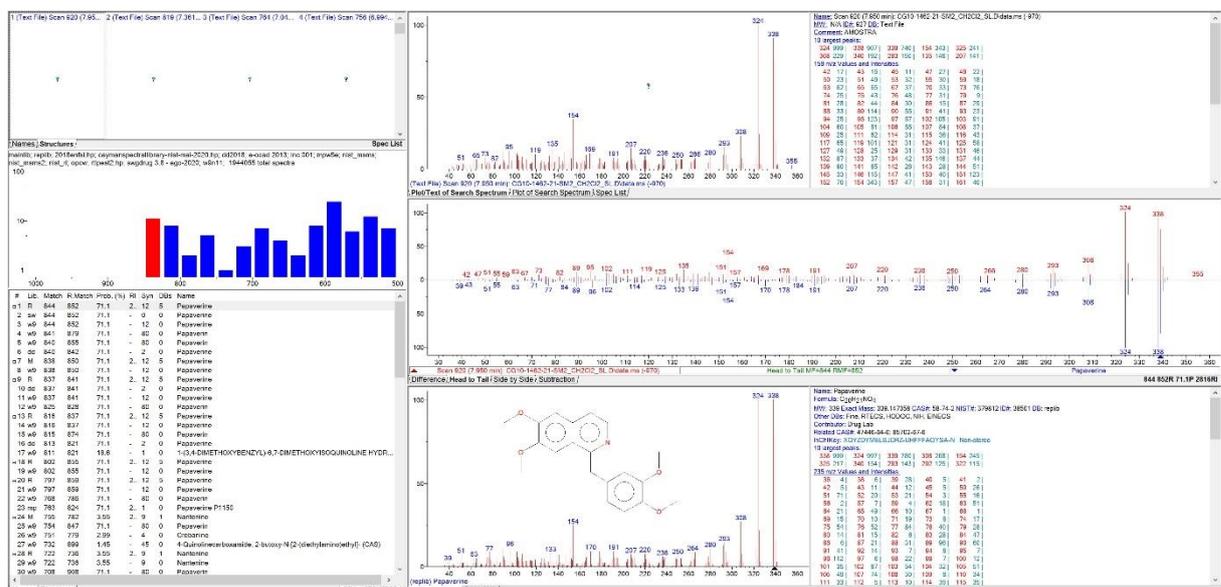


Figura 6 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com papaverina. (Anexo 13)

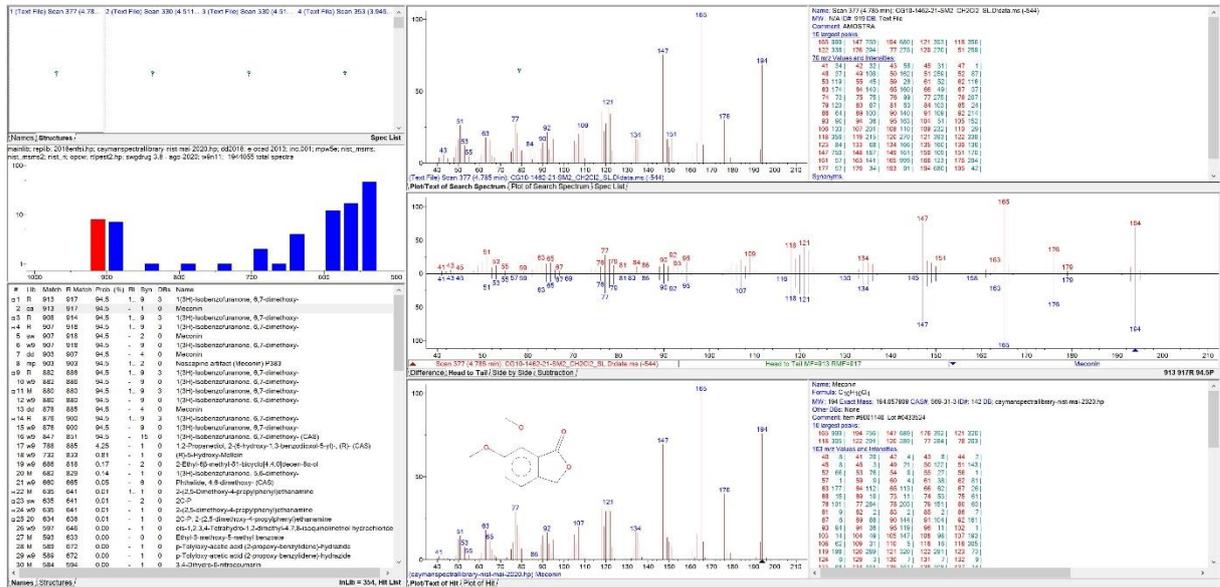


Figura 7 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com meconina. (Anexo 11)

Na figura 7, é mostrado o sinal cromatográfico e seu tempo de retenção (4,785 min.) juntamente com seus fragmentos de massa. Conferindo compatibilidade com meconina, um produto de degradação derivado de alcaloides opiáceos, indicando que a substância provém do ópio.

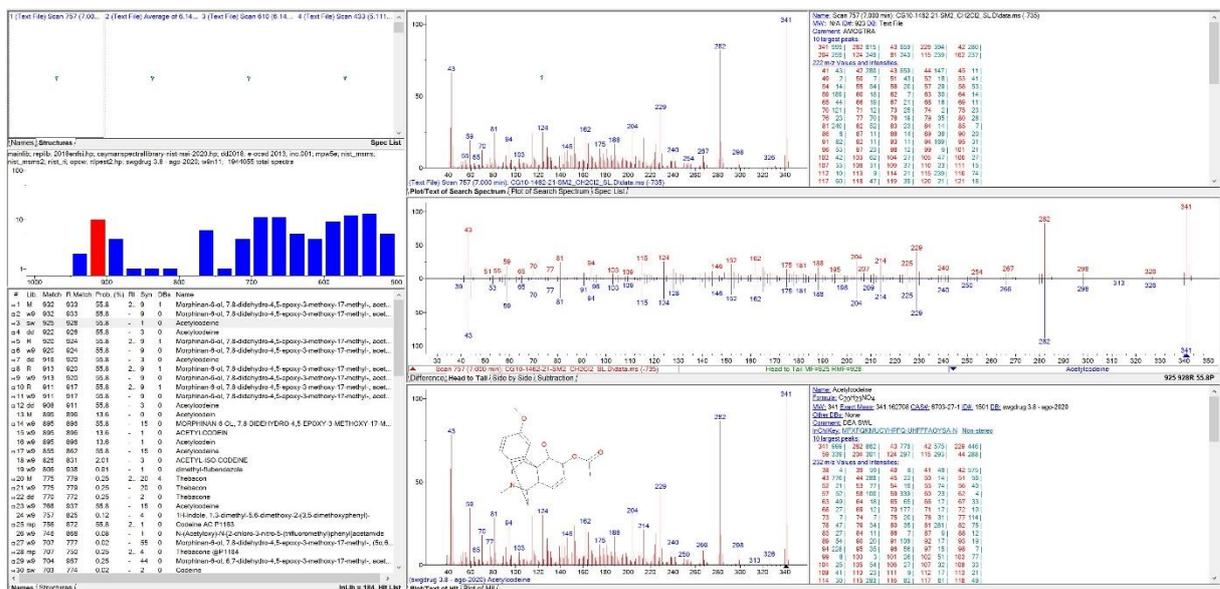


Figura 8 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com acetilcodeína (Anexo 10)

A figura 8 mostra o espectro de massa e sua comparação com o espectro depositado no banco de dados eletrônico para o sinal de tempo de retenção igual à 7,00 min. A comparação mostra a compatibilidade com acetilcodeína. Um produto de degradação da heroína, indicando substância semissintética de origem opiácea.

Os dados apresentados na figura 9 correspondem ao sinal cromatográfico de tempo de retenção do sinal cromatográfico 7,361 min.. A análise *in silico* mostrou compatibilidade com diacetilmorfina (heroína). A heroína é uma substância de uso proscrito no Brasil e em vários países, sendo um alcaloide semissintético usado como droga de abuso.

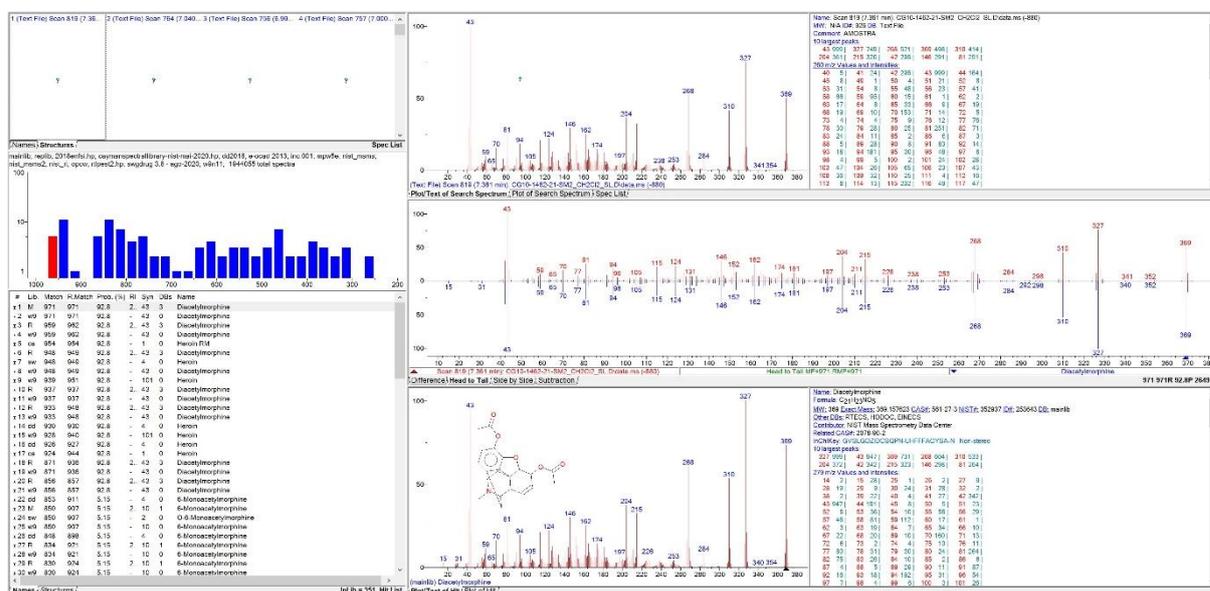


Figura 9 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Compatível com heroína/diacetilmorfina. (Anexo 12)

As análises do pó examinado diretamente sobre o cristal de ATR em espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, resultaram em indicativo de ópio, também por meio da análise *in silico*. A fim de melhorar a resolução do espectro previamente obtido, optou-se por uma extração por solvente utilizando MeOH como extrator. Os resultados obtidos para o extrato resultaram em Heroína.HCl (Cloridrato de Heroína), também por meio da comparação *in silico*, utilizando a biblioteca eletrônica de espectros de FTIR do SEPLAB/INC (Figura 9).

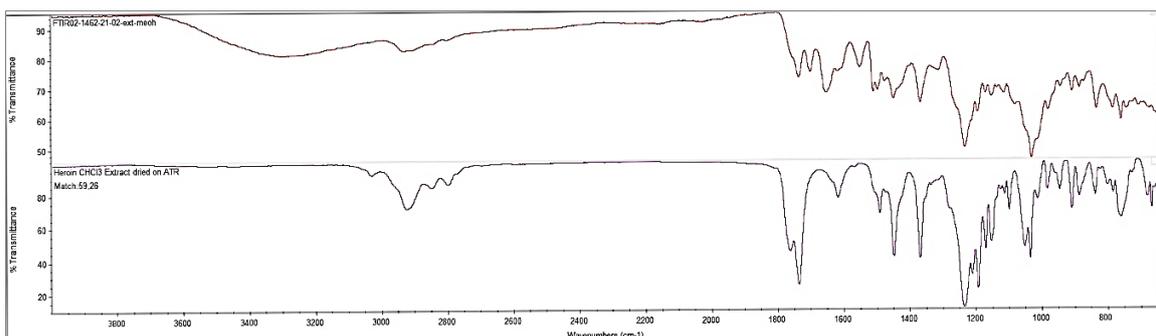


Figura 10 - Comparação do extrato seco da amostra SM-2 (MeOH) com Heroína.HCl

Por fim, a fim de confirmar a presença dessas substâncias descritas nas Figuras 03 a 10, padrões analíticos desses compostos foram examinados sob as mesmas condições de CGEM a fim de estabelecer o tempo de retenção cromatográfico (Tabela 9). Dessa forma, por meio da comparação dos tempos de retenção dos padrões analíticos juntamente com as análises dos espectros de massa dos bancos de dados eletrônicos disponíveis no software de análises do SEPLAB/INC/DITEC, foi possível estabelecer a presença das substâncias previamente relatadas, especificamente, a presença da substância heroína/diacetilmorfina e seus produtos de degradação (6-acetilmorfina e morfina). Ressalta-se que, por falta de padrões analíticos, apenas as substâncias meconina e na papaverina, não foram identificadas segundo esse protocolo, tendo sua presença apenas indicada.

Substâncias	m/z - T _r (min.) (2021/1/SM-2)	m/z - T _r (min.) (padrões)	Erro Relativo (T _r)
Heroína	369 m/z - 7,361	369 m/z - 7,367	-0,08%
Paracetamol	151 m/z - 4,511	151 m/z - 4,557	-1,00%
Cafeína	194 m/z - 5,111	194 m/z - 5,134	-0,44%
6-monoacetilmorfina	327 m/z 7,040	327 m/z - 7,104	-0,09%
Acetilcodeína	341 m/z - 7,00	299 m/z - 6,731	3,99%
Meconina	194 m/z - 4,785	-	-
Papaverina	339 m/z 7,950	-	-

Tabela 10 - Comparação dos tempos de retenção entre os sinais cromatográficos e os padrões analíticos.

Dentre as substâncias encontradas na amostra 2021/1/SM-2, a substância heroína foi quantificada em razão da recomendação expressa no exercício ICE/UNODC.

5.2 Quantificação da heroína

A concentração de heroína – identificada por meio das técnicas descritas anteriormente, foi realizada por meio da curva de calibração estabelecida em CLAE-DAD. A Figura 11 mostra a curva de calibração obtida. Na curva, cada ponto representa uma média dos pontos analisados em triplicata. A curva mostrou-se adequadamente linear, (coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9998$). O coeficiente de determinação obtido por meio da regressão linear da curva (Figura 11) justifica que 99,98% da variância da concentração da amostra é representada no modelo linear obtido, indicando o método utilizado gerou resultados linearmente proporcionais às concentrações do analitos na faixa analítica especificada.

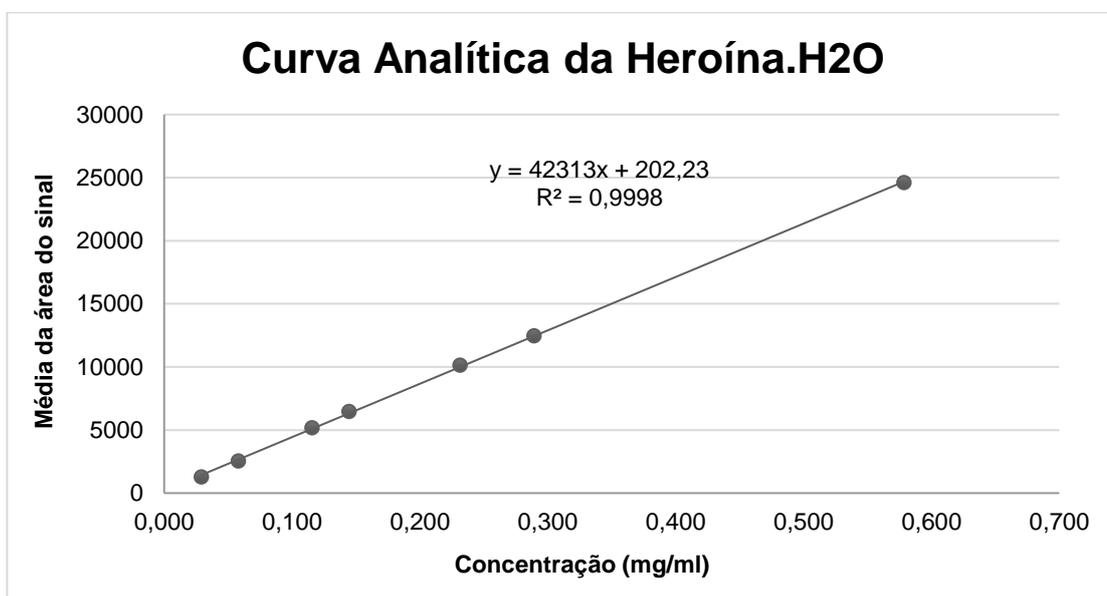


Figura 11 - Curva analítica do padrão de heroína.H2O

O teor de heroína no material analisado foi estabelecido por meio da projeção algébrica, na qual a substituição dos valores na equação representativa da curva analítica, permitiu inferir o teor de heroína na amostra. A Tabela 11 ilustra as concentrações obtidas nos pontos da curva; do controle e da amostra (Tabela 12).

Ponto da curva	Volumes _{s.E} (ml)	[] real (mg/ml)	Área do sinal (média)	[] curva (mg/ml)	Erro relativo	CV
1	0,05	0,029	1277,99	0,025	-12,11%	0,83%
2	0,1	0,058	2533,19	0,055	-4,78%	0,61%
3	0,2	0,116	5175,46	0,117	1,58%	1,70%
4	0,25	0,144	6446,48	0,147	2,04%	0,47%
5	0,4	0,231	10127,20	0,234	1,36%	0,24%
6	0,5	0,289	12462,03	0,289	0,17%	0,40%
7	1	0,578	24589,40	0,576	-0,37%	0,09%

Tabela 11 - Dados obtidos a partir da média dos pontos da curva analítica.

A exatidão da curva analítica foi verificada por meio da solução controle 2020/1/SM-3 - amostra proveniente do ICE/UNODC I/2020 de concentração conhecida (amostra analisada e não quantificada no primeiro semestre de 2020 no SEPLAB/DPER/INC/DITEC/PF). Essa amostra continha heroína e outros componentes já elucidados, mas não quantificados no SEPLAB. Sua concentração foi declarada no Relatório Anual SM 2020/1 do ICE/UNODC e tomada como parâmetro de exatidão analítica para o experimento.

A robustez do experimento foi testada por meio da pesagem em dias diferentes tanto do controle quanto da amostra 2021/1/SM-2A. A Tabela 11 relata os resultados da quantificação da amostra 2021/1/SM-2 e do controle.

Os resultados qualitativos e quantitativos foram relatados em formulário online fornecido pelo ICE/UNODC. Os formulários continham um campo para a descrição das substâncias identificadas por meio do *screening* (Anexo 2); um formulário de identificação (Anexo 3) e um formulário de quantificação (Anexo 4). Após a submissão dos resultados, dois relatórios de resultados foram disponibilizados aos participantes do exercício, de forma individual, contendo a avaliação dos testes qualitativos e quantitativos (ANEXO 5 e 6).

		Massa _(mg)	Área do pico	[] real (%)	[] média	CV	S
Controle	2020/1/SM-3A	12,53	110555	20,814	20,76 %	0,32 %	0,32
	2020/1/SM-3B	12,00	105406	20,720			
Amostra	2021/1/SM-2A	9,42	2975	6,957	7,38 %	8,13 %	0,60
	2021/1/SM-2B	9,11	3211	7,806			

a) Ressalta-se aqui uma discrepância entre o valor apresentado na Tabela 11 e o valor relatado no formulário fornecido para a resposta do exercício (discutido posteriormente e mostrado no Anexo 6). No relatório o valor do teor de heroína submetido foi de 6,96%. Essa discrepância se deu em virtude da correção de dados da tabela de quantificação realizada após a submissão do resultado. Em virtude do prazo para a submissão dos dados obtidos, o valor não pode ser corrigido e a discrepância foi comunicada à coordenação do exercício ICE/UNODC por meio de mensagem eletrônica oficial encaminhada pela direção do SEPLAB/DPER/INC/DITEC/PF.

Tabela 12 - Dados da amostra 1/2021/SM-2 e do controle 2020/1/SM-3

6. CONCLUSÕES

Nas análises qualitativas (*screening*) realizadas no SEPLAB/INC foram identificadas as substâncias cafeína, heroína e paracetamol, 6-acetilmorfina, acetilcodeína, narcotina, e traços de morfina e papaverina, substâncias de uso controlado e/ou proscrito no Brasil, de acordo com a portaria nº 344/1998. Todos esses constituintes foram observados com exceção da narcotina e acetilcodeína, por falta de padrões internos para tais substâncias e também de sensibilidade do método utilizado. Diante disso, apenas cafeína, heroína e paracetamol foram confirmados com o uso de padrão interno.

O relatório anual ICE/UNODC 2021/1 indicou a convergência dos resultados encontrados no SEPLAB/INC/DITEC/PF e as substâncias relatadas pelo ICE/UNODC, confirmando a correspondência dos resultados com o esperado no exercício.

A partir da análise do resultado quantitativo, foi possível indicar uma boa exatidão do método utilizado, visto que os coeficientes de variação se encontram abaixo de 10% (8,3%), em conformidade com os requisitos de validade dos resultados do SEPLAB/INC/DITECPF (POP-I-SEPLAB-5) - valor de aceitação de CV (%) deve ser igual ou inferior a 10%.

A amostra 2021/1/SM-2 apresentou teor de 7,38 % com desvio padrão de 0,60 e CV de 8,13%. Comparado ao teor preliminar estabelecido no relatório do ICE/UNODC (8,6%), os resultados obtidos encontram-se dentro do parâmetro aceitável para o exercício, indicando que a metodologia de quantificação adotada nos laboratórios da Polícia Federal é confiável e reproduzível.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1) ELBARDISY, H. M. et al. Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection. **Analytical Methods**, v. 11, n. 8, p. 1053–1063, 2019.
- 2) FLORIANE, G. et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. **Forensic Science International**, v. 235, p. 32–39, 2014.
- 3) GUO, Z. et al. Isolation and purification of heroin from heroin street samples by preparative high performance liquid chromatography. **Forensic Science International**, v. 221, n. 1-3, p. 120–124, 2012.
- 4) Diacetilmorfina, **ChEMBL** (Chemical – European Molecular Biology) Laboratory, 2018. **Compound: DIACETYLMORPHINE**. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL459324/> Acesso 01 de Out 2021.
- 5) Heroin drug profile, **EMCDDA** (European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction), Disponível em: <https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/heroin_en> Acesso 01 de Out 2021.
- 6) SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. et al. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2006
- 7) SILVA, D. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para identificação e quantificação de alcalóides minoritários em amostras de cocaína por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID)**. Tese (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade de Brasília. Brasília, p. 107, 2016.

- 8) OLIVEIRA, F. H.. **Consolidação de análise cromatográfica e aplicação de ferramentas quimiométricas à análise de alcalóides minoritários em amostras reais de cocaína**. Tese (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade de Brasília. Brasília, p. 125, 2018
- 9) OSHITA, D.; JARDIM, I. C. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multiresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1273-1281, 2015.
- 10) HÄDENER, M.; KÖNIG, S.; WEINMANN, W. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. **Forensic Science International**, v. 299, p. 142–150, 2019.
- 11) PATEL, B.; WENE, D.; FAN, Z. (T. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 146, p. 15–23, 2017.
- 12) BURNIER, C.; ESSEIVA, P.; ROUSSEL, C. Quantification of THC in Cannabis plants by fast-HPLC-DAD: A promising method for routine analyses. **Talanta**, v. 192, p. 135–141, 2019.
- 13) CIOLINO, L. A.; RANIERI, T. L.; TAYLOR, A. M. Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. **Forensic Science International**, v. 289, p. 438–447, 2018
- 14) HART, I. M. B.-T.; OHANA, D.; VENHUIS, B. J. Current challenges in the detection and analysis of falsified medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 197, p. 113948, 2021.
- 15) **European drug report: trends and developments 2020**. Tradução. [s.l.] Publications Office of the European Union, 2020.
- 16) BOURMAUD, A. et al. Investigation on heroin and cocaine quality in Luxembourg. **Harm Reduction Journal**, v. 18, n. 1, 2021.

- 17) Acreditação de Laboratórios (ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005). **INMETRO**. Disponível em: <http://www.gov.br/inmetro/pt-br/assuntos/acreditacao>. Acesso em: 01 de set de 2021.
- 18) UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2021**. Disponível em < <https://www.unodc.org/unodc/data-and-analysis/wdr2021.html> >. Acesso em: 01 out 2021.
- 19) MAIA, L. O.; DALDEGAN-BUENO, D.; FISCHER, B. Opioid use, regulation, and harms in Brazil: a comprehensive narrative overview of available data and indicators. **Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2021.
- 20) United Nations Of Drugs And Crime. **International Collaborative Exercises: Drug Analysis**, 2021. Disponível em< <https://www.unodc.org/LSS/Home/ICE> >
- 21) Protocol to the International Collaborative Exercises within the International Quality Assurance Programme, **United Nations International Drug Control Programme**, V.98-55524 (E), 2014.
- 22) GARRIDO G. R.; ARAUJO K. Sistemas de Gestão da Qualidade em Laboratórios de Genética Forense. **Espacios** v. 35, n. 5, p. 3-11, 2014
- 23) MULLEN, C. **Quality Assurance of forensic investigations in toxicology and traffic safety**. 2014. Tese (Doutorado) – Curso de Filosofia, Universidade de Glasgow, Glasgow, 2014.
- 24) BASTOS, F. I. et al. (Org.). III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. Rio de Janeiro. FIOCRUZ/ICICT. p. 528, 2017.
- 25) BASTOS, F. I.; COUTINHO, C.; TOLEDO, L. Epidemiologia do uso de substâncias psicoativas no Brasil. – Textos para Discussão. Rio de Janeiro.

Fundação Oswaldo Cruz, n. 39, p. 27, 2019.

- 26) CAVALCANTI, Rafael Christofoli. Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida e gasosa: sua aplicação nas ciências forenses. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2016.
- 27) NAHAR, L.; ONDER, A.; SARKER, S. D. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 413-457, 17 dez. 2019.
- 28) GROCHAU, I. H.; CATEN, C. S. T. FORTE, M. M. C. Current American landscape in laboratory accreditation according to ISO/IEC 17025. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, Germany, v. 22, n. 2, p. 57-62, 2017.
- 29) SERRANO, J. P. A. **Caracterização e quantificação de novas substâncias psicoativas por ressonância magnética nuclear**. Tese (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade de Brasília. Brasília, p. 134, 2019.
- 30) FERREIRA, A. G. Química Forense e técnicas utilizadas em resoluções de crime. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 02, n. 5, p. 44, 2016.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Especificações do MRC Heroína.HCl utilizado para padrões utilizados



SPECIFICATIONS AND CERTIFICATE OF ANALYSIS

Lipomed Document QC-CA-29HC
Version 008-04.Sep.2008

Supersedes: 007-09.Jun.2008

Chemical name:	Heroine.HCl 3,6-Diacetylmorphine.hydrochloride	
CAS Registry Nr:	1502-95-0	
Chemical formula:	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅ Hydrochloride	Molwt: 369.42 405.88
Lot No: 29.3B37.1 Art. Nr. M-29-HC		Retested: 09.06.2008 Retest date: 06/2013

TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS
1. Appearance	white to off-white crystalline powder	conforms
2. Identity	IR UV: in nanopure water $\lambda_{\max} = 278.0 \pm 1.0$ nm $\epsilon_{\text{mol}} = 1700 \pm 200$ Melting point: > 225 °C	IR corresponds UV: in nanopure water $\lambda_{\max} = 278.4$ nm $\epsilon_{\text{mol}} = 1595$ > 225 °C
3. Purity	HPLC > 98.5 % The purity is calculated from the distribution of 6 HPLC analyses with a 95% level of confidence.	98.870 ± 0.057 %
4. Optical rotation	$[\alpha]_D^{25} = -151 \pm 5$ ° (c = 1.0 in nanopure water)	$[\alpha]_D^{25} = -152.8$ ° (c = 1.0 in nanopure water)
5. Free base content (Corrected from purity and water)	> 79.6 %	90.0 %
6. Water content	Karl Fischer < 10 %	0.3 %
7. Calculated hydrochloride content		9.0 %

FOR ANALYTICAL PURPOSES ONLY: NOT FOR HUMAN USE!

The material should be stored at +2 to +8 °C in a dry and cool area in a closed container. Lipomed certifies that the identity and chemical purity of this reference standard is based on exhaustive analytical tests. Gravimetric preparation of this bulk standard is ensured by using balances calibrated with iac-MRA traceable weights.

QC - Officer: Deputy: Dr. L. Prévot

Date sign: Arlesheim,

04. SEP. 2008

Anexo 2 - Formulário de *Screening* da Substância Questionada

Analytical results, part one: screening

(A = absent; P = present; ANP = analysis not performed)

Group	Analytical technique code ^e	Cut-off group	Sample code			
			--/BS-1	--/BS-2	--/BS-3	--/BS-4
Opiates	---	----	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Cannabinoids	---	----	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Cocaine and/or metabolites	---	----	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Amphetamine-type stimulants	---	----	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Benzodiazepines	---	----	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Barbiturates	---	----	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP

^eFor each group of substances, insert the appropriate analytical technique code from the list on page 26.

Anexo 3 - Formulário Identificação da Substância Questionada

Analytical results, part two: identification/confirmation

(A = substance absent; P = substance present; ANP = analysis not performed)

Substance	Analytical technique codes ^a		Sample code			
			--/BS-1	--/BS-2	--/BS-3	--/BS-4
Morphine and/or metabolites	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Codeine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
O ⁶ -monoacetylmorphine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxylic acid	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Benzoylcegonine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Methylecgonine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Amphetamine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Methamphetamine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Tenamphetamine (MDA)	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
N-ethylmethylenedioxy-amphetamine (MDEA)	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine (MBDB)	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP

Substance	Analytical technique codes ^a		Sample code			
			--/BS-1	--/BS-2	--/BS-3	--/BS-4
Phenylpropanolamine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Diazepam	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Nordiazepam	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Oxazepam	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Temazepam	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
7-amino flunitrazepam	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Phenobarbital	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Ephedrine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP
Procaine	---	---	A P ANP	A P ANP	A P ANP	A P ANP

^aFor each substance, insert the appropriate analytical technique code from the list on page 26.

Anexo 4 - Formulário Quantificação da Substância

Analytical results, part three: quantification
(ng/ml)

Substance	Analytical technique code ^a	Sample code			
		--/BS-1	--/BS-2	--/BS-3	--/BS-4
Free morphine	---	-----	-----	-----	-----
Total morphine	---	-----	-----	-----	-----
Codeine	---	-----	-----	-----	-----
<i>O</i> ⁶ -monoacetylmorphine	---	-----	-----	-----	-----
11-nor- Δ^9 -THC-9-carboxylic acid	---	-----	-----	-----	-----
Benzoylcegonine	---	-----	-----	-----	-----
Methylecgonine	---	-----	-----	-----	-----
Amphetamine	---	-----	-----	-----	-----
Methamphetamine	---	-----	-----	-----	-----
Tenamphetamine (MDA)	---	-----	-----	-----	-----
3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)	---	-----	-----	-----	-----
<i>N</i> -ethyl-methylenedioxy-amphetamine (MDEA)	---	-----	-----	-----	-----
<i>N</i> -methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine (MBDB)	---	-----	-----	-----	-----
Phenylpropanolamine	---	-----	-----	-----	-----
Diazepam	---	-----	-----	-----	-----

Substance	Analytical technique code ^a	Sample code			
		--/BS-1	--/BS-2	--/BS-3	--/BS-4
Nordiazepam	---	---	---	---	---
Oxazepam	---	---	---	---	---
Temazepam	---	---	---	---	---
7-Flunitrazepam	---	---	---	---	---
Phenobarbital	---	---	---	---	---

^aFor each substance, insert the appropriate analytical technique code from the list on page 26.



UNODC

United Nations Office on Drugs and Crime

INTERNATIONAL QUALITY ASSURANCE PROGRAMME (IQAP)
INTERNATIONAL COLLABORATIVE EXERCISE (ICE)

2021

Round Code: **TROTAG**

Lab Code: **560**

Seized Material (SM) Group

Test Samples Round: 1

EVALUATION OF ANALYTICAL RESULTS:

Test Samples	Sample Composition	Laboratory Results	Comments	Remarks
2021/1/SM-1	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA)	+	right	
2021/1/SM-2	Caffeine	+	right	
2021/1/SM-2	Heroin	+	right	
2021/1/SM-2	Paracetamol (Acetaminophen)	+	right	
2021/1/SM-3	N-ethylorphenylone	+	right	
2021/1/SM-4	Etizolam	+	right	

Test Samples	Comments on samples
2021/1/SM-1	SM-1 was prepared from a seizure containing 16.3% MDMA base.
2021/1/SM-2	SM-2 was prepared from a seizure containing 8.6% (w/w) Heroin base. The test sample also contained 6-acetylmorphine, acetylcodeine, caffeine, narcotine, paracetamol and trace amounts of morphine and papaverine
2021/1/SM-3	SM-3 was prepared from a seizure containing Ephylone.
2021/1/SM-4	SM-4 was prepared from a sample of Etizolam.

EXPLANATORY NOTE

Test samples: the code number of the sample tested

Laboratory results: the results reported by your laboratory

"+" = positive, analyte is identified

"-" = negative, analyte is not identified

ANP = analysis not performed

Comments: evaluation of results considering the main analytes in the test samples

right = analyte found

wrong = analyte not found or false positive

Anexo 6 – Relatório de Quantificação - Quantification Report ICE/UNODC 1/2021



UNODC

United Nations Office on Drugs and Crime

INTERNATIONAL QUALITY ASSURANCE PROGRAMME (IQAP) INTERNATIONAL COLLABORATIVE EXERCISE (ICE)

2021

Round Code: **TROTAG**

Lab Code: **560**

Seized Material (SM) Group

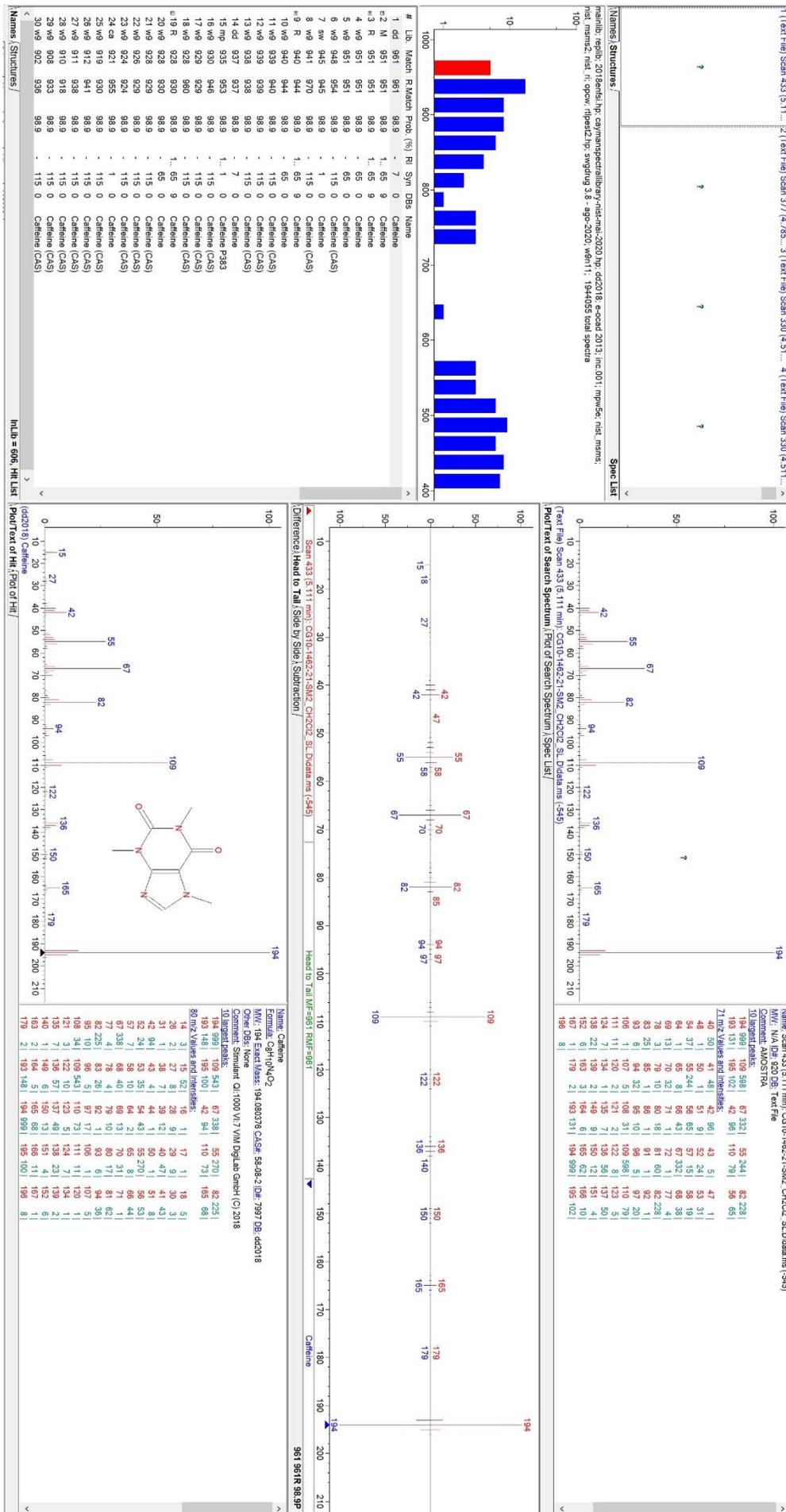
Test Samples Round: 1

RESULTS OF QUANTITATIVE ANALYSIS:

Test Samples	Sample Composition	Quantity (mass % (w/w))	Comments	Your laboratory results
2021/1/SM-1	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA)	16.3 %		15.3 %
2021/1/SM-2	Heroin	8.6 %		6.96 %

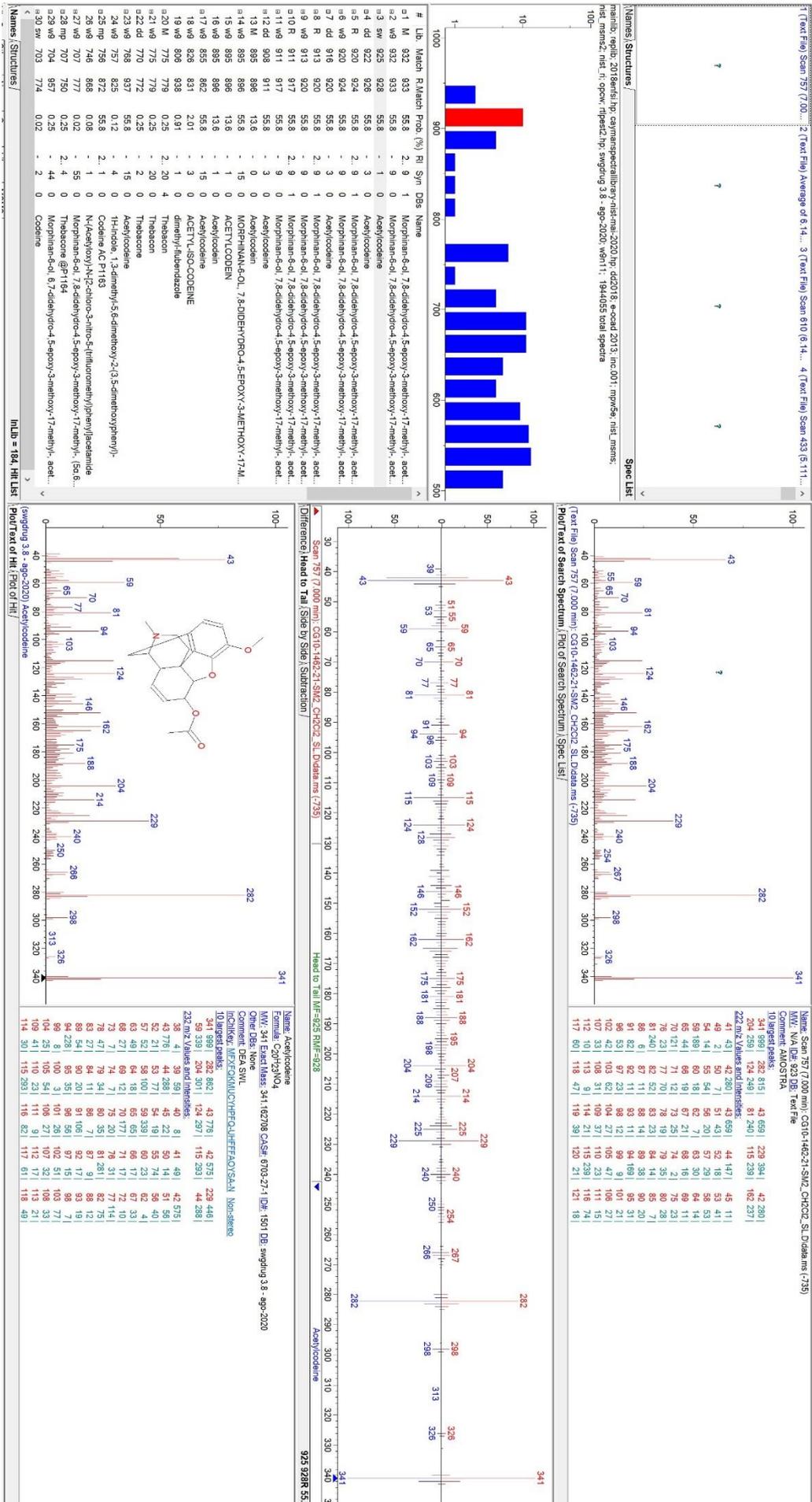
28 Jul 2021

Anexo 8 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Cafeína.

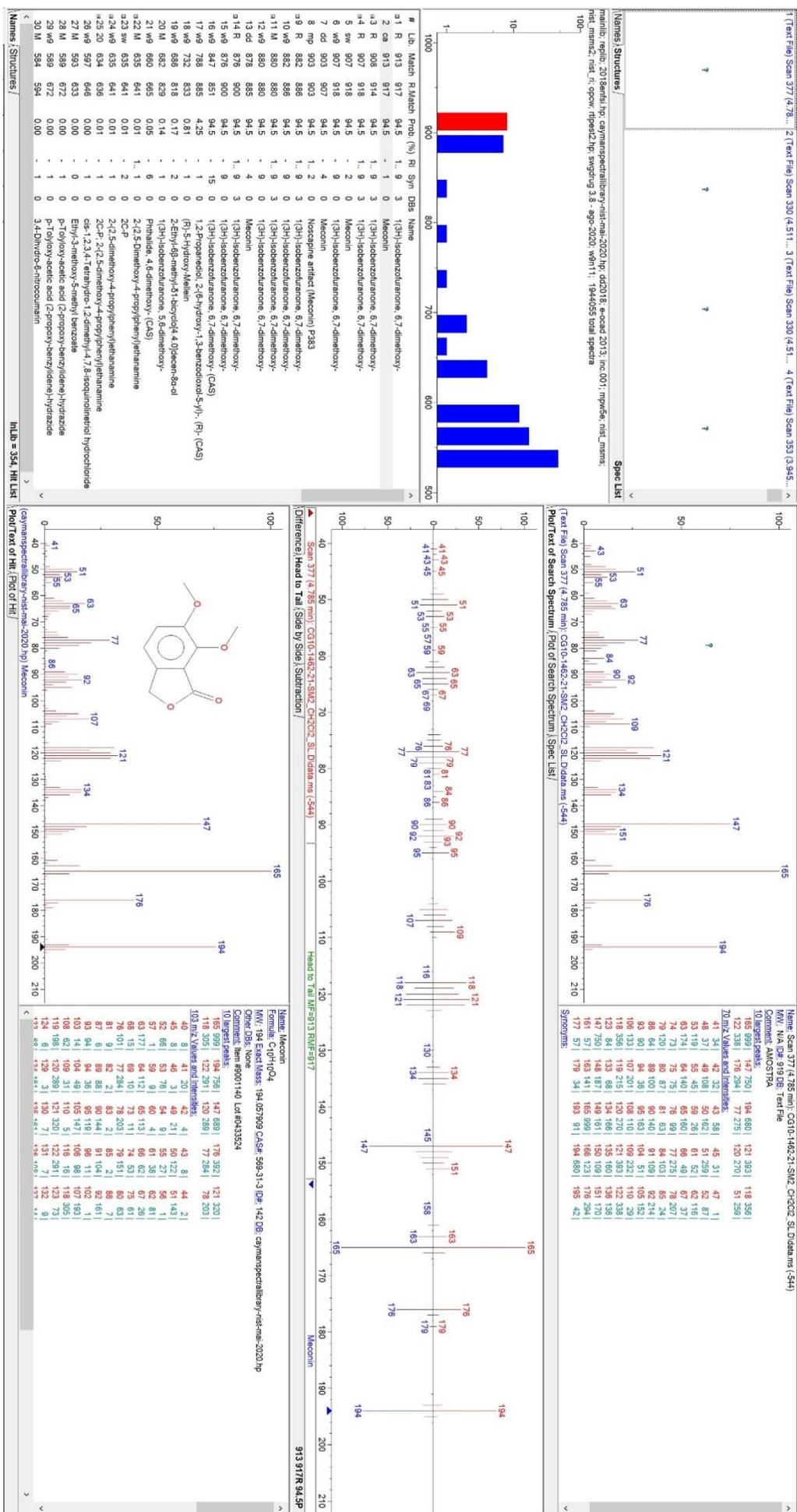


Anexo 10 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2.

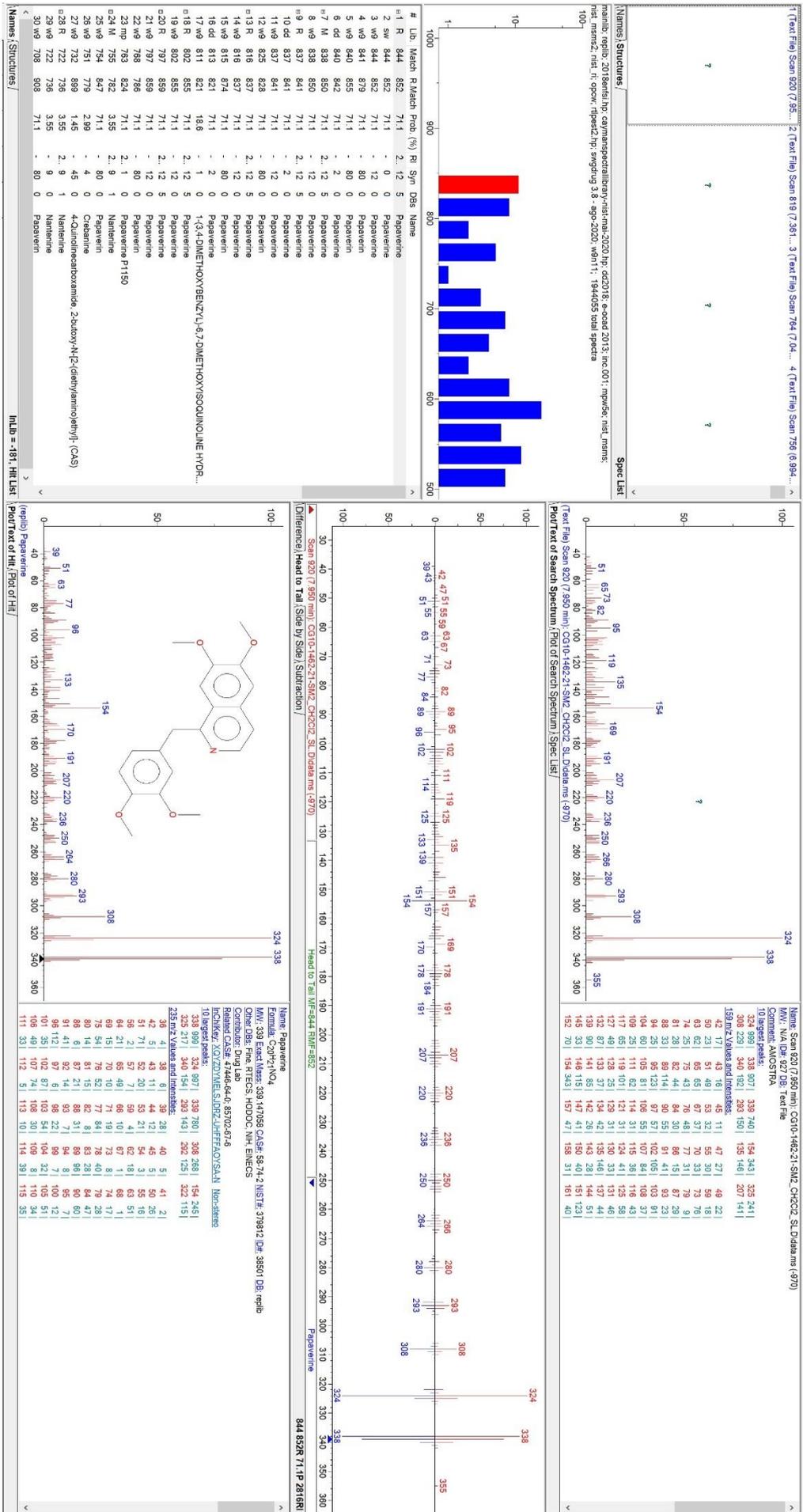
Acetilcodeína



Anexo 11 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Meconina



Anexo 13 - Espectro de massas resultante da análise da amostra 2021/1/SM-2. Papaverina



Anexo 14 - Sinais Cromatográficos da amostra 2021/1/SM-2 em CG/EM. CH₂CL₂ método *splitless*.

