

A TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA A GÁS ADEQUADA PARA FINS INVESTIGATIVOS DE ANÁLISES FORENSES

HENGLES, Gabriela Milanez; SANTOS, Cleberson Williams
Gabrielahengles@hotmail.com
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa Oswaldo Cruz

Resumo: *O aumento do uso de drogas de abuso e seu uso indiscriminado tem se tornado um problema de magnitude mundial, dessa forma, vários estudos científicos para a caracterização química vem sendo desenvolvidos como forma de investigação de análises forenses. No Brasil a Polícia Federal implementou em 2005 o projeto Perfil Químico de Drogas que tem como meta implementar uma base de dados que correlaciona ao perfil químico da droga. O desenvolvimento de metodologias analíticas para identificação e quantificação de drogas de abuso é de grande importância na química forense, uma vez que, podem ser utilizados na produção de provas materiais ou na obtenção de dados de inteligência. O objetivo do trabalho é realizar uma revisão bibliográfica sobre o desenvolvimento de metodologias analíticas para a identificação e quantificação de drogas de abuso utilizando cromatografia gasosa.*

Palavras-chave: *Cromatografia gasosa. Drogas de abuso. Validação. Análise forense.*

Resume: *The increase in the use of drugs of abuse and their indiscriminate use cause a problem of worldwide magnitude, thus, several scientific studies for the chemical characterization that has been explored as a way of investigating forensics. In Brazil, the Federal Police implemented in 2005 the Chemical Drug Profile project, which aims to implement a database that lists the chemical profile of the drug. The development of analytical methodologies for the identification and quantification of drugs of abuse is of great importance in forensic chemistry, since it can be used in the production of evidence of materials or in intelligence data. The objective of the work is to carry out a bibliographic review on the development of analytical methodologies for the identification and quantification of drugs that use gas chromatography.*

Keywords: *Gas chromatography. Abuse drugs. Validation. Forensic analysis.*

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos o consumo excessivo de drogas de abuso como, álcool, maconha, cocaína, entre outras, tornou-se crescente como uma maneira das pessoas buscarem efeitos psicoativos recreativos, sem indicação médica, a ponto de causar dependência física ou psicológica (UHART, 2009).

Os danos causados pela autoadministração se tornou um dos grandes problemas de saúde pública, social e econômica. Pesquisas mostram que pessoas dependentes de substâncias psicoativas são mais suscetíveis a cometerem crimes (SHBAIR E LHERMITTE, 2010).

A maioria das drogas de abuso tratam-se de substâncias desencadeadoras de sensações agradáveis ou eliminação de sensações desagradáveis que atuam no sistema nervoso central (SNC) e alteram o estado de consciência (ABRAMS, 2006; BRAUN, 2007).

De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas do escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC, 2015) o consumo de cocaína tem crescido no Brasil, tornando-o o maior mercado consumidor na América do Sul. Conforme o estudo o número de apreensões de cocaína no Brasil chegaram a quarenta toneladas em 2013.

O relatório também estima que 5,2% da população mundial entre 15 e 64 anos tenham feito uso pelo menos uma vez no ano de 2011 de drogas ilícitas pertencentes aos grupos de cocaínicos, anfetamínicos, canabinoides ou opioides.

A cromatografia gasosa tem sido a técnica mais utilizada para a determinação e quantificação de produtos e impurezas de drogas ilícitas, tendo sido essencial em diversos procedimentos operacionais em laboratórios de ciências forenses.

Em 1988 Lebelle e colaboradores descreveram um dos primeiros trabalhos sobre o perfil químico da cocaína através da comparação de amostras provenientes de apreensão pela polícia por CG-EM e CLAE-UV. Casale e Waggoner, em 1991, também caracterizam amostras de cocaína empregando método baseado em CG-DIC e CG-EM.

Diante da alta da criminalidade a análise de substâncias ilícitas por cromatografia gasosa vem tornando-se cada vez mais essencial, visto que, identificam e separam de maneira precisa e específica os compostos químicos, além de ser rápida e apresentar elevada sensibilidade na análise de amostras complexas (GALINDO, 2010).

O objetivo desse estudo é realizar um levantamento bibliográfico sobre o emprego da técnica de cromatografia gasosa para a detecção de drogas de abuso, como álcool, maconha, ecstasy e cocaína. Também será realizado uma análise crítica para avaliar se os métodos propostos são aprovados conforme os parâmetros estabelecidos para a validação analítica.

Dessa forma, esse trabalho tem por finalidade discorrer sobre o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas de cromatografia gasosa utilizada na Química Forense.

1.1 Histórico de análise em cromatografia gasosa

Por volta dos anos 1960 surgiram os primeiros trabalhos relatando as tentativas de redução do tempo de análise em cromatografia gasosa (CG), com a utilização de colunas empacotadas. Porém, umas das dificuldades encontradas estava no fato de que as colunas eram preenchidas com partículas de diâmetro relativamente grande, e desta forma, para separações mais rápidas exigiam-se condições drásticas de pressão.

Em 1957 Golay introduziu as colunas capilares, o que levou a obtenção de cromatogramas com melhor resolução. Porém, os equipamentos existentes deveriam passar por uma série de adaptações o que dificultava muito o amadurecimento da prática.

O surgimento de novas fases estacionárias fez com que aos poucos os problemas de resolução cromatográfica fossem resolvidos, sendo que no início dos anos 80 ela já estava consolidada. Com o avanço no desenvolvimento de novos softwares para o tratamento dos dados cromatográficos, novas fases estacionárias e a modernização dos cromatógrafos, os estudos acadêmicos para aumentar a velocidade de análise em CG se tornaram viáveis.

Visando aumentar a produtividade para a realização de análises através do crescimento do número de amostras a serem analisadas em um curto período de tempo a cromatografia gasosa passou a ser tendência nas análises de rotina.

Em um artigo publicado em 1985 Leclercq e Cramers apresentaram resultados relacionados à otimização da técnica, neste estudo os autores discorrem detalhadamente a minimização do tempo de análise com um número mínimo de pratos teóricos requeridos.

A partir dos estudos de Leclercq e Cramers verificou-se que os três pilares da separação rápida são: Características da coluna conforme a natureza das substâncias a serem determinadas, alta velocidade do gás de arraste e uso de colunas com comprimentos menores e explorar alternativas para reduzir o tempo de análise, mantendo a resolução mínima aceitável.

2 METODOLOGIA

O estudo fará levantamento de informações de pesquisas primárias, como artigos, relatórios técnicos, projetos de conclusão de curso, assim como secundárias, como exemplo os livros relacionados ao assunto. A finalidade é formar um histórico sobre o tema apresentando as contradições e dificuldades encontradas. Artigos de revisão, artigos científicos e capítulos de livros foram analisados, selecionados e utilizados na elaboração da revisão.

As referências que serão apresentadas neste trabalho foram encontradas na ferramenta de pesquisa *Google* acadêmico, assim como na biblioteca eletrônica *Scientific Electronic Library Online- SCIELO* através da pesquisa pelas seguintes palavras: análises forenses, cromatografia gasosa, entorpecentes, drogas de abuso e validação analítica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram utilizados 13 (treze) bibliografias, sendo 1 (um) artigo publicado em revista e 12 (doze) dissertações de mestrados e doutorados publicados entre 2008 à 2018 para a pesquisa de métodos de desenvolvimento e validação analítica propostos para análises de drogas ilícitas por cromatografia gasosa. Os trabalhos estudados discorriam sobre diferentes substâncias de pesquisa e amostras diversificadas de drogas estimulantes, depressoras e perturbadoras. A cromatografia gasosa mostra-se eficaz para análises desses compostos pois é precisa, sensível e rápida.

Para garantir que um método analítico é adequado e confiável e que apresenta evidências objetivas para um determinado uso, este deve ser submetido ao processo de validação. Dentre os parâmetros que se aplicam à validação de análises químicas forenses estão: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção, limite de quantificação e robustez.

De acordo com os resultados obtidos a partir da validação, a pesquisa realizada por Camargo (2008) mostrou que a cromatografia gasosa é apropriada para a determinação de Canabidiol em amostras de plasma humano coletadas de pacientes com transtorno de ansiedade. Já Silva (2016) ressaltou em seus resultados que o método para identificação e quantificação dos alcaloides minoritários anidroecgonina metil éster, anidroecgonina, metilecgonina, tropacocaína, norcocaína, N-formilcocaína, trimetoxicocaína, ecgonina, benzoilecgonina e trans-cinamoilcocaína em amostras de cocaína base ou sal cloridrato apresenta boa linearidade, exatidão e precisão adequada, além de ser robusto diante de pequenas variações aplicadas nos parâmetros de CG.

Segundo a pesquisa realizada por Almeida (2016) o método analítico desenvolvido para quantificação de MDMA em comprimidos de ecstasy foi validado através dos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação. Para Bairros (2014) o desenvolvimento de métodos de CG para identificação de drogas da classe dos benzodiazepínicos em amostras de urina demonstrou ser uma técnica de baixo custo e versátil, assim como, Pantaleão (2012) que também ressalta a sensibilidade, rapidez e praticidade da aplicação em laboratórios forenses.

Para Goulart (2012) a cromatografia gasosa é precisa e exata para a quantificação de teores de cocaína, além de poder analisar todas as formas de cocaína em um mesmo método.

Os trabalhos analisados avaliaram os seguintes parâmetros de validação: especificidade, precisão, recuperação, linearidade, robustez, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), repetibilidade e adequação do sistema.

Um dos primeiros parâmetros exploratórios que devem ser avaliados durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica é a seletividade ou especificidade, que é quando um método consegue separar e identificar o analito na presença de outros componentes que se esperam estar presentes.

De acordo com Silva (2016) e Camargo (2008) em geral avalia-se a seletividade de um método analítico através da presença de outros picos na região do analito de interesse. Silva (2016) também avaliou a seletividade de acordo com a resolução e o fator de retenção, que conforme os requisitos da Validação de Métodos de Análise Cromatográficas Quantitativas (Anvisa, 2003) devem apresentar valores de resoluções e retenção de 2 e 1,5. Em geral, todos os métodos propostos para a avaliação de drogas ilícitas se mostraram seletivos para o analito de interesse.

De acordo com Bazzarella (2010) a linearidade de um método é a capacidade de produzir picos cromatográficos com áreas diretamente proporcionais à concentração, através da regressão linear e dos coeficientes de correlação verifica-se onde o composto apresenta uma relação linear entre a resposta do detector e as concentrações dos analitos. Calcula-se a linearidade elevando o valor do coeficiente de correlação (r) ao quadrado, obtendo o coeficiente de determinação (R^2) da curva analítica. Quanto mais próximo o valor de R^2 estiver de 1, melhor será a linearidade. Goulart (2012).

Almeida (2016) em um estudo relacionando à quantificação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em *ecstasy*, trabalhou com um intervalo de concentração de 0,02 a 0,90 mg/mL de MDMA por miligrama de amostra e obteve um R^2 de

0,998. Já nos estudos de Goulart (2012) seguiu-se o critério de aceitação para o coeficiente de determinação o estabelecido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), que aceita apenas $R^2 > 0,99$, ou seja, mais rigoroso que o estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina $R^2 > 0,9$. O valor encontrado para o R^2 foi de 0,99987, o que evidencia a linearidade em toda a faixa de trabalho para a determinação e quantificação dos alcalóides cocaína e cinamoilcocaínas em amostras de cocaína.

De acordo com Silva (2016) um método é considerado robusto quando mesmo após pequenas variações nos parâmetros analíticos atende a adequação do sistema. Em cromatografia gasosa, por exemplo, avalia-se parâmetros como temperatura, volume de injeção, gás de arraste, fluxo, etc.

O INMETRO recomenda o Teste de Youden para avaliar a robustez de um método, que também avalia a influência das variações nos resultados finais. O teste consiste em determinar sete variáveis que podem interferir no método e realizar a análise multivariada para mais e para menos do valor determinado no método original. Ao final oito experimentos são realizados e o efeito de cada variável é estudado.

Nos estudos de Almeida (2016) avaliou-se a robustez através de dois testes. No teste A após a realização de um planejamento fatorial fracionado baseado no Teste de Youden, que resultou em oito ensaios, variou-se temperatura do injetor, fluxo/vazão do gás de arraste, temperaturas do forno de coluna, razão do split do injetor e volume de amostra injetada. O valor dos coeficientes de variação ficaram abaixo dos 0,5% em todos os ensaios.

No teste B, avaliou a influência do uso de balão volumétrico ou de dispensador durante a etapa de dissolução da amostra. O erro relativo entre o uso do dispensador em relação ao balão volumétrico não deve ser superior a 10%. No ensaio realizado o erro relativo entre as cada experimento foi de apenas 1,2%.

De acordo com Goulart (2012) o método para determinar adulterantes em amostras de cocaína se mostrou robusto com uma variação máxima de 3% após realizar variações nos parâmetros cromatográficos, como realizar uma análise antes e depois da limpeza do liner, utilizar uma seringa diferente da usada durante a validação e injetar em outro equipamento de CG-FID.

O limite de detecção (LOD) é determinado como a menor quantidade a ser detectada, porém, não necessariamente quantificada e o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade a ser quantificada com precisão e exatidão pelo detector, ela pode ser determinada

através de três diferentes métodos: o visual, o da relação sinal/ruído e o baseado nos parâmetros da curva analítica.

Segundo Goulart (2012) uma forma rápida e confiável de se calcular o LQ é multiplicar o valor de LD por 3. Em seus estudos ele definiu o limite de detecção após diluir o analito até que não fosse mais detectado no cromatograma. Já Bairros (2014) utilizou a resposta equivalente a três vezes o sinal ruído para determinar o limite de detecção e para encontrar o critério de aceitação para o limite de quantificação ele utilizou o coeficiente de variação, que deverá ser menor ou igual a 20% para precisão e 80%-100% de exatidão. Esse modelo de cálculo também foi adotado por Mantovani (2014).

A concordância entre os resultados encontrados demonstram se um método é preciso. A repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutividade que são expressas pelo desvio padrão e o coeficiente de variação são as formas mais comuns de expressar a precisão.

Verifica-se a exatidão de um método através da concordância entre os resultados obtidos em relação a um valor de referência, que pode ser feito pelo uso de material de referência aceito como verdadeiro ou padrão certificado, comparação entre métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão.

Para garantir que um método analítico seja preciso e exato os valores de coeficiente de variação (CV%) e o erro relativo (%) devem ser menor que 15%.

Nos estudos de Mantovani (2014) para o uso de cromatografia gasosa para determinação de cocaína tetraidrocanabinol em amostras de meconio a precisão encontra-se dentro dos critérios aceitáveis, ou seja, abaixo de 20% para os níveis baixos. A precisão foi calculada através do RSD%. Para a determinação da exatidão ele calculou a diferença entre a concentração encontrada pelo método em questão e a concentração nominal da amostra estudada. O método proposto também se mostrou exato, sendo encontrado uma variação aceitável de 80% a 120%.

Camargo (2008) demonstrou que a metodologia desenvolvida para determinação de canabidiol (CBD) e tetraidrocanabinol (THF) foi precisa e exata. A precisão inter ensaio para o CBD foi de 7,5 % a 8,2% e para o THC de 5,5% a 12,7%. Já a precisão intra ensaio foi de 2,5% a 7,0% para o CBD e para o THC de 2,1% a 8,1% em cinco dias diferentes.

A exatidão inter ensaio para o CBD foi de 1,3 % a 8,6% e para o THC de 5,5% a 12,7%. Já para os valores intra ensaio foi de 1,2% a 4,4% para o CBD e para o THC de 5,7% a 14,5% em cinco dias diferentes.

CONCLUSÃO

Ao realizar um levantamento bibliográfico sobre a técnica de cromatografia gasosa para identificação e quantificação de drogas de abuso observa-se que a técnica apresenta boa linearidade em toda a faixa de concentração e alta sensibilidade de quantificação. Verifica-se também que são reprodutíveis, precisos, exatos, além de permanecer estável diante de pequenas variações nos parâmetros do CG e na preparação da amostra, comprovando que as metodologias propostas são robustas.

Os resultados de precisão e exatidão obtidos asseguram a confiabilidade fundamental para o uso desta metodologia em laboratórios de análises forenses.

Um fator limitante da técnica seria o preparo da amostra, uma vez que, ela é trabalhosa. Outro ponto negativo está relacionado ao processamento dos resultados que são bem complexos, visto que, a identificação e integração dos picos cromatográficos devem ser realizadas caso a caso.

Os métodos desenvolvidos para identificação e quantificação atendem aos parâmetros estabelecidos para uma validação analítica, podendo portanto, serem considerados validados. Além de serem adequados para a finalidade para a qual foram propostos, visto que, atendem aos critérios de aceitação determinados pelas normas nacionais e internacionais em uso pelo sistema de gestão da qualidade do laboratório de química forense do INC/PF.

Para o uso da técnica existem limitações para os casos em que as amostras não são termicamente estáveis e voláteis. Verifica-se também que os estudos partiram de substâncias com estruturas moleculares conhecidas, porém, podem ocorrer pequenas mudanças controladas na estrutura molecular dessas moléculas com o intuito de camuflar as análises e as fiscalizações. Dessa forma, o estudo do perfil químico das drogas podem ser temas de futuros trabalhos para a elaboração de uma base de dados e otimização de ferramentas estatísticas para a classificação de amostras reais apreendidas diariamente.

REFERÊNCIAS

ABRAMS AC. **Farmacoterapia Clínica**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RE N°899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html. <Acesso em: 26 de setembro de 2019>.

ALMEIDA N. S. **Desenvolvimento e validação de metodologias para quantificação de 3,4 – metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy por cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear**. 2016. 142f. Dissertação de Mestrado (Dissertação em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

BAIROS A. V. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina**. 2014. 169f. Tese de Doutorado (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BAZZARELLA R. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2010. 82f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

BRAUN IM. **Drogas – Perguntas e Respostas**. MG Editores. São Paulo, 2007.

CAMARGO, S. P. S. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de canabidiol e tetraidrocannabinol em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas**, 2010. 57f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S., **Fundamentos de cromatografia**. Ed. Unicamp. p. 17-18; 204-228. Campinas, 2014.

FERREIRA N. G. **Investigação de adulterantes em amostras de cocaína apreendidas na região de Araçatuba no período de 2014 a 2015**. 2018. 79f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo Ribeirão Preto, 2018.

GALINDO CT. **Química Forense: a aplicação da química no contexto da perícia criminal**. 2010. 48 f. Monografia (Especialização) - Faculdade Câmara Cascuda, Natal/RN, 2010.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf. Acesso em: 07.03.2020.

JÚNIOR, S. S. G. **Otimização e Validação de Método Cromatográfico para Quantificação de Componentes Majoritários em Amostras de Cocaína**, 2012. 110f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LEBELLE, M.; et. all. *Journal of Forensic Sciences* 1988, 33, 662.

MANTOVANI, C. M. **Uso da extração acelerada por solvente (ASE) para a determinação cromatográfica de analitos de cocaína e tetraidrocannabinol em amostras de meônio**. 2014. 97f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Toxicologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MEDEIROS, R. I. **Desenvolvimento de método químico analítico forense para análise de merla por análise térmica e cromatografia gasosa de alta resolução**. 2011. 92f. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

PANTALEÃO L. N. **Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2012. 150f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SEQUINEL R.; HATANAKA R. R.; GUALTIERI C. E.; FLUMIGNAM D. Luiz; OLIVEIRA J. E.; FILHO J. **Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações.** Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000036>. Acesso em: 26 de janeiro de 2020.>

SHBAIR, M. K.; LHERMITTE, M. Drug-facilitated crimes: definitions, prevalence, difficulties and recommendations. A review. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2010.

SILVA, D. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para identificação e quantificação de alcaloides minoritários em amostras de cocaína por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC).** 2016. 107f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

SOUSA, L. R. P. **A Química Forense na detecção de drogas de abuso.** 2012. 16f. Universidade Católica de Goiás Brasília. 2012 Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267709594_A_QUIMICA_FORENSE_NA_DETECCAO_DE_DROGAS_DE_ABUSO <Acesso em: 05 de março de 2020.>

United Nations Office On Drugs And Crime. **World drug report:** New York, United Nations, 2015. Disponível em: <http://www.unodc.org/wdr2015>. <Acesso em: 07 de março de 2015>

UHART M; WAND GS. **Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research.** *Addict Biol.* 2009; 14:4364.