

“Drug Profiling: O caso da Heroína”

Tânia Afonso Pais

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em
Química Forense**

Orientadores: Professor Doutor Hugh Douglas Burrows

Professora Doutora Maria da Graça Campos

Setembro 2011

Universidade de Coimbra

Índice

Lista de abreviaturas	4
Resumo	6
Abstract	8
Agradecimentos	10
I- Introdução	11
Heroína	14
1.1- Origem da heroína	17
1.2- Preparação da heroína	18
1.3- Propriedades físico-químicas da heroína	25
1.4 - Classificação e modo de acção	26
1.5- Farmacocinética e metabolismo da heroína	27
1.6- Vias de administração de heroína	28
1.6.1- Administração intravenosa	28
1.6.2- “Chasing the Dragon	29
1.6.3- Inalação	29
1.6.4- Ingestão oral	30
II- Metodologias descritas para análise de heroína	31
2.1- Métodos Quimiométricos na análise de heroína	35
III- Métodos	38
3.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e ciências forenses	38
3.1.1- HPLC: Considerações gerais	38
3.2- Fluorescência e ciências forenses	45
3.2.1- Absorção molecular no Ultravioleta/Visível	45
3.2.1.1- Transições electrónicas	46

3.2.2- Luminescência	48
3.2.2.1- A fluorescência molecular como ferramenta analítica	50
3.2.2.2- Fluorescência	50
3.2.2.2.1- Características da emissão de fluorescência	51
3.2.2.3- Desvio de Stokes	53
3.2.3- Instrumentação em espectroscopia de fluorescência	53
IV- Materiais	55
4.1- Materiais usados em HPLC	55
4.2- Materiais usados em Fluorescência e Absorção Molecular Ultravioleta/Visível	56
V- Resultados e Discussão	57
5.1 - Resumo do processo de HPLC/DAD	57
5.1.1- Resultados obtidos por HPLC/DAD	58
5.2- Resultados obtidos de análise de paracetamol e cafeína por fluorescência e espectroscopia de absorção UV/Visível	68
VI- Conclusão	81
VII- Bibliografia	83
Anexos	90

Lista de abreviaturas

6-MAM – 6-monoacetilmorfina

M-3-G – Morfina-3-Glucuronídeo

M-6-G – Morfina-6-Glucuronídeo

VIH – Vírus da Imunodeficiência humana

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC – Cromatografia Líquida

HPLC-NP – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Normal

HPLC-RP – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa

DAD – Detector de Fotodiodos

TLC – Cromatografia de Camada Fina

UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-
Espectrometria de massa tandem

CE – Electroforese Capilar

AAS – Espectroscopia de Absorção Atômica

CEC – Electrocromatografia capilar

GC – Cromatografia Gasosa

PCA – Análise de Componentes Principais

HCA – Análise Hierárquica por Clustering

SDS – Dodecilsulfato de Sódio

UV/Visível – Ultravioleta/Visível

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

Resumo

O conhecimento das drogas, bem como a sua história, evoluiu paralelamente à história da humanidade. É parte essencial da sua cultura, dos seus rituais religiosos, das suas relações humanas. Desta forma trata-se de uma história conjunta com os indivíduos que as produzem e que as consomem. De notar que, a amplitude do termo “droga” reflecte, por um lado esta evolução fazendo referência a um elevado número de substâncias com distintos efeitos sobre a percepção, pensamentos ou emoções e com diferente capacidade para produzir dependência. Por outro lado, reflecte diferentes significados àqueles que as consomem.

A heroína é uma das drogas mais consumidas em todo o Mundo. Desta forma, as autoridades à escala mundial tentam extinguir a sua produção ilícita e o tráfico desta substância extremamente aditiva. De forma a combater o referido anteriormente, entidades públicas, através da análise química de amostras confiscadas, com especial atenção para a identificação e quantificação dos componentes minoritários, nomeadamente impurezas relacionadas com a sua origem e produção, obtêm informação importante no conhecimento desta substância, enquanto droga.

Neste trabalho, analisaram-se por HPLC/DAD os componentes possíveis de identificar, dadas as limitações de material disponível, e obtiveram-se resultados conducentes ao estabelecimento de um “drug profiling”. Esta metodologia visa a possibilidade de estabelecer perfis diferentes consoante a proveniência da droga apreendida. Completou-se este perfil através da análise por fluorescência e espectroscopia de absorção molecular UV/Visível dos contaminantes presentes

(paracetamol e cafeína). As amostras estudadas foram facultadas pela Polícia Judiciária, correspondendo a três lotes de heroína apreendidos.

Os resultados revelaram uma adição constante de paracetamol e de cafeína em proporções diferentes. Para além da identificação e dosagem da heroína, no que concerne às amostras apreendidas, foi possível encontrar resíduos dos restantes alcalóides do ópio que também tinham sido acetilados, nomeadamente os derivados da codeína.

O escasso número de amostras autorizado pelo Tribunal não permitiu muita informação, mas foi possível obter um “Drug Profiling” consistente com as metodologias usadas. A tese apresenta também uma revisão da literatura dos compostos observados em amostras de heroína.

Abstract

The knowledge of drugs, as well as their history, has evolved alongside the history of mankind. It is an essential part of people's culture, their religious rituals and their human relations. Thus, it is a history of the people that produce and consume them. The amplitude of the term "drug" reflects on the one hand this development by referring to a large number of substances with different effects on perception, thoughts or emotions and with different ability to produce a dependence. In addition, it reflects different meanings to those who consume them.

Heroin is one of the most widely consumed drugs in the world. Thus, the authorities attempt to extinguish the illicit production and trafficking of this highly addictive substance. In order to combat this, public entities, through chemical analysis of seized samples, pay special attention to the identification and quantification of minor components, including impurities related to their origin and production, to obtain important information on the knowledge of this substance, when used as a drug.

In this work, the major components which it was possible to identify were analyzed by HPLC/DAD, given the limitations of available material. The results were conducive to the establishment of a preliminary "drug profiling". The long-term goal of this methodology aims at the possibility of different profiles depending on the source of the seized drugs. This profile was complemented through the analysis by fluorescence and absorption UV/Visible spectroscopy of the major contaminants (paracetamol and caffeine), which may lead to a rapid

preliminary test for drug assay. The samples studied were provided by the Judicial Police, and involve three batches of seized heroin.

The results revealed a constant addition of paracetamol and caffeine in different proportions. In addition to the identification and quantification of heroin, with respect to the seized samples, it was possible to identify residues of the other opium alkaloids which also had been acetylated, including those derived from codeine.

Although the limited number of samples it was possible to obtain with Court authorization did not allow us to obtain too much information, it was possible to obtain a “Drug Profiling” consistent with the methodologies used, which will serve as the basis of future studies using the same methodologies. The thesis also presents data on compounds observed in heroin samples in literature studies.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado às pessoas que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Hugh Douglas Burrows e à Professora Doutora Maria Graça Campos a forma como orientaram o meu trabalho. As notas dominantes da vossa orientação foram fundamentais bem como as recomendações e a cordialidade com que sempre me receberam. Estou grata por ambas, e também pela liberdade de acção que me permitiram, que foi decisiva para que este trabalho contribuisse para o meu desenvolvimento pessoal.

Em segundo lugar agradeço à Professora Emília Azenha e à Doutora Sofia Fonseca pelo apoio e simpatia prestados ao longo deste percurso.

Agradeço também à Doutora Joana Santos da Polícia Judiciária pela ajuda para a realização deste trabalho.

Agradeço ainda a todos os meus amigos, com especial agradecimento à Rita e à Carolina pelo apoio ao longo de todo o ano.

Gostaria ainda de agradecer à minha família, pois sem eles nada disto era possível.

Deixo também uma palavra de agradecimento a todas as pessoas que estiveram envolvidas em todo o meu percurso ao longo deste ano.

I-Introdução

Arquimedes, que provou que a sua coroa de rei não era de ouro por medição da sua densidade, foi talvez o primeiro cientista do mundo forense. No entanto, foram as histórias de ficção de Sir Arthur Conan Doyle de Sherlock Holmes, escritas no final do século XIX, que anteciparam o uso da ciência na resolução de crimes no século XX. Na mesma época, os estudos de Sir Francis Galton revelaram que as impressões digitais são únicas e que não mudam com a idade. Já em 1858, William Herschel, um oficial britânico na Índia, usou as impressões dos dedos e das mãos com tinta como assinaturas em documentos para pessoas que não sabiam escrever. [1,2]

Edmond Locard, um criminalista francês, estabeleceu o primeiro laboratório dedicado à análise da criminalidade em 1910. Uma década depois, laboratórios criminalísticos foram estabelecidos pelo resto dos países Europeus. [1]

Todos os químicos em geral, são escolarizados em química orgânica, inorgânica e analítica, mas os químicos forenses especializam-se em áreas específicas. Por exemplo, em química inorgânica pode examinar vestígios de pó usando técnicas microanalíticas para identificar a composição química de partículas minúsculas. Outra aplicação química pode empregar a cromatografia em camada fina durante a análise de sangue ou urina para detectar vestígios de drogas, e outro ainda pode usar reacções em tubos de ensaio para identificar compostos de amostras em grandes quantidades.

Uma ampla gama de técnicas laboratoriais e instrumentais são usadas em estudos forenses, em que estas dependem do tipo de amostra ou substância a ser analisada. O facto de que a maior parte das

substâncias examinadas não serem puras, representa um grande desafio para um químico forense. [3]

Devido à preocupação internacional sobre o abuso de drogas, esta necessita de dados precisos, de elevada sensibilidade e confiáveis sobre a epidemiologia deste fenómeno, que deverão ser utilizados tanto para fins preventivos como também para fins repressivos. Além disso, a importância do tráfico internacional de drogas ilícitas necessita de conhecimento actualizado das rotas e da rede de distribuição. Para este objectivo, informação importante é fornecida pela análise químico-toxicológica de amostras de substâncias confiscadas. Contudo, é certo que uma detalhada caracterização química de um narcótico natural ou sintético é crucial para o sucesso das várias actividades de controlo do comércio de drogas ilícitas. Além disso, na análise de drogas ilícitas a identificação de componentes minoritários, como por exemplo, a impureza devida à origem ou à síntese, é de importância crucial. Durante a preparação de uma droga ilícita, de origem semi-sintética como a heroína, todos os procedimentos de extracção, purificação, síntese, envolvem o uso de diferentes produtos químicos, como ácidos, bases, solventes, etc., e estes podem deixar traços no produto final ou podem produzir alterações específicas na estrutura química de alguns componentes da droga. [4] Também, em muitos casos há a possibilidade de transformação dos produtos químicos depois de síntese por hidrólise, oxidação ou outras reacções de degradação, o que também vai permitir obter informação sobre a história de drogas ilícitas.

A heroína, ou diacetilmorfina, é um produto semi-sintético derivado da acetilação da morfina (Figura 1), que por sua vez é obtida a partir da *Papaver somniferum*. Em laboratórios clandestinos, a

purificação da morfina e da heroína é bastante eficiente e devido às diferenças nos procedimentos agrícolas e de fabricação a presença e a concentração de alcalóides do ópio, como também os seus derivados depois da acetilação, podem variar significativamente, e estes alcalóides e seus derivados acetilados, podem ser encontrados no que é vendido no mercado ilícito como heroína clandestina. Outras substâncias como analgésicos, anestésicos locais e cafeína são substâncias farmacologicamente activas que imitam o sabor amargo da heroína e são normalmente usados como adulterantes, ao passo que, glucidos como a lactose, o manitol e a sacarose são inactivos e muitas vezes usados para efeitos de diluição. [5-7]

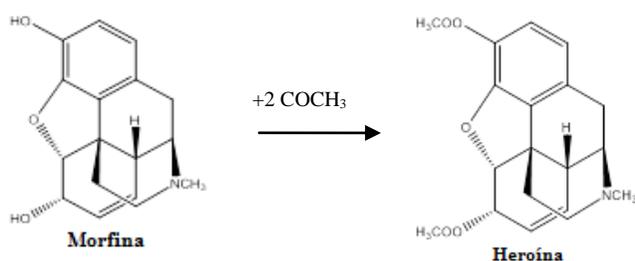


Figura 1- Acetilação da morfina

Heroína

A heroína (diacetilmorfina) ainda hoje é uma das drogas de abuso mais consumidas. Esta droga é semi-sintética sendo produzida a partir da morfina contida no ópio que é a seiva das cápsulas da papoila, *Papaver somniferum*. O abuso desta substância é conhecido há muitos anos, desde que foi sintetizada pela primeira vez, em 1874 por C.R.A Wright, numa reacção em que a morfina entrou em contacto com um excesso de anidrido acético. Mais tarde em 1898, a substância foi produzida comercialmente pela Companhia Bayer em Eberfeld na Alemanha e nomeada com o nome de Heroína. [8]

A heroína foi usada em vez da codeína e da morfina em pacientes que sofriam de doenças pulmonares, como a tuberculose. Adicionalmente, a Companhia Bayer recomendou a heroína como a cura para a dependência de morfina. As propriedades analgésicas da droga foram muito efectivas, contudo, as propriedades aditivas eram devastantes. Por todas estas razões foi proibida anos depois. Hoje em dia, a heroína não é usada como um fármaco, mas de qualquer maneira, devido à alta produção ilícita é uma das drogas mais significantes em relação a overdoses, em drogas relacionadas com a morte, em hospitalização, em envolvimento em crimes relacionados com drogas e violência. [8,9]

De acordo com o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, Decreto-Lei nº 15/93 de 22 de Janeiro, na Aprovação da Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e de Substâncias Psicotrópicas de 1988 estabeleceu-se três objectivos fundamentais.

Em primeiro lugar, privar aqueles que se dedicam ao tráfico de estupefacientes do produto das suas actividades criminosas, suprimindo assim, o seu incentivo principal e evitando que a utilização de fortunas ilicitamente acumuladas permita a organizações criminosas transnacionais invadir, contaminar e corromper as estruturas do Estado, as actividades comerciais e financeiras legítimas e a sociedade a todos os seus níveis.

Em segundo lugar, adoptar medidas adequadas ao controlo e fiscalização dos precursores, produtos químicos e solventes, substâncias que são utilizadas no fabrico de estupefacientes e de psicotrópicos, que pela sua fácil obtenção e pela disponibilidade em que estão no mercado, têm conduzido a um aumento do fabrico clandestino.

Em terceiro lugar, e por último reforçar e complementar as medidas previstas na Convenção sobre Estupefacientes de 1961 e na Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971, preenchendo fendas e potenciando os meios jurídicos de cooperação internacional em matéria penal.

A classificação das penas aplicáveis ao tráfico tendo em conta a real perigosidade das respectivas drogas parece ser a posição mais compatível com a ideia de proporcionalidade, o que não vai implicar uma necessária adesão à distinção entre drogas duras e leves e, muito menos, às conclusões obtidas por alguns países no campo da discriminação ou despenalização do consumo. Simplesmente, a decisão de uma classificação mais ajustada tem de assentar na aferição científica rigorosa da perigosidade das drogas nos seus diversos aspectos. [10]

A lei n.º 30/2000, de 29 de Novembro, define o regime jurídico aplicável ao consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, bem como a protecção sanitária e social das pessoas que consomem tais substâncias sem prescrição médica. [11]

Durante estes anos, os países de origem do ópio utilizado na produção de heroína têm aumentado significativamente. O ópio que é utilizado na produção de heroína tem quatro fontes principais, que serão mencionadas a seguir. (Figura 1.1) Geograficamente estas regiões são caracterizadas por um clima temperado com condições de solo convenientes e de chuva para a produção de ópio, apesar de haver diferenças na qualidade do ópio, no que diz respeito à quantidade de morfina e ao número de colheitas em cada uma destas áreas. [9]

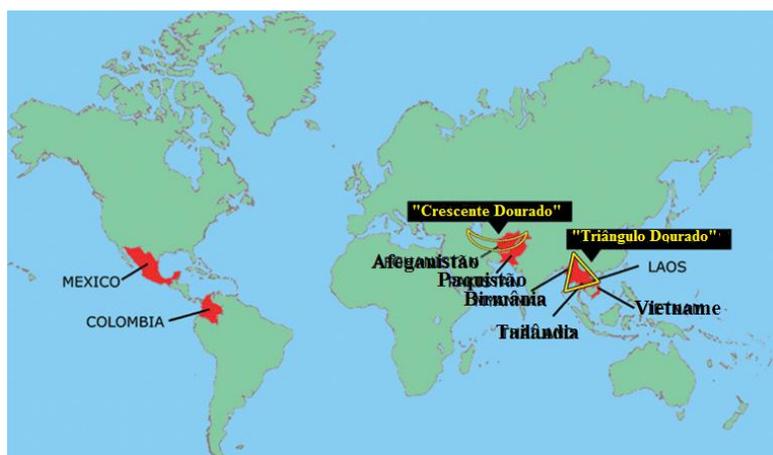


Figura 1.1- Mapa das quatro fontes principais de produção de ópio

1.1- Origem da heroína

A Birmânia, Laos e Tailândia, “Triângulo Dourado”, eram os três maiores países de origem para a produção de ópio, sendo ultrapassado pelo Afeganistão, que desde o início de 1990 tem sido a principal fonte mundial no mercado ilícito. [9, 12]

A heroína do Sul Asiático é de alta qualidade e é reconhecida pela sua aparência branca cristalina, apesar de os agentes de corte serem em grande quantidade, tais como a cafeína e o paracetamol. (Figura 1.2)

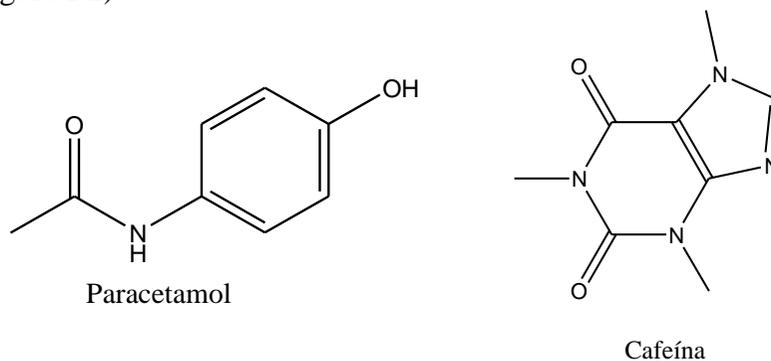


Figura 1.2- Estruturas das moléculas do paracetamol e cafeína

Em relação ao Sudoeste Asiático, a Turquia, Iraque, Irão, Afeganistão, Paquistão, Índia e o Líbano são os países reconhecidos como os de origem do ópio nesta parte do Mundo. A heroína do Sudoeste Asiático é caracterizada pela sua aparência de um pó, não sendo totalmente branca comparada com a heroína do Sul Asiático, tendo uma pureza menor. Os agentes de corte são vários, tais como, a cafeína e o paracetamol, que são aqueles que aparecem mais frequentemente.

Na América Central, o México e Guatemala são os países de fonte primária para a heroína, em que esta tem a aparência de um pó

castanho-escuro, e os adulterantes que aparecem mais frequentemente são materiais amorfos e açúcares. A aparência mais escura da heroína é devida ao processamento de subprodutos.

A heroína da América do Sul é mais pura e com menos adulterantes que a heroína do Sudoeste Asiático. Por vezes é encontrada cocaína nesta heroína, e em muitos casos não se sabe se a cocaína encontrada foi adicionada como adulterante ou se está presente como um contaminante introduzido devido ao empacotamento que é comum ao da cocaína. [9]

1.2- Preparação da heroína

Todas as amostras de heroína confiscadas vêm directa ou indirectamente do ópio, que é extraído da planta *Papaver somniferum* (Figura 1.3), que é mais conhecida como a papoila do ópio, sendo esta o material de início para a produção ilegal de heroína.

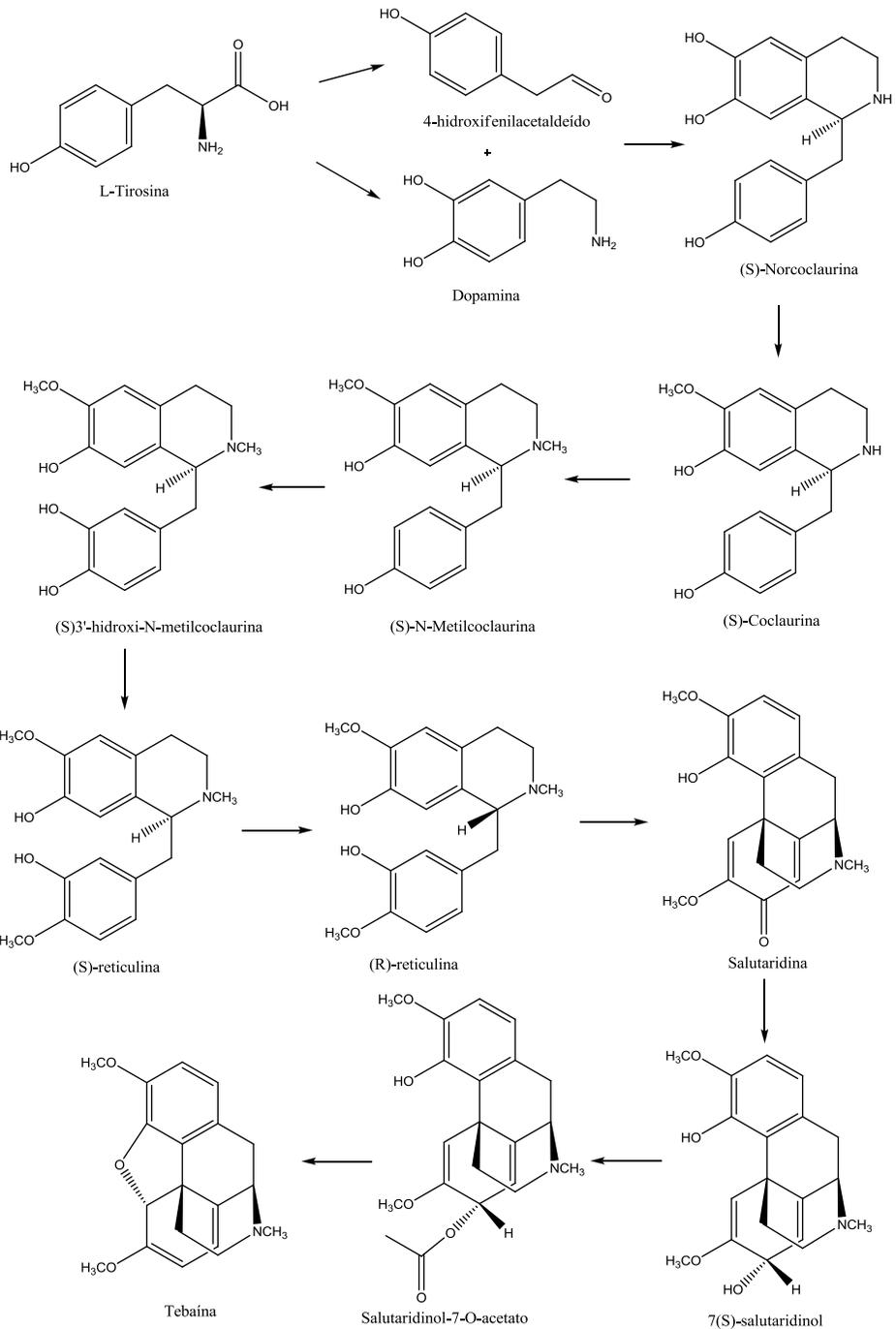
A *Papaver somniferum* faz parte da família da papoila (Papaveraceae), é uma planta herbácea com folhas alternadas, é anual com várias subespécies, uma vez que é capaz de hibridizar e mudar as suas características, e estas podem variar com factores ambientais. Devido a estas condições torna-se muito difícil conseguir fazer



Figura- 1.3- *Papaver somniferum*
uma classificação, mas está concluído que de toda a família da papoila só a *Papaver somniferum* e a *Papaver setigerum* contêm morfina.

Existem outras variedades da planta *Papaver somniferum* mas só duas delas são cultivadas para produção de heroína, devido ao seu elevado conteúdo de morfina, a *Papaver somniferum var. album* e a *Papaver somniferum var. glabrum*.

Nestas plantas o processo de biossíntese da morfina segue várias fases, como pode ser visto na Figura 1.4.



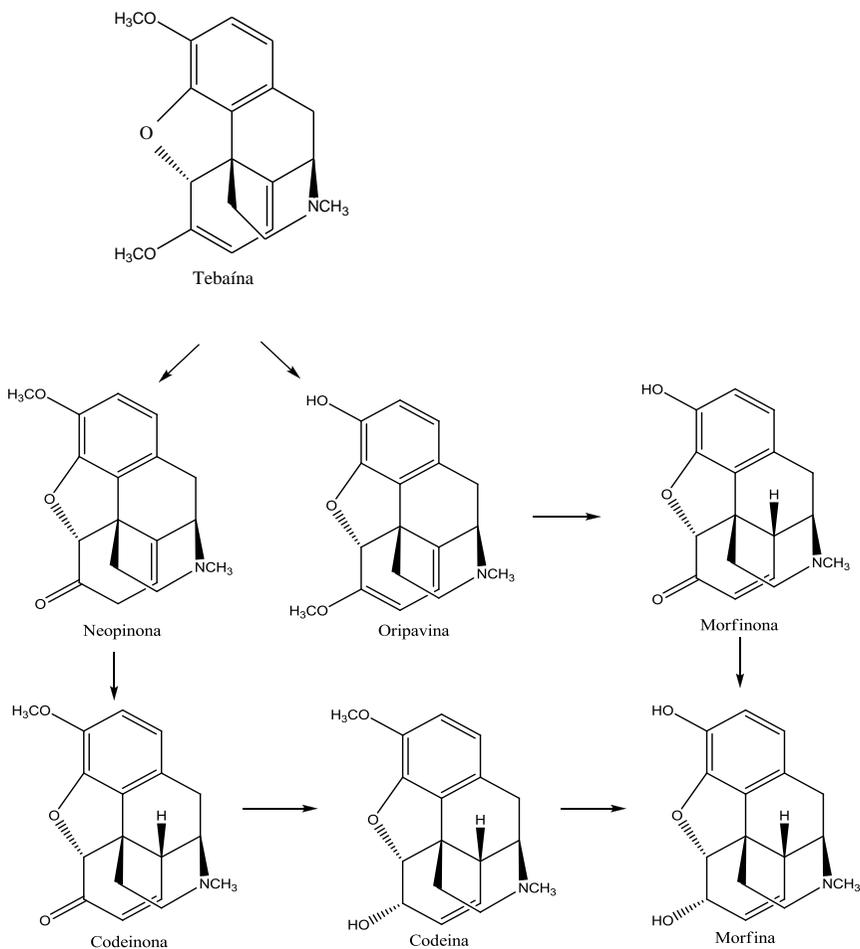


Figura 1.4- Biossíntese da morfina na papoila do ópio [13]

Depois da floração e da queda das folhas da *Papaver somniferum*, as cápsulas que estão cheias e verdes são cortadas e o látex, endurecido e húmido, ou o ópio bruto, é raspado e recolhido para um recipiente de barro ou de plástico. [5]

A preparação da heroína requer a separação da morfina do ópio, e existem alguns métodos específicos, sendo o processo de Thiboumery e Mohr o mais utilizado. Contudo todos estes processos, envolvem os quatro passos: 1) a *Papaver somniferum* é cultivada; 2) a

cabeça da papoila sofre um corte e o látex do ópio é recolhido; 3) a morfina é isolada do ópio; 4) a morfina é tratada com um agente de acetilação.

O isolamento da morfina é realizado usando um dos seguintes métodos:

- **Processo de Thiboumery e Mohr** – neste método o látex do ópio já seco é dissolvido em água quente, que depois é filtrado ainda quente, para que as substâncias botânicas insolúveis sejam removidas. Estas são lavadas com água quente e filtradas, o que vai assegurar uma maior quantidade de morfina no produto final. Ao filtrado é adicionado uma solução quente de hidróxido de cálcio. Os precipitados, que incluem os alcalóides insolúveis do ópio e os materiais insolúveis são filtrados que são posteriormente lavados com água e novamente filtrados. O resultado do filtrado, é então evaporado e depois filtrado, o que resulta numa solução concentrada de morfina de cálcio que é aquecida até ferver. Cloreto de amónio é adicionado. Quando esta solução arrefece, a forma base da morfina precipita e é recolhida por filtração. Esta é dissolvida num mínimo volume de ácido clorídrico quente e quando este arrefece o cloreto de morfina precipita, e é depois isolado por filtração.
- **Processo de Robertson e Gregory** – o ópio é lavado com água quente, em que depois a solução é evaporada e é re-extraída com água quente e filtrada, em que este filtrado é evaporado. A solução é aquecida até ferver e é adicionado cloreto de cálcio. À solução de morfina de

cálcio é adicionada água quente que depois é filtrada. A solução é concentrada, em que o morfina de cálcio precipita à medida que o líquido evapora. Este é redissolvido em água e filtrado. A este filtrado é adicionada amónia, o que vai permitir que a forma base da morfina precipite. [9]

Na produção de heroína, não é feito o isolamento da morfina previamente. Isso só acontece quando é produzida morfina como produto final, e como esta separação quase nunca é completamente eficiente a heroína consiste numa mistura de morfina e traços de outros alcalóides opiáceos, como a codeína, a noscapina, a papaverina e a tebaína. [9]

A tradicional síntese de heroína, consiste numa simples reacção de acetilação, e normalmente é realizada adicionando um grande excesso de anidrido acético directamente à morfina, ou ao extracto do ópio, seguido de aquecimento até ferver. O anidrido acético é o reagente acetilante mais usado, apesar de às vezes utilizarem outros dois reagentes, nomeadamente, o cloreto de acetilo e o diacetato de etileno. Durante o processo de acetilação é formado o primeiro produto intermediário, 3-monoacetilmorfina, em que depois a heroína é formada e é em parte diacetilada em 6-monoacetilmorfina. Os outros alcalóides, que são encontrados como contaminantes da morfina original, e que também têm grupos funcionais que podem reagir com radicais acetílicos, eles irão produzir derivados acetílicos, como no caso da codeína. Se eles não reagirem com os grupos acetílicos, irão manter-se inalterados no produto final, como no caso da papaverina e da noscapina. Se forem quimicamente instáveis, como no caso da tebaína,

irão formar uma variedade de subprodutos, como o tebaol, o acetiltebaol. [4]

O produto que se pretende é isolado tratando a mistura com carbonato de sódio e a heroína é recolhida por filtração. O produto final é normalmente usado para fumar ou para inalar. Se o que se pretende é cloridrato de heroína, o material de base é dissolvido em acetona e é adicionado ácido clorídrico, este conteúdo é seco ao ar até se obter um pó uniforme.

Finalmente, substâncias de corte são adicionadas à heroína, para aumentar o conteúdo do produto, e também para aumentar os lucros de quando é vendido, são adicionadas substâncias inertes ao pó puro. Na maior parte dos produtos vendidos é adicionado mais que um diluente. Estes diluentes são produtos químicos mais usados como enchimento do que como desencadeamento para obter uma resposta fisiológica, e podem ser adicionados para afectar a cor e a composição em prol da satisfação do consumidor.

Substâncias farmacologicamente activas ou adulterantes também são adicionadas. Alguns destes componentes têm como objectivo aumentar o efeito da heroína. No caso de alguns adulterantes o tipo de resposta fisiológica pode ser afectada, o que se pode traduzir num efeito muito ou pouco severo. No caso do paracetamol, este aumenta a volatilidade da base de heroína, o que vai aumentar o efeito do “chasing the dragon”. Outros, por exemplo, a adição da procaína, é feita mais para aliviar a dor de uma injeção intravenosa. [5]

Contudo a composição química da heroína disponível no mercado depende de vários factores, tais como:

- Composição do ópio;
- Métodos utilizados na extracção da morfina;

- Procedimentos na acetilação da morfina;
- Purificação da mistura através da adição de diferentes solventes;
- Precipitação da forma base da heroína e sua purificação;
- Conversão da forma base da heroína para os seus sais clorídricos. [4]

1.3- Propriedades físico-químicas da heroína

A heroína possui uma constante de ionização (pK_a) de 7,60, em que o nitrogénio presente na heroína a pH's ácidos vai ser protonado, o mesmo acontece para pH's básicos. O seu coeficiente de partilha octanol-água é de 1,69. Aproximadamente 40% de heroína, a pH fisiológico, encontra-se na forma não-ionizada, tendo portanto um grau de ionização baixo. A este pH a heroína é lipofílica, sendo rapidamente absorvida pelas membranas mucosas, quando fumada ou inalada, sendo os pulmões e a mucosa intranasal órgãos altamente perfurados, o que contribui para uma absorção maior de compostos lipofílicos. O ponto de fusão da base livre de heroína é de 173°C, havendo degradação da heroína a temperaturas superiores a esta, sendo solúvel em clorofórmio, álcool, éter e água. O cloridrato de heroína tem um ponto de fusão de 243-244°C, sendo solúvel em água, álcool e éter. [14-16]

Na Figura 1.5 encontra-se o espectro de massa da heroína (diacetilmorfina).

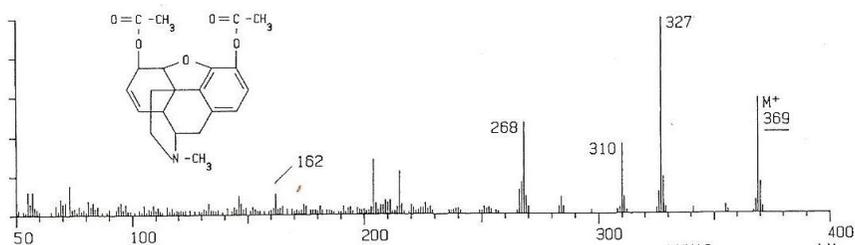


Figura 1.5- Espectro de massa da heroína [17]

1.4 - Classificação e modo de acção

Os opiáceos são drogas que são extraídos directamente do ópio, como a morfina e a codeína, ou são derivados químicos, como a heroína (diacetilmorfina). Todos estão estruturalmente relacionados com a morfina.

Três grandes classes de receptores opiáceos foram descobertas, μ , K , δ e σ como também muitas subclasses de receptores são conhecidas.

A morfina e as drogas relacionadas com esta produzem os seus maiores efeitos no corpo pela sua interacção com receptores μ , contudo parece haver alguma interacção com outros receptores para doses mais elevadas.

Os principais efeitos farmacológicos dos opiáceos são bem conhecidos, e incluem anestesia, analgesia, convulsões, desenvolvimento de tolerância e dependência, sonolência, alterações de humor, etc.

A codeína resulta da substituição do grupo $-OH$ na posição 3 da morfina, por um grupo metilo, o que vai reduzir a ligação aos receptores específicos μ da morfina, portanto actua como um fármaco menos potente que a morfina. Além disso, a heroína em si pensa-se que

tem pouca ou nenhuma actividade farmacológica, mas é uma pró-droga ou neste caso pró-fármaco, com a maior parte da sua actividade a ser devida à produção de metabolitos activos, particularmente a morfina.

[18]

1.5- Farmacocinética e metabolismo da heroína

Em poucos minutos após entrar na circulação, a heroína é rapidamente convertida num intermediário relativamente instável, a 6-monoacetilmorfina (6-MAM). Este intermediário é também rapidamente convertido em morfina completando assim o processo de desacetilação.

A morfina é metabolizada no fígado por um processo de conjugação, glucuronização. Neste processo, o ácido glucurónico é conjugado com a morfina para formar a morfina-3-glucuronídeo (M-3-G) e a morfina-6-glucuronídeo (M-6-G) (Figura 1.6). Estes produtos são mais solúveis em água que a morfina e são excretados na urina. O principal produto deste processo, a M-3-G é inactivo, contudo, o metabolito M-6-G é extremamente activo e a sua acção no corpo é acrescentada à da morfina. As proporções relativas da morfina e dos seus metabolitos glucuronídeos são importantes, para se entender a acção analgésica da heroína e da morfina. Também têm uma importante aplicação em casos forenses, particularmente na investigação de mortes relacionadas com a morfina e a heroína. [18]

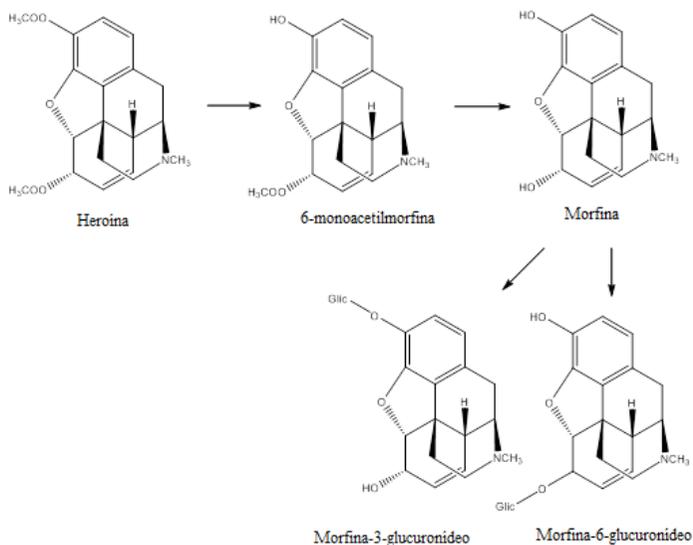


Figura 1.6- Principal via metabólica da heroína

1.6- Vias de administração de heroína

Existem várias vias de administração de heroína que se podem utilizar, tais como, injeção intravenosa, fumar, inalação, subcutânea, intramuscular, oral e também rectal. A via escolhida pode ter muitas implicações em termos de riscos de saúde. Há também algumas diferenças importantes na natureza e composição da heroína de acordo com o tipo de via de administração.

1.6.1- Administração intravenosa

A via de administração intravenosa leva a muitos riscos de saúde devido ao uso de técnicas de injeção pouco assépticas e à partilha de agulhas. Os problemas mais graves são, a transmissão do vírus VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana), a hepatite B e C, o elevado risco de overdose. Destes o mais grave é a transmissão do VIH.

A heroína usada em administração intravenosa pode ser de pureza variável, mas é geralmente usada na forma de sal cloridrato, que é mais solúvel em água. A heroína para injeção é comprada em pó branco, bege ou castanho claro, o qual é dissolvido numa pequena quantidade de água com um traço de sumo de limão, que contém ácido cítrico e ajuda a aumentar a solubilidade. Tudo isto pode ser misturado numa colher pequena sobre uma chama, usualmente um isqueiro, onde se pretende esterilizar o líquido antes da extração da droga que se coloca depois numa seringa para posterior injeção. [18]

1.6.2- “Chasing the Dragon

No procedimento “chasing the dragon”, os consumidores de heroína aquecem o pó num pedaço de alumínio com um isqueiro até derreter e evaporar. [19] Posteriormente o vapor da heroína é inalado ou fumado. Este tipo de heroína é usada na forma de “base livre”, que é mais volátil e pode ser fumada em vez de injectada. A forma base da heroína é geralmente castanha e relativamente insolúvel em água, por isso, não é ideal para injeção, enquanto que, a heroína na forma de sal cloridrato não é ideal para fumar devido ao facto de se decompor facilmente quando aquecida.

1.6.3- Inalação

É a forma menos eficiente de administração de heroína. Quantidades variáveis de heroína podem ser engolidas quando esta é inalada, reduzindo a quantidade de droga activa que chega à circulação.

1.6.4- Ingestão oral

É uma forma muito incomum de administração, isto porque a heroína é absorvida lentamente sem produzir nenhuma característica desejada, assim como também a maior parte da dose é metabolizada pelo fígado antes de chegar à circulação.

A ingestão oral de heroína pode ser vista algumas vezes em casos de suicídio ou homicídio.

Os acidentes mais comuns em que se verifica este tipo de ingestão acontecem com as “mulas”, ou seja, pessoas que transportam a heroína no corpo, engolindo-a em pequenos sacos de plástico ou látex.

Menos comum é o caso de pessoas que tentam contrabandear a heroína inserindo pacotes no recto ou na vagina. [18]

II- Metodologias descritas para análise de heroína

Devido às diferenças nos procedimentos agrícolas e de manufatura da heroína, a presença e a concentração dos alcalóides do ópio, como também os seus derivados depois da acetilação, podem variar significativamente. A presença de diluentes e de adulterantes também podem fornecer informação extra sobre a origem e o tráfico de amostras ilícitas de heroína. Todos estes parâmetros constituem um perfil, que pode ser usado em análise comparativa. Esta trata de uma análise abrangente das características químicas e/ou físicas de um extracto de droga. Em particular, aplica uma análise detalhada dos constituintes co-extraídos dos materiais naturais das plantas, bem como das impurezas das drogas semi-sintéticas resultantes do método de síntese e das condições experimentais usadas. De tudo isto resulta um “drug profile” que pode ajudar as entidades que investigam a origem dos lotes traficados a identificar a sua origem geográfica e/ou os seus traficantes, dado que a forma como procedem à preparação e ao corte do produto pode ser característico.

No geral esta análise inclui dois procedimentos. Em primeiro a caracterização da amostra seguido pela interpretação dos dados. [5] Devido à complexidade e variedade da mistura relacionada com a origem e a produção das impurezas, uma única técnica analítica não é suficiente para traçar o perfil de uma amostra. Geralmente, uma completa caracterização é obtida através da identificação dos componentes maioritários e minoritários, da origem e produção das impurezas como também dos resíduos dos solventes. [4] Os vários

métodos analíticos que têm sido usados para comparação de amostras de heroína, podem fornecer muita informação em pouco tempo, e o problema de se tratar muita informação, com o objectivo de aprendizagem, de reconhecimento e de predição, requer técnicas especiais, denominadas por técnicas quimiométricas. [20]

A caracterização de amostras ilícitas é realizada através de uma grande variedade de técnicas analíticas. Exemplos destas são, a cromatografia de camada fina (TLC) [4, 5], a cromatografia líquida de alta eficiência – espectrometria de massa tandem (UPLC-MS/MS) [21], a cromatografia gasosa (GC) [22-26], a electroforese capilar (CE) [4, 27, 28], a espectroscopia de absorção atómica (AAS) [4, 5], a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [4-7, 29, 31], a electrocromatografia capilar (CEC) [30], entre outras.

Uma das primeiras caracterizações de uma amostra de heroína pode ser realizada através da visualização da cor. Devido a ter um carácter subjectivo, esta técnica tem uma aplicação reduzida, mas pode ter aspectos mais objectivos utilizando espectros de absorção ou de reflectância difusa.

Os processos extractivos usados na preparação da amostra também podem ser condicionantes dos resultados analíticos. Os mais frequentemente usados são acetato de etilo:metanol (9:1) [31], ácido ortofosfórico (pH=2,5) [7], clorofórmio [20, 32], ácido sulfúrico [30], entre outros.

A cromatografia de camada fina (TLC) [4,5] é uma das técnicas de fácil uso, dado que é económica e tem um tempo de análise curto, sendo a sua aplicação baseada em um rastreio inicial ou em uma análise semi-quantitativa. Esta técnica pode ser usada na identificação de

alcalóides primários do ópio, de subprodutos minoritários de acetilação, como também de adulterantes e diluentes. [5]

A cromatografia gasosa (GC) é um método que permite uma boa resolução na separação de impurezas com uma boa sensibilidade e reprodutibilidade. [33] Esta metodologia se acoplada a um detector adequado é uma técnica analítica estabelecida para a análise de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em amostras gasosas, líquidas ou sólidas. [34] Em particular, a combinação com espectrometria de massa (GC-MS) tem grande potencial na análise de misturas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) consegue superar alguns problemas relativos à cromatografia gasosa como a adsorção, a instabilidade devido ao calor, a transesterificação e a solubilidade. Também não são necessários procedimentos de derivação extensivos. Como limitação, necessita de alguma solubilidade do analito. Devido à estrutura química dos alcalóides opiáceos e dos seus adulterantes, a maior parte das análises por HPLC são realizadas em modo de fase reversa. O HPLC também permite identificação directa de açúcares e carboidratos se for usado um detector de índice de refração diferencial e uma coluna adequada à separação destes constituintes. [4,5,7, 28]

Operacionalmente a grande diferença entre GC e HPLC é a natureza da fase móvel, os líquidos não são tão compressíveis como os gases, ou seja, em HPLC empacotamentos com partículas pequenas podem ser usados, fornecendo uma maior eficiência, com colunas relativamente pequenas à temperatura ambiente. Também, a composição do eluente pode ser alterada de modo a controlar a retenção e a selectividade, fornecendo um alto controlo durante a separação. [27]

Muitos sistemas de detecção de HPLC são usados em análise comparativa de amostras de heroína ilícita, sendo o detector ultravioleta o mais comum, podendo ser usado para a quantificação de alcalóides do ópio e adulterantes, como também de diluentes, contudo não é muito específico ou sensível. O detector de fotodiodos (DAD) permite uma identificação mais específica, sendo o detector de fluorescência aquele que permite uma maior selectividade e sensibilidade. [5] Numa parte desta tese analisamos os espectros de fluorescência de paracetamol e cafeína, dois dos agentes de corte mais utilizados na heroína.

A electroforese capilar (CE) é adequada para a análise da grande variedade de solutos que se encontram nas amostras de droga, especialmente os compostos que são difíceis de analisar por cromatografia gasosa e por cromatografia líquida de alta eficiência. As técnicas de electroforese capilar conseguem separar uma grande variedade de solutos, incluindo compostos que são muito polares, termicamente lábeis e/ou não voláteis, com uma grande eficiência e selectividade. Este método é adequado para amostras de heroína, contudo necessita de uma preparação adequada da amostra antes da análise instrumental. A CE oferece uma alta eficiência, selectividade, é económico, como também é uma técnica de grande potencial para um químico forense. [4,27]

A espectroscopia de absorção atómica (AAS) é aplicada na análise de compostos inorgânicos em amostras ilícitas de heroína. [5]

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa tandem [21] fornece uma maior capacidade de análise e de identificação dos compostos relativamente ao HPLC e à CE.

2.1- Métodos Quimiométricos na análise de heroína

Para a interpretação dos dados obtidos pelas técnicas analíticas utilizam-se os métodos quimiométricos, [34] que se baseiam no uso de programas estatísticos, que permitem a formação de perfis mais objectivos e de impressões. Métodos que são usados em análises comparativas de heroína, incluem a análise de componentes principais (PCA) [36, 20, 37], a análise hierárquica por clustering (HCA) [20], o método dos k-vizinhos (k-NN) [20]. Estes métodos vão permitir criar uma ligação entre as amostras analisadas para se determinar a sua origem, como também comparar amostras de heroína de rua.

Há alguns exemplos na literatura do uso de PCA na comparação de lotes de heroína, como também para a determinação da sua origem geográfica, baseada nas concentrações variadas de alcalóides ou em elementos de traços inorgânicos. [5] Este método é uma técnica de análise multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis em outro conjunto, os componentes principais, porém com propriedades diferentes. Cada componente é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e são estimados com o propósito de reter o máximo de informação, em termos de variação total contida nos dados. A PCA é associada à ideia de redução de dados, com a menor perda possível de informação. [5, 34]. Também é possível extrair informação em relação às variáveis que são importantes para a informação que é observada. O número de amostras disponíveis pode ser um factor condicionante, pois de acordo com a literatura [5], um estudo com nove amostras, as conclusões devem ser vistas com cautela.

Um outro método usado no perfil de heroína, é a análise por clustering, principalmente a análise hierárquica por clustering (HCA), em que pode ser baseada na concentração de alcalóides do ópio ou nas concentrações de traços de elementos, e através dos grupos de amostras similares é possível a identificação dos lotes de heroína e a determinação da sua origem. Contudo, na maioria dos casos não é especificado que tipo de similaridade é aplicado neste método. O resultado de um clustering hierárquico é um dendograma que fornece uma fácil estimativa visual das semelhanças entre as amostras. As distâncias entre as amostras ou grupos de amostras é a medida de similaridade ou dissimilaridade. [5,20]

A PCA e a HCA são métodos que podem ser usados para verificar se a informação está presente, pois são métodos não-supervisionados, em que não são adequados para se tomar a decisão em relação à origem de uma nova amostra que necessita de ser classificada.

O método dos k-vizinhos é usado geralmente para se realizar uma classificação. A classificação é realizada usando um conjunto de dados de referência que contem variáveis e a variável alvo. Com base no conjunto de dados de referência o modelo é estabelecido, e este é aplicado em dados não classificados. A distância do desconhecido para os k-vizinhos determina a atribuição da classe. [20]

A diluição de amostras de heroína não tem efeito adicional na capacidade discriminatória dos métodos estatísticos, sendo portanto uma das vantagens. Estes métodos resultam em uma caracterização e/ou discriminação mais objectiva. [5]

No desenvolvimento deste trabalho utilizou-se HPLC/DAD, a fluorimetria e a espectroscopia de absorção UV/ Visível. No entanto, houve muitas limitações a uma correcta abordagem destas análises. Dadas as características das amostras, a Unidade Nacional de Combate ao Tráfico de Estupefacientes/NEA apenas disponibilizou três exemplares e muita escassa quantidade de cada uma delas. Assim sendo, não foi possível fazer uma validação do método seleccionado para traçar o perfil do produto. Também o facto de apenas se dispor de três amostras não permitiu uma abordagem especulativa sobre os resultados obtidos, dado que não foi cedida nenhuma informação de referência.

A metodologia foi desenvolvida no sentido de poder ser continuada no futuro e servindo nesta fase apenas como ensaio académico exemplificativo do que poderia vir a ser explorado.

III- Métodos

3.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e ciências forenses

A **cromatografia líquida de alta** eficiência (HPLC) foi introduzida no final dos anos de 1960. É muitas vezes usada em aplicações forenses como na análise de drogas, em toxicologia, na análise de explosivos, de tintas, de fibras como também plásticos, sendo uma ferramenta chave na análise de vários materiais de natureza desconhecida. [2,38]

3.1.1- HPLC: Considerações gerais

A cromatografia é um método de separação de componentes de uma mistura em que a separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. Os métodos cromatográficos classificam-se de acordo com a natureza das fases estacionária e móvel, dos seus estados físicos e dos mecanismos de separação.

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica física de separação conduzida num líquido como a fase móvel. A amostra é separada nos seus componentes (ou analitos), distribuindo entre a fase móvel (um líquido que flui) e uma fase estacionária (sorbentes embalados dentro da coluna). A seguir, utilizamos um método analítico para detectar os componentes. O HPLC é uma forma mais recente do LC que usa colunas de partículas pequenas, através da qual a fase móvel é bombeada a alta pressão. O HPLC é caracterizado pelo uso de bombas

a alta pressão para uma separação mais rápida, por colunas reutilizáveis e mais eficazes para uma boa separação, e um melhor controlo de todo o processo para se obter resultados mais precisos e reproduzíveis. [39,40] O HPLC é umas das técnicas analíticas de separação mais utilizadas, devido à sua sensibilidade, à sua adaptabilidade para determinações quantitativas precisas, à sua fácil manipulação, é adequado para a separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis, e acima de tudo, a sua aplicação generalizada a substâncias importantes para a indústria, em muitos campos da ciência. Exemplos destas substâncias incluem os aminoácidos, as proteínas, os ácidos nucleicos, os hidratos de carbono, as drogas, os pesticidas, os antibióticos, compostos fenólicos, esteróides e uma variedade de substâncias inorgânicas. [41]

Um típico sistema de HPLC consiste num reservatório de eluente, uma bomba a alta pressão com controlo de fluxo, um sistema de injeção da amostra, uma protecção de aço inoxidável e colunas analíticas preenchidas com material de fase estacionária, um detector e um sistema de recolha e de registo de resultados. (Figura 3)

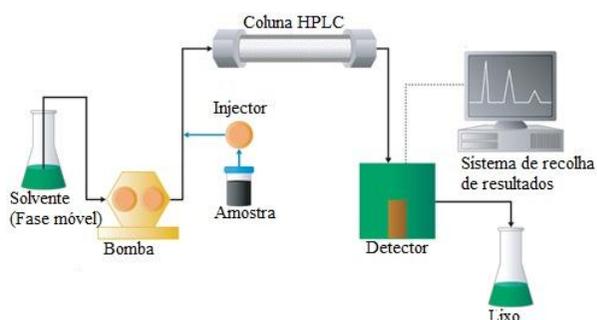


Figura 3- Sistema de HPLC

Em geral, a técnica de HPLC é um processo dinâmico onde as moléculas dos analitos se movem através de um enchimento poroso, por acção da fase móvel bombeada continuamente, e interagem com diferentes afinidades com o material da fase estacionária.

A coluna de HPLC é o coração do sistema. De modo a manter a coluna em bom funcionamento é muito importante usá-la cuidadosamente. As maiores eficiências que são possíveis com o HPLC são as opostas à convencional cromatografia líquida, pois é possível a introdução de materiais de empacotamento com partículas de tamanho entre o intervalo de 3-10 μ m. As pressões que são geradas requerem materiais de empacotamento que possam sustentar tais pressões, como a sílica que pode ser usada por longos períodos e a pressões acima de 28000 kPa sem danos físicos, sendo então o material de empacotamento de HPLC mais usado. Uma coluna de protecção (pré-coluna), ou seja uma pequena coluna, que está localizada em frente da coluna analítica de forma a protegê-la das impurezas da amostra, como também de partículas de desgaste. As pré-colunas devem ter aproximadamente 5% do tamanho da coluna e convém que sejam mudadas frequentemente. Podem conter o mesmo material de empacotamento que a coluna analítica, se tiverem apenas a função de proteger, mas podem ter outra fase se for pretendida uma pré-separação antes da separação analítica propriamente dita. [35]

As colunas não devem ser usadas com eluentes que possam dissolver o empacotamento, ou com amostras ou extractos de amostras que possam introduzir partículas ou causar precipitação de material sólido no sistema. É muito importante assegurar que os solventes usados nas misturas eluentes sejam miscíveis. [35] Além disso todos os

solventes devem ter um grau de pureza elevado, o que se designa vulgarmente por “HPLC-grade”.

Consoante as características específicas do sistema experimental, a cromatografia líquida de alta eficiência pode ser classificada como cromatografia de fase normal (HPLC-NP) ou cromatografia de fase reversa (HPLC-RP).

Na cromatografia de fase normal, também conhecida como cromatografia de sólido-líquido ou cromatografia de adsorção, é usada uma fase móvel que é apolar e uma fase estacionária que é polar. A cromatografia de fase normal é um modo de separação que consiste na adsorção/dessorção do analito para a fase estacionária polar (normalmente sílica ou alumina), em que o soluto apenas está em contacto superficial com a fase estacionária e não totalmente embebido nela. Os analitos polares migram lentamente através da coluna, devido às grandes interações com os grupos silanol. (Figura 3.1) Os típicos eluentes neste modo de HPLC são os alcanos, como o heptano.

A cromatografia de fase normal é muito adequada para a separação de compostos apolares, incluindo isómeros. Contudo tem desvantagens, em que uma delas é a fácil contaminação das superfícies polares pelos componentes da amostra, o que pode ser reduzido pela ligação de grupos funcionais polares aos grupos silanol. [39]



Figura 3.1- Esquema de Coluna e respectiva fase móvel em cromatografia de fase normal

A cromatografia de fase reversa usa um eluente polar e uma fase estacionária apolar. (Figura 3.2) As primeiras fases estacionárias eram partículas sólidas revestidas com líquidos apolares, mas foram rapidamente substituídas por grupos de ligação hidrofóbicos, tais como grupos octadecilo ligados (C_{18}), em suporte de sílica.

Na fase móvel polar normalmente é usada uma mistura de metanol ou acetonitrilo com água, para ajustar a retenção e a selectividade. A adição de água vai aumentar a polaridade do eluente, o que geralmente aumenta a retenção do analito. A adição de água ao metanol vai aumentar a viscosidade e posteriormente a pressão da coluna, enquanto a mistura de água:acetonitrilo já não.

A cromatografia de fase reversa é o modo de HPLC mais usado, pois é adequado para a análise de analitos polares (solúveis em água), de polaridade média e ainda alguns analitos apolares. [35]



Figura 3.2- Esquema de coluna e respectiva fase móvel em cromatografia de fase reversa

Modo de separação	Fase estacionária (partículas)	Fase móvel (solvente)
Fase normal	Polar	Apolar
Fase reversa	Apolar	Polar

Tabela 3- Características das fases para separações baseadas na polaridade

Quando a composição da fase móvel é alterada gradualmente ao longo da eluição cromatográfica, por aumento ou diminuição de percentagem de solvente orgânico, fala-se de uma eluição em gradiente. Nos casos em que a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a análise, o tipo de eluição é conhecido como isocrático.

O detector ideal de HPLC deve ter muita sensibilidade, uma resposta específica ou universal rápida, um amplo intervalo dinâmico linear, um limite de detecção elevado (igual a elevada sensibilidade), uma suficiente estabilidade e reprodutibilidade do sinal, uma ligação entre a coluna e o detector curta e directa e um detector com um volume tão pequeno quanto possível. Para além destes requisitos, existem outras características que afectam a aplicabilidade de um detector, por exemplo, se é necessário que um detector mostre a mesma sensibilidade para todos os solutos detectados, e também que o sinal seja o menos possível influenciado pela temperatura, a velocidade de fluxo e a composição da fase móvel. [35]

O detector da rede dos diodos, também conhecido como “Diode Array Detector” (DAD), fornece um espectro UV da eluição dos constituintes enquanto funciona como um detector de varrimento de absorvância UV/Visível de múltiplos comprimentos de onda. Os sinais dos fotodiodos individuais são processados para originar um espectro da amostra. Porque os espectros são gerados ao mesmo tempo, o DAD pode contribuir para a identificação do constituinte correspondente ao pico de absorção. O DAD pode funcionar para recolher dados em um ou mais comprimentos de onda através do cromatograma, ou recolher um espectro completo em um ou mais analitos numa só análise, gerando ainda uma visão 3D (absorvância, comprimento de onda e tempo de eluição) da absorção no UV de todos os constituintes da

amostra injectada. Se dois compostos têm espectros diferentes, é possível distingui-los mesmo tendo tempos de eluição similares. Outra aplicação comum do DAD é a determinação da pureza do composto, em que o software que acompanha o detector calcula a taxa de absorção através do pico. [40]

A detecção por fluorescência pode aumentar a sensibilidade, mas ao mesmo tempo é muito selectiva. A resposta obtida é dependente da energia da luz incidente e da configuração óptica do detector. Os detectores de fluorescência podem ser de monocromador duplo, de filtro duplo ou uma combinação de monocromador (excitação) e de filtro (emissão). Os comprimentos de onda de excitação e emissão obtidos com instrumentos de monocromador duplo fornecem selectividade máxima ao analito alvo, contudo, compostos com estruturas químicas semelhantes, possuem espectros de fluorescência diferentes, o que pode ser uma desvantagem. Com alguns instrumentos é possível programar a mudança de comprimento de onda de excitação e emissão durante uma análise, mas pressupõe o conhecimento dos analitos, do seu tempo de retenção e do espectro de fluorescência. [35]

3.2- Fluorescência e ciências forenses

A fluorescência envolve a emissão de luz pelos estados electronicamente excitados das moléculas ou dos átomos. Nos últimos 20 anos, as ciências forenses têm sido alvo de um grande crescimento e desenvolvimento, assim como as técnicas de análise a elas associadas. A espectroscopia de fluorescência é uma dessas técnicas, tendo alcançado um grande avanço tecnológico nas ciências biológicas assim como nas ciências forenses. [42] A elevada sensibilidade permite níveis de detecção até uma molécula única.

A fluorescência representa nos dias de hoje uma ferramenta essencial no desenvolvimento de biotecnologia, citometria de fluxo, diagnóstico médico, sequenciação de ADN, em análises genéticas, etc.

Uma vez que a detecção por fluorescência é muito sensível, esta tecnologia tem sido usada por cientistas de áreas muito distintas. Antes de discutir as condições para observar a fluorescência, vamos ver o que acontece quando uma molécula absorve luz.

3.2.1- Absorção molecular no Ultravioleta/Visível

A absorção de luz visível ou ultra-violeta por moléculas produz estados excitados, pela promoção de electrões a orbitais de maior energia.

A luz é uma forma de radiação electromagnética que pode ser caracterizada pelo seu comprimento de onda (λ) e pela sua frequência (ν), e que de acordo com a teoria quântica, tem uma energia, E, dada por:

$$E=h\cdot\nu=h\cdot c/\lambda$$

onde h é a constante de Planck e c é a velocidade da luz.

Diferentes processos para a interacção da luz com moléculas são possíveis, mas o de particular relevância é o de absorção de luz. Uma das leis fundamentais da fotoquímica, a lei de Grotthuis-Draper, diz que só as moléculas que absorvem luz podem induzir uma mudança química. Se a luz possuir a energia apropriada ($\Delta E=h\cdot\nu$, onde ΔE é a energia de separação entre os estados na molécula), poderá ser absorvida pelas moléculas para produzir estados excitados nos quais os electrões são promovidos para orbitais de maior energia. [43]

A absorvância é uma medida da quantidade de radiação que é absorvida por uma amostra, sabendo a intensidade da radiação que sobre ela se incide, e é directamente proporcional ao caminho percorrido pela luz na amostra e à concentração da amostra, de acordo com a lei de Beer-Lambert:

$$A=\epsilon bc$$

onde ϵ é a constante de proporcionalidade (coeficiente de absorção molar), b o caminho percorrido pelo feixe de luz na amostra (largura da célula), c a concentração e A a absorvância.

Diferentes moléculas absorvem radiação a comprimentos de onda distintos. Deste modo, um espectro de absorção ou de fluorescência é característico de uma molécula.

3.2.1.1- Transições electrónicas

A absorção de radiação provoca a excitação dos electrões de valência. Existem três tipos de transições que devem ser consideradas:

1. Transições que envolvam electrões em orbitais σ , π e n em moléculas orgânicas.
2. Transições que envolvam transferência de carga.
3. Transições que envolvam electrões d e f em complexos metálicos inorgânicos.

Quando um átomo, ou molécula, absorve energia, os electrões são promovidos (excitados) do seu estado fundamental para um estado excitado.

A absorção no UV/Visível em moléculas orgânicas é restrita a certos grupos funcionais (*chromóforos*), que contêm electrões de valência com energia de excitação baixa. Os espectros UV/Visível podem ser usados para identificação qualitativa de moléculas e espécies atómicas pois são característicos de uma determinada estrutura molecular.

Utilizamos um espectrofotómetro para medir os espectros de absorção. Este envolve uma fonte de luz, um elemento dispersivo (rede de difracção) para separar a luz branca nos vários comprimentos de onda, a amostra e um detector. Tem ainda fendas para controlar a largura do feixe de luz.

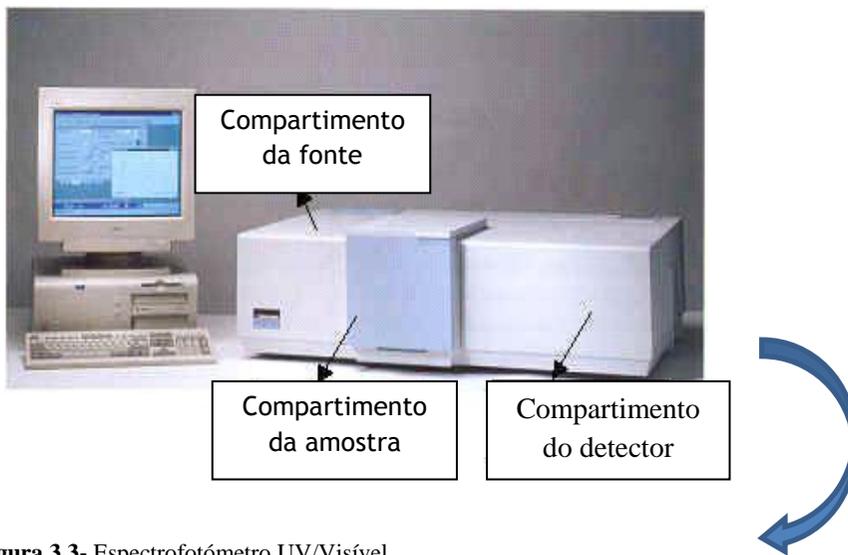


Figura 3.3- Espectrofotômetro UV/Visível

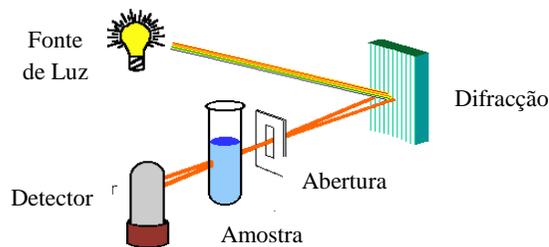


Figura 3.4- Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro UV/Visível

3.2.2- Luminescência

O conceito de luminescência foi descrito por Eilhardt Wiedemann, em 1888, para caracterizar todos os fenômenos de luz que não são unicamente condicionados por aumento da temperatura, em oposição ao fenômeno de incandescência. Alguns anos antes, Stokes observou a luminescência de alguns compostos, incluindo sais de urânio.

Chama-se luminescência à emissão de fotões, na gama do Ultravioleta, Visível ou Infravermelho Próximo, por parte de espécies excitadas electronicamente.

A seguir à absorção de luz, as moléculas no seu estado excitado podem perder o seu excesso de energia por calor, através de reacções químicas, ou por remissão de luz. Experimentalmente há dois casos diferentes. Em alguns a luz é reemitida logo a seguir à absorção, tipicamente 10^{-7} - 10^{-12} s. Em outros casos, a luminescência decai em milissegundos, segundos ou minutos depois da excitação. O decaimento de curta duração denomina-se fluorescência, enquanto o decaimento lento denomina-se fosforescência. Estes dois processos são distinguidos a nível molecular. [43]

Podemos utilizar outro método de classificação de luminescência de acordo com o modo de excitação.

Fenómeno	Modo de excitação
Fotoluminescência (fluorescência, fosforescência)	Absorção de luz (fotões)
Radioluminescência	Radiação ionizada (raio-X, α , β e γ)
Catodoluminescência	Raios catódicos (feixes de electrões)
Electroluminescência	Campo eléctrico
Termoluminescência	Aquecimento prévio ao armazenamento de energia (ex. irradiação radioactiva)
Quimioluminescência	Processo Químico (ex. oxidação)

Bioluminescência	Processo Bioquímico
Sonoluminescência	Ultrassons

Tabela 3.1- Tipos de luminescência dependendo do tipo de excitação

3.2.2.1- A fluorescência molecular como ferramenta analítica

As técnicas analíticas baseadas na detecção de fluorescência são bastante populares devido à sua elevada sensibilidade e selectividade.

Quando um analito é fluorescente, é possível fazer detecção fluorimétrica directa usando um espectrofluorímetro. Através da escolha do comprimento de onda da luz utilizada para excitar a amostra, a energia pode ser escolhida de forma a evidenciar as características de determinados componentes do sistema.

É possível analisar, recorrendo a esta técnica, hidrocarbonetos aromáticos, proteínas, algumas drogas/fármacos, clorofilas, entre outros. Hoje em dia as aplicações vão desde a análise de poluentes em águas, à monitorização de processos industriais, monitorização de espécies clinicamente relevantes, criminologia, etc. [44]

3.2.2.2- Fluorescência

A emissão de fotões devido à transição $S_1 \rightarrow S_0$ em moléculas orgânicas é designada por fluorescência.

O espectro de fluorescência está, geralmente, localizado a comprimentos de onda maiores (a energia mais baixa) do que o espectro de absorção, uma vez que a absorção vem do nível vibracional zero do estado fundamental e a fluorescência vem do nível vibracional

zero do estado excitado, formado pela perda de energia no estado excitado que se deve a relaxação vibracional. (Figura 3.5). A diferença na energia entre as bandas de absorção e fluorescência chama-se o desvio de Stokes. A fosforescência vem a comprimentos de onda maiores em consequência do facto que a energia do estado tripleto é inferior ao do estado singlete.

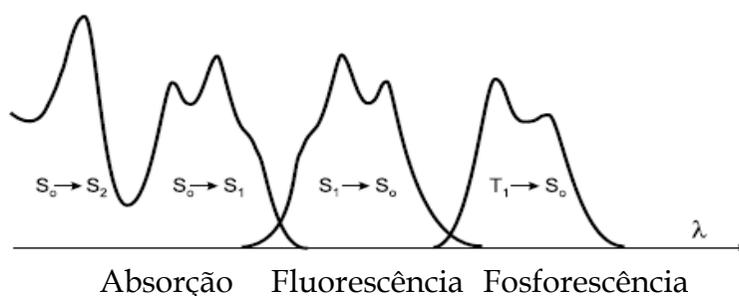


Figura 3.5- Espectros de absorção e emissão (por fluorescência ou fosforescência) de radiação em função dos comprimentos de onda

3.2.2.2.1- Características da emissão de fluorescência

Como já foi referido anteriormente, a emissão de fluorescência das moléculas é sempre observada a comprimentos de onda maiores que a absorção. Isto é expresso na forma do Diagrama de Jablonski, ou seja, é uma representação dos vários estados energéticos de uma molécula. [43] (Figura 3.6)

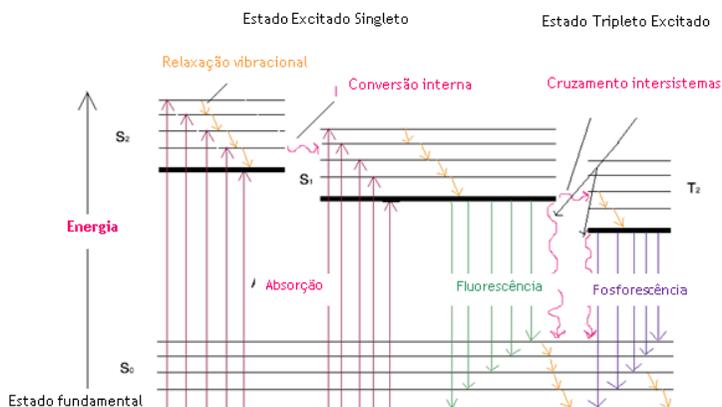


Figura 3.6- Diagrama de Jablonski

De acordo com este diagrama, cada nível electrónico encontra-se dividido em vários níveis vibracionais, que por sua vez se encontram divididos em vários níveis rotacionais. Na Figura 3.6 é ainda possível visualizar alguns dos fenómenos de transições electrónicas entre os vários níveis de energia: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistemas, fosforescência e transições tripleto-tripletto. Estados electrónicos singletos são chamados S_0 (estado electrónico fundamental), S_1 , S_2 , ... S_n e os estados tripleto, T_1 , T_2 , ... T_n . Os níveis vibracionais estão associados com cada estado electrónico.

As setas verticais ascendentes correspondem a transições entre níveis de energia desde o nível vibracional zero (o mais baixo) do nível S_0 até ao nível vibracional do nível de destino (excitação). As setas verticais descendentes correspondem à transição com emissão de radiação, desde o nível vibracional excitado até ao de destino, com energia mais baixa.

Verifica-se que, à temperatura ambiente, a maioria das moléculas se encontra no nível vibracional mais baixo do estado fundamental.

De acordo com a regra de Stokes (observação empírica que antecedeu o diagrama de Jablonski), o comprimento de onda da emissão de fluorescência deverá ser sempre maior que o do espectro de absorção. No entanto, em muitos casos, o espectro de absorção sobrepõe-se ligeiramente ao espectro de emissão, isto é, a fracção de luz é emitida a um comprimento de onda mais baixo que o da luz absorvida.

Em geral, para moléculas rígidas as diferenças entre os níveis vibracionais são semelhantes no nível fundamental e nos estados

excitados, de tal maneira que o espectro de fluorescência é semelhante à banda de menor energia do espectro de absorção (imagem espelhada). [44]

3.2.2.3- Desvio de Stokes

O desvio de Stokes é o intervalo (geralmente em nanómetros) entre o máximo da banda de absorção com menor energia e o máximo de fluorescência. Este parâmetro fornece informação acerca dos estados excitados.

De um ponto de vista prático, a detecção da fluorescência das espécies é tanto mais fácil quanto maior for o desvio de Stokes, devido à separação espectral da luz de excitação e de emissão. [44]

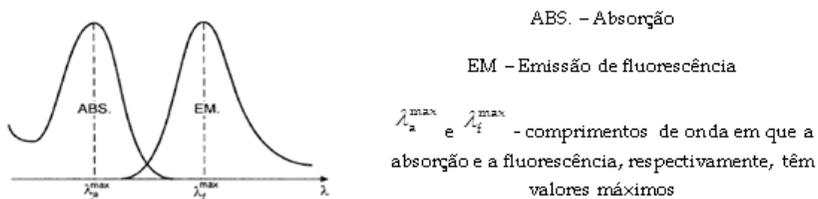


Figura 3.7- Definição do Desvio de Stokes

3.2.3- Instrumentação em espectroscopia de fluorescência

Ao fornecer radiação a uma amostra, num comprimento de onda fixo, estipulado anteriormente, é possível detectar a intensidade da radiação emitida ao longo de um determinado intervalo de comprimentos de onda. Obtém-se desta forma um espectro de emissão de fluorescência. Com alguns fluorímetros além de se obterem espectros de emissão de fluorescência, também é possível a obtenção dos de excitação. Num espectro de excitação de fluorescência obtém-se

a emissão de fluorescência a um comprimento de onda fixo em função de um comprimento de onda de excitação. Em princípio, o espectro de excitação deve ser igual ao espectro de absorção, mas com a vantagem de sensibilidade mais elevada de observação. Para a observação de fluorescência, os requerimentos básicos são uma fonte de luz excitatória, a amostra, e um sistema de detecção. Contudo, para estudos quantitativos é essencial separar os comprimentos de onda para excitação e emissão de fluorescência, e é desejável, para otimizar a sensibilidade, o uso de sistemas ópticos apropriados, envolvendo as fendas, lentes, etc. Ou seja, um fluorímetro típico possui: uma lâmpada de xénon, como fonte de luz excitatória; um monocromador para seleccionar o comprimento de onda de excitação e outro para emissão; a fluorescência é detectada por um fotodíodo, fotomultiplicador ou CCD (charge coupled device). [43] Existem também fendas com a função de controlar a quantidade de luz e também de restringir os comprimentos de onda da radiação que atravessa a amostra e que chega ao monocromador. (Figura 3.8)

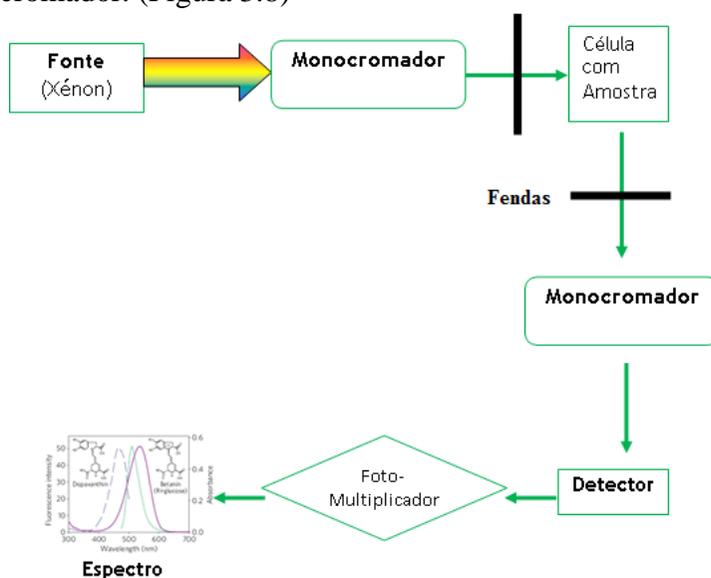


Figura 3.8- Esquema de um fluorímetro

IV- Materiais

4.1- Materiais usados em HPLC

Para a realização deste trabalho, foi usado um equipamento de HPLC da marca Gilson, acoplado a um detector fotodiodo array (DAD) modelo 170 com as seguintes características: temperatura de 25 °C, fluxo 1,5 mL/min, coluna da marca Sherisorb ODS C18 25 cm × 5Ø, bombas modelos 305 e 306, um sistema de injeção automática modelo 234, um sistema de mistura modelo 811 e um sistema de interface modelo 506 C. A fase móvel consistiu numa mistura eluente de água contendo ácido ortofosfórico e acetonitrilo HPLC-grade, microfiltrada e degaseificada.

Os padrões utilizados foram etomorfina cristalizada, diamorfina cristalizada, codeína cristalizada, com referências à União química portuguesa da Fábrica de alcalóides naturais sintéticos e seus derivados da Uquipa, o fosfato de codeína da Gehe & Co. A. G. Dresden-N, e ainda cloridrato de morfina, cafeína, paracetamol, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico disponibilizados pela Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra.

As amostras de heroína (amostra 19277/10-a18, amostra 10263/09-a13 e amostra 10263/09-a11) foram cedidas pela Unidade Nacional de Combate ao Tráfico de Estupefacientes, com a respectiva autorização do Tribunal. (Anexo 1)

4.2- Materiais usados em Fluorescência e Absorção Molecular Ultravioleta/Visível

Para a realização deste trabalho foi usado um fluorímetro (SPEX-FL322) da marca Jobin Yvon-SPEX do grupo Horiba e um espectrofotômetro de absorção molecular UV/Visível (UV-2100) da marca Shimadzu. Células de quartzo da Hellma com um percurso óptico de 10 mm.

Os compostos utilizados nesta análise foram paracetamol, cafeína, heroína e uma das amostras fornecidas pela Unidade Nacional de Combate ao Tráfico de Estupefacientes, com a respectiva autorização do Tribunal.

Os solventes utilizados foram etanol (Panreac; 99,5%), metanol (Merck; 99,8%) e clorofórmio (Fischer Chemical; 99,99%).

O Dodecilsulfato de sódio (SDS) com referência à Sigma Aldrich.

V- Resultados e Discussão

5.1 - Resumo do processo de HPLC/DAD

As amostras de heroína e os padrões foram dissolvidos em uma solução de clorofórmio:metanol (1:1), sendo o solvente recomendado pela Dr^a Joana Santos da Polícia Judiciária na análise de amostras de heroína. Foi também sugerido adicionar amónia, caso os compostos não fossem solúveis em clorofórmio:metanol, o que não foi necessário pois os compostos analisados dissolveram-se no solvente.

A análise das amostras foi realizada em triplicado, durante três dias seguidos. (Anexo 2)

As concentrações das amostras e dos padrões foram as seguintes:

- Amostra 19277/10-al8: 7,92 mg/mL; 8,26 mg/mL; 8,02 mg/mL
- Amostra 10263/09-al3: 8,99 mg/mL; 7,32 mg/mL; 8,10 mg/mL
- Amostra 10263/09-al1: 11,30 mg/mL; 9,84 mg/mL; 9,12 mg/mL
- Paracetamol: 0,29 mg/mL
- Cafeína; 0,2 mg/mL
- Codeína: 1,25 mg/mL
- Diamorfina: 0,97 mg/mL
- Etomorfina: 0,91 mg/mL
- Fosfato de codeína: 0,95 mg/mL
- Cloridrato de morfina: 0,28 mg/mL
- Ácido salicílico: 0,39 mg/mL

- Ácido acetilsalicílico: 0,66 mg/mL

Fez-se a análise por HPLC/DAD de todas as soluções de modo a obter os cromatogramas correspondentes, onde foram registados os tempos de retenção, os espectros de absorção ultravioleta e as áreas correspondentes às quantidades injectadas.

5.1.1- Resultados obtidos por HPLC/DAD

Numa fase inicial fez-se um ensaio preliminar de screening para aferir a metodologia tendo-se adaptado a mistura eluente de água contendo ácido ortofosfórico e acetonitrilo HPLC-grade. O fluxo não pode ser superior a 1,5 mL por condicionantes do sistema que foi usado. A fluxos superiores a pressão era demasiado elevada, o que não era suportado pelo aparelho nem pela coluna. Assim, os tempos de retenção obtidos são superiores aos descritos na bibliografia, mas a resolução dos constituintes pode considerar-se boa.

A amostra 19277/10-al8 foi seleccionada para estes testes iniciais. Depois de extraída nas condições descritas foi sujeita a uma eluição isocrática, obtendo-se o perfil correspondente ao cromatograma da Figura 5.

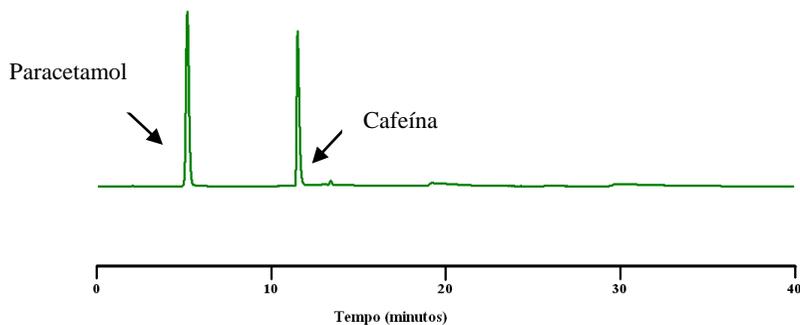


Figura 5- Cromatograma da amostra 19277/10-al8 a $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ e 340 nm , fluxo a 1,5 mL/min, volume de injeção 20 μL (concentração de 7,92 mg/mL)

Dado que a partir dos 12 minutos os compostos não apresentavam uma boa resolução, alteraram-se as condições da análise fazendo uma eluição por gradiente, mas mantendo o mesmo fluxo de 1,5 mL/min. Amostras padrões foram sujeitas a estas alterações e os resultados obtidos com volumes de injeção de 20µL e de 100µL. Estas concentrações são influenciadas pela diferença em que se encontram os adulterantes nas amostras.

Na tabela 5 encontram-se os resultados das amostras disponíveis para este ensaio em que a quantificação foi feita a diferentes comprimentos de onda, tendo-se escolhido o de absorção máxima para cada um deles.

Amostras n.º	Heroína ($\lambda_{\text{máx}}$ 278 nm) (%)	Codeína ($\lambda_{\text{máx}}$ 283 nm) (%)	Paracetamol ($\lambda_{\text{máx}}$ 244 nm) (%)	Cafeína ($\lambda_{\text{máx}}$ 273 nm) (%)
19277/10- al8	24,34	2,15	6,68	8,21
10263/09- al1	49,49	6,03	9,42	15,29
10263/09- al3	40,52	6,99	5,96	12,45

Tabela 5- Resultados das amostras disponíveis para este ensaio

Na Figura 5.1 é possível ver a total sobreposição do perfil do extracto da amostra com o da solução padrão injectada contendo padrão de paracetamol, um dos dois contaminantes destas amostras. Os espectros ultravioleta também são sobreponíveis (Figura 5.2) corroborando a identificação deste componente na amostra problema.

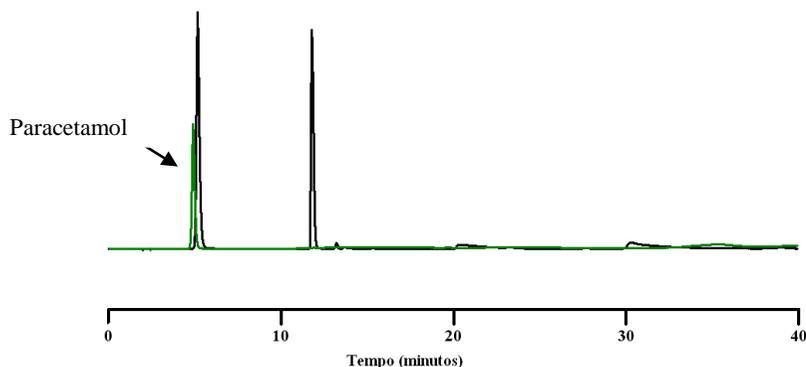


Figura 5.1- Cromatograma da amostra 19277/10-al8 (preto) e solução padrão de paracetamol (verde) a $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ e 340 nm , fluxo $1,5 \text{ mL/min}$, volume de injeção $20\mu\text{L}$

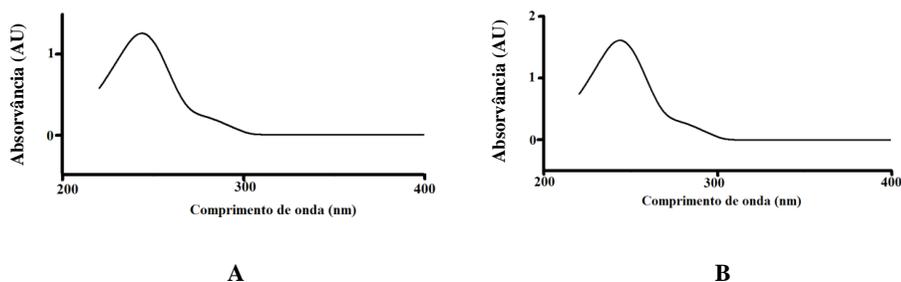


Figura 5.2: A- Paracetamol na amostra; B- Paracetamol padrão

Para as outras duas amostras também se verificou a sobreposição do perfil do extracto da amostra com o da solução padrão de paracetamol, como também os espectros ultravioleta são sobreponíveis.

Através da Figura 5.3 pode-se ver a sobreposição do perfil do extracto da amostra com o da solução padrão injectada contendo padrão

de cafeína, o outro contaminante presente nas amostras de heroína, sendo também os espectros ultravioleta sobreponíveis (Figura 5.4).

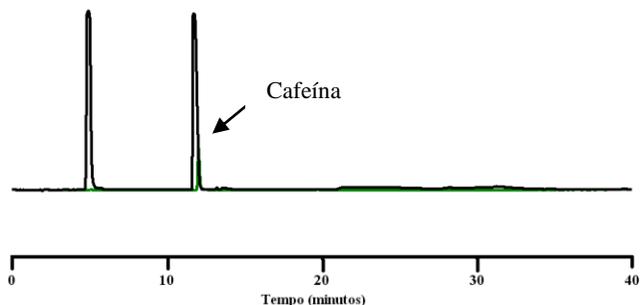


Figura 5.3- Cromatograma da amostra 10263/09-a11 (preto) e solução padrão de cafeína (verde) a $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ e 340 nm , fluxo a $1,5 \text{ mL/min}$, volume de injeção $20 \mu\text{L}$

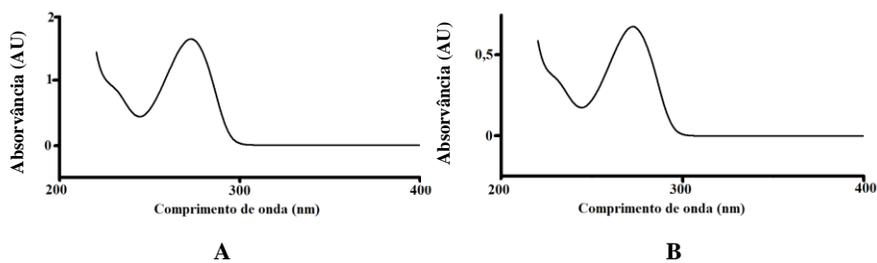


Figura 5.4: **A-** Cafeína na amostra; **B-** Cafeína padrão

Da análise da Figura 5.5 verifica-se a presença de codeína, devido à sobreposição do perfil do extracto da amostra e da solução padrão de codeína, mas pelos espectros de ultravioleta (Figura 5.6) verifica-se uma diferença numa das bandas, em que na amostra, esta é menos acentuada, que pode ser devido à presença de codeína já acetilada. Este resultado verificou-se na análise das três amostras.

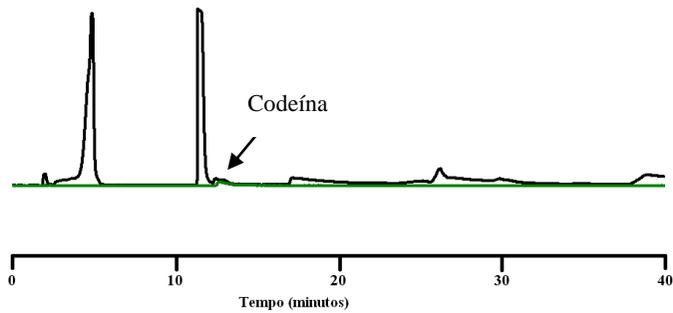


Figura 5.5- Cromatograma da amostra 10263/09-al3 (preto) e solução padrão de codeína (verde) a $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ e 340 nm , fluxo a $1,5 \text{ mL/min}$, volume de injeção de $100\mu\text{L}$ e $20\mu\text{L}$, respectivamente

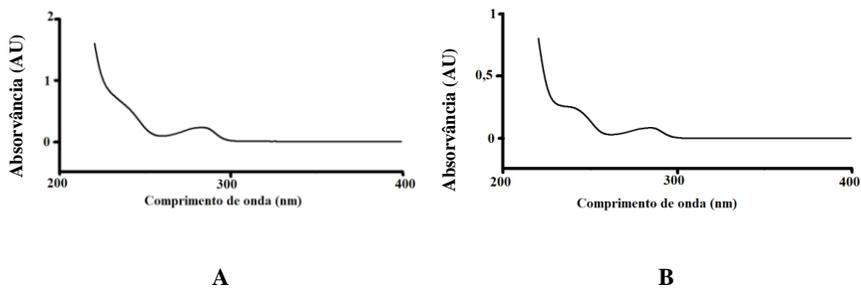


Figura 5.6: **A-** Acetilcodeína na amostra; **B-** Codeína padrão

Por último, foi possível identificar e quantificar a heroína nas amostras (Figura 5.7), onde os respectivos espectros ultravioleta (Figura 5.8) confirmam a presença de heroína.

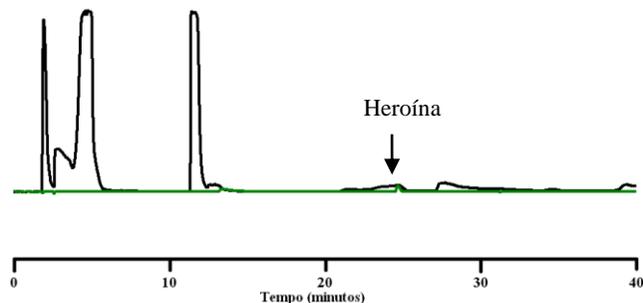


Figura 5.7- Cromatograma da amostra 10263/09-al1 (preto) e solução padrão de heroína (verde) a $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ e 340 nm , fluxo a $1,5 \text{ mL/min}$, volume de injeção de $100\mu\text{L}$

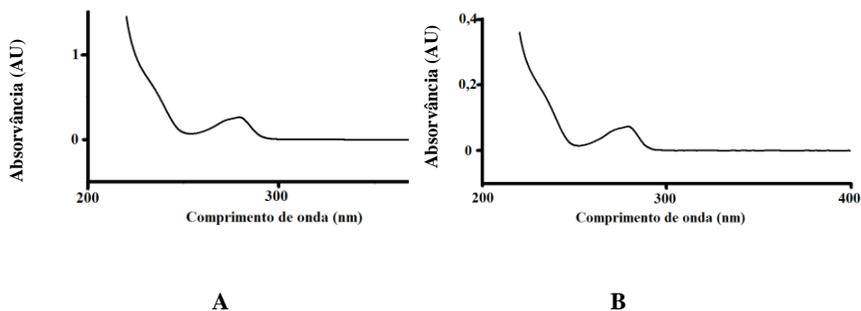


Figura 5.8: A- Heroína na amostra; B- Heroína padrão

Da análise da amostra 19277/10-al8 com a solução padrão de heroína (Figura 5.9), não se verifica a total sobreposição relativamente ao perfil do extracto da amostra e da solução padrão de heroína, mas os espectros ultravioleta são sobreponíveis (Figura 5.10), o que pode indicar que a heroína presente na amostra pode já estar degradada e já estar na sua forma metilada.

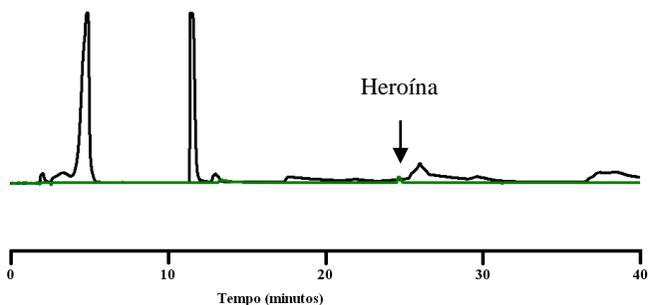


Figura 5.9- Cromatograma da amostra 19277/10-al8 (preto) e solução padrão de heroína (verde) a $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ e 340 nm , fluxo a $1,5 \text{ mL/min}$, volume de injeção de $100\mu\text{L}$

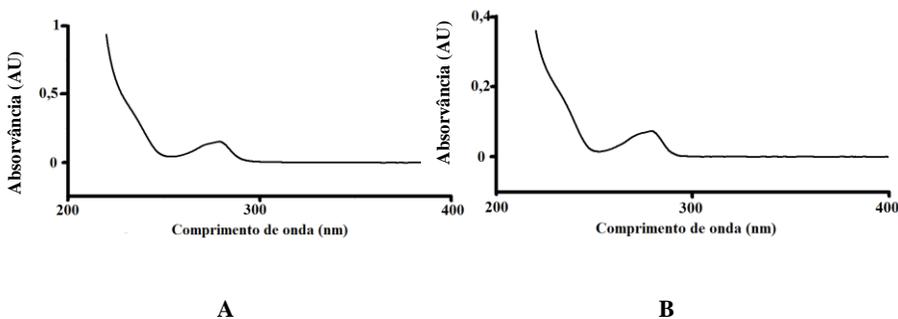


Figura 5.10: A- Heroína na amostra; B- Heroína padrão

Da análise dos outros padrões disponíveis, não foi possível identificá-los nas amostras, como também não foi possível identificar os restantes compostos presentes nestas.

No anexo 2, encontram-se os resultados obtidos para os três ensaios, em que se verifica um desvio de 6,11 em um dos ensaios de cafeína. Os desvios em relação aos ensaios para a determinação de heroína são elevados, podendo ser devido a alguma sobreposição com outro componente, do próprio aparelho ou da metodologia.

Comparando os resultados obtidos com os da literatura (Tabela 5.1), as amostras estudadas apresentam uma concentração elevada de heroína, comparativamente à literatura [29, 31], tendo valores aproximados em relação a outras amostras estudadas [23, 32] e como se pode ver pela análise dos cromatogramas obtidos, existe um arrastamento do pico pertencente à heroína, o que poderá influenciar a quantidade presente desta nas amostras.

Em relação à presença de acetilcodeína, produto da acetilação da codeína, esta encontra-se em concentrações similares às amostras estudadas na literatura, em que também se encontra acetilada, devido a molécula de codeína possuir grupos funcionais que podem reagir com

os radicais acetílicos e que posteriormente irá produzir derivados acetílicos, neste caso a acetilcodeína.

O paracetamol e a cafeína são os adulterantes mais usados em amostras de heroína, o que se pode comprovar pela análise dos resultados obtidos e também com os da literatura, em que são utilizados como adulterantes para aumentar o efeito da heroína, sendo estes produtos legais e de fácil obtenção, como também oferecem um maior lucro ao produtor, estando em concentrações inferiores em relação às amostras estudadas na literatura. [31]

Componentes	Artigos [23]	[29]	[31]	[32]
Heroína	20-40	13	17,6	40-54
Codeína	1-5	2	1	2-5
Paracetamol	-	-	46,9	-
Cafeína	-	-	24,2	-

Tabela 5.1- Valores da literatura de análises a amostras de heroína, com as respectivas percentagens

De acordo com a literatura pode-se verificar a presença de alguns constituintes da heroína, (Tabela 5.2), uma vez que no trabalho efectuado só foi possível identificar e quantificar a heroína, a acetilcodeína, o paracetamol e a cafeína.

O paracetamol, a cafeína, o pirazetam encontram-se como adulterantes em amostras de heroína.

Artigos				
Componentes	[21]	[24]	[25]	[31]
Heroína	+	+	+	+
Paracetamol	-	+	-	+
Cafeína	-	+	-	+
Codeína	+	-	-	+
Acetilcodeína	+	+	+	-
Morfina	+	-	-	+
3-monoacetilmorfina	+	+	+	-
6-acetilmorfina	-	-	+	-
Papaverina	+	+	+	-
Noscapina	+	+	+	-
Boldina	+	-	-	-
Reticulina	+	-	-	-
Tebaína	+	-	-	-
Pirazetam	-	-	-	+
Acetiltebaol	-	+	+	-

Tabela 5.2- Presença (+) e ausência (-) de componentes da heroína, com a respectiva literatura

A análise dos resultados por métodos quimiométricos, método que não foi possível aplicar devido à escassa quantidade de material, pode ser realizada inicialmente por um princípio de ausência ou presença de um determinado composto, ou por uma gama de percentagem de cada composto para verificar se se encontra nesses valores, podendo, no caso de se situar nessa zona, indicar se as amostras possuem um grau de similaridade.

Inicialmente era suposto identificar a reticulina e a boldina, que de acordo com [21] está presente na heroína, de modo a tentar verificar se era um factor através do qual se poderia determinar em que altura o látex do ópio tinha sido recolhido, uma vez que a reticulina se encontra no processo de biossíntese da morfina na *Papaver somniferum*. Tal não foi possível, devido à difícil obtenção do padrão de reticulina.

5.2- Resultados obtidos de análise de paracetamol e cafeína por fluorescência e espectroscopia de absorção UV/Visível

Com estes estudos, pretendeu-se estudar por fluorescência os constituintes de corte das amostras e a sua interacção, com ênfase particular de um possível método de detecção de paracetamol e cafeína. (Figura 5.11)

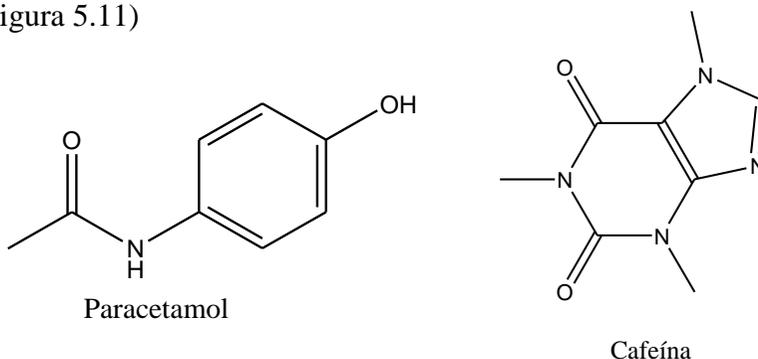


Figura 5.11- Estrutura das moléculas de paracetamol e cafeína

Numa fase inicial estudou-se o paracetamol em água, em etanol, ambos a diferentes pH's, em SDS e por fim numa mistura de metanol:clorofórmio (1:1), que foi o eluente utilizado na análise das amostras de heroína por HPLC/DAD.

Foram registados os espectros de absorção UV/Visível e de fluorescência do paracetamol em água com uma concentração de 1×10^{-5} M. Na Figura 5.12 encontram-se representados os mesmos.

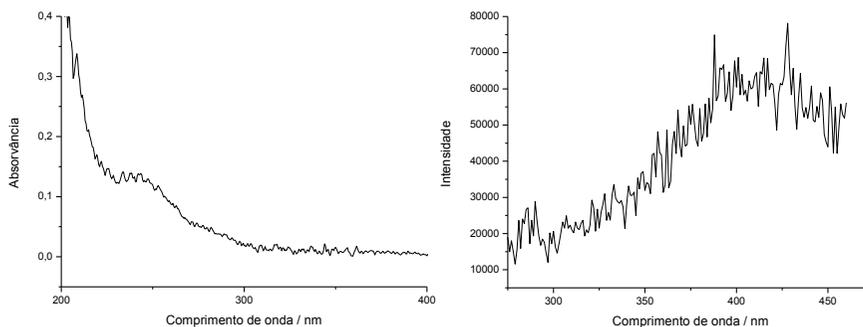


Figura 5.12- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente de paracetamol em água $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $\lambda_{\text{exc}}=260 \text{ nm}$

O paracetamol tem pK_a em água de 9,78 a 25°C . [45] O estado excitado pode ter um valor diferente do pK_a . [46] Fez-se variar o pH da solução de paracetamol no valor natural, em que o pH registado era de 5,96, com uma solução de HCl 1M, para pH's ácidos e uma solução de NaOH 0,1 M para pH's básicos. Registaram-se os espectros de absorção UV/Visível e de fluorescência nos quais estão presentes os vários pH's referidos (Figura 5.13).

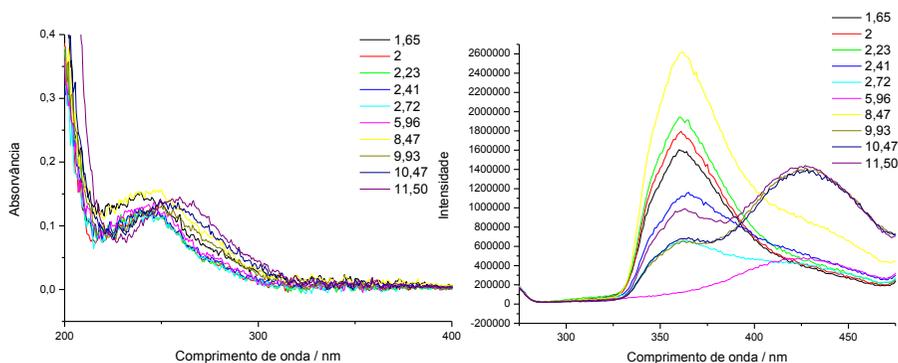


Figura 5.13- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente de paracetamol em água $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $\lambda_{\text{exc}}=260 \text{ nm}$

Pela observação dos espectros observa-se que à medida que se aumenta o pH da solução de paracetamol, há uma deslocação da banda para comprimentos de onda maiores, como se pode ver na Figura 5.14, que representa o pH mais baixo (1,65) e o pH mais elevado (11,50). Considerando o pK_a (9,78) do paracetamol, a banda a comprimentos de onda maiores nos espectros de absorção e fluorescência deve corresponder ao anião em que o grupo fenólico está ionizado.

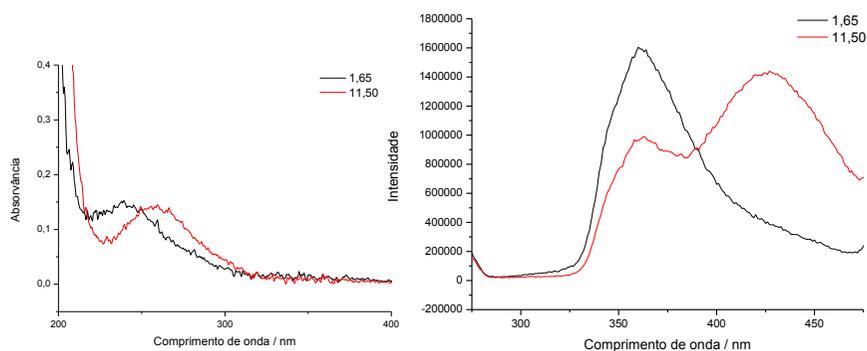


Figura 5.14- Espectros de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente de paracetamol em água $1 \times 10^{-5} M$, $\lambda_{exc}=260$ nm

A limitação dos estudos em água é a solubilidade do paracetamol. Posteriormente dissolveu-se paracetamol em etanol 95%, com uma concentração de $5 \times 10^{-5} M$, em que se obteve os espectros de absorção UV/Visível e de fluorescência (Figura 5.15).

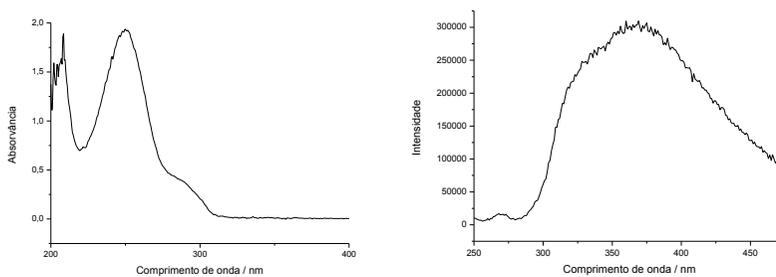


Figura 5.15- Espectros de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente de paracetamol em etanol $5 \times 10^{-5} M$, $\lambda_{exc}=260$ nm

Comparando os espectros da solução de paracetamol em água e em etanol há um deslocamento da banda em etanol para comprimentos de onda menores.

Fez-se variar o pH da solução de paracetamol em etanol 5×10^{-5} M com soluções tampão, nomeadamente, solução tampão CH_3COOH e CH_3COONa 0,1M, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 0,025M, Na_2CO_3 e NaHCO_3 0,025M e HClO_4 0,01M. Registaram-se os seguintes espectros de absorção UV/Visível e fluorescência. (Figura 5.16) Na presença de etanol, os espectros da forma aniônica do paracetamol aparecem para valores de pH aparente mais baixos do que em água, que pode ser devido à resposta do eléctrodo de vidro neste solvente.

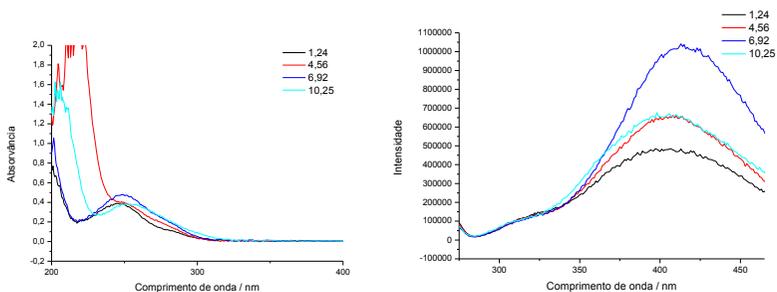


Figura 5.16- Espectros de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, $\lambda_{\text{exc}}=260$ nm

Registaram-se os espectros de fluorescência da solução de paracetamol em etanol juntamente com a solução tampão para comprimentos de onda de excitação de 250 nm e 280 nm (Figura 5.17).

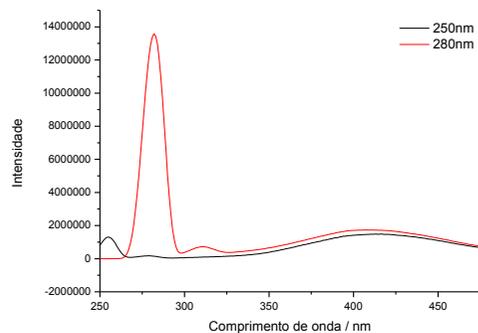


Figura 5.17- Espectro de fluorescência do paracetamol em etanol $5 \times 10^{-5} \text{M}$ com a solução tampão

A limitação do estudo em água é a solubilidade, e no caso do etanol, é difícil determinar com rigor o valor de pH. Em consequência, estudos foram feitos em soluções aquosas na presença do tensoactivo aniónico dodecilsulfato de sódio (SDS). À solução de paracetamol em etanol de concentração $5 \times 10^{-5} \text{M}$ foi adicionado a solução tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ e quantidades variáveis de uma solução de SDS 0,2M, para se obter várias concentrações de SDS, permanecendo a concentração de paracetamol constante $2 \times 10^{-6} \text{M}$. (Figura 5.18)

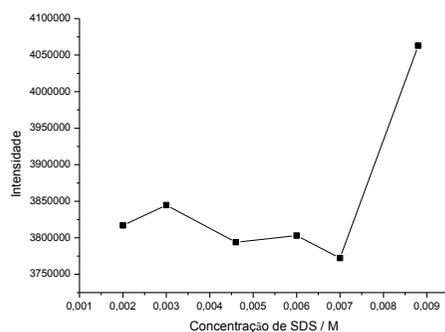


Figura 5.18- Gráfico da intensidade de fluorescência do paracetamol $2 \times 10^{-6} \text{M}$ em função da concentração de SDS para um $\lambda=427 \text{ nm}$

Pela observação do gráfico, vê-se que a intensidade de fluorescência do paracetamol aumenta à medida que se aproxima da concentração micelar crítica do SDS ($8 \times 10^{-3} \text{M}$). Esses resultados são concordantes com o aumento do rendimento quântico de fluorescência de soluções aquosas de paracetamol na presença de SDS. [47]

À solução de paracetamol em etanol adicionou-se somente a solução de SDS 0,2M, para se obter diferentes concentrações desta (Figura 5.19).

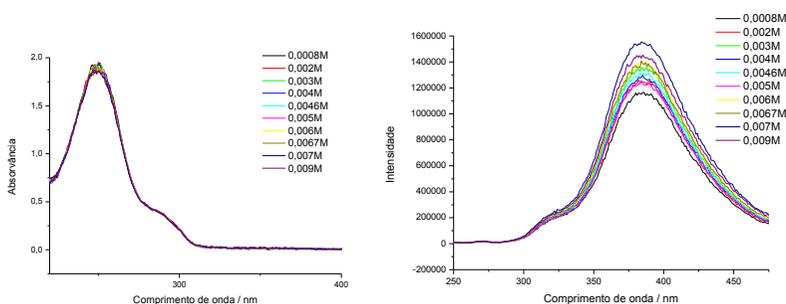


Figura 5.19- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente de paracetamol em etanol $5 \times 10^{-5} \text{M}$ com as concentrações de SDS, $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$

Pela observação dos vários espectros em que o paracetamol foi dissolvido em solventes diferentes (água, etanol e o tensoactivo SDS) com o objectivo de se verificar a solubilidade do paracetamol, pode-se observar que o paracetamol em água com variação do pH não é muito solúvel, enquanto que, o paracetamol quando dissolvido em etanol, juntamente com o tensoactivo SDS, apresenta uma solubilidade melhor, sendo portanto um método viável para a detecção de paracetamol, havendo problemas com a absorção do SDS quando presente com a solução tampão.

Como as amostras de heroína foram dissolvidas em clorofórmio:metanol (1:1), procedeu-se ao estudo de alguns componentes das amostras, o paracetamol, a cafeína, o cloridrato de

morfina e a codeína nesta mistura, em que se obteve os seguintes espectros de absorção UV/Visível e de fluorescência.

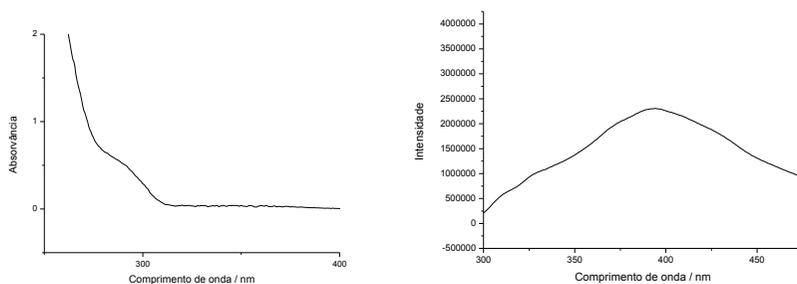


Figura 5.20- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, do paracetamol em clorofórmio:metanol (1:1) $2,51 \times 10^{-4} \text{M}$, $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$

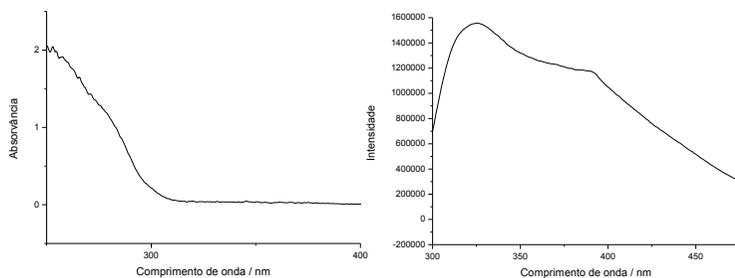


Figura 5.21- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, da cafeína em clorofórmio:metanol (1:1) $2,06 \times 10^{-4} \text{M}$, $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$

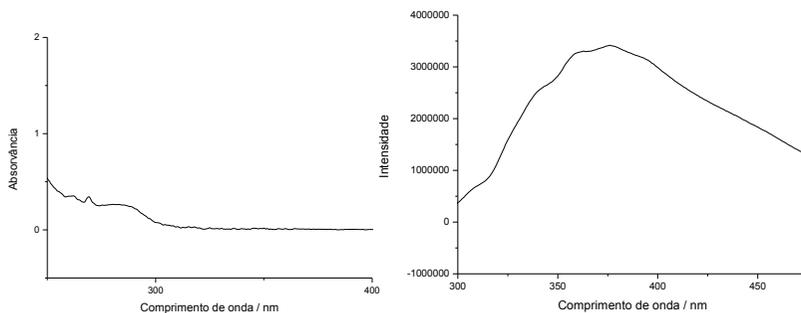


Figura 5.22- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, do cloridrato de morfina em clorofórmio:metanol (1:1) $6,84 \times 10^{-5} \text{M}$, $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$

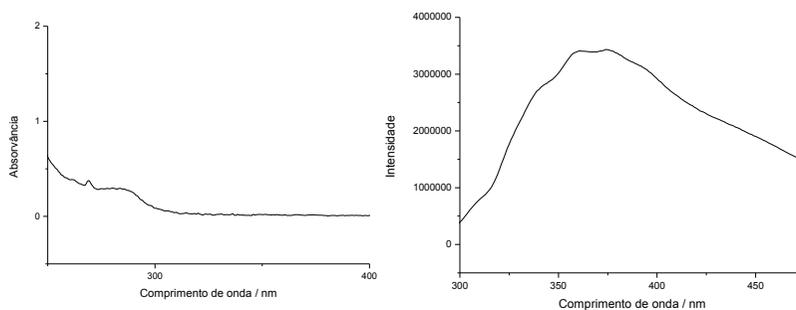


Figura 5.23- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, da codeína em clorofórmio:metanol (1:1) $7,35 \times 10^{-5} \text{M}$, $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$

Procedeu-se ao estudo do paracetamol com a cafeína, em que se variou a concentração de cafeína (Figura 5.24).

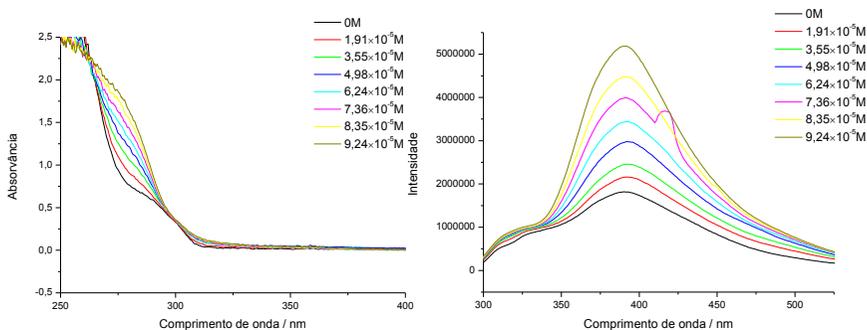


Figura 5.24- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, de paracetamol $5,15 \times 10^{-4} \text{M}$ com as respectivas concentrações de cafeína, $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$

Obteve-se o espectro de absorção UV/Visível (Figura 5.25) com mais concentrações de cafeína, como também o gráfico da absorvância em função da concentração de cafeína (Figura 5.26).

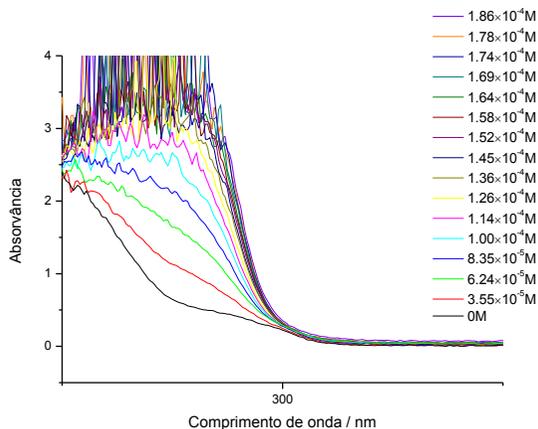


Figura 5.25- Espectro de absorção UV/Visível de paracetamol $2,12 \times 10^{-4} \text{M}$ com as respectivas concentrações de cafeína

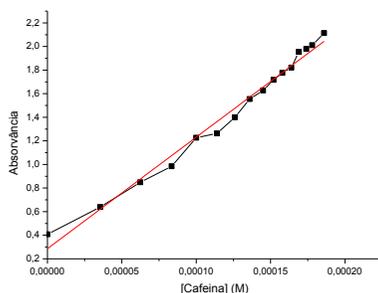


Figura 5.26- Gráfico da absorvância em função da concentração de cafeína

Através da análise dos espectros, os resultados mostram aparentes pontos isobésticos que podem indicar uma interação entre o paracetamol e a cafeína, possivelmente pela formação de complexos de transferência de carga por contacto. [48] Para clarificar a situação, realizou-se uma análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (Figura 5.27), do paracetamol, da cafeína e da mistura dos dois compostos em clorofórmio deuterado:metanol deuterado (1:1).

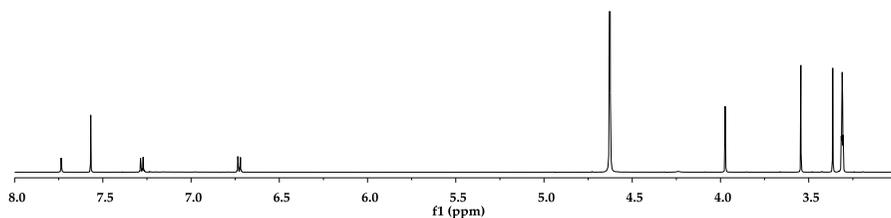


Figura 5.27- Espectro de RMN da mistura de paracetamol e cafeína

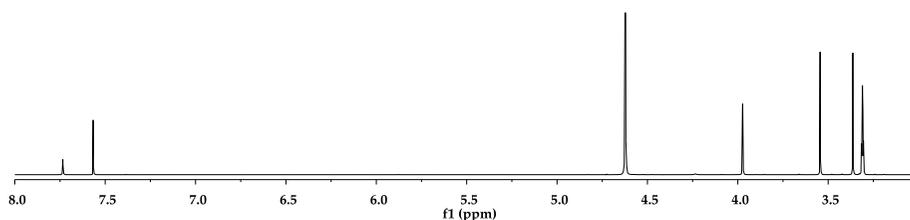


Figura 5.27.1- Espectro de RMN da solução de cafeína

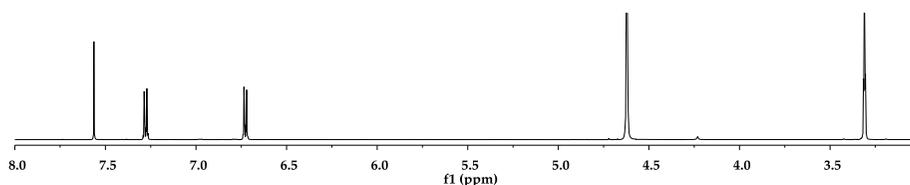


Figura 5.27.2- Espectro de RMN da solução de paracetamol

Pela análise dos espectros de RMN vê-se que não há nenhuma interação entre os dois compostos, pois na mistura não existe nenhum deslocamento dos desvios.

Ainda se realizou, para se comprovar que não existe nenhuma formação de complexos, espectros de absorção UV/Visível (Figura 5.28) e através do método de Job [49] (Figura 5.29). Em que a solução de paracetamol e de cafeína têm concentrações semelhantes, neste caso, a concentração de paracetamol $9,26 \times 10^{-5} \text{M}$ e a de cafeína $9,27 \times 10^{-5} \text{M}$.

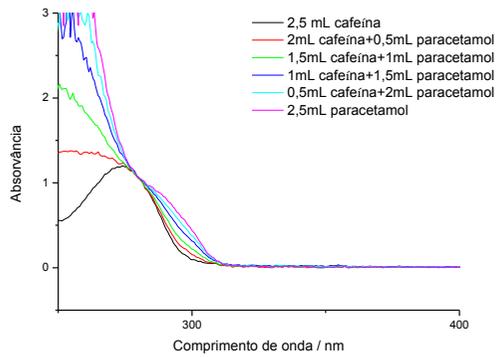


Figura 5.28- Espectro de absorção UV/Visível

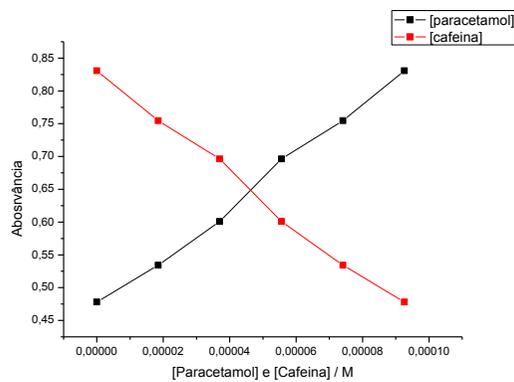


Figura 5.29- Gráfico da absorvância em função da concentração de paracetamol e cafeína

Analisou-se a amostra de heroína 19277/10-al8 (Figura 5.30) e o padrão de heroína (Figura 5.31) por fluorescência e absorção UV/Visível.

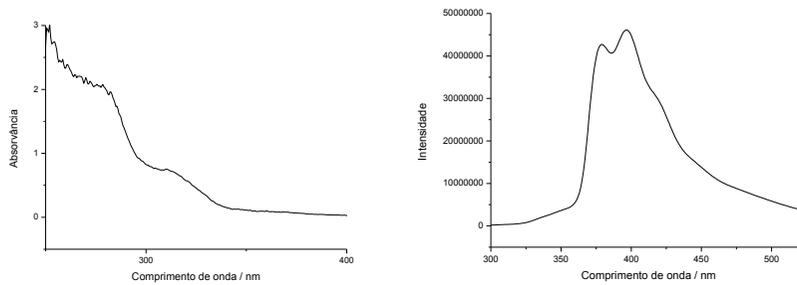


Figura 5.30- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, da amostra de heroína $5,60 \times 10^{-4} M$, $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$

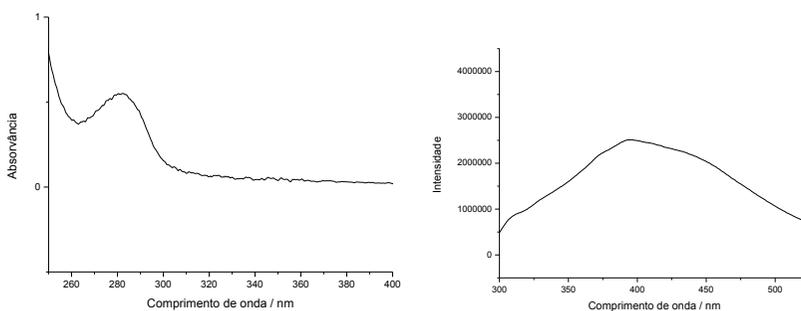


Figura 5.31- Espectro de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, do padrão de heroína $1,79 \times 10^{-4} M$, $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$

Os espectros de absorção UV/Visível e de fluorescência da solução de paracetamol, de cafeína, da amostra de heroína e do padrão de heroína apresentam-se na Figura 5.32.

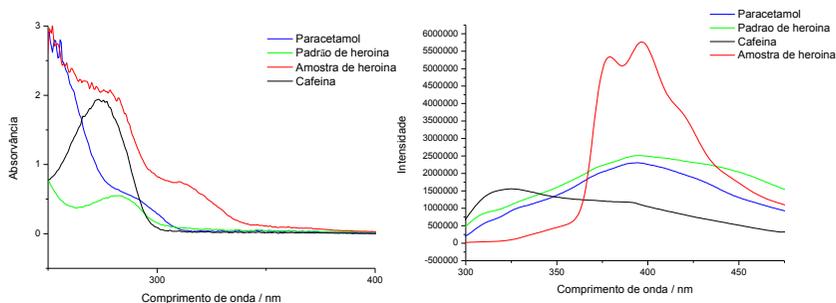


Figura 5.32- Espectros de absorção UV/Visível e fluorescência, respectivamente, da solução de paracetamol, do padrão de heroína, da solução de cafeína e da amostra de heroína

Analisando os resultados obtidos da absorção UV/Visível e de fluorescência da cafeína e do paracetamol, pode-se concluir que possivelmente há um método viável de detecção de paracetamol e de cafeína em amostras de heroína, mas necessita de uma maneira para se distinguir as várias bandas no espectro que ocorre na mesma zona.

VI- Conclusão

Após a realização deste trabalho, com a análise dos cromatogramas obtidos, algumas conclusões podem ser retiradas.

Uma delas é que o HPLC/DAD pode ser utilizado para a identificação e quantificação de alcalóides do ópio como também dos adulterantes presentes em amostras de heroína. Desta forma é possível obter um “drug profiling” que permite separar e identificar os componentes da amostra. Estes constituintes podem ser importantes para identificar o produtor, dado que rendimentos de acetilação ou o grau de purificação das amostras antes da reacção podem ser evidenciados. Numa mesma análise é ainda possível identificar e dosear outros contaminantes que são normalmente adicionados, sendo que o tipo e a dose relativa também podem ser indicativos da sua origem.

Nestas amostras, apesar das limitações no número e na quantidade de cada uma, foi possível identificar e quantificar a heroína, e um dos outros alcalóides contaminantes a acetilcodeína, resultante da fraca purificação da morfina do ópio, e que também foi sujeita à acetilação. No material em estudo os adulterantes eram paracetamol e cafeína, em quantidades significativas. O paracetamol serve para aumentar a volatilidade da base de heroína, enquanto que a cafeína produz um efeito de euforia, característico do consumo de heroína, ou seja, estes dois adulterantes vão aumentar o efeito que esta produz. Foi desenvolvido também um método de caracterização de paracetamol e cafeína nas amostras utilizando fluorescência e absorção molecular UV/Visível.

Devido à difícil obtenção de material, não foi possível identificar outros constituintes da heroína. No entanto, as diferenças encontradas no perfil dos constituintes referidos nas amostras 10263/09-a11 e 10263/09-a13, assim como, as quantidades relativas dos mesmos permite-nos avaliar que poderiam ser provenientes de uma mesma origem. A amostra 19277/10-a18 tem características diferentes e pode por isso ser considerada de outra proveniência.

Os resultados são apenas indicativos, mas se validados com mais amostras, podem ser uma boa fonte de informação para as entidades judiciais.

A continuação do trabalho pode adoptar a mesma metodologia, mas com a análise de mais amostras, pois assim seria possível obter um perfil mais completo da heroína. Também, seria interessante desenvolver técnicas sensíveis aos componentes presentes em menor concentração e aplicar métodos quimiométricos à análise dos dados, de forma a determinar se a heroína pertence a um mesmo produtor, como também se provém do mesmo local onde foi produzida para se aumentar a aplicação de “drug profile” da heroína em ciência forense.

VII- Bibliografia

[1] <http://science.jrank.org/pages/2821/Forensic-Science-History.html>

(Acedido em: 13-04-2011)

[2] Tilstone, W J., Savage, K. A., Clark, L. A. (2006). *Encyclopedia of Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods and Techniques*. ABC-CLIO.

[3] <http://www.chemistryexplained.com/Fe-Ge/ForensicChemistry.html>

(Acedido em: 13-04-2011)

[4] Chiarotti, M., Fucci, N. (1999). Comparative analysis of heroin and cocaine seizures. *J. Chromatogr. B*, 733, 127-136.

[5] Dams, R., Benijts, T., Lambert W. E., Massart D. L., De Leenheer; A. P. (2001). Heroin impurity profiling: trends throughout a decade of experimenting. *Forensic Sci. Int.*, 123, 81-88.

[6] Macchia, M., Bertini, S., Mori, C., Orlando, C., Papi, C., Placanica, G. (2004). Efficient application of monolithic silica column to determination of illicit heroin street sample by HPLC. *Il Farmaco*, 59, 237-239.

[7] Grogg-Sulser, K., Helmlin, H-J., Clerc, J-T. (1995). Qualitative and quantitative determination of illicit heroin street samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography: method development by CARTAGO-S. *J. Chromatogr. A*, 692, 121-129.

[8] Klemenc, S. (2002). 4-dimethylaminopyridine as a catalyst in heroin synthesis. *Forensic Sci. Int.*, 129, 194-199.

[9] Karch, S. B. (Ed.) (1998). *Drug Abuse Handbook*. CRC Press LLC.

[10] Lei da Droga. *Códigos electrónicos Datajuris*. Datajuris, Direito e Informática, Lda.

[11] <http://www.idt.pt/PT/Legislacao/Paginas/LegislacaoNacional.aspx> (Acedido em: 1-07-2011).

[12] Remberg, B., Sterrantino, A. F., Artner, R., Janitsch, C., Krenn, L. (2008). Science in Drug Control: The Alkaloid Content of Afghan Opium. *Chemistry & Biodiversity*, 5, 1770-1779.

[13] Ziegler, J., Facchini, P. J., Geißler, R., Schmidt, J., Ammer, C., Kramell, R., Voigtländer, S., Gesell, A., Pienkny, S., Brandt, W. (2009). Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochem.*, 70, 1696-1707.

[14] Bones, J., Thomas, K. V., Paull, B. (2007). Using Environmental Analytical Data to Estimate Levels of Community Consumption of Illicit Drugs and Abused Pharmaceuticals. *The Royal Society of Chemistry*.

[15] Rook, E. J., Huitema, A., Brink, W., Ree, J., Beijnen, J. (2006). Pharmacokinetics and Pharmacokinetic Variability of Heroin and its

metabolites: Review of the Literature. *Current Clin. Pharm.*, 1, 109-118.

[16] Budavari, S. (1996). *The Merck Index: An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals* (12th edition). Merck, USA.

[17] Pflieger, K., Mauren, H., Weber, A. (1985). *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons and their Metabolites*. VCH, Germany.

[18] Waring R. H., Steventon G. B., Mitchell S. C. (2007). *Molecules of Death*. Imperial College Press. London.

[19] Klous, M. G., Huitema, A. D. R., Rook, E. J., Hillebrand, M. J. X., Hendriks, V. M., Brink, W. V., Beijnen, J. H., Ree, J. M. V. (2005). Pharmacokinetic comparison of two methods of heroin smoking: “chasing the dragon” versus the use of a heating device. *Eur. Neuropsychopharm.*,15, 263-269.

[20] Klemenc, S. (2001). In common batch searching of illicit heroin samples – evaluation of data by chemometrics methods. *Forensic Sci. Int.*, 115, 43-52.

[21] Lurie, I. S., Toske, S. G. (2008). Applicability of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for heroin profiling. *J. Chromatogr. A*, 1188, 322-326.

[22] Strömberg, L., Lundberg, L., Neumann, H., Bobon, B., Huizer, H., Stelt, N. W. (2000). Heroin impurity profiling: A harmonization study for retrospective comparisons. *Forensic Sci. Int.*, 114, 67-88.

[23] Sharma, S. P., Purkait, B. C., Lahiri, S. C. (2005). Qualitative and quantitative analysis of seized street drug samples and identification of source. *Forensic Sci. Int.*, 152, 235-240.

[24] Esseiva, P., Gaste, L., Alvarez, D., Anglada, F. (2011). Illicit drug profiling, reflection on statistical comparisons. *Forensic Sci. Int.*, 207, 27-34.

[25] Dufey, V., Dujourdy, L., Besacier, F., Chaudron, H. (2007). A quick and automated method for profiling heroin samples for tactical intelligence purposes. *Forensic Sci. Int.*, 99, 108-117.

[26] Esseiva, P., Dujourdy, L., Anglada, F., Taroni, F., Margot, P. (2003). A methodology for illicit heroin seizures comparison in a drug intelligence perspective using large database. *Forensic Sci. Int.*, 132, 139-152.

[27] Lurie, I. S. (1998). Capillary electrophoresis of illicit drug seizures. *Forensic Sci. Int.*, 92, 125-136.

[28] Lurie, I., Hays, P. A., Garcia, A. E., Panicker, S. (2004). Use of dynamically coated capillaries for the determination of heroin, basic impurities and adulterants with capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 1034, 227-235.

- [29] Holt, P. J. (1996). Particle size analysis of six illicit heroin preparations seized in the U.K. *Forensic Sci. Int.*, 81, 17-28.
- [30] Lurie, I. S., Anex, D. S., Fintschenko, Y., Choi, W. (2001). Profiling of impurities in heroin by capillary electrochromatography and laser-induced fluorescence detection. *J.Chromatogr. A*, 924, 421-427.
- [31] Schneider, S., Meys, F. (2011). Analysis of illicit cocaine and heroin samples seized in Luxembourg. *Forensic Sci. Int.*
- [32] Besacier, F., Chaudron-Thozet, H., Rousseau-Tsangaris, M., Girard, J., Lamotte, A. (1997). Comparative chemical analyses of drug samples: general approach and application to heroin. *Forensic Sci. Int.*, 85, 113-125.
- [33] Dujourdy, L., Barbati, G., Taroni, F., Guéniat, O., Esseiva, P., Anglada, F., Margot, P. (2003). Evaluation of links in heroin seizures. *Forensic Sci. Int.*, 131, 171-183.
- [34] Gröger, T., Schäffer, M., Pütz, M., Ahrens, B., Drew, K., Eschner, M., Zimmermann, R. (2008). Application of two-dimensional gas chromatography combined with pixel-based chemometric processing for the chemical profiling of illicit drug samples. *J. Chromatogr. A*, 1200, 8-16.

[35] Flanagan, R. J., Taylor, A., Watson, I. D., Whelpton, R. (2008). *Fundamentals of Analytical Toxicology*. Wiley. England.

[36] Li, W., Yu, D., Zhang, F., Sun, B., Liu, J., Li, M., Liu, J. (2011). Detection of heroin covered by skin by using robust principal components analysis. *Measurement*, 44, 267-273.

[37] Esseiva, P., Anglada, F., Dujourdy, L., Taroni, F., Margot, P., Pasquier, E., Dawson, M., Roux, C., Doble, P. (2005). Chemical profiling and classification of illicit heroin by principal component analysis, calculation of inter sample correlation and artificial neural networks. *Talanta*, 67, 360-367.

[38] Bell, S. (2008). *Encyclopedia of Forensic Science*. Revised Edition. Facts On File. New York.

[39] Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Wiley Interscience, New Jersey.

[40] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (3^a ed.). Wiley, New Jersey.

[41] Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6^a ed.). Thomson, USA.

[42] Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer. New York.

- [43] *Introduction to Ocular Fluorometry*. Euroeye - European Concerted Action on Ocular Fluorometry. Franco Docchio. Coimbra.
- [44] Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH. Michigan.
- [45] Meloun, M., Syrový, T., Vrána, A. (2005). The thermodynamic dissociation constants of losartan, paracetamol, phenylephrine and quinine by the regression analysis of spectrophotometric data. *Analytica Chimica Acta*, 533, 97-110.
- [46] Gao, J., Li, N., Freindorf, M. (1996). Hybrid QM/MM Simulations Yield the Ground and Excited State pK_a Difference: Phenol in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 4912-4913.
- [47] Marrakian, T., Afkhami A., Mohammadnejad M. (2009). Second-order advantage applied to simultaneous spectrofluorimetric determination of paracetamol and mefanamic acid in urine samples. *Anal. Chim. Acta*, 645, 25-29.
- [48] Mulliken, O. R. (1957). The molecular spectra of complexes in solution – contact charge transfer complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4839-4846.
- [49] Job, P. (1928). Studies of the formation of complex minerals in solution and their stability. *Anales de Chimie France*, 9, 113-203.

Anexos

- Anexo 1



S. R.
MINISTÉRIO DA JUSTIÇA

POLÍCIA JUDICIÁRIA

UNIDADE NACIONAL DE COMBATE AO TRÁFICO DE ESTUPEFACIENTES

TERMO DE ENTREGA

----- Aos três dias do mês de Maio de Dois Mil e Onze, no edifício onde se encontra instalada a **UNIDADE NACIONAL DE COMBATE AO TRÁFICO DE ESTUPEFACIENTES/NEA-CASA FORTE**, de harmonia com a autorização para cedência de **Heroína (200 mg) – Guia nº 2482/09**, e **Heroína (100 mg) – Guia nº 3069/10**, no total de 300 mg de Heroína, eu **MARIA CONCEIÇÃO JESUS RODRIGUES SARAI-VA**, Chefe de Núcleo, faço entrega das amostras constituídas para o **Projecto de “Drug Profiling”**, a desenvolver pelo Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, ao seu representante **Sr. Dr. Hugh D.Burrows**.-----

----- O representante da **Universidade de Coimbra**, foi informado, que deve ser dado cumprimento ao disposto no **nº 8 do artº 62º do Decreto Lei nº 15/93 de 22/01**, logo que o estupefaciente for desnecessário e inútil, **enviando cópia do ofício a esta Unidade Nacional**.-----

----- E para constar, se lavrou o presente termo que vai ser devidamente assinado pelos seus intervenientes.-----

ENTREGUEI,

RECEBI,

03/05/2011

Av.ª Duque de Loulé, 39 1050-085 Lisboa
Tel. 218643600- Fax.21 3150675
PORTUGAL

Guia n.º 2182/09

Amostras retiradas do Exame n.º 200910263, conforme ofício n.º 2417307 de 24/02/2011 do Tribunal Judicial de Santa Cruz

●
Alínea 1) 100 mg de Heroína
Alínea 2) 100 mg de Heroína

Guia n.º 3089/10

Amostra retirada do Exame n.º 201019277, conforme ofício n.º 1456551 de 21/02/2011 do DIAP de Coimbra

Alínea 8) 100 mg de Heroína



• Anexo 2

Tabela 1- Resultados das amostras disponíveis para os três ensaios

	1º Ensaio (%)	2º Ensaio (%)	3º Ensaio (%)	σ (Desvio padrão)	Média
Heroína					
• 19277/10-a18	-	24,34	36,75	8,76	30,55
• 10263/09-a11	37,80	49,49	49,83	6,85	45,71
• 10263/09-a13	39,26	40,52	44,92	2,97	41,57
Codeína					
• 19277/10-a18	2,45	2,15	2,23	0,16	2,28
• 10263/09-a11	6,42	6,03	5,82	0,30	6,09
• 10263/09-a13	5,61	6,99	5,37	0,87	5,99
Paracetamol					
• 19277/10-a18	7,58	6,68	6,41	0,61	6,89
• 10263/09-a11	8,06	9,42	10,36	1,16	9,28
• 10263/09-a13	5,26	5,96	5,27	0,40	5,50
Cafeína					
• 19277/10-a18	9,36	8,21	7,54	0,92	8,37
• 10263/09-a11	4,70	15,29	15,28	6,11	11,76
• 10263/09-a13	11,51	12,45	11,56	0,53	11,84

Tabela 1- Resultados das amostras disponíveis para os três ensaios