



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MEDIDAS COLORIMÉTRICAS COM *SMARTPHONES* PARA IDENTIFICAÇÃO DE
AMOSTRAS DE COCAÍNA E QUANTIFICAÇÃO DE ALGUNS ADULTERANTES

Pâmela Anália Costa de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Coorientador: Dr. Márcio Talhavini

Brasília, DF

2017

Pâmela Anália Costa de Oliveira

MEDIDAS COLORIMÉTRICAS COM *SMARTPHONES* PARA IDENTIFICAÇÃO DE
AMOSTRAS DE COCAÍNA E QUANTIFICAÇÃO DE ALGUNS ADULTERANTES

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
mestre em Química. Programa de Pós-
Graduação em Química, Universidade de
Brasília

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Coorientador: Dr. Marcio Talhavini

Brasília - DF

2017



FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Pâmela Anália Costa de Oliveira**, matrícula nº **15/0170513**, intitulada ***“Medidas Colorimétricas com Smartphones para Identificação de Amostras de Cocaína e Quantificação de Alguns Adulterantes”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 14 de julho de 2017.

Prof. Dr. Alexandre Fonseca
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Dr. André Ricardo Meinicke
Membro Titular (INC/DPF)

Prof.^a Dra. Ingrid Távora Weber
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Valéria Regina Bellotto
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 14 de julho de 2017.

**Um navio é seguro
no porto, mas não é
para isso que navios
foram construídos.**

- Grace Hopper

**Eu, um universo de
átomos, um átomo no
universo.**

- Richard Feynman

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela possibilidade de poder passar por experiências tão ricas e de um aprendizado ímpar. Em segundo lugar à minha família, em especial à minha avó, Maria Anália, minha motivação em tudo que faço e motivo de toda a minha gratidão. Ao meu avô Antônio, que não está mais aqui, mas que sei que está muito orgulhoso. Também ao meu pai, Frederico, por todo apoio silencioso, à minha tia Fátima e minha prima Taine, minhas companheiras. À minha família do coração: Hevian, minha melhor amiga, minha irmã Julia e meu sobrinho Arthur que me enchem de alegria e força.

Aos meus amigos que tanto me apoiam e estão sempre presentes: Sarah, Ana Carolina, Maria Fernanda, Carime, Ana, Beatriz, Fran, Gabi e Aline.

Um agradecimento mais que especial ao meu orientador prof. Dr. Alexandre Fonseca, pessoa de didática única que sem dúvidas nasceu para ensinar, obrigada por toda ajuda, paciência, pelos momentos de riso e de explicações. Ao meu coorientador, Dr. Marcio Talhavini, por toda a paciência, amizade e disponibilidade. Sou grata por ter reunido essa dupla maravilhosa na minha orientação.

Gostaria de agradecer aos amigos do LIAMA que transformam nosso ambiente de trabalho em um lugar alegre e divertido: aos professores Ana Cristi, Jez e Lilian, e aos amigos Camila, Fabi, Tay, Lucas, Elisa e Katharina. Obrigada pelas risadas e também por toda ajuda.

Por fim, um agradecimento à UnB pela oportunidade de realizar este trabalho, à Polícia Federal e à CAPES pela ajuda financeira.

Índice de Títulos e Subtítulos

Índice de Figuras	vii
Índice de tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Acrônimos	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
1.0 Introdução e Objetivos	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	1
1.2.1 Objetivos Específicos	2
2.0 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Cocaína	3
2.1.1 Adulterantes e diluentes	5
2.1.2 Perfil Químico	5
2.1.3 Caracterização da Cocaína	6
2.2 Colorimetria baseada em imagens digitais	8
3.0 Materiais e métodos	10
3.1 Construção do sistema de leitura por imagens digitais	10
3.2 Aplicativo PhotoMetrix	11
3.3 Amostras sintéticas empregadas nos estudos	12
3.3.1 Amostras com quatro constituintes	13
3.3.2 Amostras com três constituintes	14
3.4 Determinação colorimétrica de Cocaína	17
3.4.1 Reagentes e Soluções	17
3.5 Determinação de Levamisol	18
3.5.1 Reagentes e Soluções	19
3.6 Determinação de Procaína	20
3.6.1 Reagentes e Soluções	21
3.7 Determinação de Cafeína	22
3.7.1 Reagentes e soluções	22
3.8 Estudos Cinéticos e Comparação das Medidas RGB com Outros Instrumentos	23
4.0 Resultados e discussão	24

4.1 Avaliação Cinética das Reações Colorimétricas	24
4.2 Determinação colorimétrica de Cocaína	27
4.2.1 Determinação de Cocaína em Amostras com 4 Constituintes	31
4.2.2 Determinação de Cocaína em Amostras Sintéticas com 3 Constituintes.....	33
4.3 Determinação de Procaína	38
4.3.1 Determinação de Procaína em Amostras com 3 Constituintes.....	42
4.4 Testes Preliminares para Determinação de Levamisol	44
4.5 Testes Preliminares para Determinação de Cafeína	47
5.0 Conclusão	51
6.0 Referências.....	52

Índice de Figuras

Figura 1: Equilíbrio ácido-base da estrutura da cocaína.....	3
Figura 2: Fluxograma com as formas encontradas da droga e algumas substâncias utilizadas para extração, refino e interconversão. Adaptado da referência 10.....	4
Figura 3: Caixa <i>lab-made</i> construída para criar um ambiente de luz controlada. Suporte para acomodar os frascos (A), Visão interna (B) e frontal (C) da caixa e destaque para a fita de LED utilizada na parte superior interior da caixa (D).....	11
Figura 4: Tela principal do aplicativo PhotoMetrix (A), tela do modo <i>UnivariateAnalysis</i> (B) e tela do modo <i>Calibration</i> (C).....	12
Figura 5: Gráfico representando as composições possíveis para misturas ternárias.....	14
Figura 6: Representação da limitação nas faixas de concentração e triângulo equilátero equivalente.....	15
Figura 7: Representação gráfica dos pontos correspondentes às amostras escolhidas.....	15
Figura 8: Exemplo da reação do teste de Scott. A região de observação fica na fase orgânica (inferior e azul).....	17
Figura 9: Exemplo da reação de determinação de levamisol. A região de observação fica na fase orgânica (inferior e amarela).....	19
Figura 10: Medidas de absorvância realizadas em 630 nm para uma solução de cocaína a 600 mg L ⁻¹ empregando-se o teste de scott modificado.....	24
Figura 11: Medidas de absorvância realizadas em 630 nm para uma solução de lidocaína a 3000 mg L ⁻¹ empregando-se o teste de scott modificado.....	25
Figura 12: Medidas de absorvância realizadas em 630 nm para uma solução de cafeína a 0,15 mg L ⁻¹ empregando-se a reação de complexação da cafeína oxidada com MBTH.....	26
Figura 13: Medidas de absorvância realizadas em 630 nm para uma solução de cocaína a 0,15 mg L ⁻¹ empregando-se a reação de complexação com MBTH.....	27
Figura 14: Esquema de reação para o teste de Scott.....	27
Figura 15: Espectro de absorção do complexo de tiocianato de cobalto e cocaína.....	28
Figura 16: Variação da cor azul entre os padrões utilizados com faixa de concentração de 200 à 1000 mg L ⁻¹	29
Figura 17: Curva de calibração para a faixa de concentração de 200 à 1000 mg L ⁻¹	29
Figura 18: Padrão de cocaína com 245 ppm e padrão de lidocaína com 5000 ppm.....	33
Figura 19: Esquema de reação entre a procaína e o ácido cromotrópico.....	38
Figura 20: Espectro de absorção do complexo de procaína e ácido cromotrópico.....	39

Figura 21: Variação de cor para os dez padrões utilizados na construção da curva analítica de concentrações 1 à 90 mg L ⁻¹ , respectivamente.....	39
Figura 22: Curva de calibração para a determinação de procaína na faixa de concentração de 1 à 90 mg L ⁻¹	40
Figura 23: Esquema de reação entre o levamisol e alaranjado de metila.....	44
Figura 24: Espectro de absorção do complexo formado através da reação entre o levamisol e alaranjado de metila.....	44
Figura 25: Curva de calibração para o levamisol na faixa de concentração de 3 à 27 mg L ⁻¹	45
Figura 26: Variação de cor para os quatro padrões utilizados na construção da curva analítica de concentrações 2,9 à 26 mg L ⁻¹ , respectivamente.....	45
Figura 27: Esquema de reação entre a cafeína e o MBTH.....	47
Figura 28: Espectro de absorção do produto obtido pela reação de cafeína e MBTH.....	47
Figura 29: Variação de cor para os quatro padrões utilizados na construção da curva analítica de concentrações 0,05 à 0,2 mg L ⁻¹ , respectivamente, tendo o branco à esquerda.....	48
Figura 30: Curva de calibração pra cafeína com faixa de concentração de 75 à 375 mg L ⁻¹	48

Índice de tabelas

Tabela 1: Constituintes e teores das amostras de 1 à 6.....	13
Tabela 2: Constituintes e teores das amostras de 7 à 12.....	13
Tabela 3: Constituintes e teores das amostras 13 à 18.....	14
Tabela 4: Composição das amostras planejadas.....	16
Tabela 5: Comparação de algumas figuras de mérito entre os três métodos.....	31
Tabela 6: Concentração de referência e estimada em percentagem das amostras e erro.....	31
Tabela 7: Determinação de cocaína para amostras contendo cocaína cloridrato, levamisol e cafeína com diferentes teores relacionados com as amostras apresentadas na Tabela 4 da seção 3.3.2.....	34
Tabela 8: Determinação de cocaína para amostras contendo cocaína base livre, lidocaína e procaína com diferentes teores relacionados com as amostras apresentadas na Tabela 4 da seção 3.3.2.....	35
Tabela 9: Erros relativos e desvios padrão para as amostras analisadas pelos três métodos..	36
Tabela 10: Resultados para o teste t pareado entre os dados obtidos por <i>smartphone</i> e por meio do espectrofotômetro comercial.....	37
Tabela 11: Resultados para o teste t pareado entre os dados obtidos por <i>smartphone</i> e por meio do fotômetro de LED.....	38
Tabela 12: Comparação de algumas figuras de mérito entre os três métodos.....	42
Tabela 13: Determinação de procaína para amostras contendo cocaína base livre, lidocaína e procaína com diferentes teores relacionados com as amostras apresentadas na Tabela 4 da seção 3.3.2.....	42
Tabela 14: Erros relativos e desvios padrão para as amostras analisadas pelos três métodos.....	43
Tabela 15: Resultados para o teste t pareado entre os dados obtidos por <i>smartphone</i> e por meio do fotômetro de LED.....	44

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

MBTH - cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona

LED - diodo emissor de luz

UNODC – *United Nation Office on Drugs and Crime*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

PeQui - Projeto de Perfil Químico da droga

TNT – Trinitrotolueno

DCHA – Diciclohexilamina

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

PLA - Ácido Polilático

EVA - Etil Vinil Acetato

RGB - (*red, green, blue*)

SPI - Metaperiodato de Sódio

LDR – *Light Dependent Resistor*

LOD – Limite de Detecção

C.V. – Coeficiente de Variação

MLR – Regressão Linear Múltipla

PLS – Regressão com Mínimos Quadrados Parciais

Resumo

Sendo a cocaína uma das drogas ilícitas mais populares do mundo, a possibilidade de correlacionar amostras da droga apreendidas e obter dados quanto a suas fontes de produção e rotas de tráfico são de extrema importância para a investigação policial. Dessa forma, é importante obter um perfil químico da droga, no qual se identifica e quantifica a cocaína, os adulterantes e os diluentes presentes. Para este fim, a técnica recomendada é a cromatografia gasosa, uma técnica de custo e tempo de análise elevados, preparo de amostra laborioso, além de não permitir análises *in situ*. Considerando esses aspectos, o presente projeto visa a utilização de *smartphones* para determinações colorimétricas baseadas em imagens digitais a fim de se identificar e quantificar cocaína e alguns dos principais adulterantes presentes em amostras apreendidas de forma rápida, simples e portátil. Determinações colorimétricas quantitativas para a cocaína e três adulterantes foram avaliadas, sendo eles o levamisol, procaína e cafeína. As curvas analíticas construídas com base nos valores de RGB obtidos proporcionaram coeficientes de determinação adequados ($R^2 > 0,99$) para as faixas de concentração de analito avaliadas, sendo estimados os limites de detecção de 29,4, 2,47, 1,51 e 43,10 mg L⁻¹, para cocaína, procaína, levamisol e cafeína, respectivamente. Amostras sintéticas contendo os adulterantes com teores conhecidos e semelhantes aos encontrados em amostras apreendidas foram preparadas e utilizadas para se avaliar a exatidão dos métodos propostos. Para a determinação dos teores de cocaína, o teste de scott modificado levou a erros relativos entre 0,04 e 19,65 % em relação aos valores de referência indicando uma acurácia adequada do método, principalmente como uma ferramenta de avaliação preliminar para os teores da droga. As determinações de cafeína e levamisol basearam-se nas reações colorimétricas com cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona, MBTH, e alaranjado de metila, respectivamente, levando a resultados insatisfatórios devido à resposta interferente da cocaína nestes métodos, que, mesmo com uso de ferramentas quimiométricas, não foram minimizadas. A determinação de procaína a partir da sua reação com ácido cromotrópico proporcionou erros relativos de 8,35 a 22,43 % em relação aos valores nominais das amostras, indicando a possibilidade de uso do método para sua determinação sem a necessidade de separações analíticas prévias. Adicionalmente, para as determinações de cocaína e procaína, conduziu-se as detecções empregando-se um espectrofotômetro comercial e um fotômetro a base de diodo emissor de luz (LED) como forma de avaliar o desempenho da proposta baseada em imagens digitais frente a uma instrumentação bem estabelecida, além de avaliar a possibilidade de uso de uma alternativa de baixo custo para as medidas. Ao nível de 95% de confiança, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos com o sistema comercial e o baseado em imagens digitais para algumas amostras estudadas indicando a ausência de erros sistemáticos inerentes ao método. Pode-se concluir que a proposta é uma boa alternativa para a determinação preliminar dos teores de cocaína e procaína em amostras de drogas e que a sua utilização para outros adulterantes necessitará de estudos que permitam a eliminação de interferências.

Palavras chave: cocaína, adulterantes, imagens digitais.

Abstract

Cocaine as one of the most popular illicit drugs in the world, turns the possibility to correlate drug samples seized and to obtain data regarding their sources of production and trafficking routes into factors of extreme importance for police investigation. Thus, it is important to obtain a chemical profile of the drug, which identifies and quantifies the cocaine, adulterants and diluents present, which are substances added to the drug in order to increase profit or intensify its effects. To this end, the recommended technique is gas chromatography, a technique of high cost and time of analysis, labor sample preparation, and not allow in situ analysis. Considering these aspects, the present project aims at the use of smartphones for colorimetric determinations based on digital images in order to identify and quantify cocaine and some of the main adulterants present in samples seized in a fast, simple and portable way. Quantitative colorimetric determinations for cocaine and three adulterants were evaluated, levamisole, procaine and caffeine. Analytical curves constructed on the basis of the obtained RGB values provided adequate determination coefficients ($R^2 > 0.99$) for the analyzed analyte concentration ranges, with detection limits of 29.4, 2.47, 1.51 and 43,10 mg L⁻¹, for cocaine, procaine, levamisole and caffeine, respectively. Synthetic samples containing the adulterants with known contents and similar to those found in seized samples were prepared and used to evaluate the accuracy of the proposed methods. For the determination of cocaine levels, the modified scott test led to relative errors between 0.04 and 19.65% over the reference values indicating an adequate accuracy of the method, mainly as a preliminary assessment tool for the levels of cocaine. The determinations of caffeine and levamisole were based on the colorimetric reactions with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrochloride hydrazone, MBTH, and metil orange, respectively, leading to unsatisfactory results due to the interfering response of cocaine in these methods, which, even with use of chemometric tools, were not minimized. The determination of procaine based on the reaction with chromotropic acid, gave relative errors of 8.35 to 22.43% in relation to the pre-established values in the samples, indicating the possibility of using the method for its determination without the need for previous analytical separations. Additionally, for the determinations of cocaine and procaine, the detections were conducted using a commercial spectrophotometer and a photometer based on light emitting diode (LED) as a way of evaluating the performance of the proposal based on digital images against an instrumentation Well-established, in addition to evaluating the possibility of using a low cost alternative to the measures. At the 95% confidence level, no significant differences were observed between the results obtained with the commercial system and the one based on digital images for some samples studied, indicating a similar performance of the measurements. It can be concluded that the proposal is a good alternative for the preliminary determination of the levels of cocaine and procaine in drug samples and that its use for other adulterants will require studies that allow the elimination of interference.

Keywords: Cocaine, adulterants, digital image.

1.0 Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

O uso de cocaína é, além de um problema relacionado à saúde pública, um problema de segurança, por ser a causa de boa parte da violência urbana devido ao tráfico. ¹ A publicação do *World Drug Report* de 2016 relata que, apesar de haver uma queda no mercado global de cocaína, o número de usuários recreativos continua a subir. Em 1998, eram 14 milhões de usuários entre 15 e 64 anos, já em 2014 esse número subiu para 18,8 milhões, um crescimento de cerca de 35%. ² Nesse contexto, o Brasil ocupa uma posição de grande importância, uma vez que faz fronteira com os três maiores produtores de cocaína do mundo e possui uma longa costa oceânica que permite o envio da droga a outros continentes. ³

Visto que a cocaína é uma droga raramente apreendida na sua forma pura, identificar seus adulterantes é uma importante etapa para a investigação. A partir desses dados, pode-se correlacionar apreensões e até mesmo identificar rotas de distribuição e origem da droga. Para essas análises, o método atualmente recomendado pelo manual da *United Nation Office on Drugs and Crime* (UNODC) é a cromatografia gasosa. Apesar de oferecer excelentes resultados, esse método geralmente requer um preparo de amostras relativamente complexo, elevado tempo de análise e necessidade de instrumentação analítica que, quase sempre, não está disponível nas proximidades de apreensão da droga. ^{4,5} Outros métodos alternativos menos laboriosos e de menor custo têm sido propostos como, por exemplo, aqueles baseados em espectroscopia no infravermelho e em ferramentas quimiométricas. ^{4,6} Entretanto, esta estratégia ainda exige a familiarização do analista com a instrumentação e com as técnicas quimiométricas, o que pode ser considerado um limitante para a sua aplicação em campo.

Análises colorimétricas baseadas em imagens digitais são poderosas ferramentas para a rápida determinação qualitativa ou quantitativa de substâncias que encontra vasta aplicação e exige apenas a utilização de um sensor de cores, usualmente de uma câmera fotográfica, como, por exemplo, as presentes nos celulares inteligentes, os chamados smartphones. ⁷⁻¹⁰ Devido à elevada capacidade de processamento e armazenamento de dados conseguidos com os smartphones e a disponibilidade de aparelhos com câmeras de elevada resolução e sensibilidade, a maioria das medidas com sensores colorimétricos tem sido realizadas com esta estratégia de detecção. Deve-se lembrar ainda que a operação dos aplicativos costuma ser simples e que o dispositivo é portátil possibilitando a sua aplicação em campo e transmissão dos resultados via *web*.

1.2 Objetivos

Considerando o exposto, o presente trabalho se propõe a analisar a possibilidade de se identificar e quantificar cocaína e alguns dos principais adulterantes encontrados em amostras apreendidas por meio de medidas colorimétricas baseadas em reagentes cromogênicos específicos conduzidas por imagens digitais obtidas com *smartphone*.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Construir um ambiente de luz controlada para as medidas digitais realizadas com smartphones;
- Construir e avaliar curvas de calibração colorimétricas para a determinação de cocaína, levamisol, procaína e cafeína, estabelecendo as faixas de trabalho e limites de detecção e precisão para as medidas;
- Avaliar a interferência mútua dos analitos avaliados nas determinações colorimétricas propostas.
- Estabelecer um protocolo adequado para as medidas realizadas em amostras de drogas apreendidas
- Realizar e avaliar as determinações colorimétricas qualitativas e quantitativas dos analitos em amostras sintéticas de cocaína
- Comparar os resultados obtidos com a estratégia proposta com medidas realizadas com um espectrofotômetro e com um fotômetro *lab-made*.

2.0 Revisão Bibliográfica

2.1 Cocaína

A cocaína é uma das drogas mais usadas no mundo. Trata-se de um alcalóide estimulante do sistema nervoso central presente nas folhas de plantas da família *Erythroxylaceae*, nativas da América do Sul que se desenvolvem preferencialmente entre níveis de 700 a 1700 metros de altitude, em regiões de clima úmido. Essas plantas já eram conhecidas e utilizadas há mais de 4500 anos pelas grandes civilizações pré-colombianas dos Andes.¹¹⁻¹³ Mas, foi somente em 1898, que a fórmula exata e sua estrutura química foi descoberta. Seu nome definido pela IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, é éster metílico do ácido [1R-(exo,exo)]-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxílico.¹⁴ Sua estrutura apresenta um núcleo tropano, o qual é um estimulante psicomotor que age inibindo a recaptação pré-sináptica de noradrenalina, dopamina e serotonina.¹⁵

A droga comercializada pode ser encontrada de várias formas que variam de acordo com a demanda e a forma de produção. Como pode ser observado na Figura 1, têm-se duas formas da droga, do ponto de vista químico: o sal de cocaína (cloridrato de cocaína) ou sua forma de cocaína base livre. O cloridrato de cocaína é um sólido branco, cristalino e solúvel em água, podendo ser usado de forma intravenosa ou aspirado. A forma base é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos, como éter etílico e acetona, e volátil quando aquecida devido ao seu baixo ponto de fusão.^{6,15,16}

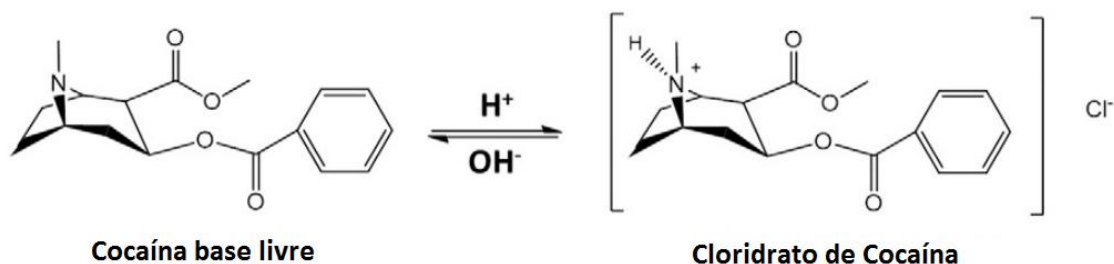


Figura 1. Equilíbrio ácido-base da estrutura da cocaína.

É necessário padronizar a classificação das formas ofertadas da droga a fim de se obter, principalmente, dados estatísticos confiáveis e significantes que podem ser usados pela Polícia. A classificação a seguir é adotada pelo Projeto PeQui da Polícia Federal e considera cinco formas da droga: pasta base, coca base, crack, merla e sal de cocaína.¹⁶

A pasta base corresponde à droga em sua forma química de base livre e representa o produto da primeira extração da droga das folhas da planta. Geralmente encontrado na forma de pó ou aglomerado de cor marrom ou bege escuro.^{11,16}

A coca base também corresponde à droga em sua forma química de base livre. Trata-se do produto da oxidação da pasta base seguida de uma remoção de certos alcalóides como, por exemplo, a cis e trans-cinamoilcocaína.^{11,16}

O crack também corresponde à droga na sua forma de base livre. Corresponde ao produto da droga submetida à um processo de fusão seguida de resfriamento e solidificação. Comumente encontrado como pequenas pedras ou fragmentos de cor marrom, bege amarelado ou marfim.¹⁶

A merla corresponde à droga na sua forma base livre tipicamente composta de cocaína, água e sais de sódio. Possui altos níveis de benzoilecgonina devido à degradação rápida da cocaína ocasionada pela alta concentração de água presente.¹⁶

Por fim, o sal de cocaína corresponde à droga na sua forma de cloridrato de cocaína. Corresponde ao produto da reação entre a coca base e um ácido, geralmente o ácido clorídrico, seguida da precipitação em solventes orgânicos. Geralmente encontrada como um pó branco ou acinzentado.^{11,16}

A Figura 2 mostra como pode haver uma interconvertibilidade entre essas formas empregando alguns solventes, ácidos e sais.

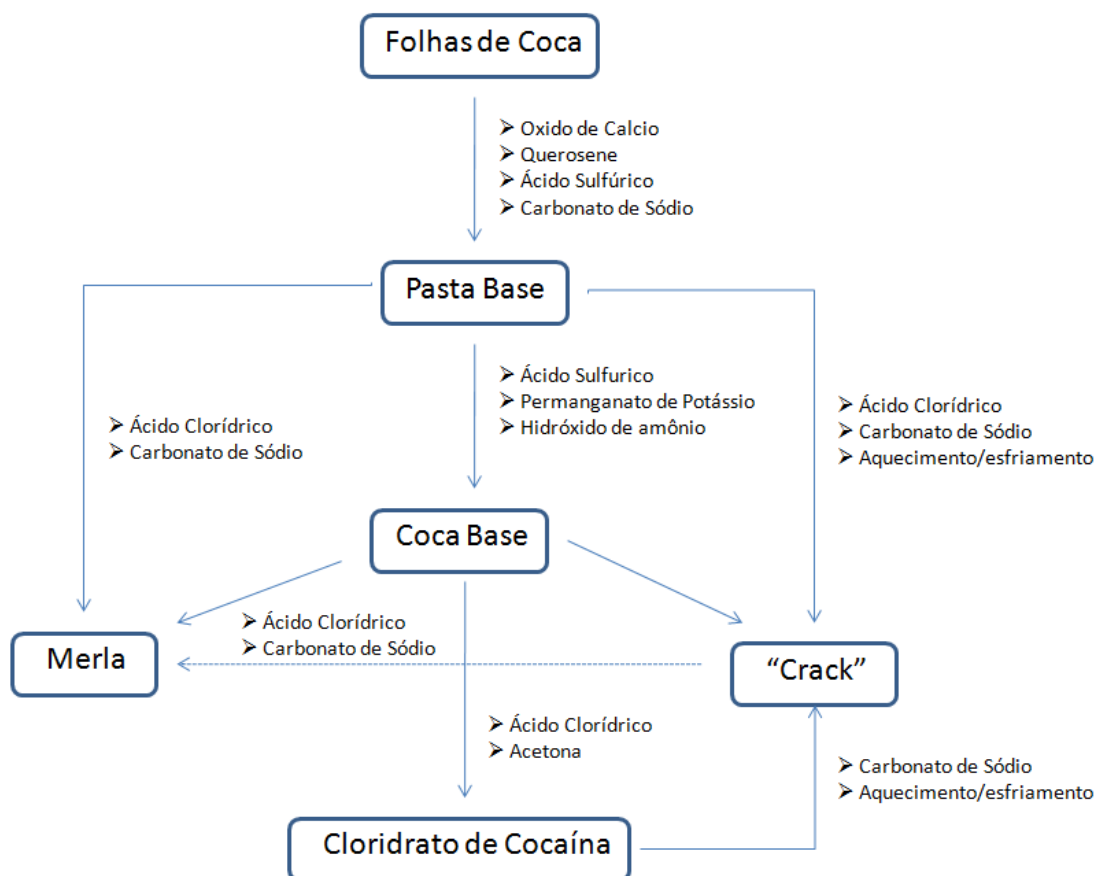


Figura 2. Fluxograma com as formas encontradas da droga e algumas substâncias utilizadas para extração, refino e interconversão. Adaptado da referência 10.

2.1.1 Adulterantes e diluentes

Recentemente, observa-se uma queda na pureza da droga apreendida, raramente encontra-se cocaína como uma droga 100% pura.^{6,17} Algumas substâncias de baixo custo são adicionadas à droga com o objetivo de aumentar seu volume e, assim, aumentar-se o lucro nas vendas. Essas substâncias farmacologicamente inativas são chamadas de diluentes. Como exemplos têm-se açúcares (glucose, manose, lactose e sacarose), carbonatos, bicarbonatos, silicatos, amido e sulfatos.^{3,6,18}

Enquanto isso, para compensar a perda dos efeitos farmacológicos gerada pela baixa pureza, adiciona-se também substâncias que aumentam ou imitam os efeitos psicoativos da droga. No Brasil, os adulterantes mais comuns são: a cafeína (estimulante), lidocaína (anestésico local), procaína (anestésico local), prilocaína (anestésico), benzocaína (anestésico), fenacetina (antipirético e analgésico), diltiazem (anti-hipertensivo) e levamisol (apresenta sinergia estimulante com a cocaína).^{3,19} Na Europa, de acordo com Broséus et al, os principais adulterantes são, atualmente, fenacetina, levamisol e lidocaína.¹⁸

Além disso, pode-se encontrar solventes derivados dos processos de extração e refino da droga ou compostos minoritários advindos das folhas das plantas de coca (cis e trans-isoamil-cocaína, hidroxicoaína, tropocaína, trimetoxicocaína e truxilina).^{11,20}

A determinação dos adulterantes presentes na droga pode ter valor clínico, uma vez que esses compostos podem gerar reações inesperadas nos usuários da droga.¹⁷ Indorato et al. inclusive reportam a possibilidade de dois casos de morte estarem relacionados à adulteração de cocaína com levamisol.²¹

2.1.2 Perfil Químico

Uma ferramenta importante para as investigações policiais é a determinação do perfil químico da droga caracterizado pela reunião de dados de uma caracterização físico-química detalhada da droga de abuso apreendida.²² A partir dessas informações, pode-se determinar características de sua origem, processamento, tráfico e pureza. Quando combinados com dados de investigações, pode-se estabelecer conexões entre traficantes de droga, fornecedores e usuários, traçar padrões de redes de distribuição da droga e identificar quais substâncias químicas devem preferencialmente ser controladas em cada região.^{6,23}

Deve-se enfatizar que o Brasil, como um dos dez maiores produtores de produtos químicos do mundo, é regionalmente atraente em termos de indústria química por ser também o único país a fazer fronteira com os três maiores produtores de cocaína do mundo. Portanto, torna-se desafiador um controle químico das substâncias que têm sido utilizadas nos processos de refino e extração ou que estão sendo adicionadas à droga, no Brasil.²⁴

Várias instituições têm implementado e promovido programas de perfil químico de drogas ilícitas em todo o mundo.²⁵ No Brasil, desde 2006, a Polícia Federal vem desenvolvendo e implementando seu próprio programa. O Projeto PeQui (Perfil Químico de Drogas) foi desenvolvido para fornecer à polícia informações de inteligência e dados advindos das análises químicas, correlacionando apreensões e obtendo dados a respeito da origem da droga, por exemplo.¹⁶

2.1.3 Caracterização da Cocaína

Testes presuntivos são muito utilizados em campo e em laboratório com o objetivo de se obter uma identificação qualitativa de substâncias controladas.²⁶ Os métodos atuais são geralmente colorimétricos. Para a cocaína, o teste usado é chamado de teste de Scott e baseia-se na complexação do alcalóide com o tiocianato de cobalto em solução gerando a cor azul.²⁷

O teste de Scott modificado consiste em três etapas e os seguintes resultados precisam ser observados para que o resultado para a presença de cocaína seja positivo:

1. Uma solução aquosa de tiocianato de cobalto é adicionada à uma porção da amostra em questão e, então, um precipitado azul é formado;
2. Adiciona-se uma solução de ácido clorídrico ao precipitado formado e, então, observa-se o desaparecimento deste precipitado;
3. Um certo volume de clorofórmio é então adicionado e observa-se o reaparecimento da cor azul na fase orgânica, o que indica a presença de cocaína.²⁸

Ainda que o teste de Scott seja vastamente utilizado como teste qualitativo, a literatura reporta alguns trabalhos que utilizam esse teste para a quantificação de cocaína. da Silva et al. reportaram a quantificação da droga utilizando sistemas de injeção sequencial em fluxo, SIA, para a reação do teste de Scott e posterior determinação espectrométrica na região do visível, especificamente em 630 nm. Apesar das claras vantagens de inserção de reagentes e homogeneização, o método é relativamente demorado e não permite sua utilização *in situ*, considerando o equipamento utilizado que não permite portabilidade.²⁹ Krauss et al., entretanto, propuseram um método de teste presuntivo para a cocaína e metanfetamina *in situ* utilizando, para a cocaína, uma adaptação da reação do teste de Scott em dispositivos microfluidicos de poliéster e toner em formato de multicamadas que induzem a mistura dos reagentes equilibrando a ação capilar aliada à fluidez advinda da centrifugação. A análise é feita com um smartphone, onde se observa a variação da saturação das imagens capturadas. Apesar de o método proposto ser rápido, ele apresenta uma instrumentação que não está disponível comercialmente e exige o treinamento de pessoal para utilizá-la. Além disso, na forma proposta do teste de Scott a impossibilidade de adição de clorofórmio durante as etapas,

aumentou a incidência de falsos positivos, levando à necessidade de se utilizar massas maiores de amostras.²⁶

Marcelo et al. propuseram um método de avaliação do teste de Scott por meio de imagens digitais obtidas com um Scanner e analisadas utilizando técnicas quimiométricas. O teste de Scott foi realizado adicionando 3 mL de tiocianato de cobalto à 5, 10, 15 e 20 mg de amostra seguido da adição de 3 mL de clorofórmio. Uma alíquota de 2 mL da fase orgânica é então transferida para um recipiente de vidro que é levado então para uma scanner para a obtenção da imagem digital. Utilizando o software MatLab extrai-se os histogramas de canais RGB da imagem e aplica-se as técnicas quimiométricas. Apesar dos bons resultados quanto a possibilidade de se identificar falsos positivos e falsos negativos, o método apresenta partes laboriosas e que podem ser fontes de erros, como a parte de transferência da alíquota da fase orgânica para o recipiente onde será realizada a medida. O uso de scanner para a obtenção da imagem digital requer o uso posterior de um *software* que extraia os valores de RGB, o que poderia ser simplificado com o uso de um *smartphone* que, com um aplicativo, realizaria as duas funções rapidamente, fazendo com que o método se torne mais rápido e mais prático.²⁸

Uma vez confirmada a presença de cocaína pelo teste colorimétrico, algumas metodologias analíticas são empregadas para se obter uma caracterização da droga. Por meio de um teste de solubilidade em água e etiléter, seguido de precipitação com ácidos e bases, pode-se determinar a forma em que a droga se encontra (sal ou base livre). Outro fator importante a se determinar é a taxa de oxidação da droga, que é um importante parâmetro diretamente relacionado à forma com que a droga foi produzida e é estimada baseada na concentração de cis e trans-cinamoil-cocaína. Quanto mais oxidada está a amostra, menor é a concentração de cis e trans-cinamoil-cocaína presente.³⁰

Informações a respeito de solventes remanescentes de processos de refino e purificação ou extração da droga são geralmente obtidas por meio da técnica de cromatografia gasosa utilizando a amostragem por *headspace* (HS-CG).²³

A determinação do teor de cocaína (pureza) e a identificação e quantificação dos adulterantes presentes na amostra se dão, comumente, pelo método recomendado pela *United Nations Office on Drugs and Crime*: as cromatografias líquida e gasosa.^{5,31} Apesar dos excelentes resultados, as cromatografias são técnicas relativamente caras e que requerem um tempo considerável de preparo de amostra e operação do equipamento, exigindo também treinamento de pessoal para a interpretação de dados.⁴

A literatura reporta propostas de diferentes métodos alternativos às cromatografias, principalmente baseados em espectroscopia e quimiometria. Grobério et al., assim como Rodrigues et al., realizaram a quantificação de cocaína e seus adulterantes utilizando espectroscopia de infravermelho e métodos quimiométricos.^{6,30} Enquanto Ryder et al. reportam a quantificação também de cocaína, porém utilizando espectroscopia Raman e métodos quimiométricos.³² Apesar dos bons resultados, utilizar estes métodos requer um número alto de amostras para validação e predição do modelo quimiométrico a fim de se obter resultados

representativos. E, além disso, há desvantagens inerentes ao uso de espectroscopia, como a interferência da fluorescência de fundo na medida com Raman e a interferência da água nas medidas com infravermelho.²⁶

2.2 Colorimetria baseada em imagens digitais

Quando uma cena é capturada por um dispositivo eletrônico, como uma câmera fotográfica, *scanners*, *webcams* ou *smartphones*, por exemplo, o sinal é convertido em uma forma numérica. Usualmente, a área capturada é dividida em pequenas partes situadas em um arranjo bidimensional, onde cada ponto é chamado *pixel*.^{9,33} Para uma imagem digital ser o mais fiel possível à imagem real em um determinado tamanho, é necessário um número adequado de *pixels* que represente esta imagem. Essa capacidade é chamada de resolução e, atualmente, os celulares são equipados com câmeras de alta resolução, além de várias opções disponíveis, tais como autofoco, *zoom* digital e balanço de branco.³⁴

Um pesquisador da Kodak, Bryce Bayer, propôs a representação de cor digital e numérica mais utilizada. Essa representação baseia-se no uso de três filtros de cores, vermelho, verde e azul, onde a combinação de suas intensidades possibilita a geração de diferentes cores.⁹ Geralmente, são utilizadas três matrizes para armazenar as informações de uma imagem. São armazenados na matriz R (*red*) os valores da cor vermelha, na matriz G (*green*) os valores da cor verde e, finalmente, na matriz B (*blue*) os valores da cor azul. Esses padrões são chamados RGB. A resposta analítica que uma imagem gera representa esses padrões de cores: RGB, com valores variando entre 0 e 255 para cada padrão.⁹ O princípio, neste caso, é o mesmo da absorção molecular: uma substância colorida absorve seletivamente comprimentos de onda da região visível do espectro eletromagnético. A coloração resultante é a cor complementar da absorvida e é composta pela combinação dos comprimentos de ondas restantes. Portanto, uma solução azul apresentará variação no padrão R (Red), sua cor complementar.^{9,35}

Utilizando tais informações das imagens, pode-se realizar determinações qualitativas e quantitativas com desempenho adequado, sem necessitar de instrumentos como espectrofotômetros ou espectrofluorímetros, diminuindo o custo das análises.^{7,33} Além disso, o uso de câmeras de *smartphones* facilita o desenvolvimento de sistemas portáteis de análises químicas para análises rápidas de campo. Recentemente, o uso de imagens digitais tem sido amplamente explorado para análises de naturezas diversas. Neto et al. reportaram a discriminação de oito marcas de água mineral utilizando a reação de complexação de íons metálicos com Negro de Eriocromo-T e Murexida e um *smartphone*; Gaiao et al. e Tôrres et al. reportaram titulações ácido-base com detecção do ponto final a partir de imagens digitais advindas de *webcams*, sendo o último aplicado a determinação de acidez total de vinhos; Choodum et al., por sua vez, reportam a determinação de trinitrotolueno (TNT) em solos a partir de sua complexação com diciclohexilamina (DCHA) e detecção com *smartphone*; Garcia et al.

realizaram a estimativa do intervalo post-mortem por meio da determinação de Fe^{2+} por imagem digital utilizando uma reação colorimétrica do metal com 1,10-fenantrolina em amostras de humor vítreo.^{8,33,34,36,37}

Seguindo essa tendência, a análise de drogas baseada em imagens digitais tem sido explorada recentemente, apresentando um grande potencial a ser avaliado. Choodum et al. realizaram medidas semi-quantitativas de anfetamina, metilanfetamina e opioides, a partir de testes presuntivos como o de teste de Marquis e o teste de Simon, utilizando o software Adobe Photoshop para obtenção dos padrões RGB a partir das imagens digitais.^{38,39} Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisa passou a utilizar *smartphones* para a obtenção dos valores de RGB, e, com isso, reportou a quantificação de metanfetamina.¹⁰ Tosato et al. relatam um método quantitativo baseado em cromatografia de camada delgada, CCD, obtenção de imagem digital com um *smartphone*, obtenção de valores de RGB com o MatLab e métodos quimiométricos para a determinação de cocaína em amostras apreendidas. O método proposto se mostrou eficiente mesmo utilizando uma instrumentação simples para a sua execução. Entretanto, devido a quantidade de etapas envolvidas na medida e a necessidade de aplicação de métodos quimiométricos, há a necessidade de pessoal familiarizado com as técnicas de CCD e de quimiometria para a sua execução, o que pode limitar a aplicação da proposta.¹⁵

Recentemente, um grupo de pesquisas nacional desenvolveu e avaliou um aplicativo para determinações colorimétricas baseadas em imagens digitais obtidas por dispositivos móveis que permite a realização de análises quantitativas ou qualitativas a partir de uma interface amigável e intuitiva. O aplicativo está disponível gratuitamente para sistema operacional *Android* ou *Windows-phone* e os autores disponibilizam também tutoriais na web que auxiliam em sua utilização. De maneira geral, para análises quantitativas univariadas, o usuário obtém imagens de soluções padrões de concentrações conhecidas em um ambiente de luz controlada e o aplicativo obtém, a partir dos valores de parâmetros da imagem como as cores RGB, curvas analíticas que são apresentadas ao usuário em função do seu coeficiente de correlação. Realizada a calibração, o usuário realiza as medidas para as soluções das amostras e, selecionando a curva analítica desejada, obtém os valores de concentração calculados pelo aplicativo. Considerando o exposto, na presente dissertação são relatados estudos para avaliar a possibilidade de aplicação de medidas colorimétricas, obtidas com *smartphones* através do aplicativo PhotoMetrix, para a determinação de cocaína e alguns adulterantes usualmente encontrados em amostras da droga a partir de procedimentos simples que não necessitem de separações cromatográficas ou aplicação de métodos quimiométricos e que, por esse motivo, sejam mais facilmente aplicáveis.

3.0 Materiais e métodos

Nesta seção serão descritos a construção do sistema de leitura por imagens digitais utilizando um celular, e medidas com o aplicativo PhotoMetrix ⁴⁰, e os estudos preliminares para a quantificação de cocaína baseada na reação de Scott ²⁷, procaína pela reação com ácido cromotrópico ⁴¹, levamisol com alaranjado de metila ⁴² e cafeína com cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) ^{43,44}.

3.1 Construção do sistema de leitura por imagens digitais

Todas as reações colorimétricas foram conduzidas pela mistura dos reagentes em frascos de vidro com volume total de aproximadamente 3 mL, diâmetro externo de 11 mm e 4 cm de altura. As medidas de intensidade de cor foram efetuadas diretamente nestes frascos em um ambiente de luz controlada, descrito a seguir, a partir do *smartphone* LG G4 H815P com câmera traseira com resolução de 16 Mp.

Uma caixa em madeira pintada em preto-fosco foi construída para criar um ambiente de luz controlada e, assim, eliminar efeitos da variação da luz ambiente nas leituras (Figura 2). ⁴⁵ A caixa foi construída com dimensões de 19 cm x 27 cm x 12,5 cm (largura x comprimento x altura). Na parte superior interna foi fixada uma fita de LED contendo 9 emissores de cor branca cuja intensidade foi controlada por um potenciômetro (Figura 2 (D)). Em seu interior, foi afixado um suporte para acomodar os frascos, construído em ácido polilático (PLA) utilizando uma impressora 3D (Figura 2(A)), a aproximadamente 8,5 cm da parte frontal da caixa, na qual foi feito um orifício para a câmera do celular que ficou posicionado na parte externa onde foi afixado um suporte em forma de encaixe, confeccionado em etil vinil acetato (EVA) e polimetilmetacrilato (acrílico), para que não houvesse movimento do aparelho durante as medidas. Na parte posterior do frasco foi posicionado um anteparo recoberto com EVA branco de forma a fornecer um fundo neutro para a imagem.

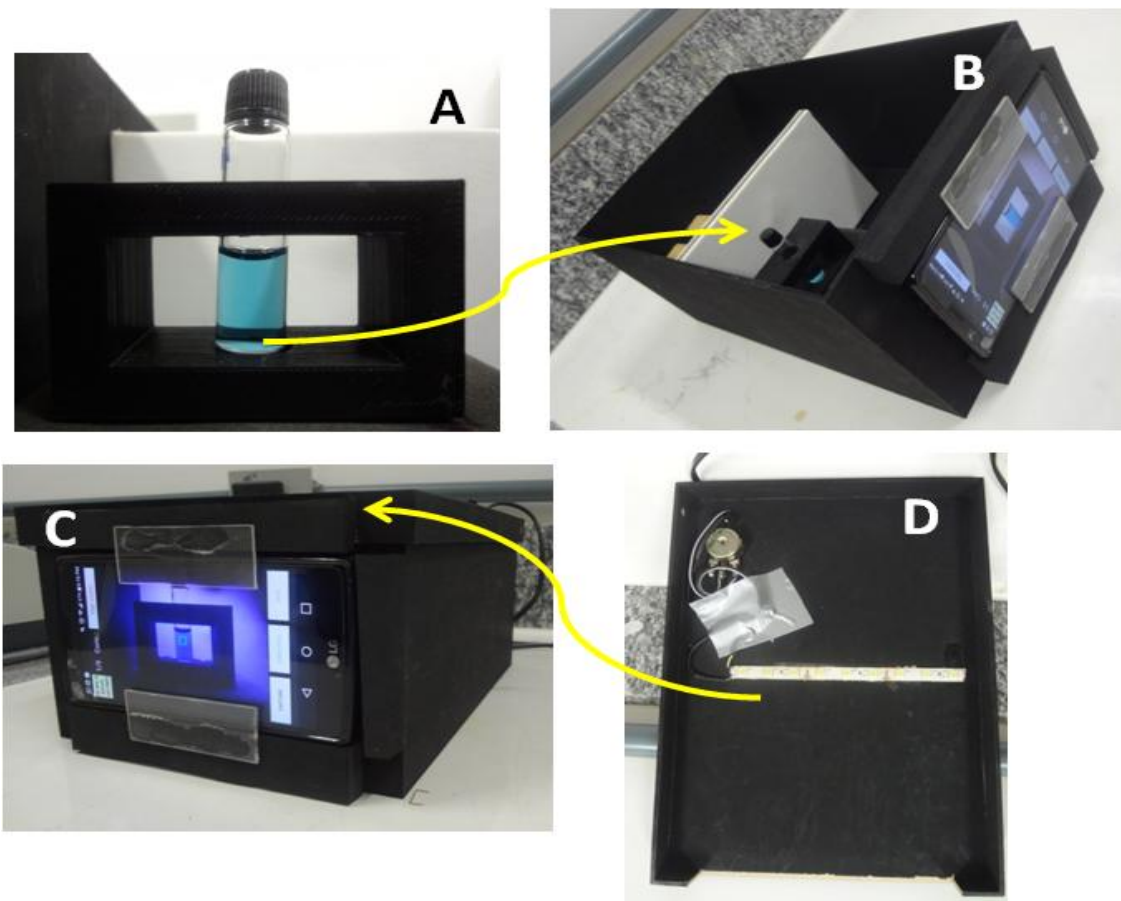


Figura 3. Caixa *lab-made* construída para criar um ambiente de luz controlada. Suporte para acomodar os frascos (A), Visão interna (B) e frontal (C) da caixa e destaque para a fita de LED utilizada na parte superior interior da caixa (D).

3.2 Aplicativo PhotoMetrix

Para a calibração e determinação colorimétrica, utilizou-se o aplicativo denominado PhotoMetrix, desenvolvido por Helfer et al., disponível gratuitamente na *Play Store* para smartphones Android e *Windows Phone*.^{40,46}

Na tela principal do aplicativo (Figura 3 (A)), o usuário pode selecionar as opções de análise uni ou multivariada, sendo a análise univariada utilizada no presente trabalho. Ao acessar este modo de análise, tem-se a opção *calibration* (Figura 3 (B)), onde se determina o número de padrões desejados para a construção da curva analítica (Figura 3 (C)). Estabelecida estas configurações iniciais, o usuário realiza a medida colorimétrica de cada um dos padrões individualmente, indicando para o aplicativo quais as concentrações dos padrões para cada medida, como no exemplo da Figura 3 (D). No exemplo, o quadrado verde representa o local onde será realizada a medida. Ao final, o aplicativo disponibiliza curvas de calibração com suas respectivas equações e fatores de correlação para diferentes parâmetros de imagem entre

eles, o RGB. O usuário seleciona, então, a curva mais conveniente para a aplicação e a mesma pode ser enviada para o email, como no exemplo da Figura 3 (E).

Terminada a calibração, o usuário deve acessar o modo de quantificação da amostra, *sampling*, e selecionar a curva mais adequada. O aplicativo captura os valores de RGB da amostra em questão e os relaciona com a curva selecionada. Assim, a concentração da amostra avaliada é determinada.

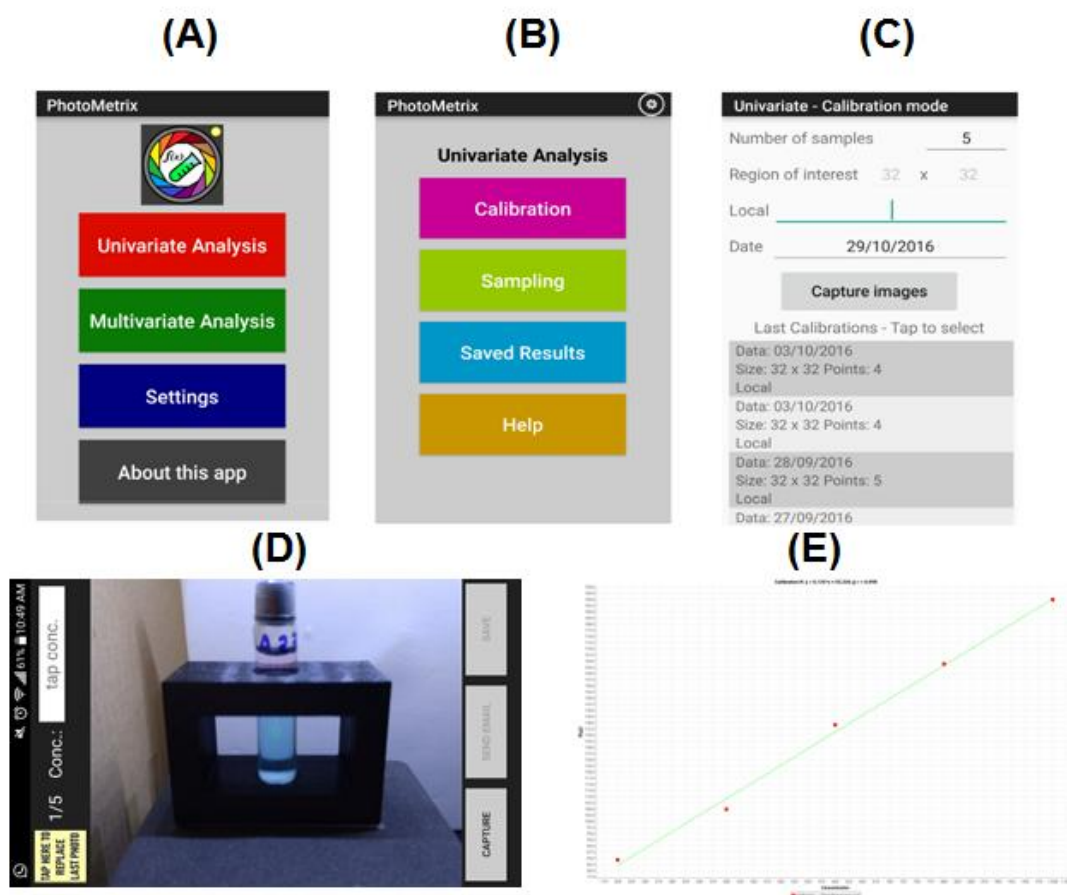


Figura 4. Tela principal do aplicativo PhotoMetrix (A), tela do modo *UnivariateAnalysis* (B) e tela do modo *Calibration* (C)

3.3 Amostras sintéticas empregadas nos estudos

Para os estudos realizados foram empregadas amostras sintéticas que consistiam na mistura de cocaína com alguns adulterantes e/ou diluentes na sua forma sólida. Os estudos foram divididos entre amostras com quatro ou três constituintes, incluindo a cocaína em sua forma cloridrato ou de base livre.

3.3.1 Amostras com quatro constituintes

Estas amostras foram preparadas por pesquisadores do Instituto Nacional de Criminalística e utilizadas em um trabalho recente.⁴⁷ De um total de 45 amostras preparadas, dezoito foram selecionadas de forma que suas composições variassem o máximo possível, sendo seis amostras com cloridrato de cocaína contendo levamisol, cafeína e ácido bórico (Tabela 1), seis amostras com cocaína base livre contendo benzocaína, bicarbonato de sódio e aminopirina (Tabela 2) e seis amostras, também com cocaína base livre, contendo, porém, amido, fenacetina e lidocaína (Tabela 3).

Tabela 1. Constituintes e teores das amostras de 1 à 6.

Amostras	Constituintes			
	Cocaína Cloridrato	Levamisol	Cafeína	Ácido Bórico
Amostra 1	5%	85%	5%	5%
Amostra 2	85%	5%	5%	5%
Amostra 3	5%	45%	45%	5%
Amostra 4	45%	45%	5%	5%
Amostra 5	45%	5%	5%	45%
Amostra 6	25%	25%	25%	25%

Tabela 2. Constituintes e teores das amostras de 7 à 12.

Amostras	Constituintes			
	Cocaína Base Livre	Benzocaína	Bicarbonato de Sódio	Aminopirina
Amostra 7	85%	5%	5%	5%
Amostra 8	30%	5%	32,5%	32,5%
Amostra 9	57,5%	5%	32,5%	5%
Amostra 10	30%	23,3%	23,3%	23,3%
Amostra 11	48,3%	23,3%	5%	23,3%
Amostra 12	48,3%	23,3%	23,3%	5%

Tabela 3. Constituintes e teores das amostras 13 à 18.

Amostras	Constituintes			
	Cocaína Base Livre	Amido	Fenacetina	Lidocaína
Amostra 13	10%	80%	5%	5%
Amostra 14	10%	10%	5%	75%
Amostra 15	80%	10%	5%	5%
Amostra 16	45%	10%	5%	40%
Amostra 17	33,3%	33,3%	28,3%	5%
Amostra 18	27,5%	27,5%	22,5%	22,5%

3.3.2 Amostras com três constituintes

Dois grupos contendo 10 amostras com composições ternárias foram preparados. Estas amostras foram planejadas de forma a sempre conter cocaína, nas suas duas formas (cloridrato e base livre) alternadamente, e outros dois adulterantes. Considerando os adulterantes mais encontrados nas apreensões de cocaína pela Polícia Federal, quatro foram escolhidos para compor as amostras: levamisol, cafeína, lidocaína e procaína.

Uma vez que a soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%, tem-se que, para uma mistura qualquer de q componentes:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1$$

Portanto, para uma mistura de três componentes, tem-se que:

$$x_1 + x_2 + x_3 = 1$$

Todas as composições possíveis para misturas ternárias podem ser representadas pelo triângulo equilátero apresentado na Figura 5. Os vértices correspondem aos componentes puros e as arestas às misturas binárias, enquanto os pontos situados no interior do triângulo representam as misturas de três componentes. ⁴⁸

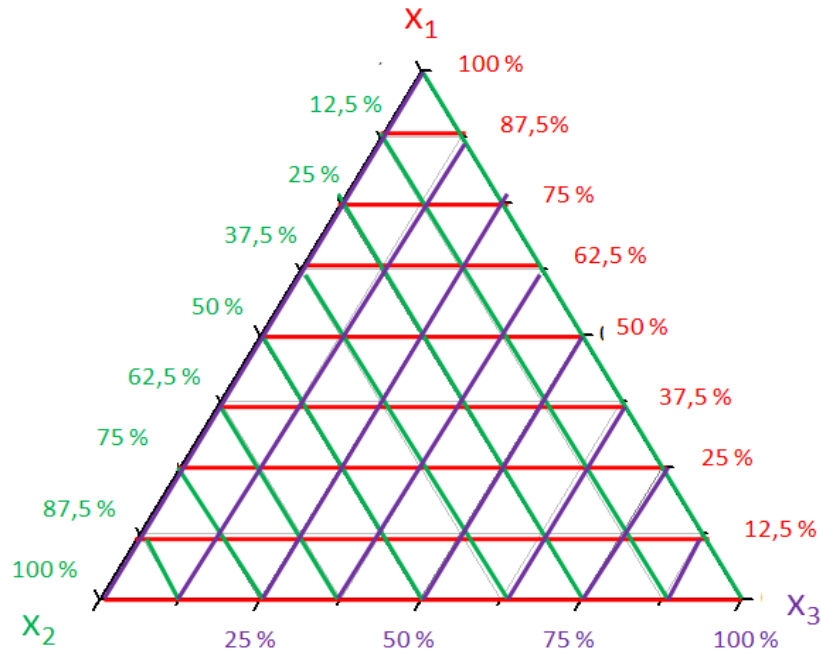


Figura 5. Gráfico representando as composições possíveis para misturas ternárias

Com base na quantificação dos adulterantes encontrados em apreensões realizadas pela Polícia Federal, concluiu-se que, em geral, os adulterantes estão presentes nas amostras numa faixa de concentração de 1 à 40 %. Dessa forma, limitou-se a concentração de cocaína nas amostras à faixa de 75 - 95 % e a concentração dos adulterantes à faixa de 5 - 25 %.³⁰

Para que as concentrações da amostras obedeçam a essa limitação, o gráfico ternário deve ser reduzido ao pequeno triângulo equilátero inscrito neste gráfico apresentado na Figura 6.

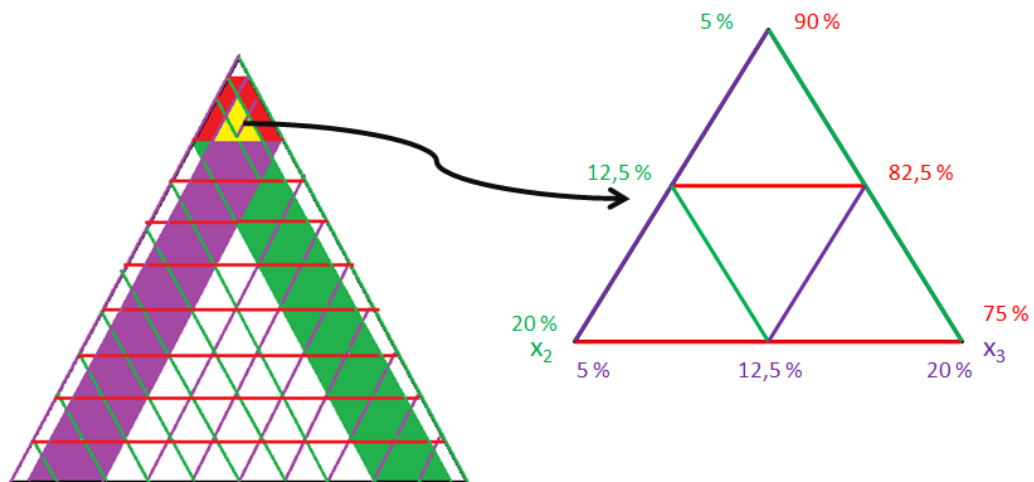


Figura 6. Representação da limitação nas faixas de concentração e triângulo equilátero equivalente.

Do gráfico ternário final, 10 pontos foram determinados para corresponder às 10 amostras planejadas. Esses pontos foram escolhidos de forma a se obter a maior variedade de concentração possível. As composições escolhidas, como mostrado na Figura 7, foram as correspondentes aos 3 vértices do triângulo, aos 3 centros das arestas, aos vértices de um segundo triângulo inscrito e ao centro do triângulo principal.

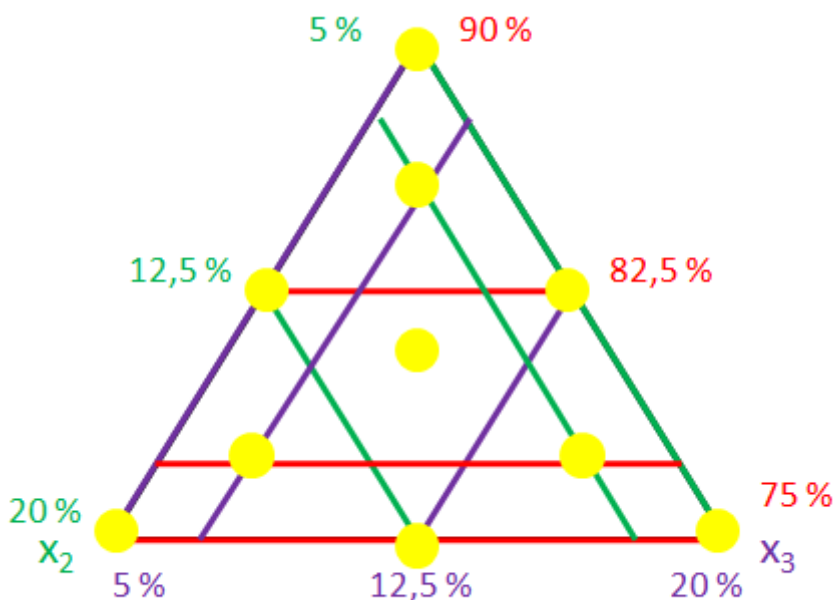


Figura 7. Representação gráfica dos pontos correspondentes às amostras escolhidas.

A Tabela 4 apresenta as composições das amostras, considerando x_1 a cocaína, e x_2 e x_3 os adulterantes, onde, no primeiro grupo, x_1 corresponde à cocaína cloridrato, x_2 ao levamisol e x_3 à cafeína e, no segundo grupo, x_1 corresponde à cocaína base livre, x_2 à lidocaína e x_3 à procaína.

Tabela 4. Composição das amostras planejadas.

Amostras	X_1 (%)	X_2 (%)	X_3 (%)
1	75	20	5
2	90	5	5
3	75	5	20
4	82,5	12,5	5
5	75	12,5	12,5
6	82,5	5	12,5
7	78	14	8
8	84	8	8
9	78	8	14
10	81	9,5	9,5

3.4 Determinação colorimétrica de Cocaína

A determinação de cocaína foi baseada no teste de Scott modificado. Essa modificação permite que o mesmo seja válido também para cocaína base e, para isso, faz-se necessária a adição de ácido clorídrico para que a cocaína base seja dissolvida e o teste seja completo. ⁴⁹

3.4.1 Reagentes e Soluções

Uma solução estoque de cocaína 5000 mg L^{-1} foi preparada dissolvendo-se a massa adequada da substância (cloridrato ou base), purificada no Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, em 5,00 mL de clorofórmio P.A.

Uma solução $0,029 \text{ mol L}^{-1}$ de tiocianato de cobalto foi preparada dissolvendo-se a massa necessária da substância (Sigma Aldrich – 99%) em solução de ácido clorídrico 2% (v/v).

Soluções padrão de cocaína para a calibração (200 à 1000 mg L^{-1}) foram preparadas transferindo-se 0,5 mL da solução de tiocianato de cobalto, o volume adequado da solução estoque de cocaína (80 à $400 \text{ }\mu\text{L}$) e o volume de clorofórmio igual a $2000 \text{ }\mu\text{L}$ menos o volume adicionado da solução estoque. Após a mistura dos reagentes, é observada a formação de duas fases, sendo a fase orgânica (inferior) utilizada como região de observação para a colorimetria.

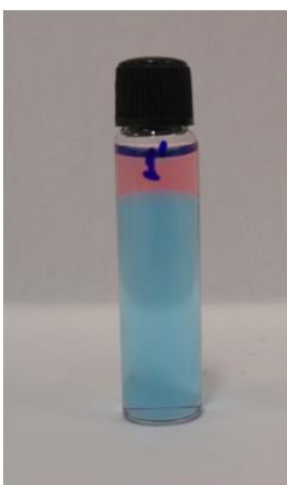


Figura 8. Exemplo da reação do teste de Scott. A região de observação fica na fase orgânica (inferior e azul).

Para a análise das amostras com quatro constituintes, que foram utilizadas em um estudo preliminar, levou-se em consideração os teores de cocaína conhecidos e calculou-se a massa necessária de amostra para preparar soluções com aproximadamente 600 mg L^{-1} em cocaína. Então, 2,00 mL dessas soluções foram transferidos para os frascos de medida e misturados com 0,50 mL de tiocianato de cobalto.

O volume das soluções estoques variou com o teor das amostras: para amostras muito concentradas (80 à 85% em cocaína) preparou-se soluções de 10 mL, para amostras de 25 à 57,5% preparou-se soluções de 5 mL, enquanto para amostras de 5 à 10% soluções de 2 mL. Vale destacar, que as massas utilizadas variaram entre 5,36 e 23,34 mg, sendo necessária a pesagem em balança de elevada precisão (cinco casas decimais) e que volumes maiores de solução e, portanto, massas maiores não foram utilizadas no preparo devido à pequena quantidade que se tinha disponível dessas amostras.

Para a análise das amostras planejadas com três constituintes, entretanto, um protocolo foi criado para que, considerando a faixa de concentração utilizada para a cocaína no preparo das amostras (75 à 90 %), as concentrações das amostras após a dissolução sempre se encontrassem dentro da faixa de concentração da curva analítica construída.

Para que isso ocorresse, 50 mg da amostra a ser analisada foram dissolvidas em 10 mL de clorofórmio. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 400 μL e, a esta alíquota, foi adicionado 500 μL da solução de tiocianato de cobalto $0,029 \text{ mol L}^{-1}$ acidificada e 1600 μL de clorofórmio puro. Após a homogeneização, realizou-se a medida.

Este protocolo permite que amostras com 75% de cocaína, limite mínimo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração, após a dissolução, de 750 mg L^{-1} e amostras com 90%, limite máximo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração de 900 mg L^{-1} que, considerando a curva utilizada com uma faixa de concentração variando de 200 à 1000 mg L^{-1} , são concentrações plenamente adequadas para a análise.

É importante destacar a dificuldade existente quanto à pipetagem de líquidos voláteis, como é o caso das soluções de clorofórmio. Ao pipetar esses líquidos com pipetas automáticas de deslocamento de ar, o líquido volatiliza dentro do sistema de pipetagem aumentando a pressão interna e, assim, empurrando o líquido para a saída do sistema, a ponteira. Esse evento acarreta em perda de volume e, portanto, um erro na concentração. A fim de se evitar esses erros, fez-se uso da técnica de pipetagem reversa. Além disso, deve-se aspirar e dispensar o líquido diversas vezes antes de pipetá-lo para que a atmosfera interna do sistema de pipetagem seja saturada diminuindo a taxa de evaporação do líquido.⁵⁰

3.5 Determinação de Levamisol

A determinação de levamisol foi baseada no trabalho de El-Didamony, que propõe a formação de um complexo da substância com alaranjado de metila e posterior extração com um solvente orgânico.⁴² O autor sugere o uso de diclorometano como solvente, porém, utilizou-se clorofórmio no presente trabalho de forma a manter o mesmo solvente utilizado para a determinação de cocaína com o teste de Scott. O extrato gerado possui cor amarelada.

3.5.1 Reagentes e Soluções

Uma solução 0,02% (m/v) de alaranjado de metila foi preparada dissolvendo-se a massa necessária da substância (Sigma Aldrich – 99%) em 50 mL de água purificada por osmose reversa.

Uma solução tampão de ácido acético e acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo-se o volume adequado de solução de ácido acético glacial em 80 mL de água, seguida de adições de solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} até a obtenção do pH 3,6. Posteriormente a solução foi diluída a 100 mL com água purificada.

Como não havia disponível no laboratório de pesquisa um reagente padrão de cloridrato de levamisol, a solução estoque foi preparada, por meio da extração da substância a partir de comprimidos do fármaco Ascaridil contendo cerca de 150 mg por comprimido. Para isso, três comprimidos foram macerados e a massa correspondente a dois comprimidos foi transferida para um béquer de 100 mL e dissolvido com 50 mL de água. A suspensão resultante foi filtrada diretamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi aferido com as água de lavagem do béquer. A concentração final da solução estoque foi de aproximadamente $2,5 \text{ g L}^{-1}$.

Para o preparo das amostras planejadas, descrito na seção 3.3.2, e sua análise, 15 comprimidos do medicamento Ascaridil, contendo 150 mg de levamisol por comprimido, foram pesados individualmente e sua massa média calculada. Considerando que cada um deles continha 150 mg do princípio ativo, calculou-se a porcentagem média de levamisol nos comprimidos que foi de 47,9 %. Com base nesta proporção, não se extraiu mais o medicamento por meio de filtração, no lugar disso, calculou-se a massa necessária a se pesar para que esta contivesse a massa requerida do princípio ativo. A solução estoque de levamisol foi preparada dissolvendo-se em 10 mL de clorofórmio a massa necessária do medicamento para que se obtivesse uma concentração de 300 mg L^{-1} .

Uma curva analítica foi construída com uma faixa de concentração de aproximadamente 3 à 27 mg L^{-1} de levamisol. Para isso, 125 μL da solução de alaranjado de metila e 50 μL da solução tampão foram adicionados aos volumes adequados da solução estoque de cloridrato de levamisol em clorofórmio (20 a 180 μL). Para que cada padrão tivesse 500 μL de solução aquosa, adicionou-se o respectivo volume de água purificada necessário para completar cada um. Por fim, um volume de clorofórmio igual a 2000 μL menos o volume adicionado da solução padrão foi adicionado à mistura e o frasco foi agitado para promover a extração.

Após a mistura dos reagentes foi observada a formação de duas fases, sendo a fase orgânica (inferior) utilizada como região de observação para a colorimetria.



Figura 9. Exemplo da reação de determinação de levamisol. A região de observação fica na fase orgânica (inferior e amarela).

Para a análise das amostras planejadas que continham levamisol em sua composição, foi estabelecido um protocolo para que, considerando a faixa de concentração utilizada para o levamisol no preparo das amostras (5 à 20 %), as concentrações das soluções das amostras sempre se encontrassem dentro da faixa de concentração da curva analítica construída.

Para isso, 50 mg da amostra a ser analisada são dissolvidos em 10 mL de clorofórmio. Desta solução, retira-se uma alíquota de 40 μL e à esta alíquota adiciona-se 125 μL da solução de alaranjado de metila, 50 μL da solução tampão, 325 μL de água destilada e 1960 μL de clorofórmio puro. Após a homogeneização, realiza-se a medida.

Este protocolo permite que amostras com 5% de levamisol, limite mínimo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração, após a dissolução, de 5 mg L^{-1} e amostras com 20%, limite máximo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração de 20 mg L^{-1} que, considerando a curva utilizada com uma faixa de concentração variando de 3 à 27 mg L^{-1} , são concentrações plenamente adequadas para a análise.

3.6 Determinação de Procaína

A determinação de procaína foi baseada no trabalho de Silva et al. e trata-se de uma diasetização da substância, seguida de uma reação com ácido cromotrópico em meio básico.⁴¹ O complexo formado gera uma solução de coloração avermelhada.

3.6.1 Reagentes e Soluções

Uma solução de 2000 mg L⁻¹ de ácido cromotrópico foi preparada dissolvendo-se a massa adequada da substância (Merck – 98,5%) em 25,00 mL de uma solução 0,2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio.

Uma solução de nitrito de sódio 0,8 mmol L⁻¹ (55,2 mg L⁻¹) foi preparada dissolvendo-se a massa adequada da substância (Vetec – 99%) em 25,00 mL de água purificada por osmose reversa.

Uma solução estoque de procaína 0,05 mmol L⁻¹ (200 mg L⁻¹) foi preparada dissolvendo-se a massa necessária da substância (Sigma Aldrich – 99%) em 25,00 mL de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido clorídrico.

Para a construção da curva analítica, cuja faixa de concentração foi de 1 à 90 mg L⁻¹, volumes adequados da solução estoque (2,5 à 225 µL) foram adicionados aos frascos. A fim de se obter sempre 500 µL de solução ácida, os respectivos volumes necessários de uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ foram adicionados para completar este volume. Em seguida, 500 µL da solução de nitrito de sódio foram adicionados e, por fim, 1000 µL da solução de ácido cromotrópico. As soluções resultantes, diferentemente das anteriores, não apresentam duas fases.

Para a análise das amostras planejadas do segundo grupo, as quais continham procaína em sua composição, um protocolo foi criado para que, considerando a faixa de concentração utilizada para a procaína no preparo das amostras (5 à 20 %), as concentrações das amostras após a dissolução sempre se encontrassem dentro da faixa de concentração da curva analítica construída.

Para isso, 50 mg da amostra a ser analisada é dissolvida em 10 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ que, além de necessária para a acidificação do meio que a reação requer, é importante também para a dissolução da cocaína base livre que é insolúvel em água pura. Desta solução da amostra, retira-se uma alíquota de 40 µL e à esta alíquota adiciona-se 460 µL da solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹, 500 µL de uma solução de nitrito de sódio 55,2 mg L⁻¹ e 1000 µL de ácido cromotrópico. Após a homogeneização, realiza-se a medida.

Este protocolo permite que amostras com 5% de procaína, limite mínimo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração, após a dissolução, de 20 mg L⁻¹ e amostras com 20%, limite máximo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração de 80 mg L⁻¹ que, considerando a curva utilizada com uma faixa de concentração variando de 1 à 90 mg L⁻¹, são concentrações plenamente adequadas para a análise.

3.7 Determinação de Cafeína

A determinação de cafeína foi baseada no trabalho de Singh et al. e trata-se de uma oxidação da substância com metaperiodato de sódio na presença de ácido acético seguida de uma reação com cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona, MBTH, gerando um produto de coloração azulada.⁴³

3.7.1 Reagentes e soluções

Uma solução 0,01 mol L⁻¹ de metaperiodato de sódio (SPI) foi preparada dissolvendo-se a massa adequada da substância (Sigma Aldrich - 99,8%) em água. Da mesma forma, uma solução 0,01 mol L⁻¹ de cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) (Sigma Aldrich – 97%) foi preparada.

Uma solução de ácido acético 0,1 mol L⁻¹ foi preparada diluindo-se o volume adequado do ácido glacial (Synth) em água.

Uma solução estoque de cafeína de concentração 80 mg L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se a massa adequada de cafeína anidra P.A (Nuclear – 98,5%) em uma solução aquosa 20% (v/v) de metanol.

Para a construção da curva analítica, cuja faixa de concentração foi de 0,05 à 0,2 mg L⁻¹, os volumes adequados da solução estoque de cafeína (1,5 à 6 µL) foram adicionados aos frascos. Em seguida, 100 µL da solução de metaperiodato de sódio e 50 µL da solução de ácido acético foram adicionados. O frasco foi agitado para, então, adicionar-se 2000 µL de água destilada e, por fim, 200 µL da solução de cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona. A solução resultante não apresenta duas fases.

Com este método, tem-se uma curva de calibração com coeficiente de quantificação satisfatório, entretanto, a faixa de concentração é bastante baixa, motivo que requer a necessidade de uma diluição da amostra para que sua concentração pertença à faixa linear apresentada. Desta forma, um método alternativo foi reportado na literatura onde substitui-se, em suma, a adição da solução de ácido acético pela presença de um tampão de meio ácido.⁴⁴ Com este método, uma curva de calibração com uma faixa linear de concentrações mais altas foi obtida. Por isso, as amostras planejadas foram analisadas por meio desta segunda opção.

A diferença está no preparo da solução de SPI 0,01 mol L⁻¹ que, neste caso, é preparada por meio da dissolução da massa adequada do reagente em uma solução tampão acetato de pH 5,5. Na construção da curva analítica, adicionou-se ao frasco um volume adequado da solução estoque de cafeína, 800 µL da solução de SPI preparada em solução tampão e 200 µL da solução de MBTH. Após a homogeneização realizou-se a medida. Desta forma, a curva analítica apresentou uma faixa linear entre 75 e 375 mg L⁻¹.

Para a análise das amostras planejadas que continham cafeína em sua composição, o protocolo criado para que, considerando a faixa de concentração utilizada para a cafeína no preparo das amostras (5 à 20 %), as concentrações das amostras após a dissolução sempre se encontrassem dentro da faixa de concentração da curva analítica construída.

Para isso, 50 mg da amostra a ser analisada é dissolvida em 10 mL de água destilada. Desta solução, retira-se uma alíquota de 700 μL e à esta alíquota adiciona-se 300 μL de água destilada, 800 μL da solução de metaperiodato de sódio preparada em tampão acetato de pH 5,5, espera-se três minutos e adiciona-se 200 μL da solução de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona. Após a homogeneização, realiza-se a medida.

Este protocolo permite que amostras com 5% de cafeína, limite mínimo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração, após a dissolução, de 87,5 mg L^{-1} e amostras com 20%, limite máximo de concentração das amostras preparadas, apresentem concentração de 375 mg L^{-1} que, considerando a curva utilizada com uma faixa de concentração variando de 75 à 375 mg L^{-1} , são concentrações plenamente adequadas para a análise.

3.8 Estudos Cinéticos e Comparação das Medidas RGB com Outros Instrumentos

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações nas medidas, relacionadas à velocidade das reações de formação dos produtos coloridos, realizou-se medidas de absorvância das soluções colorimétricas em intervalos de aproximadamente 20 min desde a mistura dos reagentes, como para a reação de determinação de cocaína, até cerca de 300 min após a mistura, como para a reação de cafeína. As medidas foram realizadas à 25 °C empregando-se um espectrofotômetro Agilent Cary 8454 com sistema *peltier* para controle da temperatura.

As determinações colorimétricas de procaína e cocaína nas amostras foram comparadas com as medidas realizadas em um espectrofotômetro comercial (USB 2000 – Ocean optics) e também com um fotômetro *lab-made* equipado com diodos emissores de luz emitindo em 525 nm e 632 nm, independentemente, e em um fotoresistor (LDR – Light Dependent Resistor) como detector. As medidas com o fotômetro foram utilizadas como forma de apresentar outra alternativa portátil e de baixo custo para a realização das medidas.

4.0 Resultados e discussão

4.1 Avaliação Cinética das Reações Colorimétricas

Os resultados dos estudos cinéticos realizados para a determinação de cocaína com a reação do teste de Scott são mostrados na Figura 10 com os gráficos de absorvância medida em 630 nm em função do tempo para uma solução de cocaína a 600 mg L^{-1} . Pode-se observar que, a aproximadamente 170 segundos, ou seja, menos de 3 minutos, há uma estabilização do sinal de absorvância que se mantém por pelo menos 20 minutos. Portanto, pode-se inferir que a medida de RGB pode ser realizada após este período sem que haja imprecisão causada por variação de absorvância no tempo nas medidas. É importante relatar que a diminuição do sinal de absorvância observada nos momentos iniciais se deve a acomodação das fases orgânica e aquosa na cubeta, uma vez que a mistura reacional foi agitada manualmente no frasco de vidro e depois transferida para a cubeta para a realização das medidas. Assim, o espalhamento de luz causado pela separação ineficiente das fases leva ao aumento do sinal. Para as leituras realizadas a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o comportamento foi bastante similar, mostrando a possibilidade de aplicação do método em diferentes temperaturas do ambiente.

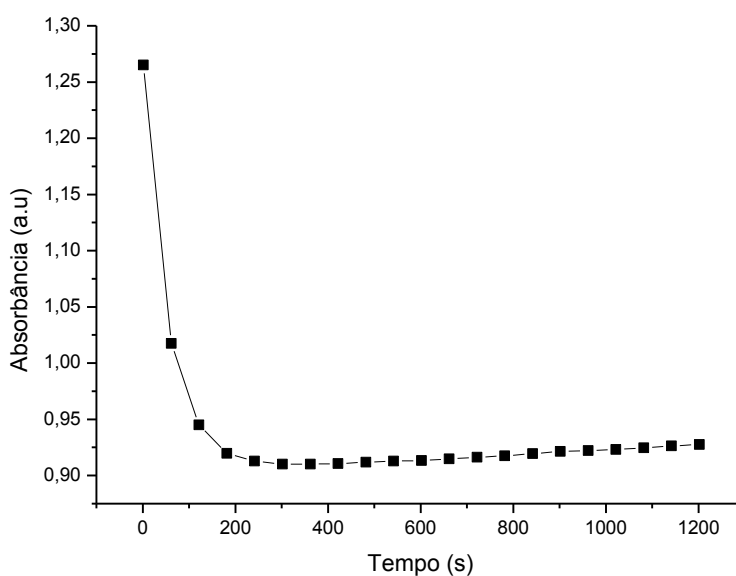


Figura 10. Medidas de absorvância realizadas em 630 nm para uma solução de cocaína a 600 mg L^{-1} empregando-se o teste de scott modificado.

Como será discutido mais adiante no texto, a lidocaína é um interferente para o método de Scott realizado diretamente sobre a droga em sua forma sólida. A fim de avaliar o perfil cinético de absorção para esta substância no teste de Scott modificado, empregou-se as mesmas condições utilizadas para o estudo com a cocaína, inclusive com a mesma

concentração de 600 mg L^{-1} . Entretanto, nenhuma absorbância foi observada para esta concentração, o que indicou uma sensibilidade maior para a cocaína na reação do teste de Scott modificado. Então realizou-se uma nova medida para a lidocaína em concentração de 3000 mg L^{-1} , por aproximadamente 22 minutos, em intervalos de 1 minuto e em 25° C , como poder ser observado na Figura 11. Observou-se que, a essa concentração, a lidocaína apresenta um comportamento similar ao da cocaína, mas com valores inferiores de absorbância, mesmo para uma concentração que é 5 vezes maior que a da droga.

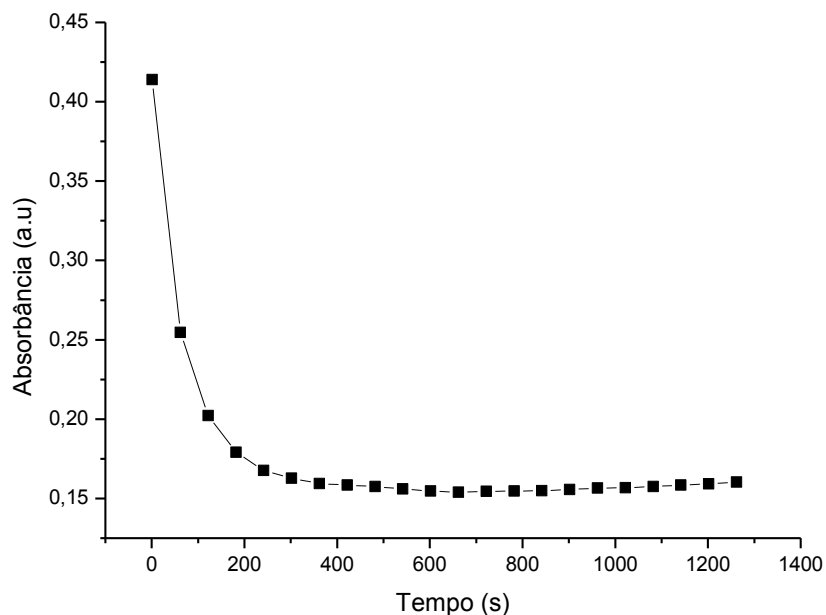


Figura 11. Medidas de absorbância realizadas em 630 nm para uma solução de lidocaína a 3000 mg L^{-1} empregando-se o teste de scott modificado.

Um estudo cinético da reação de cafeína com MBTH foi realizado com os seguintes parâmetros: a concentração de cafeína foi de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$, a aquisição do espectro ocorreu durante 18000 segundos, 5 horas, de 1 em 1 minuto a 25° C no comprimento de onda de 630 nm , o resultado pode ser observado na Figura 12.

Pode-se observar que a reação não apresenta um comportamento cinético comum, onde a absorbância aumenta até que a reação alcance o equilíbrio e, após isso, permanece constante. Entretanto, Shpigun et al. relatam em seu trabalho um comportamento cinético semelhante ao aqui observado para a reação. Dessa forma, exclui-se a possibilidade de haver algum erro na execução do estudo. ⁴⁴

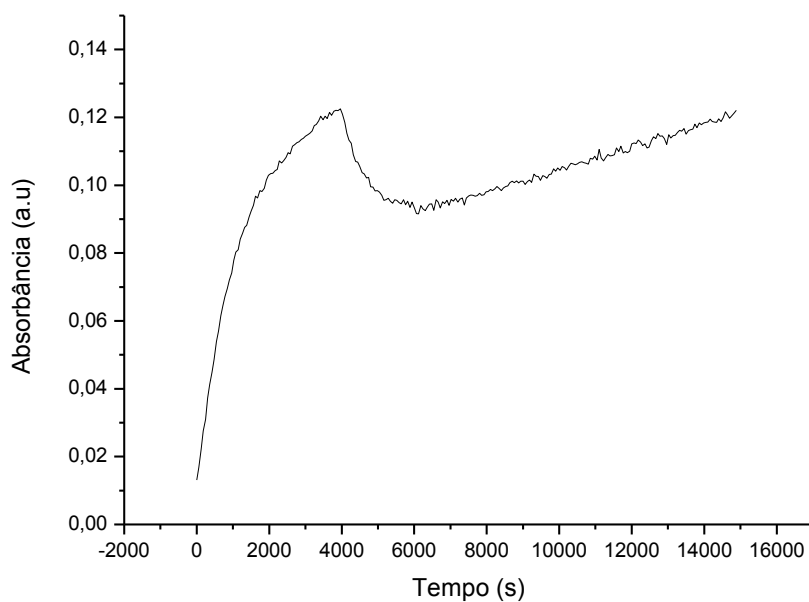


Figura 12. Medidas de absorbância realizadas em 630 nm para uma solução de cafeína a $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ empregando-se a reação de complexação da cafeína oxidada com MBTH.

Um estudo cinético substituindo a cafeína pela cocaína nesta reação também foi realizado utilizando os mesmos parâmetros anteriores. O gráfico obtido de Absorbância X Tempo pode ser observado na Figura 13. Neste caso, foi observado um comportamento mais próximo do comum, onde a absorbância aumenta até que a reação alcance o equilíbrio e, após isso, permanece constante.

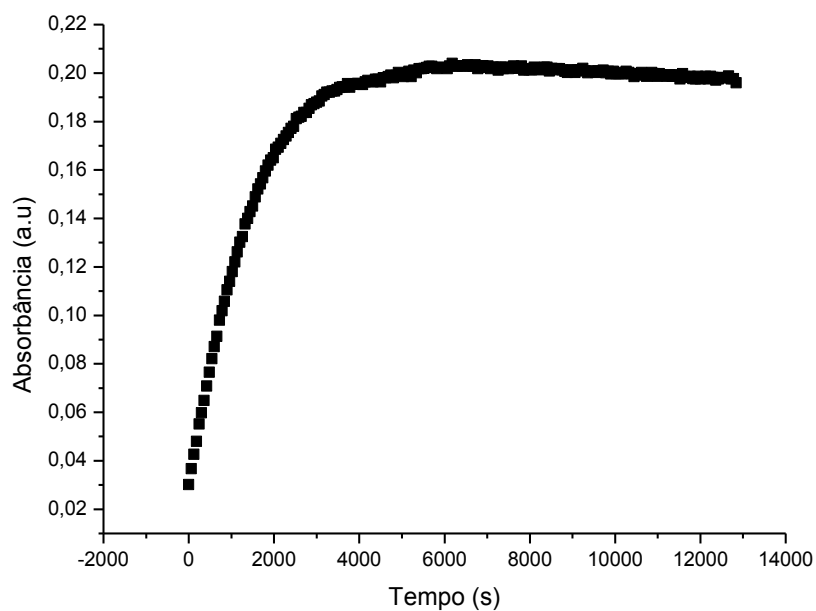


Figura 13. Medidas de absorbância realizadas em 630 nm para uma solução de cocaína a 0,15 mg L⁻¹ empregando-se a reação de complexação com MBTH.

4.2 Determinação colorimétrica de Cocaína

Como descrito anteriormente, a determinação de cocaína se deu por uma análise baseada no teste de Scott. A Figura 14 apresenta um esquema da reação que leva a formação do complexo de tiocianato de cobalto com duas moléculas de cocaína, de coloração azulada, cuja intensidade se relaciona com a concentração de cocaína.⁵¹

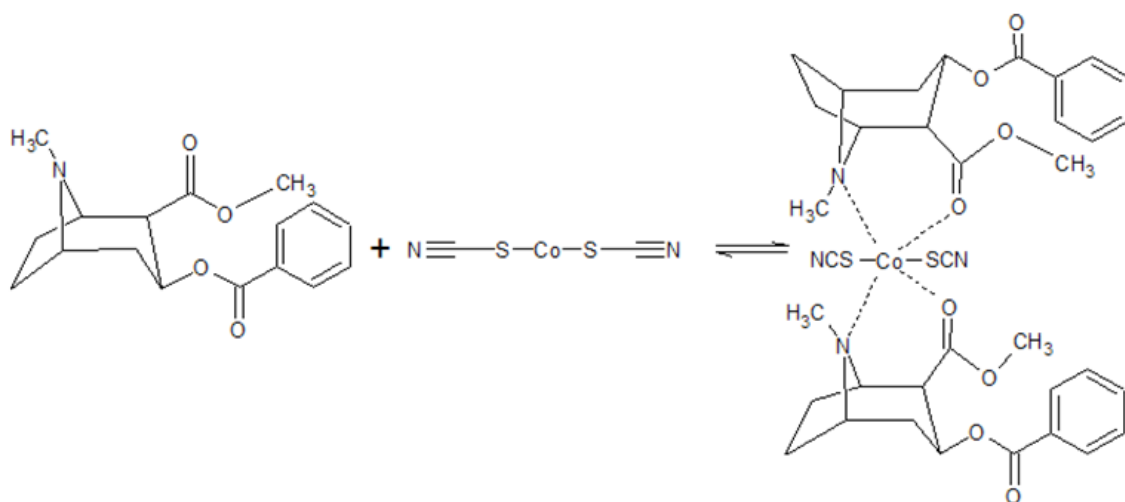


Figura 14. Esquema de reação para o teste de Scott.

Conforme apresentado na Figura 15 o espectro do complexo em solução de clorofórmio apresenta um máximo de absorção em 630 nm, comprimento de onda que corresponde ao vermelho e que justifica a escolha da componente R do sistema RGB para a realização das medidas.

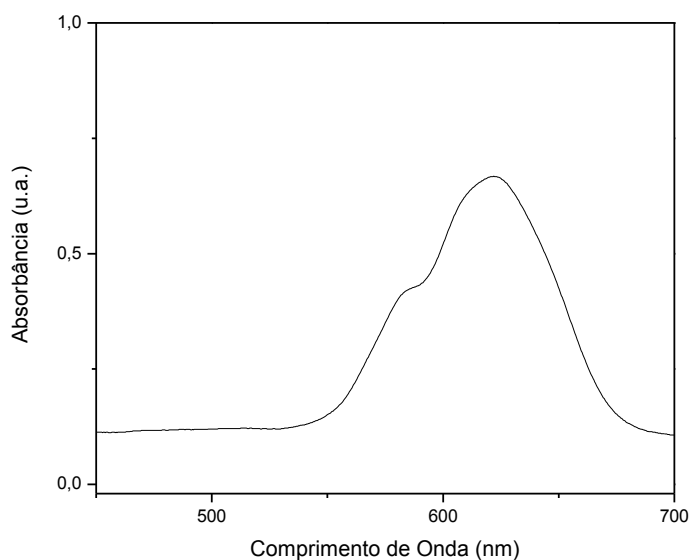


Figura 15. Espectro de absorção do complexo de tiocianato de cobalto e cocaína.

A variação da cor azul obtida para os padrões com 200, 400, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹ de cocaína, utilizados para a construção de uma curva analítica, é mostrada na Figura 16. Nota-se claramente o aumento da tonalidade da cor azul com o aumento da concentração o que permite a calibração baseada em imagens. Neste caso, utiliza-se como sinal analítico para as medidas a diferença entre o valor 255 (valor máximo de R no sistema RGB) e o valor medido da componente R (Red) da imagem para o padrão. Isto é necessário para que haja um aumento linear do sinal com aumento das concentrações, facilitando a interpretação dos sinais.

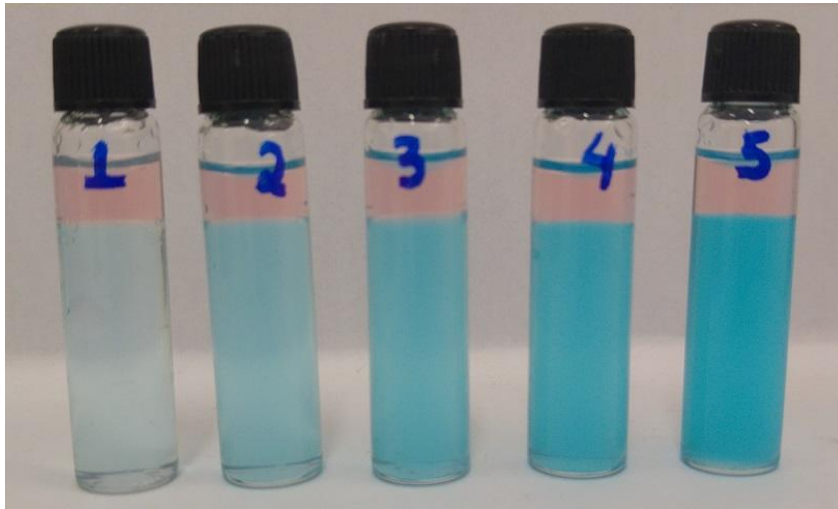


Figura 16. Variação da cor azul entre os padrões utilizados com faixa de concentração de 200 à 1000 mg L⁻¹.

Inicialmente foi avaliada uma faixa ampla de concentrações de forma a estabelecer a região linear de calibração. Observou-se que essa região está compreendida entre 200 à 1400 mg L⁻¹ da droga fornecendo um coeficiente de determinação $R^2 = 0,992$ ao se avaliar uma curva com 7 pontos. Além dessa faixa, o sistema de detecção parece saturar.

Para a determinação das concentrações de cocaína nas amostras sintéticas, o sistema foi calibrado utilizando-se apenas cinco padrões na faixa de concentração de 200 à 1000 mg L⁻¹. O número menor de padrões é justificado para facilitar as possíveis aplicações em campo da técnica. Desta calibração, obteve-se uma curva com a equação $y = 0,13541x + 64,9693$ e coeficiente de determinação $R^2 = 0,99811$.

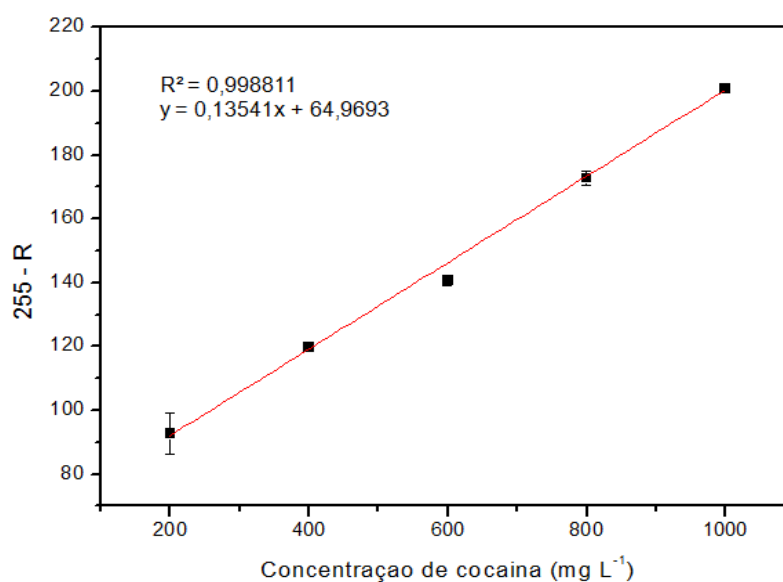


Figura 17. Curva de calibração para a faixa de concentração de 200 à 1000 mg L⁻¹.

O limite de detecção, que é a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança, foi calculado com base na seguinte equação:

$$y_{LD} = y_b + 3s_{y_b}$$

Onde, y_b é o intercepto em y obtido a partir da curva de calibração e s_{y_b} é o desvio padrão deste intercepto. Desta forma, obtém-se o que foi chamado de y_{LD} que representa o sinal que seria obtido no limite de detecção. Ao aplicar este y_{LD} na equação da curva de calibração, encontra-se x , que é a concentração referente a este limite e, portanto, o limite de detecção.⁵²

O limite de detecção obtido por meio deste cálculo foi de 49 mg L⁻¹. Ao levar em consideração o protocolo adotado para análise das misturas neste trabalho, este limite de detecção corresponderia a uma amostra com cerca de 5% de cocaína. Vale ressaltar que amostras tão pouco concentradas não são comuns em apreensões realizadas pela Polícia Federal, permitindo afirmar que este limite é bastante adequado.⁵³

Ao se comparar com dados reportados na literatura, observa-se que o limite apresentado por Tosato et al.¹⁵ é mais de vinte vezes maior que o aqui apresentado, uma vez que o grupo fez uso de cromatografia de camada delgada para a análise. Enquanto Grobério et al.⁴ apresentam um LOD, limite de detecção, de pouco mais que o dobro que o obtido neste trabalho, em termos de porcentagem, utilizando análise por espectroscopia na região do infravermelho e análise dos dados utilizando métodos quimiométricos. O grupo reportou um limite de detecção de 12 % de cocaína na amostra. da Silva et al.²⁹ reportam um método com LOD próximo ao calculado aqui, de 29,4 mg L⁻¹, utilizando um sistema de análise por injeção sequencial e medidas de absorvância na região visível do espectro.

A título de comparação, curvas analíticas nas mesmas faixas de concentração foram construídas com um espectrofotômetro comercial e com um fotômetro a base de LED descrito na seção 3.8. Conforme listado na Tabela 5, as curvas construídas a partir das medidas realizadas com os diferentes instrumentos apresentaram coeficientes de correlação lineares e limites de detecção semelhantes aos obtidos com o sistema proposto. Adicionalmente, as precisões das medidas com estes instrumentos foram estimadas com base nos coeficientes de variação (C.V.) determinados para 3 medidas do padrão de maior concentração (1000 mg L⁻¹). Os valores encontrados se aproximaram de 2% e um teste F ao nível de 95 % de confiança mostrou que os desvios aleatórios encontrados para as medidas com o *smartphone* e com o espectrofotômetro são estatisticamente semelhantes. Quando os desvios aleatórios encontrados para as medidas com o fotômetro de LED são comparados com os desvios do espectrofotômetro através do teste F, entretanto, a hipótese nula deve ser rejeitada e o método que utiliza o fotômetro de LED se mostrou significativamente mais preciso que o método de referência, o espectrofotômetro. Outra comparação pode ser realizada entre os desvios

encontrados para as medidas com o smartphone e o fotômetro de LED e, neste caso, os desvios são estatisticamente semelhantes.

Tabela 5. Comparação de algumas figuras de mérito entre os três métodos.

Figuras de Mérito	Smartphone	Espectrofotômetro	Fotômetro de LED
R²	0,99811	0,99754	0,9903
LOD (mg L⁻¹)	49	0,6	164
Precisão (C.V.)	1,10	2,2	0,6

4.2.1 Determinação de Cocaína em Amostras com 4 Constituintes

A exatidão do método proposto foi preliminarmente aferida a partir da determinação de cocaína nas amostras sintéticas contendo quatro constituintes entre adulterantes e diluentes e a própria cocaína, reportadas na seção 3.3.1. As concentrações determinadas para as amostras sintéticas estudadas juntamente com os valores de referência e os erros relativos são listadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração de referência e estimada em percentagem das amostras e erro.

Amostras	Concentração Ref. (%)	Concentração Estimada (%)	Erro %
Amostra 1	5	8,23	64,71
Amostra 2	85	91,53	7,69
Amostra 3	5	9,67	93,34
Amostra 4	45	66,46	47,70
Amostra 5	45	52,79	17,31
Amostra 6	25	32,82	31,30
Amostra 7	85	93,30	9,77
Amostra 8	30	32,35	7,83
Amostra 9	57,5	63,78	10,93
Amostra 10	30	33,56	11,85
Amostra 11	48,3	50,63	4,82
Amostra 12	48,3	55,96	15,86
Amostra 13	10	10,56	5,65
Amostra 14	10	10,28	2,86
Amostra 15	80	92,55	15,69
Amostra 16	45	53,07	17,94
Amostra 17	33,3	38,05	14,26
Amostra 18	27,5	30,23	9,94

De uma maneira geral, os erros relativos situaram-se abaixo de 20% para a maioria das amostras. Pode-se observar que os maiores erros, acima de 50%, foram obtidos para as amostras com menor teor de cocaína (amostras 1 e 3), ambas contendo 5% da droga, o que, segundo relatórios da polícia federal, são bastante incomuns de serem encontradas em apreensões. Outra observação importante é que, embora os erros relativos para essas amostras sejam elevados, os erros absolutos (diferenças entre os teores percentuais estimados e os de referência) foram de 3,23% e 4,27% para as mesmas amostras, o que corresponde a valores inferiores ao limite de detecção da técnica.

Além disso, experimentos adicionais revelaram uma tendência de amostras compostas por levamisol apresentarem erros mais altos que o esperado; o que coincide com o observado para as amostras 1 e 3, uma vez que essas apresentam o levamisol como constituinte majoritário, e para as amostras 4 e 6, que apresentam uma concentração de levamisol alta, porém não majoritária. Com base nisso, testes de interferência do levamisol no teste de Scott foram realizados. Foi possível concluir que, para a forma com que o teste de Scott foi conduzido neste trabalho, o levamisol apresentou-se como um interferente na reação levando a resultados falsos positivos. Entretanto, os resultados positivos só começam a aparecer após uma determinada concentração, que foi determinada como aproximadamente 300 mg L^{-1} , o que corresponderia à uma amostra com teor de 6 % desta droga. A recorrência de resultados falsos positivos nos testes presuntivos colorimétricos para análise de drogas é um grave problema enfrentado pelos usuários dos testes e amplamente discutido na literatura. Entretanto, uma pesquisa bibliográfica pode revelar que, até então, nenhum trabalho reportou este medicamento como um fornecedor de resultados falsos positivos para o teste de Scott. Há trabalhos que, inclusive, o citam como um conhecido não interferente para a reação.²⁸

Outra constatação importante deste estudo foi que a lidocaína, uma droga que sabidamente gera um resultado falso positivo no teste de Scott realizado da forma convencional não proporcionou erros muito discrepantes com relação às amostras que não continham este adulterante.¹⁹ As amostras de 13 à 18, que exibem lidocaína em sua composição, apresentaram erros relativos da mesma ordem de grandeza dos demais, sem apresentar uma variação significativa. Observa-se na Tabela 4 que, mesmo para uma amostra contendo 75% de lidocaína (amostra 14), concentração majoritária, a exatidão para a determinação de cocaína foi pouco afetada. Com o objetivo de verificar a interferência de lidocaína na determinação proposta foram realizados testes com diferentes concentrações de lidocaína, sendo observado um resultado visualmente positivo para concentrações maiores que aproximadamente 3800 mg L^{-1} do fármaco. De fato, conforme mostra a Figura 18, a intensidade da cor azul observada para o teste de Scott numa concentração bastante elevada de lidocaína, 5000 mg L^{-1} , ainda é visualmente menor que aquela apresentada para um padrão de cocaína utilizado de 245 mg L^{-1} , o que mostra que a reação é mais sensível para a cocaína que para a lidocaína e que a determinação de cocaína através do método proposto pode ser conduzida sem interferência desta substância em amostras mais puras da droga.

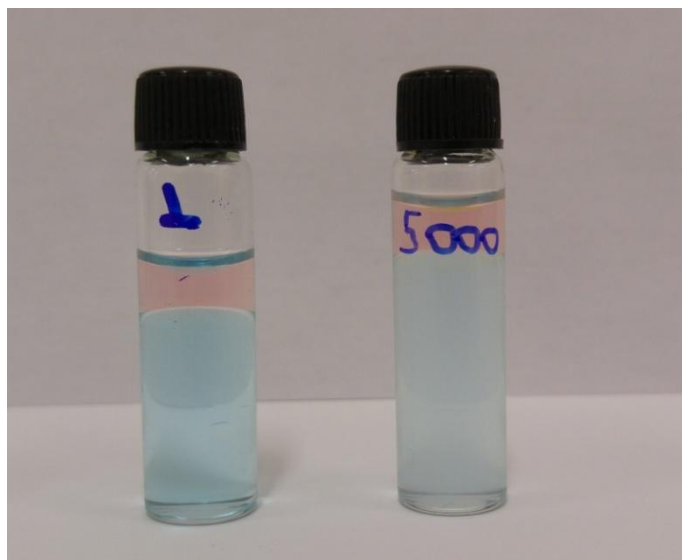


Figura 18. Padrão de cocaína com 245 mg L^{-1} e padrão de lidocaína com 5000 mg L^{-1} .

Para as demais amostras, foi observado um comportamento aleatório da exatidão, o que pode estar relacionado com a própria imprecisão das medidas colorimétricas, mas também com a representatividade limitada da amostragem. Deve-se ressaltar que, para algumas amostras, apenas 5,36 mg foram utilizados para a preparação da solução estoque da amostra, de forma que, a homogeneização pouco efetiva do sólido poderia comprometer os resultados.

4.2.2 Determinação de Cocaína em Amostras Sintéticas com 3 Constituintes

A exatidão do método proposto foi também avaliada para amostras sintéticas contendo apenas adulterantes, sem diluentes, e com maiores teores de cocaína. De fato, segundo relatórios da Polícia Federal, amostras apreendidas com baixos teores da droga são incomuns, de modo que as amostras analisadas neste estudo se assemelham mais com aquelas que são usualmente apreendidas com relação aos teores de cocaína.

Os resultados obtidos para o primeiro conjunto de amostras, contendo cocaína cloridrato, levamisol e cafeína são apresentados na Tabela 7. Conforme apresentado, os erros relativos variaram, em módulo, de 0,04 à 12,88, sendo que a maioria das amostras, sete delas, apresentaram erros abaixo de 9%, indicando uma melhora na exatidão com relação às medidas realizadas para as amostras com quatro constituintes descritas na seção 4.2.1. Deve-se destacar ainda que, mesmo para a amostra que apresentou o maior erro relativo (amostra 8), a diferença em valores absolutos, entre o teor de referência e o teor estimado foi de 9 %, um valor que se aproxima do limite de detecção do método considerando-se o protocolo aplicado. Apesar disso, observa-se também que, com exceção da amostra 1, para todas as

outras amostras foram observados erros relativos menores do que zero, ou seja, a maioria dos valores estimados são menores que os valores de referência, o que pode indicar a presença de erros sistemáticos (determinados), para os quais não foi possível encontrar as origens ou relação com algum procedimento, material ou reagente. Observou-se, porém que a amostra 1 apresenta a maior concentração de levamisol em relação às demais, o que pode ter ocasionado, devido à interação do adulterante, um valor estimado maior que o valor de referência. Os demais erros, todavia, se tornam maiores ou menores independentemente da composição da amostra analisada, o que indica que os adulterantes adicionados não devem estar relacionados com esta constatação.

Tabela 7. Determinação de cocaína para amostras contendo cocaína cloridrato, levamisol e cafeína com diferentes teores relacionados com as amostras apresentadas na Tabela 4 da seção 3.3.2.

Amostra	Conc. Referência (%)	Conc. Estimada ± Desvio	Erro Relativo
		Padrão (%)	
1	74,04	82,11 ± 1,70	10,9
2	89,91	82,24 ± 3,05	- 8,53
3	74,17	73,17 ± 3,47	- 1,35
4	81,96	81,92 ± 2,01	- 0,04
5	77,18	70,39 ± 0,02	- 8,80
6	81,25	75,14 ± 1,35	- 8,64
7	83,92	78,14 ± 3,06	- 6,89
8	85,08	74,12 ± 2,04	- 12,88
9	78,67	71,14 ± 2,15	- 9,57
10	81,64	77,93 ± 3,54	- 4,54

Ao comparar estes resultados com os de técnicas espectroscópicas, como no trabalho de da Silva et al., onde foi realizada a quantificação de cocaína baseado no teste de Scott e medida com UV-Vis, observa-se que os resultados também apresentam uma certa proximidade. da Silva et al. analisaram 5 amostras e o maior erro encontrado foi de 7,70 %, quando comparado com a técnica de referência CG – MS, cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas.²⁹

Os resultados obtidos para o segundo conjunto de amostras, contendo cocaína base, lidocaína e procaína são listados na Tabela 8. Como pode ser observado, também para este conjunto de amostras foram obtidos resultados com tendência para valores abaixo dos valores de referencia, não sendo determinadas as fontes para este comportamento. Pode-se verificar, entretanto, que a amplitude de variação destes erros foi menor que aquela observada para o primeiro conjunto de amostras, sendo os erros mais concentrados, entre 12 e 16 %.

Tabela 8. Determinação de cocaína para amostras contendo cocaína base livre, lidocaína e procaína com diferentes teores relacionados com as amostras apresentadas na Tabela 4 da seção 3.3.2.

Amostra	Conc. Referência (%)	Conc. Estimada \pm Desvio		Erro Relativo
		Padrão (%)		
1	74,95	65,51 \pm 1,77		- 12,69
2	89,32	78,52 \pm 0,44		- 12,09
3	74,67	62,47 \pm 2,49		- 16,34
4	83,47	72,90 \pm 2,33		- 12,66
5	74,29	63,37 \pm 1,19		- 14,70
6	82,57	69,45 \pm 5,01		- 15,89
7	77,46	65,97 \pm 0,77		- 14,83
8	83,68	67,24 \pm 0,79		- 19,65
9	77,64	68,13 \pm 0,00		- 12,25
10	80,78	67,71 \pm 1,63		- 16,30

As mesmas amostras foram analisadas, a título de comparação, em outros dois equipamentos. Um deles um espectrofotômetro comercial da marca OceanOptics com fonte de tungstênio e detector de arranjo de diodos com uma adaptação para acomodar os frascos de vidro utilizados como cubeta. O outro, um fotômetro construído pelo grupo, cuja fonte de radiação é um LED de cor vermelha que emite em 630 nm, e um detector fotoresistor, também chamado de LDR – Light Dependent Resistor com circuito conversor corrente/voltagem.

O espectrofotômetro, como método convencionalmente utilizado para análises colorimétricas foi escolhido como método de referência nesta comparação. Enquanto isso, o fotômetro de LED como equipamento *lab-made* é reportado aqui como uma técnica alternativa dada a sua simplicidade e possibilidade de portabilidade.

Os erros relativos e seus respectivos desvios padrão para as três técnicas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Erros relativos e desvios padrão para as amostras analisadas pelos três métodos.

Amostras	Smartphone	Espectrofotômetro	Fotômetro de LED
1	- 12,69 ± 1,77	7,31 ± 3,30	- 1,39 ± 2,21
2	- 12,09 ± 0,44	- 5,62 ± 5,53	- 8,05 ± 3,94
3	- 16,34 ± 2,49	- 8,14 ± 1,49	- 0,66 ± 1,80
4	- 12,66 ± 2,33	- 13,42 ± 1,59	- 5,57 ± 3,87
5	- 14,70 ± 1,19	- 7,39 ± 1,13	- 5,29 ± 1,05
6	- 15,89 ± 5,01	- 7,63 ± 0,42	- 10,91 ± 1,62
7	- 14,83 ± 0,77	- 14,33 ± 1,41	- 3,63 ± 1,28
8	- 19,65 ± 0,79	- 12,92 ± 1,01	- 8,95 ± 2,11
9	- 12,25 ± 0,00	- 3,01 ± 0,70	- 2,21 ± 3,41
10	- 16,30 ± 1,63	- 27,36 ± 2,71	- 5,42 ± 1,91

Pode-se observar que os maiores erros estão relacionados às medidas realizadas com o *smartphone*, mas que todos os instrumentos apresentaram um viés de resposta para valores abaixo do esperado, indicando que a possível existência de erros sistemáticos não deve ser atribuída a forma de medida utilizada.

Uma avaliação estatística dos dados foi realizada por meio de um teste de hipóteses. Para se comparar médias de medidas para a mesma amostra entre dois métodos, utiliza-se a avaliação aos pares, chamado de teste t pareado. Neste teste, o parâmetro t é calculado seguindo a seguinte equação

$$t = \frac{\overline{d} - \Delta_0}{\frac{s_d}{\sqrt{N}}}$$

Onde, d é a diferença média entre os resultados, Δ_0 será igual a 0 para se testar a hipótese nula, de que não há diferença significativa entre os resultados, s_d é o desvio padrão da diferença nas médias e N o número de amostras, neste caso.

Realizou-se o cálculo do t utilizando esta equação para dois conjuntos de dados. O primeiro, o par de dados obtidos pelo Smartphone e pelo Espectrofotômetro, e o segundo, o par de dados obtidos pelo Smartphone e pelo Fotômetro, de forma a colocar em comparação sempre o método proposto.

Após o cálculo de t, este valor é comparado com $t_{\text{crít}}$, um valor tabelado, levando em consideração o número de graus de liberdade, $N - 1$, e o nível de confiança desejado. Considerando, neste caso, portanto, os graus de liberdade como 9 e o nível de confiança como 95 %, tem-se que, para a comparação entre as medidas realizadas com o Smartphone e com o Espectrofotômetro comercial, o t calculado é maior que o $t_{\text{crít}}$, portanto há diferença significativa entre os resultados dos dois métodos. Pode-se concluir desta forma que as diferenças numéricas podem ser advindas de erros sistemáticos. Com base neste resultado, outro teste t

foi realizado, desta vez, entretanto, comparando amostra por amostra a fim de se identificar se o erro está no método ou em algumas amostras específicas.

O teste t para diferenças nas médias foi utilizado. Neste caso, a fórmula utilizada para o cálculo de t leva em conta apenas os pares de amostras, seguindo a equação

$$t = \frac{x_1 - x_2}{s_{comb} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}}$$

Onde, X_1 e X_2 são as médias a serem comparadas dos dois métodos, N_1 e N_2 as réplicas e s_{comb} , chamado de desvio padrão combinado, é uma média ponderada das estimativas individuais.

Os resultados da comparação dos valores de t calculados com o valor de t_{crit} tabelado para cada amostra, levando em consideração o nível de confiança de 95 % e grau de liberdade igual a $N_1 + N_2 - 2$, ou seja, 4, encontram-se na tabela 10.

Tabela 10. Resultados para o teste t pareado entre os dados obtidos por *smartphone* e por meio do espectrofotômetro comercial.

Amostra	Varição Significativa?
1	Sim
2	Não
3	Sim
4	Não
5	Sim
6	Sim
7	Não
8	Sim
9	Sim
10	Sim

Pode-se observar destes resultados que nem todas as amostras apresentaram variação significativa frente ao método utilizado como referência. As amostras 2, 4 e 7 apresentaram valores de t calculado menores que o valores de t_{crit} tabelados para o limite de confiança desejado. Para estas amostras, portanto, aceita-se a hipótese nula que declara que as duas médias são idênticas e que qualquer diferença é resultado de erros aleatórios. Dessa forma, pode-se dizer que não há evidência de erro sistemático inerente ao método utilizado, uma vez que, para essa conclusão, seria necessário que todas as amostras apresentassem resultados de forma a se rejeitar a hipótese nula.

Da mesma forma, tem-se que, para a comparação entre as medidas realizadas com o Smartphone e com o fotômetro de LED utilizando o teste t pareado, o t calculado é maior que o

t_{crit} tabelado, portanto pode-se afirmar que há diferenças significativas entre os dois métodos. Com base neste resultado, o segundo teste t foi realizado comparando amostra por amostra.

Os resultados da comparação dos valores de t calculados com o valor de t_{crit} tabelado para cada amostra, levando em consideração o nível de confiança de 95 % e grau de liberdade igual a 4, encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Resultados para o teste t pareado entre os dados obtidos por *smartphone* e por meio do fotômetro de LED.

Amostra	Varição Significativa?
1	Sim
2	Não
3	Sim
4	Não
5	Sim
6	Não
7	Sim
8	Sim
9	Sim
10	Sim

Novamente, pode-se observar que nem todas as amostras apresentaram resultados de t calculado maiores que o valor de t tabelado para o nível de confiança desejado. Para as amostras 2, 4 e 6, pode-se afirmar, que a hipótese nula deve ser aceita e que os resultados não apresentam variação significativa quando comparados. Essas amostras são as mais concentradas em relação a cocaína do conjunto, o que pode indicar que, para amostras mais concentradas, os erros se tornam mais aleatórios e a possibilidade de erros sistemáticos é diminuída.

4.3 Determinação de Procaína

A determinação de procaína se deu pela reação da mesma com o ácido cromotrópico, gerando uma solução de coloração avermelhada. Conforme apresentando na Figura 19, a reação consiste na diazotização da procaína seguida de seu acoplamento com o agente colorimétrico.⁴¹

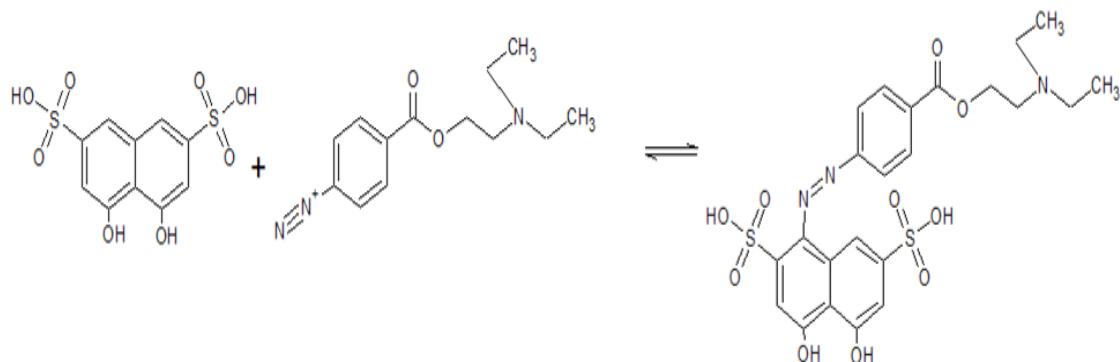


Figura 19. Esquema de reação entre a procaína e o ácido cromotrópico.

O espectro obtido para a solução aquosa do produto da reação de procaína é apresentado na Figura 20, onde se observa um máximo de absorvância em 525 nm (região referente à cor azul esverdeada) o que justifica a utilização da componente G (verde) do sistema RGB como variável sensível as concentrações do analito.

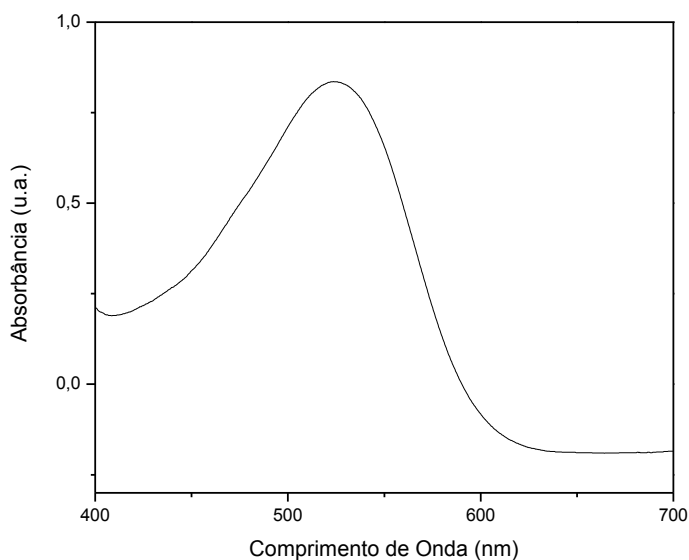


Figura 20. Espectro de absorção do complexo de procaína e ácido cromotrópico.

A Figura 21 apresenta a variação da cor vermelha obtida para os dez padrões utilizados para a construção de uma curva analítica nas concentrações de 1 à 90 mg L⁻¹. Nota-se claramente o aumento da tonalidade da cor vermelha com o aumento da concentração da substância, que permite o uso da colorimetria digital para a determinação.

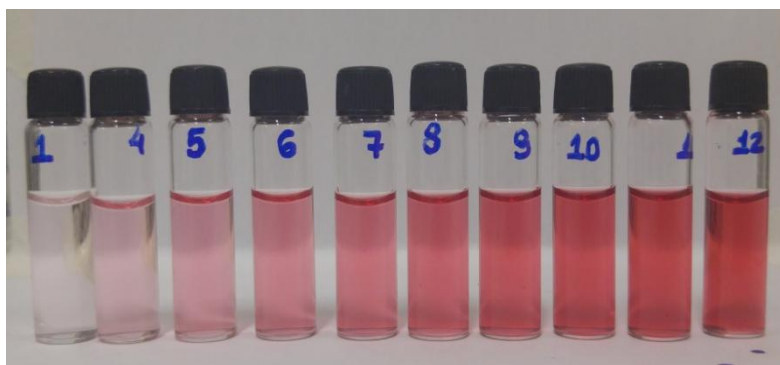


Figura 21. Variação de cor para os dez padrões utilizados na construção da curva analítica de concentrações 1 à 90 mg L⁻¹, respectivamente.

Deve-se ressaltar que esta reação apresenta como interferente a benzocaína. Portanto, para análises de amostras que contenham este medicamento, deve-se realizar um pré-tratamento de amostra para evitar que, a partir de uma possível interferência, a exatidão do método seja afetada.

Inicialmente, uma faixa mais ampla de concentrações, 2,5 à 118 mg L⁻¹, foi avaliada de forma a estabelecer a região linear de calibração. Pode-se observar que a região linear está compreendida entre 2,5 à 71 mg L⁻¹ do fármaco, fornecendo um coeficiente de correlação $r=0,986$ para 7 pontos avaliados empregando-se como sinal a variação da componente G (Green) da imagem. Para além dessa faixa, o comportamento deixa de ser linear o que não permitiria uma boa calibração com o aplicativo PhotoMetrix. Observou-se, entretanto, que, aplicando-se a operação matemática logarítmica nos valores de G obtidos, é possível obter um comportamento linear para faixas maiores de concentrações. Dessa forma, a curva analítica será de $\log(G)$ em função da concentração. Fazendo desta forma, de fato, uma nova curva analítica foi construída com faixa de concentração de 1 à 90 mg L⁻¹ obtendo-se a equação linear $\log(G) = -0,008x + 2,2705$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,99607$, como pode ser observado na Figura 22. Considerando que a maior faixa linear proporcionaria uma maior versatilidade ao método, por minimizar a necessidade de diluições, por exemplo, optou-se por utilizar esta curva nos estudos realizados com o segundo grupo de amostras ternárias que continham procaína em sua composição.

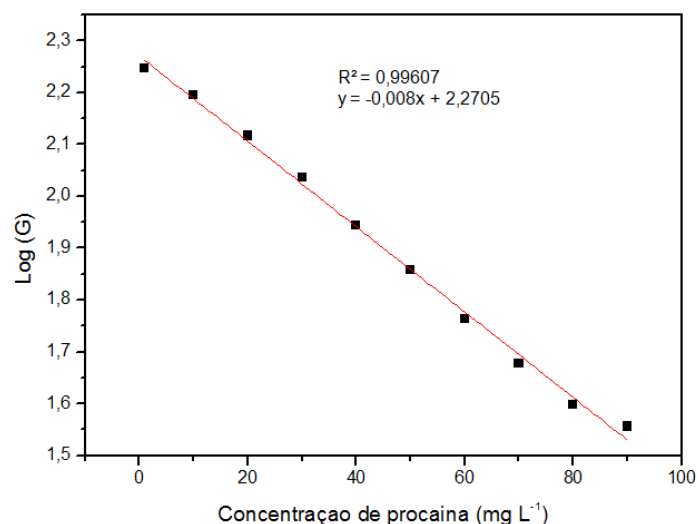


Figura 22. Curva de calibração para a determinação de procaína na faixa de concentração de 1 à 90 mg L⁻¹.

O limite de detecção calculado da mesma forma como descrito na seção 4.2 para a determinação de cocaína, foi igual à 2,47 mg L⁻¹ que, considerando o protocolo adotado para a análise deste adulterante, representa uma amostra com menos de 1 % de procaína em sua composição. Comparando-se esses resultados com aqueles obtidos com um método proposto por da Silva et al., em que se utiliza a imobilização do reagente em um sistema analítico de papel e leituras de RGB também por *smartphone*, percebe-se que sua faixa linear e limite de detecção foram menores que os encontrados neste trabalho.⁴¹ Possivelmente, a imobilização do reagente no papel promove uma concentração da cor em um pequeno ponto o que faz com que o sistema apresente maior sensibilidade, mas apresenta uma limitação à concentrações mais baixas. Entretanto, deve-se ressaltar que ambos os limites de detecção são convenientes para a determinação proposta haja vista que os teores de adulterantes raramente são tão baixos quanto um 1%.

A título de comparação, curvas analíticas de 1 à 90 mg L⁻¹ foram construídas com um espectrofotômetro comercial e com um fotômetro a base de LED descrito na seção 3.8, utilizando-se para isto um LED verde (525 nm) para as medidas. Conforme listado na Tabela 12, as curvas construídas a partir das medidas realizadas com os diferentes instrumentos apresentaram coeficientes de correlação lineares e limites de detecção semelhantes aos obtidos com o sistema proposto. Adicionalmente, as precisões das medidas com estes instrumentos foram estimadas com base nos coeficientes de variação determinados para 3 medidas do padrão de maior concentração (90 mg L⁻¹). Os valores encontrados se aproximaram de 2 % e um teste F ao nível de 95 % de confiança mostrou que os desvios aleatórios encontrados para as medidas são estatisticamente semelhantes.

Tabela 12. Comparação de algumas figuras de mérito entre os três métodos.

Figuras de Mérito	Smartphone	Espectrofotômetro	Fotômetro de LED
R ²	0,99607	0,98569	0,9958
LOD (mg L ⁻¹)	2,46	7,58	2,86
Precisão (C.V.)	1,46	0,20	3,26

4.3.1 Determinação de Procaína em Amostras com 3 Constituintes

Para avaliar a exatidão do método proposto, realizou-se a determinação de procaína nas amostras sintéticas contendo cocaína base, lidocaína e procaína com diferentes teores, conforme descrito na seção 3.3.2. Os teores encontrados e os valores de referência, assim como os erros relativos são listados na Tabela 13.

Tabela 13. Determinação de procaína para amostras contendo cocaína base livre, lidocaína e procaína com diferentes teores relacionados com as amostras apresentadas na Tabela 4 da seção 3.3.2.

Amostras	Conc. Referência (%)	Conc. Estimada ± Desvio Padrão (%)	Erro Relativo
1	20,02	17,07 ± 0,30	- 14,73
2	5,29	6,32 ± 0,30	19,47
3	5,30	4,84 ± 0,42	- 8,68
4	11,54	9,90 ± 0,22	- 14,21
5	13,10	11,41 ± 0,17	- 12,90
6	5,39	4,94 ± 0,28	- 8,35
7	14,80	11,48 ± 1,28	- 22,43
8	8,31	7,32 ± 0,28	- 11,91
9	8,08	7,06 ± 0,35	- 12,62
10	9,61	7,53 ± 0,26	-21,64

Como observado, os erros relativos se situaram entre 8 e 20% com tendência para valores abaixo dos valores de referência podendo indicar a presença de erros sistemáticos, os quais não foram diagnosticados. É importante observar, entretanto, que as diferenças absolutas entre os valores corresponderam a cerca de 1% em teor para a maioria das amostras, valor que se compara ao limite de detecção do método proposto. Pode-se afirmar então, que, embora o método não apresente uma elevada exatidão, o mesmo pode ser aplicado para avaliação preliminar da concentração de procaína nas drogas. Pode-se observar também que, comparando-se os erros relativos obtidos com os teores de procaína de

referencia, não são observadas correlações como a de aumento de erro com a diminuição dos teores, o que ocorreu de forma relativamente aleatória.

As mesmas amostras foram analisadas com o espectrofotômetro comercial e com o fotômetro de LED *lab-made*. Os resultados obtidos em termos dos erros relativos para cada uma das técnicas são apresentados na Tabela 14. De maneira geral, os erros para as determinações com o espectrofotômetro foram menores que aqueles obtidos o smartphone ou com o fotômetro de LED. Além disso, os erros com o espectrofotômetro apresentaram uma variação mais aleatória com erros positivos e negativos mais distribuídos entre as amostras estudadas. Esse resultado pode indicar que os erros sistemáticos estão relacionados ao procedimento de medida realizado com o *smartphone*, que ainda não foi detectado. Vale reportar que as medidas com todos os instrumentos foram realizadas com as mesmas soluções e diretamente nos frascos, sem o uso de cubetas, de forma que adaptações tiveram que ser realizadas para permitir as leituras com o fotômetro e com o espectrofotômetro.

Tabela 14. Erros relativos e desvios padrão para as amostras analisadas pelos três métodos.

Amostras	Smartphone	Espectrofotômetro	Fotômetro de LED
1	- 14,73 ± 0,30	- 4,24 ± 0,08	32,92 ± 1,18
2	19,47 ± 0,30	24,00 ± 0,05	38,00 ± 0,66
3	- 8,68 ± 0,42	1,13 ± 0,28	- 2,07 ± 0,88
4	- 14,21 ± 0,22	- 4,33 ± 0,09	5,98 ± 0,55
5	- 12,90 ± 0,17	3,82 ± 0,09	17,71 ± 0,09
6	- 8,35 ± 0,28	8,16 ± 0,08	23,19 ± 0,23
7	- 22,43 ± 1,28	- 7,84 ± 0,18	18,38 ± 0,03
8	- 11,91 ± 0,28	3,73 ± 0,07	13,24 ± 0,86
9	- 12,62 ± 0,35	- 11,88 ± 0,10	23,02 ± 0,15
10	-21,64 ± 0,26	- 2,39 ± 0,35	1,46 ± 0,51

O teste t pareado, assim como foi realizado na seção anterior, foi utilizado para analisar estatisticamente os resultados obtidos. Para a comparação entre as medidas realizadas com o smartphone e com o espectrofotômetro comercial, utilizado como técnica de referência, pode-se observar que o valor obtido de t é menor que o valor de t_{crit} tabelado para o nível de confiança de 95 % e grau de liberdade igual a 9. Desta forma, aceita-se a hipótese nula que diz que há igualdade entre os resultados e que, portanto, as diferenças numéricas são frutos de erros aleatórios inevitáveis e não de erros sistemáticos. Portanto, não houve a necessidade de aplicar o teste t para diferenças nas médias, que compara amostra por amostra.

Para a comparação entre as medidas realizadas com o smartphone e com o fotômetro de LED, o resultado obtido a partir do teste t pareado revelou que o resultado de t calculado é maior que o valor de t_{crit} tabelado para o nível de confiança de 95 % e grau de liberdade igual a

9. Portanto, pode-se julgar as diferenças numéricas como resultado de erros sistemáticos. A fim de se identificar se os erros sistemáticos são advindos do método, realizou-se a comparação de amostra por amostra com o teste t para diferenças nas médias.

Os resultados da comparação dos valores de t calculados com o valor de t_{crit} tabelado para cada amostra, levando em consideração o nível de confiança de 95 % e grau de liberdade igual a $N_1 + N_2 - 2$, ou seja, 4, encontram-se na tabela 15.

Tabela 15. Resultados para o teste t pareado entre os dados obtidos por *smartphone* e por meio do fotômetro de LED.

Amostra	Varição Significativa?
1	Sim
2	Sim
3	Não
4	Sim
5	Sim
6	Sim
7	Sim
8	Sim
9	Sim
10	Sim

Pode-se observar que apenas para a amostra 3 a hipótese nula, de que não há diferença significativa entre os métodos, é aceita.

4.4 Testes Preliminares para Determinação de Levamisol

Para a determinação de levamisol, utilizou-se a reação do fármaco com alaranjado de metila em meio ácido e posterior extração do complexo obtido com clorofórmio. A solução resultante apresenta uma coloração amarelada, decorrente da reação química em meio ácido representada na Figura 23.

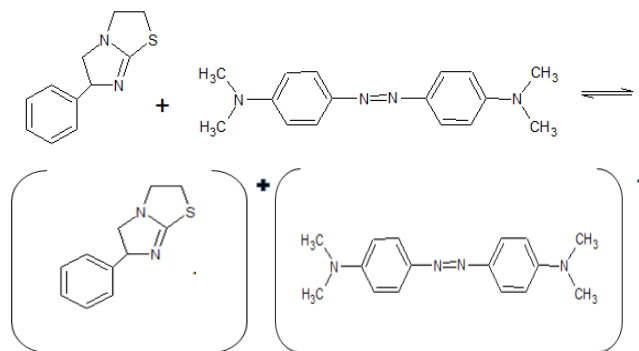


Figura 23. Esquema de reação entre o levamisol e alaranjado de metila.

O espectro obtido para a fase orgânica com o produto da reação é apresentado na Figura 24, que mostra um máximo de absorvidade em 425 nm (correspondente a cor azul do espectro visível), justificando a escolha da componente B do sistema RGB para a realização das medidas por colorimetria digital.

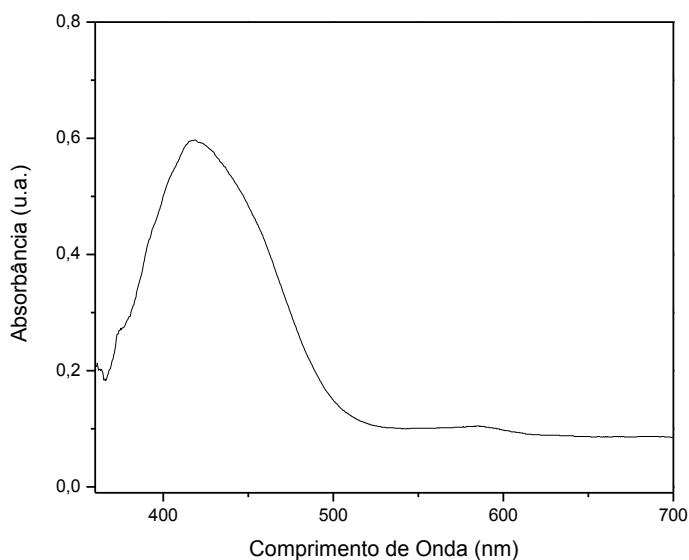


Figura 24. Espectro de absorção do complexo formado através da reação entre o levamisol e alaranjado de metila.

Um evidente aumento da coloração amarela associado ao aumento da concentração pode ser observado na Figura 25, o que possibilita a aplicação das medidas colorimétricas. Inicialmente um estudo a cerca da linearidade da curva de calibração foi realizado. Pode-se observar que a região linear está compreendida entre 2,9 e 27 mg L⁻¹ da droga fornecendo um coeficiente de determinação R² = 0,988 para os 9 pontos avaliados empregando-se como sinal a variação da componente B (Blue) da imagem. Observa-se que acima dessa concentração, ocorre a perda de linearidade.

Para a análise das amostras, uma curva de calibração variando de 3 à 27 mg L⁻¹ foi construída. Obteve-se uma equação $y = 2,50422x + 76,30215$ e um coeficiente de determinação $R^2 = 0,99663$, como pode ser visto na Figura 26.

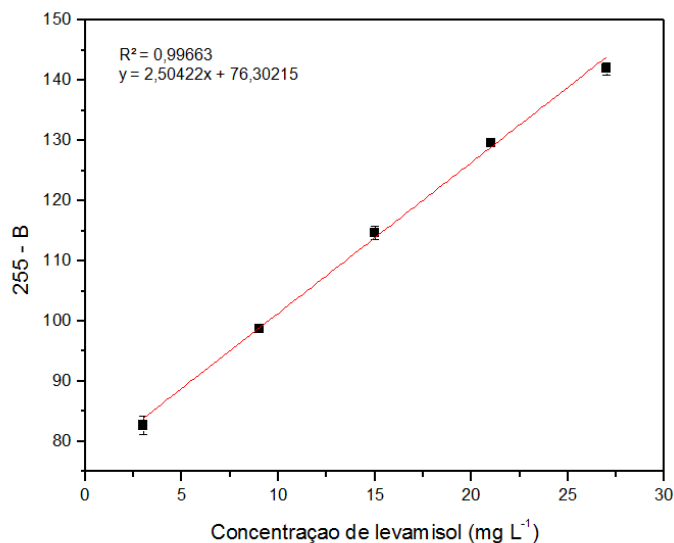


Figura 26. Curva de calibração para o levamisol na faixa de concentração de 3 à 27 mg L⁻¹.

O limite de detecção calculado como descrito anteriormente, foi igual à 1,51 mg L⁻¹ que, considerando o protocolo adotado para a análise deste adulterante, representa uma amostra com aproximadamente 6 % de levamisol em sua composição.

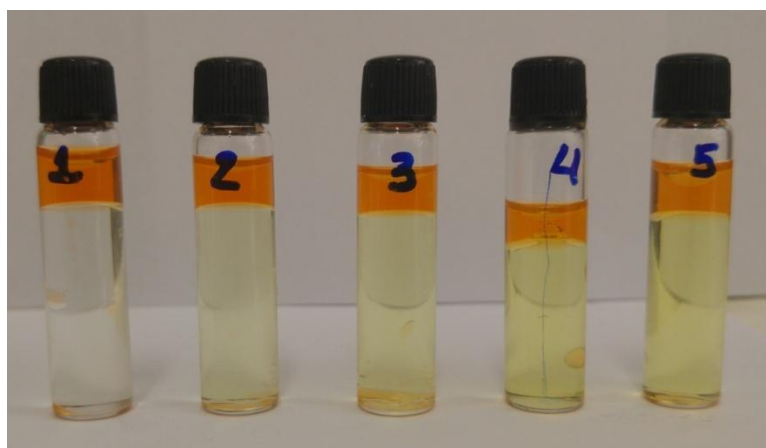


Figura 25. Variação de cor para os quatro padrões utilizados na construção da curva analítica de concentrações 2,9 à 26 mg L⁻¹, respectivamente.

Testes preliminares foram realizados utilizando as amostras 2, 4, 5 e 6, estudadas na seção 3.3.1, para determinação de levamisol. Entretanto, a determinação das concentrações de levamisol nas amostras levou a resultados bastante discrepantes em relação ao valor de

referência. Acreditava-se que o erro poderia estar no fato de não haver disponível, no laboratório de pesquisa, um reagente padrão de cloridrato de levamisol, e a extração do fármaco utilizado para o preparo do padrão poderia estar sendo ineficiente. Com essa consideração, como descrito anteriormente, uma nova metodologia foi adotada para contornar este problema: 15 comprimidos do medicamento Ascaridil, contendo 150 mg de levamisol por comprimido, foram pesados individualmente e sua massa média calculada. Considerando que cada um deles continha 150 mg do princípio ativo, calculou-se a porcentagem média de levamisol nos comprimidos que foi de 47,9 %.

Com base nesta proporção, não se extraiu mais o medicamento por meio de filtração, calculava-se a massa necessária a se pesar para que esta contivesse a massa requerida do princípio ativo. Dessa forma, o erro inerente à extração do fármaco foi descartado.

Utilizando esta metodologia, analisou-se o primeiro grupo de as amostras com três constituintes descrita na seção 3.3.2, contendo cocaína, levamisol e cafeína. Entretanto, ao se analisar as amostras seguindo o protocolo adotado para a reação de determinação deste adulterante, os erros encontrados se mostraram bastante elevados. Erros superiores à 100 %, chegando até mesmo a 145 %. Esta observação levantou a questão de uma possível interferência da cocaína na reação para determinação de levamisol. Em experimentos posteriores pode-se confirmar esta interferência e concluiu-se que, para o tipo de determinação proposto neste trabalho, esta reação não pode ser utilizada. Levando em consideração sua alta sensibilidade e elevados coeficientes de quantificação para as curvas analíticas construídas, esta reação se mostrou, todavia, adequada para determinações de levamisol em matrizes diferentes da proposta.

De fato, uma proposta que vem sendo estudada por alguns grupos de pesquisa para permitir a determinação do fármaco em amostras de cocaína é a de promover a separação dos constituintes da droga por cromatografia em camada delgada e realizar a detecção digital diretamente sobre a placa cromatográfica revelada.^{15,27} Nosso grupo de pesquisa tem iniciado alguns trabalhos para permitir esta separação em cromatografia em papel e escaneamento da corrida cromatográfica com um espectrofotômetro equipado com fibras ópticas.

4.5 Testes Preliminares para Determinação de Cafeína

A determinação de cafeína se deu pela oxidação da cafeína com metaperiodato de sódio e acoplamento do produto gerado com MBTH para produzir uma solução azulada, cuja reação é ilustrada na Figura 27.

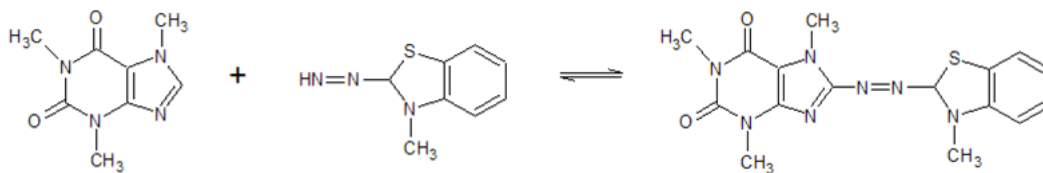


Figura 27. Esquema de reação entre a cafeína e o MBTH.

O espectro obtido para uma solução de cafeína é apresentado na Figura 28, que mostra um máximo de absorvidade em 630 nm (correspondente a cor vermelha), justificando a escolha da componente R do sistema RGB para a realização das medidas por colorimetria digital.

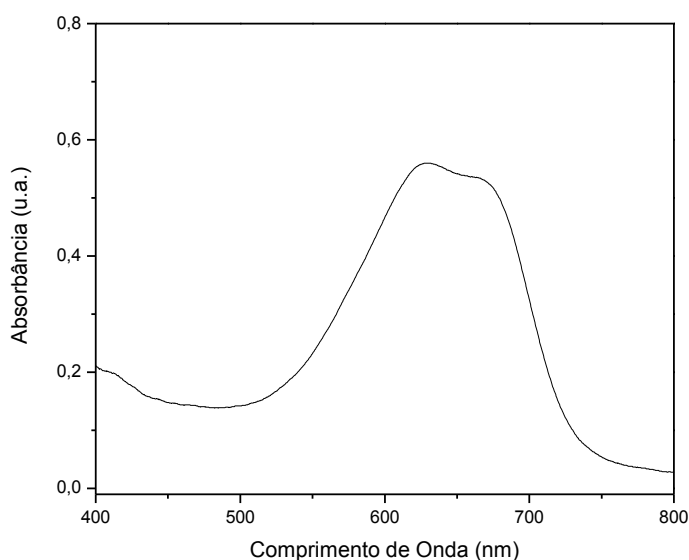


Figura 28. Espectro de absorção do produto obtido pela reação de cafeína e MBTH.

A Figura 29 apresenta a variação da cor azul obtida para os quatro padrões utilizados para a construção de uma curva analítica nas concentrações de 0,05 à 0,2 mg L⁻¹. Nota-se claramente o aumento da tonalidade da cor azul com o aumento da concentração da substância. A curva analítica, Figura 27, apresentou um fator de determinação ($R^2 = 0,994$) elevado, principalmente considerando a faixa de concentração analisada que é bastante baixa. Como descrito na seção 4.1, a reação do fármaco com MBTH mostrou-se bastante dependente do tempo, sendo necessária a realização das medidas com tempo controlado que, neste caso, ocorreu há 4000 seg, 1 hora e 6 min, aproximadamente, após a adição de MBTH às soluções

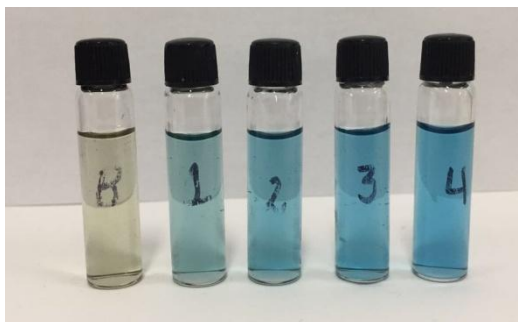


Figura 29. Variação de cor para os quatro padrões utilizados na construção da curva analítica de concentrações 0,05 à 0,2 mg L⁻¹, respectivamente, tendo o branco à esquerda.

Utilizando o segundo método, descrito na seção 3.7.1, uma curva de calibração com padrões de concentração de 75 à 375 mg L⁻¹ foi construída. Esta curva apresentou coeficiente de determinação de 0,9796 e equação $y = 0,132x + 90,41$, como mostra a Figura 30.

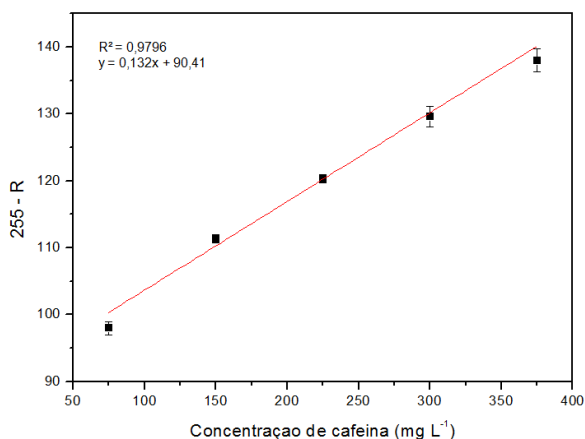


Figura 30. Curva de calibração pra cafeína com faixa de concentração de 75 à 375 mg L⁻¹.

O limite de detecção calculado, neste caso, foi de 43,10 mg L⁻¹.

Uma vez que a cafeína é um alcalóide assim como a cocaína, um teste de interferência foi realizado conduzindo a reação substituindo apenas a cafeína pelo cloridrato de cocaína. Foi observado que a reação ocorre também com a cocaína, gerando, porém, um azul de intensidade diferente do azul gerado pela reação com o estimulante. Para a determinação de cafeína em amostras de cocaína, esse resultado mostrou-se um problema. As amostras planejadas que continham cafeína em sua composição foram analisadas e os resultados obtidos foram insatisfatórios. O parâmetro R praticamente não variou entre as amostras, confirmando que a reação não é adequada para a determinação da cafeína na presença de outro alcalóide.

É importante relatar que, considerando as diferenças de resposta para a cafeína e cocaína no teste com MBTH e de levamisol e cocaína no teste com alaranjado de metila, poderia se obter alguma informação com relação à concentração das substâncias pela aplicação de métodos de análise multivariado como a regressão linear múltipla (MLR) ou regressão com mínimos quadrados parciais (PLS). Entretanto, a informação gerada pelo sistema RGB se mostrou insuficiente para proporcionar uma resposta para estes casos. Mais uma vez a separação prévia das substâncias se mostrou necessária para permitir a determinação pelo método colorimétrico proposto.

5.0 Conclusão

Os dados apresentados demonstram que o método proposto permite a identificação e a quantificação de cocaína e procaína em amostras sintéticas com diferentes níveis de concentração, as quais simulam amostras apreendidas, por meio de medidas colorimétricas baseadas em reagentes cromogênicos específicos conduzidas por imagens digitais obtidas com *smartphone*. Esta determinação pôde ser realizada de forma eficiente e com erros e limites de detecção aceitáveis utilizando uma estratégia portátil e de baixo custo. Além disso, o método se mostrou preciso quando comparado com uma técnica de referência, como a espectroscopia na região visível do espectro.

Na reação de determinação de cocaína por meio do teste de Scott, pôde-se minimizar interferências causadas pelo adulterante lidocaína que, frequentemente é a causa de falsos positivos nesse tipo de teste. E pode-se ainda identificar um interferente que, até então, na literatura, não havia sido citado como tal, o levamisol.

Todavia, a determinação de levamisol e cafeína pelas suas respectivas reações propostas não foi possível devido aos problemas de interferência causados pela própria cocaína, no caso, matriz das amostras. Entretanto, deve-se ressaltar que essas reações apresentaram curvas de calibração com ótimos coeficientes de quantificação e limites de detecção demonstrando a possibilidade do seu uso para determinação desses analitos em amostras diferentes das estudadas neste trabalho.

Um ambiente de luz controlada para a realização das medidas digitais foi construído de forma simples e com sucesso de forma que pôde-se eliminar efeitos de variação de luz ambiente nas leituras.

Como perspectivas futuras pode-se adicionar um estudo de novas reações colorimétricas para os adulterantes mais comuns, incluindo para o levamisol e para a cafeína que excluam a interferência causada pela matriz das amostras.

6.0 Referências

- (1) Almeida, V. G. K.; Cassella, R. J.; Pacheco, W. F. Determination of Cocaine in Real Banknotes Circulating at the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *251*, 50–55.
- (2) *United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report*, Viena, 2016.
- (3) Lapachinske, S. F.; Okai, G. G.; dos Santos, A.; de Bairros, A. V.; Yonamine, M. Analysis of Cocaine and Its Adulterants in Drugs for International Trafficking Seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *247*, 48–53.
- (4) Grobério, T. S.; Zacca, J. J.; Talhavini, M.; Braga, J. W. B. Quantification of Cocaine Hydrochloride in Seized Drug Samples by Infrared Spectroscopy and PLSR. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (9), 1696–1703.
- (5) Pérez-Alfonso, C.; Galipienso, N.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. A Green Method for the Determination of Cocaine in Illicit Samples. *Forensic Sci. Int.* **2014**, *237*, 70–77.
- (6) Rodrigues, N. V. S.; Cardoso, E. M.; Andrade, M. V. O.; Donnici, C. L.; Sena, M. M. Analysis of Seized Cocaine Samples by Using Chemometric Methods and FTIR Spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24* (3), 507–517.
- (7) Byrne, L.; Barker, J.; Pennarun-Thomas, G.; Diamond, D.; Edwards, S. Digital Imaging as a Detector for Generic Analytical Measurements. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2000**, *19* (8), 517–522.
- (8) Gaiao, E. da N.; Martins, V. L.; Lyra, W. da S.; Almeida, L. F. de; Silva, E. C. da; Araújo, M. C. U. Digital Image-Based Titrations. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570* (2), 283–290.
- (9) Gomes, M. S.; Trevizan, L. C.; Nóbrega, J. A.; Kamogawa, M. Y. Uso de Scanner Em Espectrofotometria de Absorção Molecular: Aplicação Em Experimento Didático Enfocando a Determinação de Ácido Ascórbico. *Quim. Nova* **2008**, *31* (6), 1577–1581.
- (10) Choodum, A.; Parabun, K.; Klawach, N.; Daeid, N. N.; Kanatharana, P.; Wongniramaikul, W. Real Time Quantitative Colourimetric Test for Methamphetamine Detection Using Digital and Mobile Phone Technology. *Forensic Sci. Int.* **2014**, *235*, 8–13.
- (11) Magalhães, E. J.; Nascentes, C. C.; Pereira, L. S. A.; Guedes, M. L. O.; Lordeiro, R. A.; Auler, L. M. L. A.; Augusti, R.; de Queiroz, M. E. L. R. Evaluation of the Composition of Street Cocaine Seized in Two Regions of Brazil. *Sci. Justice* **2013**, *53* (4), 425–432.
- (12) Eug, P.; America, S.; Mariani, V.; XVIII, P. L. Cocaine: Myths, History and Abuse. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **2001**, *23* (2).
- (13) Passagli, M. *Toxicologia Forense: Teoria E Prática*, 2ª edição.; Millennium Editora: Campinas, 2009.
- (14) de Souza, L. M.; Rodrigues, R. R. T.; Santos, H.; Costa, H. B.; Merlo, B. B.; Filgueiras, P. R.; Poppi, R. J.; Vaz, B. G.; Romão, W. A Survey of Adulterants Used to Cut Cocaine in Samples Seized in the Espírito Santo State by GC-MS Allied to Chemometric Tools. *Sci. Justice* **2016**, *56* (2), 73–79.

- (15) Tosato, F.; Rosa, T. R.; Morais, C. L. M.; Maldaner, A. O.; Ortiz, R. S.; Filgueiras, P. R.; Gomes Lima, K. M.; Romão, W. Direct Quantitative Analysis of Cocaine by Thin Layer Chromatography plus a Mobile Phone and Multivariate Calibration: A Cost-Effective and Rapid Method. *Anal. Methods* **2016**, *8* (42), 7632–7637.
- (16) Zacca, J. J.; Botelho, É. D.; Vieira, M. L.; Almeida, F. L. A.; Ferreira, L. S.; Maldaner, A. O. Brazilian Federal Police Drug Chemical Profiling - The PeQui Project. *Sci. Justice* **2014**, *54* (4), 300–306.
- (17) Bernardo, N. P.; Siqueira, M. E. P. B.; De Paiva, M. J. N.; Maia, P. P. Caffeine and Other Adulterants in Seizures of Street Cocaine in Brazil. *Int. J. Drug Policy* **2003**, *14* (4), 331–334.
- (18) Broséus, J.; Gentile, N.; Bonadio Pont, F.; Garcia Gongora, J. M.; Gasté, L.; Esseiva, P. Qualitative, Quantitative and Temporal Study of Cutting Agents for Cocaine and Heroin over 9 Years. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *257*, 307–313.
- (19) Funari, C. S.; Castro-gamboa, I.; José, A.; Bolzani, S. Estudo Do Teste de Scott via Técnicas Espectroscópicas: Um Método Alternativo Para Diferenciar Cloridrato de Cocaína E Seus Adulterantes. *Quim. Nov.* **2014**, *37* (9), 1538–1544.
- (20) Zacca, J. J.; Grobério, T. S.; Maldaner, A. O.; Vieira, M. L.; Braga, J. W. B. Correlation of Cocaine Hydrochloride Samples Seized in Brazil Based on Determination of Residual Solvents: An Innovative Chemometric Method for Determination of Linkage Thresholds. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (4), 2457–2464.
- (21) Indorato, F.; Romano, G.; Barbera, N. Levamisole-Adulterated Cocaine: Two Fatal Case Reports and Evaluation of Possible Cocaine Toxicity Potentiation. *Forensic Sci. Int.* **2016**, *265* (265), 103–106.
- (22) Maldaner, A. O.; Zacca, J. J.; Melo, R. C. A.; Zancanaro, I.; Oliveira, C. S. L.; Kasakoff, L. B. Chemical Profiling of Street Cocaine from Different Brazilian Regions. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27* (4), 719–726.
- (23) Bruni, A. T.; Velho, J. A.; Oliveira, M. F. de. *Fundamentos de Química Forense - Uma Análise Prática Da Química Que Soluciona Crimes*, 1^o edição.; Millennium Editora: Campinas, 2012.
- (24) Botelho, É. D.; Cunha, R. B.; Campos, A. F. C.; Maldaner, A. O. Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (4), 611–618.
- (25) Broséus, J.; Huhtala, S.; Esseiva, P. First Systematic Chemical Profiling of Cocaine Police Seizures in Finland in the Framework of an Intelligence-Led Approach. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *251*, 87–94.
- (26) Krauss, S. T.; Remcho, T. P.; Lipes, S. M.; Aranda, R.; Maynard, H. P.; Shukla, N.; Li, J.; Tontarski, R. E.; Landers, J. P. Objective Method for Presumptive Field-Testing of Illicit Drug Possession Using Centrifugal Microdevices and Smartphone Analysis. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (17), 8689–8697.
- (27) Haddoub, R.; Ferry, D.; Marsal, P.; Siri, O. Cobalt Thiocyanate Reagent Revisited for

- Cocaine Identification on TLC. *New J. Chem.* **2011**, 35 (7), 1351.
- (28) Marcelo, M. C. A.; Mariotti, K. C.; Ortiz, R. S.; Ferrão, M. F.; Anzanello, M. J. Scott Test Evaluation by Multivariate Image Analysis in Cocaine Samples. *Microchem. J.* **2016**, 127, 87–93.
- (29) da Silva, M. J.; dos Anjos, E. V.; Honorato, R. S.; Pimentel, M. F.; Paim, A. P. S. Spectrophotometric Cocaine Determination in a Biphasic Medium Employing Flow-Batch Sequential Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 629 (1–2), 98–103.
- (30) Grobério, T. S.; Zacca, J. J.; Botelho, É. D.; Talhavini, M.; Braga, J. W. B. Discrimination and Quantification of Cocaine and Adulterants in Seized Drug Samples by Infrared Spectroscopy and PLSR. *Forensic Sci. Int.* **2015**, 257, 297–306.
- (31) *United Nations Office on Drugs and Crime, Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine*; Viena, 2005.
- (32) Ryder, Alan G.; O'Connor, Gerard M.; Thomas J., G. Quantitative Analysis of Cocaine in Solid Mixtures Using Raman Spectroscopy and Chemometric Methods. *J. Raman Spectrosc.* **2000**, 31 (3), 221–227.
- (33) Silva, G. F.; Fonseca, A.; Braga, J. W. B. Classificação de Águas Minerais Baseada Em Imagens Digitais Obtidas Por Smartphones. *Quim. Nov.* **2016**, 39 (7), 876–881.
- (34) Choodum, A.; Kanatharana, P.; Wongniramaikul, W.; Nic Daeid, N. Using the iPhone as a Device for a Rapid Quantitative Analysis of Trinitrotoluene in Soil. *Talanta* **2013**, 115, 143–149.
- (35) Atkins, P.; Jones, L. *Princípios de Química - Questionando a Vida Moderna E O Meio Ambiente*, 5ª edição.; Editora Bookman: Porto Alegre, 2012.
- (36) Tôrres, A. R.; Da Silva Lyra, W.; De Andrade, S. I. E.; Andrade, R. A. N.; Da Silva, E. C.; Araújo, M. C. U.; Da Nóbrega Gaião, E. A Digital Image-Based Method for Determining of Total Acidity in Red Wines Using Acid-Base Titration without Indicator. *Talanta* **2011**, 84 (3), 601–606.
- (37) Garcia, P. T.; Gabriel, E. F.; Pessôa, G. S.; Santos Júnior, J. C.; Mollo Filho, P. C.; Guidugli, R. B.; Höehr, N. F.; Arruda, M. A.; Coltro, W. K.; Garcia, P.; et al. Paper-Based Microfluidic Devices on the Crime Scene: A Simple Tool for Rapid Estimation of Post-Mortem Interval Using Vitreous Humour. *Anal. Chim. Acta* **2017**, 974 (17), 69–74.
- (38) Choodum, A.; Nic Daeid, N. Digital Image-Based Colourimetric Tests for Amphetamine and Methylamphetamine. *Drug Test. Anal.* **2011**, 3 (5), 277–282.
- (39) Choodum, A.; Nic Daeid, N. Rapid and Semi-Quantitative Presumptive Tests for Opiate Drugs. *Talanta* **2011**, 86 (1), 284–292.
- (40) Helfer, G. A.; Magnus, V. S.; Böck, F. C.; Teichmann, A.; Ferrão, M. F.; Da Costa, A. B. PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, 28 (2), 328–335.
- (41) Silva, T. G.; De Araujo, W. R.; Muñoz, R. A. A.; Richter, E. M.; Santana, M. H. P.; Coltro, W. K. T.; Paixão, T. R. L. C. Simple and Sensitive Paper-Based Device Coupling

- Electrochemical Sample Pretreatment and Colorimetric Detection. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (10), 5145–5151.
- (42) El-Didamony, A. M. Spectrophotometric Determination of Benzydamine HCl, Levamisole HCl and Mebeverine HCl through Ion-Pair Complex Formation with Methyl Orange. *Spectrochim. Acta - Part A* **2008**, *69* (3), 770–775.
- (43) Singh, D. K.; Sahu, A. Spectrophotometric Determination of Caffeine and Theophylline in Pure Alkaloids and Its Application in Pharmaceutical Formulations. *Anal. Biochem.* **2006**, *349* (2), 176–180.
- (44) Shpigun, L. K.; Andryukhina, E. Y.; Shushenachev, Y. V. Spectrophotometric Determination of Purine Alkaloids by Flow Injection and Sequential Injection Analysis. *J. Anal. Chem.* **2015**, *70* (8), 926–935.
- (45) Shen, L.; Hagen, J. a.; Papautsky, I. Point-of-Care Colorimetric Detection with a Smartphone. *Lab Chip* **2012**, *12* (21), 4240.
- (46) Grasel, F. S.; Ferrão, M. F.; Helfer, G. A.; Costa, A. B. Principal Component Analysis of Commercial Tannin Extracts Using Digital Images on Mobile Devices. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27* (12), 2372–2377.
- (47) da Silva, A. F. Discriminação E Quantificação de Cocaína E Adulterantes Em Drogas Por Espectroscopia de Infravermelho E Resolução Multivariada de Curvas, Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, UnB, 2016.
- (48) Neto, B. de B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Como Fazer Experimentos - Pesquisa E Desenvolvimento Na Ciência E Na Indústria*, 2° edição.; Editora da Unicamp: Campinas, 2001.
- (49) Deakin, A. L. A Study of Acids Used for the Acidified Cobalt Thiocyanate Test for Cocaine Base. *Microgram J.* **2003**, *1* (June), 40–43.
- (50) Dicas e Macetes de Pipetagem - vol 02 <http://www.analiticaweb.com.br/informe/dicas-de-pipetagem-precisao-para-liquidos-volateis-02-2015/dicas-pipetagem-precisao-para-liquidos-volateis.pdf> (accessed Aug 1, 2016).
- (51) Oguri, K.; Wada, S.; Eto, S.; Yamada, H. Specificity and Mechanism of the Color Reaction of Cocaine with Colbaltous Thiocyanate. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Heal.* **1995**, *41* (July), 274–279.
- (52) Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*, 3° edição.; Ellis Horwood: Chichester, 1993.
- (53) Maldaner, A. O.; Botelho, E. D.; Zacca, J. J.; Camargo, M. A.; Braga, J. W.; Groberio, T. S. Brazilian Federal District Cocaine Chemical Profiling - Mass Balance Approach and New Adulterant Routinely Quantified (Aminopyrine). *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26* (6), 1227–1231.