



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Curso de Química Tecnológica

**Estudos para a determinação de levamisol em amostras de cocaína por  
cromatografia planar e imagens digitais**

Jorge Filipe Dias Pires

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, Dezembro de 2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Curso de Química Tecnológica

**Estudos para a determinação de levamisol em amostras de cocaína por  
cromatografia planar de imagens digitais**

Jorge Filipe Dias Pires

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Monografia apresentada ao Instituto de Química – IQ,  
da Universidade de Brasília – UnB,  
como requisito parcial ao programa de graduação em Química Tecnológica, para  
obtenção do título  
de Bacharel em Química Tecnológica.

Brasília, Dezembro de 2017

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**Instituto de Química**

**Curso de Química Tecnológica**

Monografia apresentada ao Instituto de Química – IQ, da Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial ao programa de graduação em Química Tecnológica para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

**Estudos para a determinação de levamisol em amostras de cocaína por cromatografia planar de imagens digitais**

Jorge Filipe Dias Pires

---

Professor orientador: Dr. Alexandre Fonseca

***A persistência é o caminho  
para o êxito – Charlie Chaplin***

## **Agradecimentos**

Há muitas pessoas a quem eu devo agradecer. Alguns nomes se destacam por serem os alicerces que fundamentam a minha vida e dessa forma possibilitaram que esse trabalho pudesse ser concebido. Outros nomes são como uma bela luz que ilumina a faixada e interior da casa, mesmo que não estejam sempre presentes, se mostram no período de maior escuridão.

Primeiramente eu quero agradecer aos meus pais, João Pires e Licea Pires que me fizeram atravessar a porta que me trouxe aqui e que por isso merecem um parágrafo destinado só a eles.

Quero abrir outro parágrafo para agradecer a minha namorada, Heidi Schulte, que, como luz guia me mostrou saídas que sozinho eu não teria visto.

Um terceiro parágrafo para o meu professor orientador, Doutor Alexandre Fonseca, que aceitou ser o meu guia nesse caminho tortuoso que eu escolhi trilhar.

Reservo essa último parágrafo para meus amigos, que escutaram com paciência as minhas reclamações, em especial André Nascimento e Jessica Ferreira. Meus profundos agradecimentos a equipe do LIAMA, por tornarem o trabalho diário mais prazeroso e por último, mas não menos importante ao Doutor Marcio Talhavini, por fornecer as amostras que foram utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho e a FAPDF (0193.001318/2016) por ter financiado o projeto, cujo sem o auxílio não teria acontecido.

## **Lista de abreviaturas**

CCD	Cromatográfica em camada delgada
PLA	Placa em ácido polilático
RF	Fator de retenção
UV	Ultra Violeta
TG	Temperatura de transição vítrea

## Lista de figuras

Figura 1. Equilíbrio ácido-base da estrutura da cocaína.....	2
Figura 2. Estrutura do Levamisol.....	3
Figura 3. Ilustração para processo de cromatografia em camada delgada.....	6
Figura 4. Papel cromatográfico com impressão em cera utilizado para os estudos. Frente (A) e verso (B) com recobrimento de cera.....	8
Figura 5. Suportes em PLA para CCD com quatro (A) e seis (B) canais .....	11
Figura 6. Deposição da suspensão de sílica nas placas.....	12
Figura 7. Visão geral da câmara relevadora.....	14
Figura 8. Lâmpadas germicidas acopladas na parte superior de caixa.....	14
Figura 9. Filtro óptico de absorção.....	15
Figura 10. Espectro de absorção.....	15
Figura 11. Interface do programa utilizado para obtenção dos cromatogramas.(A) visão da placa dentro da câmara relevadora. (B) Cromatograma obtido pela leitura de pixels do programa. (1) e (2) regiões de ajuste do tamanho do amostrador e da distâncias entre os amostradores respectivamente.....	18
Figura 12. Dispositivo de papel empregado na corrida cromatográfica.....	19
Figura 13. Corrida do solvente.....	22
Figura 14. Imagem da placa de CCD proposta após a separação de levamisol (1) e cocaína (2). Os dois primeiros canais referem-se à corridas dos padrões puros e o último canal refere-se a corrida para mistura dos padrões.....	23
Figura 15. Cromatograma obtido para a separação de uma mistura de levamisol 5 mg/mL (1) e cocaína 10 mg/mL (2).....	24
Figura 16. Imagem da placa de CCD proposta após a corrida com levamisol 5 mg/mL.....	24
Figura 17. Cromatogramas obtidos após a corrida com levamisol 5 mg/mL .....	25
Figura 18. Imagem da placa de CCD após a corrida com os padrões de levamisol de 2 - 5 mg/mL.....	26
Figura 19. Cromatogramas obtidos após a corrida com Levamisol variando as concentrações de 2 mg/mL a 5 mg/mL.....	26
Figura 20. Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores de área apresentados na Tabela 2.....	28

Figura 21. Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores da altura do pico apresentados na Tabela 2.....	28
Figura 22. Imagem da placa de CCD proposta após a corrida para mistura de levamisol 5 mg/mL e cocaína 10 mg/mL .....	29
Figura 23. Cromatograma obtido pelo programa desenvolvido <i>in lab</i> referente à Figura 22.....	29



## Resumo

Esse trabalho descreve os estudos realizados para avaliar a possibilidade de uso da cromatografia planar aliada a detecção com imagens digitais para a determinação qualitativa e quantitativa de levamisol em amostras de cocaína. Inicialmente, buscou-se realizar a separação do analito a partir da cromatografia em papel e revelação da corrida com reagente de Dragendorff, mas a separação mostrou-se ineficiente obtendo-se fatores de retenção (RF) muito próximos para a cocaína e o levamisol, o que impossibilitou a determinação do analito. Posteriormente avaliou-se a possibilidade de uso da cromatografia em camada delgada (CCD) com sílica incorporada com revelador fluorescente. Para isso, propôs-se o desenvolvimento de placas cromatográficas alternativas às já propostas na literatura empregando-se a impressão 3D para a construção de um suporte que facilitasse a deposição da sílica. Adicionalmente, foram propostos nesse trabalho a fabricação de um ambiente de revelação das placas com radiação ultravioleta (UV) e um programa de computador que permitisse a obtenção de cromatogramas baseados nas imagens digitais obtidas por uma *webcam*. Empregando-se a CCD e corrida com solução de metanol/amônia (99,5/0,5; v/v) foi possível obter um RF de 0,39 para cocaína e de 0,84 para levamisol, permitindo a separação adequada das bandas cromatográficas. O sistema proposto apresentou uma repetibilidade para os valores de RF de 1,2% e para as áreas dos picos de 13% considerando o sinal para o levamisol. A curva analítica apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,983 para faixa de concentração de (2-5 mg/mL) sendo estimado um limite de detecção da ordem de 1,85 mg/mL. Os resultados obtidos indicam que o sistema proposto poderá ser utilizado no futuro para determinação quantitativa de levamisol em amostras de cocaína a partir de um procedimento simples e de baixo custo.

**Palavras-chave:** Levamisol, cocaína, cromatografia em camada delgada.

## **Abstract**

This work describes the studies realized to evaluate the possibility of use of planar chromatography allied with detection of digital images for the qualitative and quantitative determination of levamisole in cocaine samples. Initially, we sought to perform the separation of the analyte from paper chromatography and run development with Dragendorff reagent, but the separation proved to be inefficient by obtaining very close retention factors (RF) for cocaine and levamisole, which made it impossible to determine the analyte. Subsequently it was evaluated the possibility of using thin-layer chromatography (TLC) with silica incorporated with fluorescent indicator. For this, it was proposed the development of alternative chromatographic plates to those already proposed in the literature using a 3D printing for the construction of a support that facilitates the deposition of the silica. In addition, it was proposed in this work the fabrication of an environment for the revelation of plaques with ultraviolet radiation (UV) and a computer program that would allow to obtain chromatograms based on the digital images obtained by a webcam. Using a TLC and running with methanol / ammonia solution (99.5 / 0.5; v / v) it was possible to obtain an RF of 0.39 for cocaine and 0.84 for levamisole, allowing adequate separation of chromatographic bands. The proposed system presented a repeatability for the RF values of 1.2% for the peak and areas of 13% considering the signal for levamisole. The analytical curve presented a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.983 for the concentration range of (2-5 mg / mL). A detection limit of 1.85 mg / mL was estimated. The results indicate that the proposed system could be used in the future for the quantitative determination of levamisole in cocaine samples from a simple and low cost procedure.

**Keywords:** Levamisole, cocaine, chromatography.

## Sumário

1	– INTRODUÇÃO.....	1
1.1	– Cocaína e levamisol.....	1
1.2	– Cromatografia em camada delgada.....	4
2	– OBJETIVOS.....	7
2.1	– Objetivos específicos.....	7
3	– METODOLOGIA.....	8
3.1	– Cromatografia em papel.....	8
3.2	– Cromatografia em camada delgada.....	9
3.2.1	–Preparo das placas cromatográficas.....	9
3.2.2	– Estudo para separação de cocaína e levamisol por CCD.....	12
3.2.2.1	– Revelação das corridas cromatográficas por UV com imagens digitais.....	13
4	– RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
4.1	– Cromatografia em papel.....	19
4.2	– Avaliação das placas cromatográficas fabricadas em ácidos polilático (PLA) por impressão 3D.....	20
4.2.1	– Estudos para separação de cocaína e levamisol por CCD.....	22
5	– CONCLUSÃO.....	31
6	– BIBLIOGRAFIA.....	32

# 1 – INTRODUÇÃO

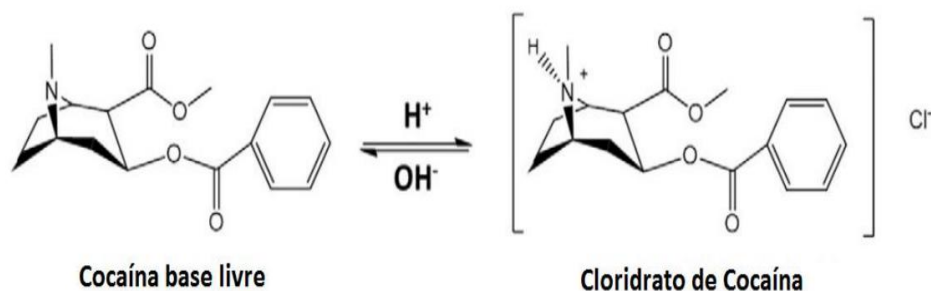
## 1.1 Cocaína e levamisol

Indícios de consumo de coca são encontrados desde o período das civilizações pré-colombianas que habitavam os Andes, que já conheciam e faziam uso da planta *Erythroxylon coca* há mais de 4500 anos. A planta da coca é cultivada em clima tropical, tem seu crescimento em forma de arbustos e podem ser plantadas em altitudes entre 450 m e 1800 m acima do nível do mar. O nome da coca tem sua origem em uma palavra do dialeto aimará, “khoka”, que significa “a árvore”. <sup>[1]</sup>

Até a chegada dos colonizadores espanhóis, a coca era um luxo da nobreza Inca, contudo, quando as explorações tiveram início, o consumo se popularizou apesar da desaprovação da Igreja católica, que acreditava que o uso da planta era a responsável pela dificuldade de catequisar os nativos. <sup>[2-4]</sup>

Os efeitos colaterais da cocaína passavam despercebidos. Devido ao intenso trabalho a que eram submetidos. Índios desnutridos e doentes que utilizavam a planta de maneira crônica, não se distinguiam daqueles que não a utilizavam. <sup>[1]</sup>

A cocaína foi introduzida ao meio científico através da medicina no século XIX. O químico alemão Friedrich Gaedecke conseguiu em 1855 o extrato das folhas da coca, o *erythroxyline*. Poucos anos depois, em 1859 o químico alemão Albert Niemann isolou, dentre diversos alcalóides, o extrato da cocaína, que correspondia a 80% da amostra. Sua fórmula exata, só foi descoberta em 1898. Willstatt conseguiu a sintetização da cocaína em seu laboratório em 1902, que através de uma conversão ácido base (Figura 1) se chega à forma cloridrato e apresenta-se como um pó branco. Sua aparição como fármaco milagroso, fez com que esse fosse prescrito para o tratamento de diversas enfermidades. <sup>[5-6]</sup>



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

O uso indiscriminado logo mostrou seus efeitos, pois a quantidade de cocaína ingerida agora era muitas vezes maior do que no período colonial. O seu uso em tratamentos contra dependência em outras drogas (heroína, opio) se mostrou ineficiente, pois em muitos casos levava a um quadro de dependência dupla. Havia também o definhamento físico e moral dos usuários.<sup>[6]</sup>

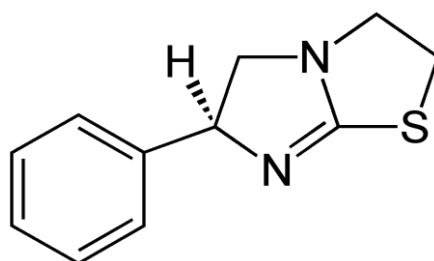
Devido à falta de estudos sobre a cocaína não se sabia ao certo o quão danoso ela poderia ser, contudo o efeito de dependência se tornou um dos principais efeitos colaterais relatados. Antes que começassem a surgir leis contra a comercialização desse produto, a sociedade do século XIX passou por uma fase de abuso da droga.<sup>[3-5,7]</sup> Essas leis diminuíram a popularidade da droga até o surgimento dos cartéis, que produziam em grande escala e conseguiam levar esse produto para um maior número de consumidores, pois o processo havia sido barateado.<sup>[7-9]</sup>

Atualmente a cocaína é considerada uma droga ilícita, sendo comercializada com adição de diversas substâncias principalmente com objetivo de aumentar o lucro dos traficantes.<sup>[10]</sup> Essas substâncias podem ser consideradas adulterantes, quando apresentam efeitos semelhantes ou que potencializam a cocaína ou, diluentes, quando são utilizadas unicamente para aumentar o volume do lote. Alguns exemplos de diluentes são as fibras de algodão, amido, bicarbonato de sódio, talco, leite em pó

entre outros. Fármacos como a lidocaína, aspirina, cafeína e levamisol são exemplos de adulterantes normalmente encontrados em amostras de cocaína<sup>[11,12]</sup>

O levamisol, cuja estrutura é apresentada na Figura 2 é um produto farmacêutico que já foi usado como imunomodulador no tratamento de AIDS, hepatite B crônica e câncer de mama, mas com uso mais aplicado a verminoses em animais. Em seres humanos, devido a seus efeitos adversos, seu uso se restringiu muito, ao ponto que a sua aplicação atual é bastante limitada.<sup>[13]</sup>

Por volta de 2005 às primeiras amostras de cocaína com levamisol foram apreendidas.<sup>[14]</sup> Efeitos colaterais atribuídos à presença de levamisol na cocaína foram reportados em julho de 2008, onde cinco pacientes foram hospitalizados com febre, infecções e agranulocitose. Agranulocitose é caracterizada por uma abrupta redução do número de granulócitos no sangue. Seus sintomas são febre e faringite. Testes toxicológicos usando cromatografia gasosa e espectrometria de massas identificaram cocaína e levamisol na urina dos pacientes.<sup>[15]</sup>



**Figura 2.** Estrutura do Levamisol

Existem duas teorias sobre o motivo de o levamisol ser adicionado à cocaína. Uma delas é que essa substância é adicionada como um marcado para droga, para que as remessas possam ser rastreadas pelos traficantes. O argumento utilizado para sustentar essa hipótese é que a quantidade de levamisol encontrada nas amostras recolhidas é relativamente baixa (0,6%-11,6%) do total do produto.<sup>[12]</sup> A segunda

hipótese fala do potencial sinérgico da droga, que tem como objetivo aumentar o efeito que a droga tem o cérebro.

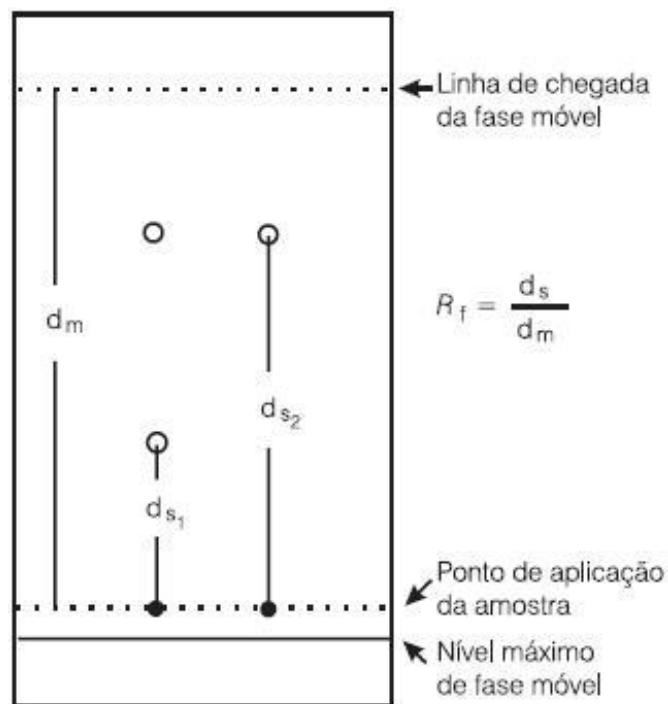
Um fator que justifica a determinação do levamisol em cargas de cocaína é que ao fazer isso, é possível auxiliar na correlação entre o traficante e a origem da droga. Esse tipo de rastreamento pode ajudar em apreensões de drogas, desde o pequeno ao grande fornecedor.

Na literatura são encontrados alguns métodos utilizados para determinar levamisol em fármacos e fluídos biológicos através de espectrofotometria <sup>[16]</sup>, cromatografia líquida de alta eficiência <sup>[17-23]</sup>, e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas <sup>[24-25]</sup>. Apesar de apresentarem um desempenho plenamente satisfatório, a maioria desses métodos tem limitações como o tempo de análise e alto custo. Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos mais simples e que eventualmente possam ser aplicados em campo surgem como alternativas que permitem realizar, ao menos, uma análise semiquantitativa da droga nos locais de apreensão, aumentando o conhecimento da inteligência policial sobre o material.

## 1.2 – Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada tem como princípio a separação dos compostos de uma determinada mistura, baseada na interação dos compostos com a fase estacionária (usualmente sílica ou alumina) e a fase móvel (solventes). Os componentes que apresentam maior afinidade com a fase estacionária tendem a adsorver sobre o sólido e ficam mais retidos nesta fase, enquanto as espécies que apresentam maior afinidade pelo solvente tendem a migrar com o fluxo que é desenvolvido durante a corrida, causando a separação das substâncias por um processo que recebe o nome de *migração diferencial*. <sup>[26]</sup>

Os trabalhos com essa técnica tiveram início em 1938 com um estudo dos pesquisadores IZMAILOV e SHRAIBER que necessitavam de um método para separação de compostos de uma maneira rápida. Contudo, mesmo com a versatilidade dessa técnica, ela só passou a ser utilizada de maneira sistemática na década de 1960 e até os dias de hoje a CCD é uma técnica muito utilizada para análise qualitativa de substâncias. O processo de análise por CDD segue uma ordem determinada. Uma linha para aplicação de amostra é determinada para garantir que todos os compostos analisados interajam de maneira igual com o eluente e para fase estacionária, outra linha é demarcada na extremidade que não teve contato com a fase móvel (Figura 3). A importância de delimitar os pontos onde a amostra foi adicionada e até que ponto o eluente carregou essa amostra, se dá pelo interesse no fator de retenção (RF) da amostra, que pode ser calculado pela razão da distância percorrida pelos componentes pela distância percorrida pelo eluente. Comparações do valor de RF da amostra com o de um padrão é o método qualitativo mais utilizado no CCD. [26]



**Figura 3.** Ilustração para processo de cromatografia em camada delgada.



A cromatografia em camada delgada é uma das técnicas mais utilizadas para análises qualitativas. O uso de placas comerciais garante que as análises possuam repetibilidade aceitáveis, o que é uma dificuldade para placas de sílica feitas em laboratório, que devido a sua forma preparo, que consiste em depositar uma suspensão de sílica sobre uma placa de vidro que será espalhada de maneira homogênea pela superfície com o auxílio de um bastão de vidro e secado em estufa. Contudo, o fato das placas comerciais terem um custo elevado, a possibilidade de obter placas de menor custo é uma proposta interessante. <sup>[26]</sup>

As vantagens como, fácil entendimento e execução, separações em um curto espaço de tempo, baixo custo e elevada reprodutibilidade, fizeram com que a CCD se popularizasse no meio científico.

Como foi dito acima, o processo de separação por CCD envolve usualmente a adsorção em fase sólida. Entretanto, se for feito um pré-tratamento nas fases estacionárias, a separação pode ser dar por partição ou troca iônica, o que possibilita a separação de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas. <sup>[26]</sup>

A CCD tem sua aplicação majoritária em análises qualitativas, contudo, ela pode ser utilizada para fins quantitativos, porém, para isso, são necessários meios mais laboriosos e equipamentos mais sofisticados, além da utilização de placas cromatográficas comerciais, que garantem uma maior repetitividade para aplicação dos métodos.

Atualmente, as técnicas mais utilizadas para determinação de cocaína e seus adulterantes são a cromatografia líquida de alto desempenho <sup>[27-29]</sup> e a cromatografia gasosa <sup>[30-36]</sup>, que possuem um grande potencial para análises forense. Contudo, com intuito de baratear o custo e simplificar a análise, a técnica de cromatografia em camada delgada surge como uma alternativa viável para esta determinação, principalmente devido a sua portabilidade.

## **2 – OBJETIVOS**

O principal objetivo desse trabalho é propor uma alternativa de eficiência adequada e de baixo custo para a determinação qualitativa e quantitativa de levamisol em amostras de cocaína.

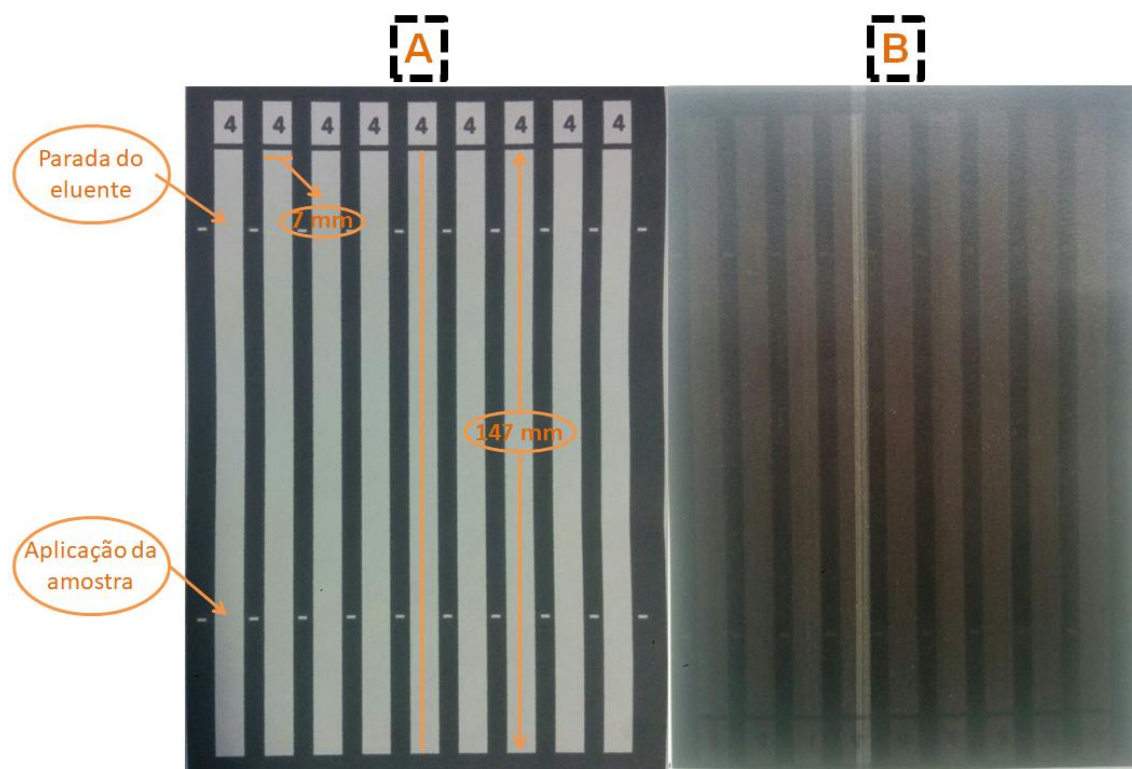
### **2.1 – Objetivos específicos:**

- Avaliar entre a cromatografia em camada delgada e em papel, a melhor estratégia para separação de levamisol da cocaína;
- Construir e avaliar um suporte para desenvolvimento de cromatografia em camada delgada baseado em impressão 3D;
- Desenvolver e avaliar um ambiente de revelação para CCD fundamentado em radiação UV e imagens digitais;
- Avaliar o desempenho analítico da alternativa de CCD proposta para a separação e quantificação de levamisol na presença de cocaína;

### 3 – METODOLOGIA

#### 3.1 – Cromatografia em papel

Para as corridas realizadas no presente trabalho com cromatografia em papel foi utilizado o papel cromatográfico Whatman CHR4 e a delimitação das áreas de corrida com impressão em cera a partir de um impressora xerox color quebe 8580. Conforme mostra a Figura 4, canais com 7 mm de largura e 147 mm de altura foram confeccionados de forma a permitir corridas cromatográficas com maior controle do fluxo de eluente, minimizando fluxos laterais. De fato, após a impressão com cera dos canais, a folha cromatográfica é aquecida a cerca de 80°C em uma chapa de aquecimento para que a cera, ao derreter penetre nas fibras do papel, definindo as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Como mostra a Figura 4 (B) o verso da folha foi impresso com uma camada de cera para que a corrida ocorresse apenas em uma das superfícies do papel.



**Figura 4.** Papel cromatográfico com impressão em cera utilizado para os estudos. Frente (A) e verso (B) com recobrimento de cera

Devido à utilização de cera no papel optou-se pela utilização de uma solução aquosa como eluente com o objetivo de evitar a solubilização da cera durante as corridas. Então, uma solução tampão fosfato pH 12 0,02 mol/L foi preparada em glicose 3% (m/v). A glicose tem o objetivo de diminuir a solubilidade da fase móvel, o que propicia uma maior separação das amostras.

Soluções em metanol de cocaína 10 mg/mL e de levamisol 4 mg/mL foram preparadas a partir da solubilização das massas apropriadas das substâncias (Sigma Aldrich) e aplicadas (3 µL) com auxílio de um micropipeta nas regiões apropriadas do papel (Figura 4).

Todas as corridas foram realizadas em um béquer de forma alta de 500 mL, adicionando-se cerca de 80 mL de eluente e forrando-se as laterais do sistema com papel cromatográfico embebido em eluente. Após a corrida, o papel cromatográfico era seco com o auxílio de um secador de cabelos previamente à revelação.

Para a revelação das bandas foi utilizado o reagente de Dragendorff, que na presença de alcaloides e amins forma um precipitado alaranjado. Primeiramente foi necessária a preparação de duas soluções. Na primeira foram utilizados 1,7 g de nitrato de bismuto, 20 mL de ácido acético glacial e 80 mL de água. Assim primeira solução é concluída. Separadamente, uma solução com 50 % de massa de iodeto de potássio (m/v) em água é preparada. Misturando-se a totalidade duas soluções preparadas, temos a formação da solução estoque, que para ser usada, tem a sua totalidade diluída em 20 mL de ácido acético glacial e 100 mL de água destilada. O reagente diluído foi transferido para um nebulizador pneumático adaptado de um inalador hospitalar.

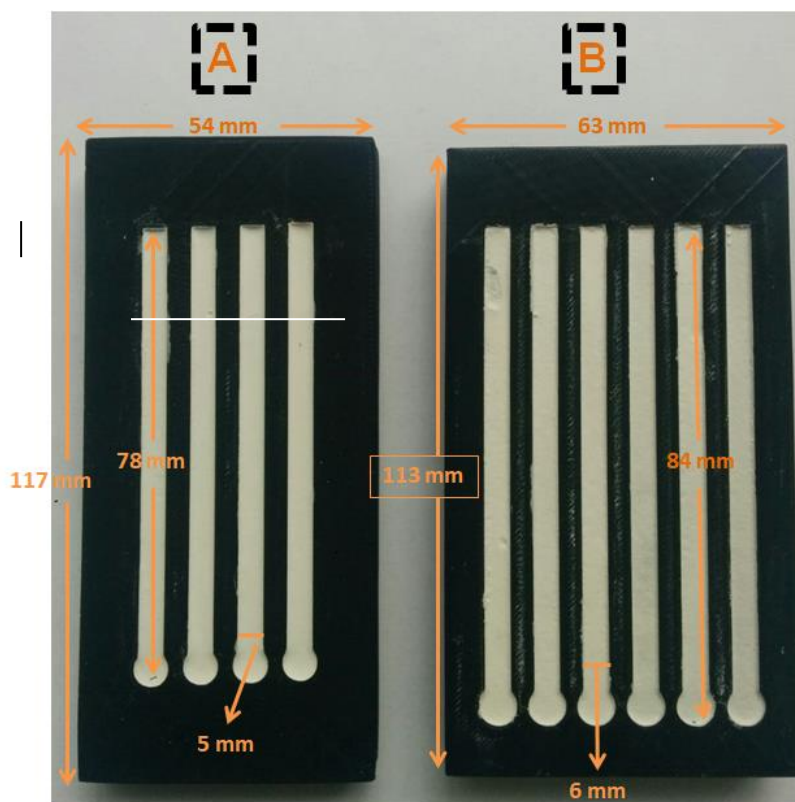
### **3.2 – Cromatografia em camada delgada (CCD)**

#### **3.2.1 – PREPARO DAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS**

Os estudos realizados com CCD no presente trabalho foram conduzidos de uma forma alternativa às relatadas na literatura, empregando-se um suporte de ácido polilático (PLA) impresso com impressora 3D de forma a delimitar as regiões de aplicação da fase estacionária. Para isso foi utilizada uma impressora 3D cliever – CL 1 black edition em conjunto com o *software SketchUp 2016* para o desenvolvimento do *layout*.

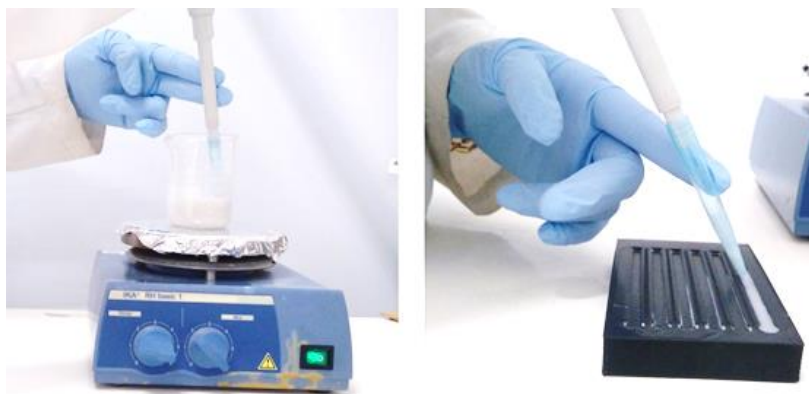
Foram impressos dois modelos de placas, com quatro e seis canais. As placas de quatro canais tem 117 mm de comprimento por 54 mm de largura e 10 mm de espessura, sendo que os seus canais possuem 78 mm de comprimento, 5 mm de largura e 1 mm de profundidade (Figura 5 A) Já a placa de seis canais tem 113 mm de comprimento por 63 mm de largura e 13 mm de espessura, sendo que os seus canais possuem 84mm de comprimento, 6 mm de largura e 1 mm de profundidade(Figura 5 B).

A sílica foi preparada com uma proporção de 5 % em massa de amido solúvel (dinâmica – química contemporânea) e 95 % em massa de sílica gel incorporada com revelador fluorescente 60 Hf<sub>245+366</sub> (E.Merck). 250 mg de amido eram solubilizados em 17,5 mL de água quente e, em seguida, pequenas porções de sílica eram adicionadas à solução sob agitação até que se completasse a massa total de 5 g de sílica. Finalizada essa etapa, eram adicionadas ainda mais duas alíquotas de 5 mL de água para se obter a suspensão desejada. É importante relatar que essa composição de sílica foi a que apresentou os melhores resultados entre outras composições avaliadas.



**Figura 5.** Suportes em PLA para CCD com quatro (A) e seis (B) canais

Após esse processo, 450  $\mu$ L da suspensão, mantida sob agitação constante, eram transferidos para os canais com o uso de uma micropipeta. Para evitar eventual entupimento da ponteira, o diâmetro de sua extremidade foi aumentado por meio de um corte realizado com um estilete. Após a transferência da suspensão para todos os canais, a placa era movimentada de forma a proporcionar uma distribuição mais uniforme do sólido nos canais e imediatamente transferida para uma estufa a 70°C onde permanecia por aproximadamente 50 minutos. A Figura 6 mostra fotografias que ilustram parte desse procedimento.



**Figura 6:** Deposição da suspensão de sílica nas placas.

### 3.2.2 - ESTUDOS PARA SEPARAÇÃO DE COCAÍNA E LEVAMISOL POR CCD

Soluções padrão de cocaína com concentrações variando entre 5 mg/mL e 10 mg/mL foram preparadas pela dissolução de massas apropriadas da droga em metanol. É importante relatar que foi utilizada a cocaína em sua forma de cloridrato, a qual foi purificada e gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal localizado em Brasília. Soluções padrão de cloridrato de levamisol na faixa de concentração de 1,0 a 10,0 mg/mL foram preparadas pela dissolução da substância (Sigma-Aldrich) em metanol.

Como eluente foi utilizada uma solução de metanol com hidróxido de amônio nas proporções de 99,5 % e 0,5 % (v/v), respectivamente. <sup>[18]</sup>. Para as corridas, 80 mL do eluente foram transferidos para um béquer de forma alta de 500 mL cujas paredes foram forradas com papel cromatográfico embebido no eluente para que a corrida cromatográfica fosse o mais uniforme possível.

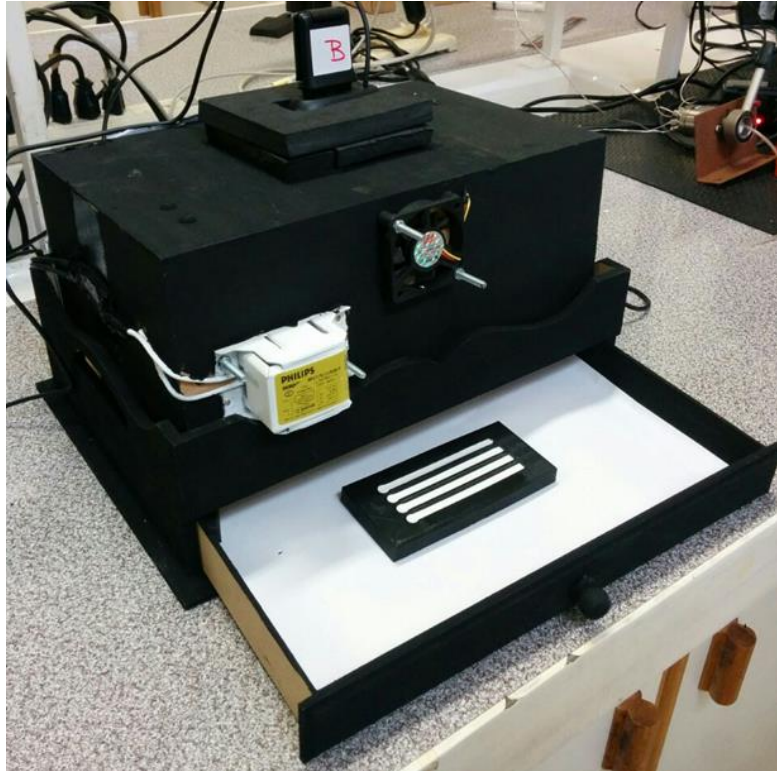
Usualmente, volumes da ordem de 3,0  $\mu$ L da solução dos padrões eram aplicados a 2,0 cm de uma das extremidades do canal com sílica e, então, a extremidade do lado onde foi aplicada a amostra era mergulhada na solução de eluente. Desse modo, cerca de 0,5 cm da sílica contida nos canais ficavam em contato com a solução, permitindo uma corrida cromatográfica em um intervalo de aproximadamente 7 minutos. Terminada a corrida, a placa era seca em estufa a 70 °C

por cerca de 10 minutos antes das medidas com imagens digitais e câmara UV, descritos na próxima seção.

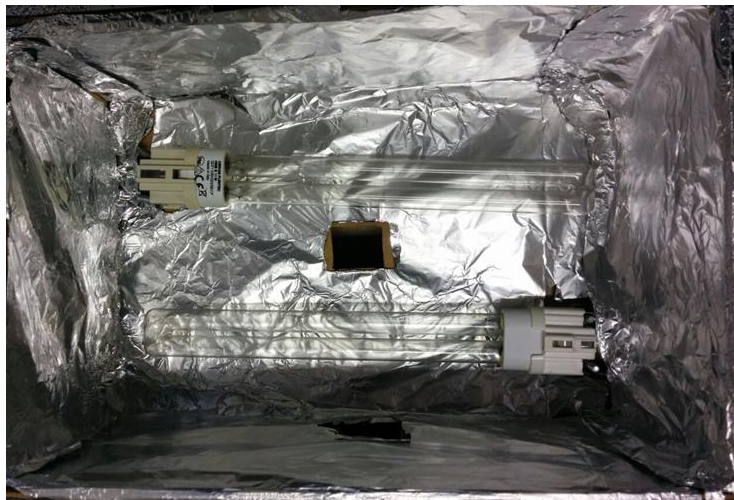
### 3.2.2.1 – REVELAÇÃO DAS CORRIDAS CROMATOGRAFICAS POR UV E ANÁLISE POR IMAGENS DIGITAIS

O processo de revelação UV foi conduzido em uma câmara construída no próprio laboratório e consistia em uma caixa de madeira com uma gaveta inferior para posicionamento das placas sob a radiação UV. A Figura 7 mostra algumas fotografias da câmara proposta que apresenta 29 cm de largura, 19 cm de comprimento e 12 cm de altura. Na parte superior interna da câmara foram fixadas duas lâmpadas germicidas (Osram Puritec Hns S 11w) que emitem a radiação UV com comprimento de onda de 254 nm (Figura 8), necessárias a excitação do material fluorescente da sílica. Com esse arranjo, as lâmpadas apresentavam uma distância de cerca de 16,5 cm das placas cromatográficas. Na parte superior externa da câmara, e de forma centralizada, foram posicionados um filtro óptico de absorção com transmitância máxima em  $500 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$  (Figura 9 e 10) e uma *webcam* HD 720P C270 Logitech para permitir a obtenção de imagens digitais da placa.





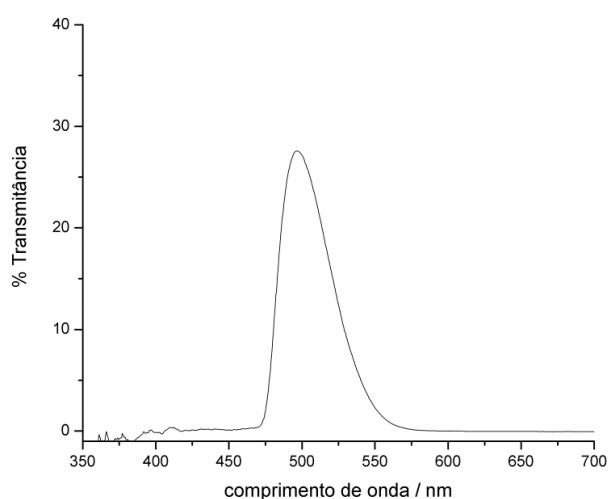
**Figura 7:** Visão geral da câmara relevadora.



**Figura 8:** Lâmpadas germicidas acopladas na parte superior de caixa.



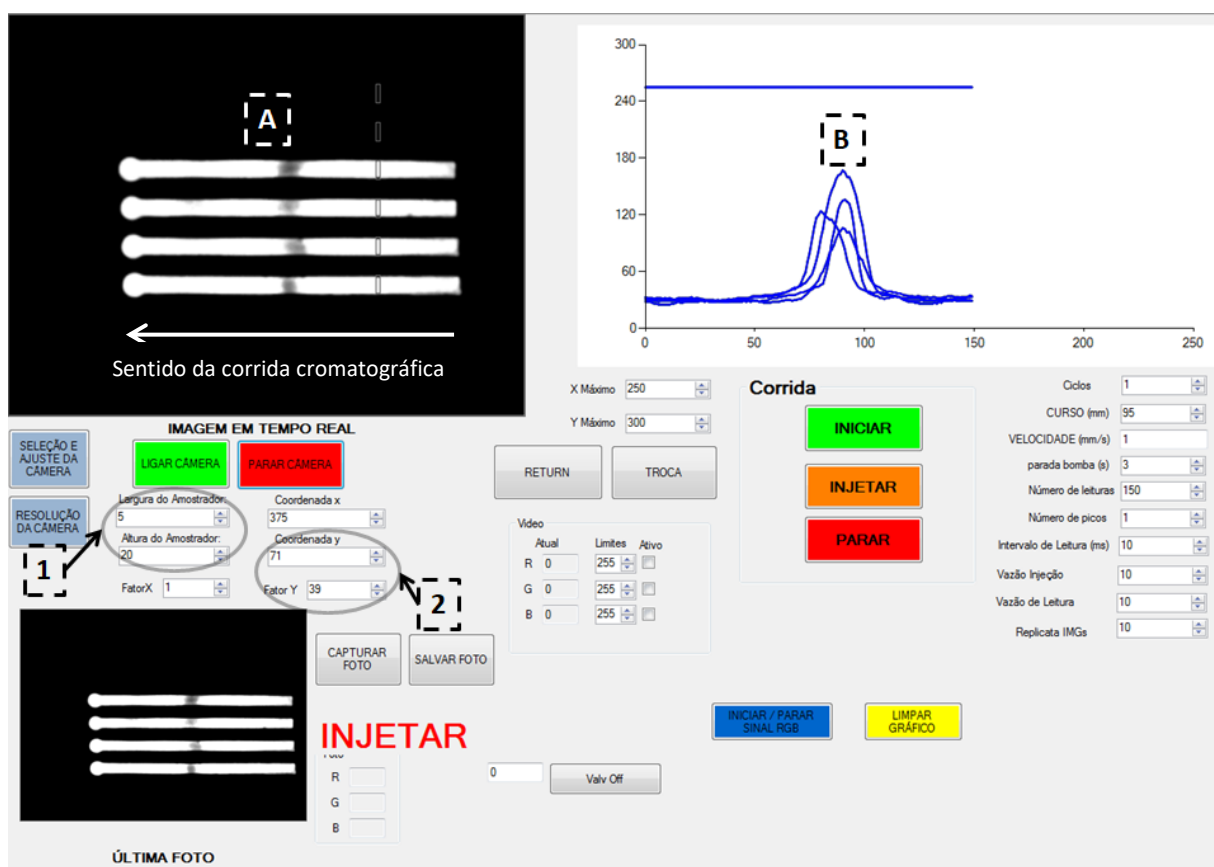
**Figura 9:** Filtro óptico de absorção utilizado na seleção do comprimento de onda da lâmpada fluorescente.



**Figura 10:** Espectro de absorção do filtro da Figura 9.

Com o objetivo de simplificar e diminuir os custos para detecção nos sistemas cromatográficos propostos foi desenvolvida uma estratégia que permite a detecção dos analitos separados utilizando a resposta colorimétrica baseada no sistema RGB de imagens digitais. Para isso, um programa de computador foi escrito em VisualStudio 2013 para permitir a aquisição do sinal em tempo real gerando cromatogramas em função da distância percorrida pelas substâncias nas placas cromatográficas.

A Figura 11 apresenta a interface ao usuário do programa desenvolvido, no qual a imagem obtida por uma webcam de alta definição (Logitech c270) é mostrada em tempo real em conjunto com seis amostradores de sinal RGB, consistindo de retângulos de tamanho variável que definem as regiões das imagens para as quais serão obtidos os sinais digitais médios para o conjunto de pixels contidos em seus interiores. Para a realização das medidas, o usuário define a largura e comprimento dos amostradores (número de pixels que serão lidos) e os posiciona imediatamente antes da região de aplicação das amostras nas placas cromatográficas. Durante a leitura, esses amostradores deslocam-se pixel a pixel no mesmo sentido de fluxo que percorreu a fase móvel e os valores dos sinais RGB são plotados concomitantemente para as seis regiões amostradas gerando dezoito cromatogramas (Sinais para R, G e B para cada um dos amostradores).



**Figura 11:** Interface do programa utilizado para obtenção dos cromatogramas. Visão da placa dentro da câmara relevadora (A). Cromatograma obtido pela leitura de pixels do programa (B). (1) e (2) regiões de ajuste do tamanho do amostrador e da distância entre os amostradores respectivamente.

No canto esquerdo da interface do programa encontram-se as janelas para seleção das configurações da câmera e as janelas que definem:

- Largura do amostrador: Define a largura do retângulo que obterá os sinais digitais

- Altura do amostrador: Define a altura do retângulo que obterá os sinais digitais

- Coordenada X: Define o posicionamento dos amostradores no sentido horizontal.

- Coordenada Y: Define o posicionamento dos amostradores no sentido vertical

- Fator Y: Define as distâncias no eixo Y entre os amostradores

Vale relatar que com os ajustes desses parâmetros é possível alinhar todos os amostradores e realizar a leitura cromatográfica em até seis canais, simultaneamente.

À direita da interface do programa, o usuário pode visualizar a aquisição em tempo real dos cromatogramas e ajustar alguns parâmetros necessários para a realização das medidas, como:

- Número de Leituras: Define o deslocamento em número de pixels necessário para realizar as leituras em todo o comprimento dos canais

- Replicatas: Define o número de medidas a serem realizadas para o amostrador em determinada posição (para cada posição do amostrador, durante as medidas, são realizadas n leituras de R G B dos pixels naquela posição, o que permite a obtenção de uma média dos sinais para cada posição).

De modo geral, o procedimento de leitura, utilizando o programa, consiste em posicionar a placa cromatográfica sob o foco da *webcam* e ajustar adequadamente os parâmetros de imagem como brilho, contraste, ganho, exposição, equilíbrio de branco, e intensidade de cor de forma que seja possível observar, com elevada nitidez, as

bandas cromatográficas após as corridas e secagem das placas. De fato, as configurações são ajustadas para fornecer uma imagem em escala de cinza, o que, para o estudo realizado, faz com que os sinais para R G e B apresentem a mesma magnitude durante as leituras, pois o sinal recebido não tem variação de cores, mas apenas de escalas de cinza. Realizado esse ajuste, os amostradores de R G B são devidamente posicionados e, ao clicar no botão iniciar, o usuário é solicitado a inserir um nome de arquivo que conterà, ao final das leituras, os dados da corrida.

Nos estudos realizados neste trabalho, utilizou-se amostradores de RGB com 5 pixels de largura e 20 pixels de altura e os parâmetros de imagem foram ajustados como:

- Exposição = 85,7 %
- Ganho = 18,7%
- Brilho = 12,0 %
- Contraste = 100 %
- Intensidade de cor = 0 %
- Equilíbrio de Branco = 100 %

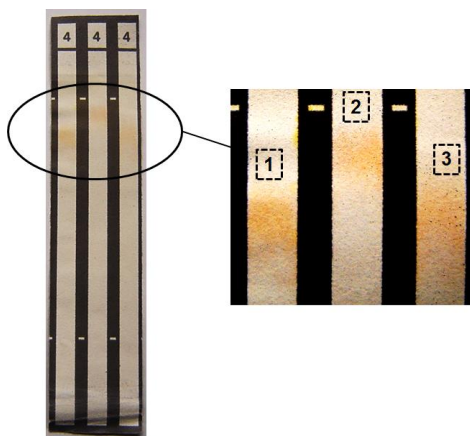
Antes das leituras, os amostradores de RGB eram posicionados, via software, imediatamente antes da região de aplicação das amostras/padrões nos canais cromatográficos e as leituras conduzidas pixel a pixel até atingir a região de parada do solvente.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Cromatografia em papel

A Figura 12 mostra a fotografia de um dos dispositivos de papel empregados na corrida cromatográfica realizada com os padrões de cocaína e levamisol aplicados em canais diferentes. Como pode ser observado, o procedimento utilizado não proporcionou uma distinção adequada das bandas de levamisol e de cocaína, sendo possível apenas distinguir entre as bandas de cocaína e lidocaína, a qual foi adicionada apenas para demonstrar o potencial de separação do método empregado.

Por se tratar de um material de baixo custo, o papel se torna bastante atrativo para as corridas cromatográficas *in loco*, mas, considerando os resultados obtidos, sua aplicação à separação do levamisol em amostras de cocaína parece inviável a partir do procedimento proposto. Assim, estudos adicionais, com fases móveis diferentes devem ser realizados com objetivo de potencializar a separação dessas substâncias no papel. Vale destacar, entretanto, que alguns ensaios foram realizados no presente trabalho empregando-se o papel sem impressão com cera e corridas com alguns solventes orgânicos puros, ou suas misturas (metanol, acetona, hexano, entre outros) não sendo observados resultados qualitativos satisfatórios para a separação dos analitos.



**Figura 12:** Dispositivo de papel empregado na corrida cromatográfica. Não é possível observar uma diferença significativa entre os fatores de retenção (RF) dos compostos,

onde a mancha 1 é a cocaína, 2 é a lidocaína e 3 o levamisol. O eluente utilizado nessa corrida foi o tampão fosfato pH 120,02 mol/L em glicose 3% (m/V).

#### 4.2 - AVALIAÇÃO DAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS FABRICADAS EM ÁCIDO POLILÁTICO (PLA) POR IMPRESSÃO 3D

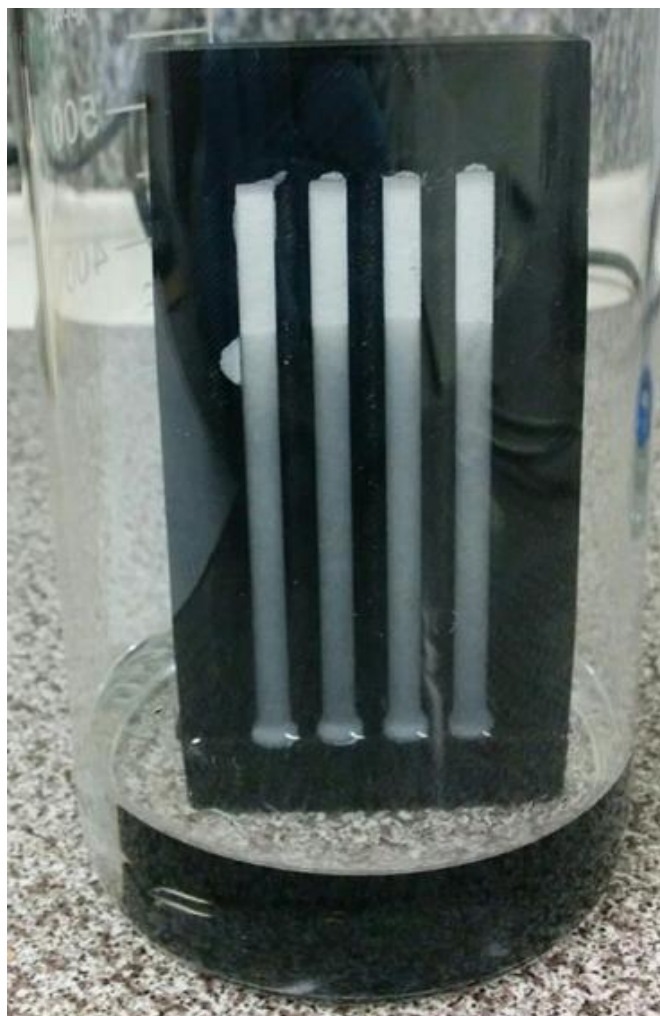
Os suportes mostrados na Figura 5 se mostraram uma alternativa eficiente e de baixo custo para o desenvolvimento de CCD, uma vez que a deposição da fase estacionária é realizada de maneira uniforme sem a necessidade de espalhamento controlado da suspensão de sílica sobre uma superfície, como é usualmente necessário quando se utiliza placas de vidro. Apesar disso, algumas limitações importantes foram observadas ao se utilizar o PLA como material de suporte, como a falta de inércia a muitos solventes orgânicos como acetona, hexano e diclorometano, além da baixa resistência do PLA a temperaturas elevadas, o que inviabiliza o procedimento de ativação da sílica. De fato, a literatura mostra que a sílica é ativada em temperaturas superiores a 110 °C e o PLA apresenta uma temperatura de transição vítrea (TG) de 60 °C [26]. Desse modo, em temperaturas superiores a TG, haverá deformação do molde que poderá afetar a estrutura da placa e dos canais. Apesar disso, a literatura mostra que algumas separações cromatográficas podem ser realizadas sem a ativação da sílica [26] e, por esse motivo continuou-se a avaliar o dispositivo proposto.

Outra constatação importante, observada durante o trabalho, foi a influencia da composição da sílica na aderência ao suporte PLA. Mesmo suspendendo a sílica utilizada com diferentes proporções de água e com o uso de gesso ( $\text{Ca.SO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ), como aglutinante, o sólido adsorvente apresentou baixa adesão ao suporte, não sendo possível a realização de corridas cromatográficas verticais. Foi evidenciado que a fase estacionária que permanecia em contato com o eluente durante as corridas desprendia-se do suporte afetando o desempenho da CCD.

Considerando esse aspecto, buscou-se alternativas para melhorar a fixação da sílica ao suporte. Desse modo, utilizando-se o procedimento descrito na seção 3.2.1, onde foi realizada a mistura da sílica com amido, onde obteve-se um desempenho plenamente adequado para o desenvolvimento de corridas ascendentes. Observou-se que, até mesmo a sílica que permanece em contato direto com a solução do eluente não foi removida do suporte, possibilitando o seu uso. Além disso, notou-se que o processo de deposição possibilitou que todos os canais do mesmo suporte apresentassem velocidades de corrida semelhantes. Como mostra a Figura 13, a frente do solvente se encontra em posições similares nas fases estacionárias após 5 minutos do início da corrida, o que pode indicar uma boa repetibilidade do processo de fabricação das placas cromatográficas.

Avaliando os resultados obtidos, pode-se afirmar que os suportes em PLA apresentaram limitações que podem dificultar a aplicação para algumas separações cromatográficas por CCD. Nesse sentido, encontra-se em fase de desenvolvimento um suporte a base de alumínio que deverá superar algumas dessas limitações.



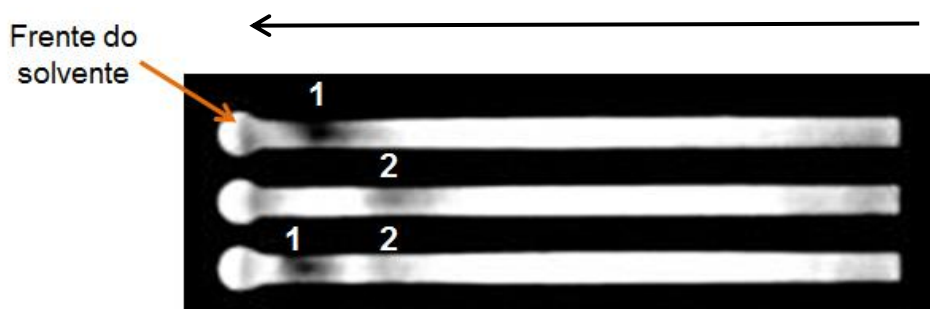


**Figura 13:** Corrida do solvente indicando a uniformidade da frente da corrida.

#### 4.2.1 - ESTUDOS PARA SEPARAÇÃO DE COCAÍNA E LEVAMISOL POR CCD

A Figura 14 mostra a imagem de uma corrida cromatográfica realizada com a sílica depositada em suporte de PLA com padrões de levamisol (5 mg/mL), cocaína (10 mg/mL) e também para a mistura das substâncias com mesma concentração dos padrões. O método utilizado na revelação faz uso de uma sílica fluorescente que responde ao comprimento de onda de 254 nm. Quando a placa é inserida na caixa reveladora, a sílica é vista emitindo luz branca enquanto que a cocaína e o levamisol são detectados por meio de bandas escuras, uma vez que a imagem foi ajustada para escala de cinza. Como pode ser observado, a separação das substâncias ocorre de

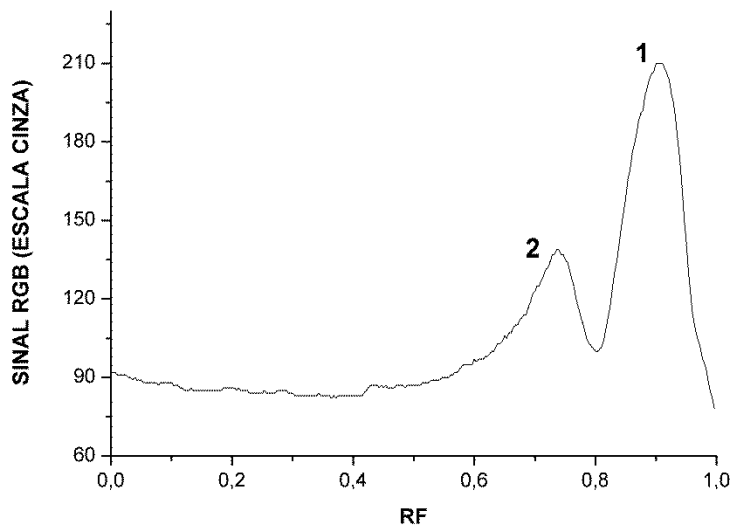
maneira satisfatória podendo-se distinguir com boa nitidez as bandas características para o levamisol e para a cocaína.



**Figura 14:** Imagem da placa de CCD proposta após a separação de levamisol (1) e cocaína (2). Os dois primeiros canais referem-se à corridas dos padrões puros e o último canal refere-se a corrida para mistura dos padrões. A seta indica o sentido da corrida.

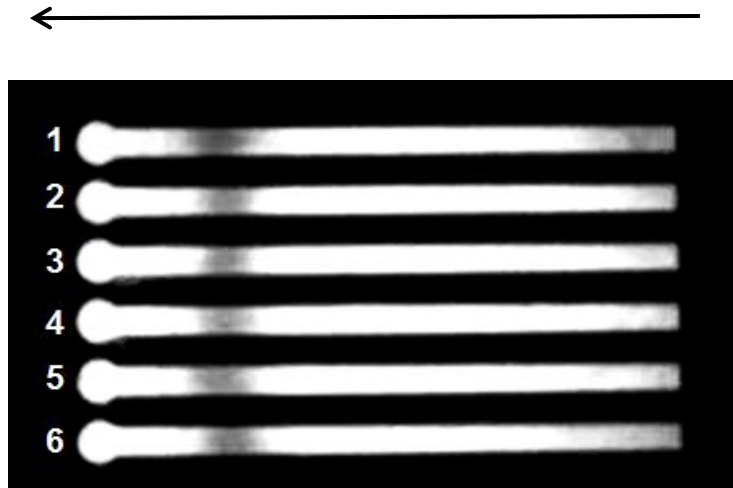
A Figura 15 traz o cromatograma obtido para a corrida realizada para a mistura das substâncias mostrada no último canal da imagem na Figura 14. Como pode ser observado, a estratégia baseada em imagem digital com escala de cinza permite distinguir os picos para o levamisol e cocaína com RFs estimados em 0,90 e 0,74 respectivamente. Observa-se também uma razão sinal/ruído adequada para as condições propostas.

Apesar destas constatações, nota-se no registro que não há uma separação completa das substâncias, o que pode ser verificado pela presença de um sinal acima do sinal da linha de base entre os picos cromatográficos. De fato, parte desse problema pode ser contornado otimizando-se o volume de aplicação da amostra, assim como a concentração das substâncias que, sabidamente, causam o alargamento das bandas.

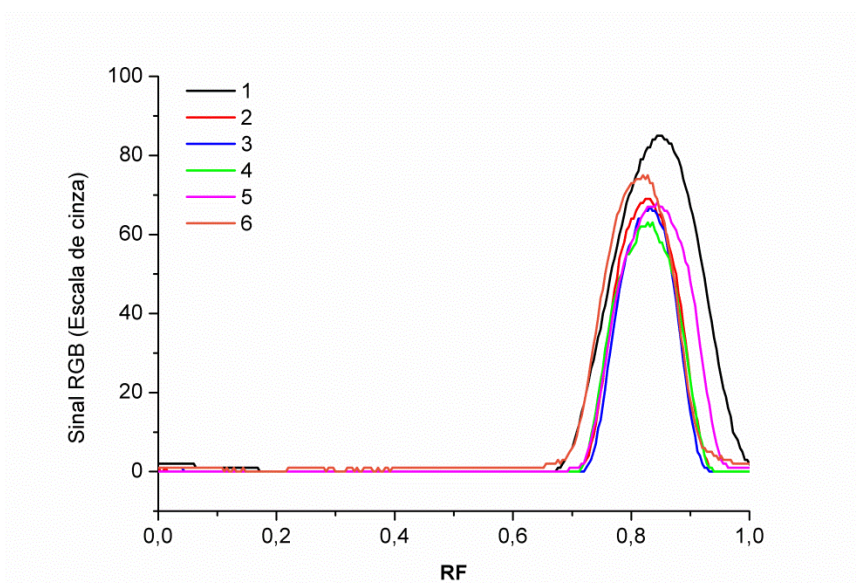


**Figura 15:** Cromatograma obtido para a separação de uma mistura de levamisol 5 mg/mL (1) e cocaína 10 mg/mL (2). Devido ao sentido da corrida, ficou constando que o Levamisol se desloca mais que a cocaína, quando o programa faz a leitura, o primeiro sinal detectado é o da cocaína, seguida pelo sinal do levamisol.

Utilizando a placa com seis canais realizou-se corridas cromatográficas com o mesmo padrão de levamisol 5 mg/mL com o objetivo de avaliar a repetibilidade de todo o processo, desde a fabricação do dispositivo até a detecção do sinal analítico. A Figura 16 mostra as bandas cromatográficas obtidas indicando um desempenho similar para todos os canais avaliados. Com base nos cromatogramas apresentados na Figura 17, estimou-se os valores de RF para os picos e as suas respectivas áreas. A Tabela 1 lista os valores encontrados acompanhados das médias e dos desvios padrões.



**Figura 16:** Imagem da placa de CCD proposta após a corrida com levamisol 5 mg/mL.



**Figura 17:** Cromatogramas obtidos após a corrida com levamisol 5 mg/mL.

**Tabela 1:** Resultados encontrados para as corridas com levamisol 5 mg/mL.

Pico	Área	Rf
1	12,8	0,85
2	7,3	0,83
3	6,6	0,83
4	6,9	0,83
5	8,6	0,84
6	8,9	0,82
Média	9,1	0,83
Desvio padrão	2,1	0,01
CV(%)	23,1	1,2

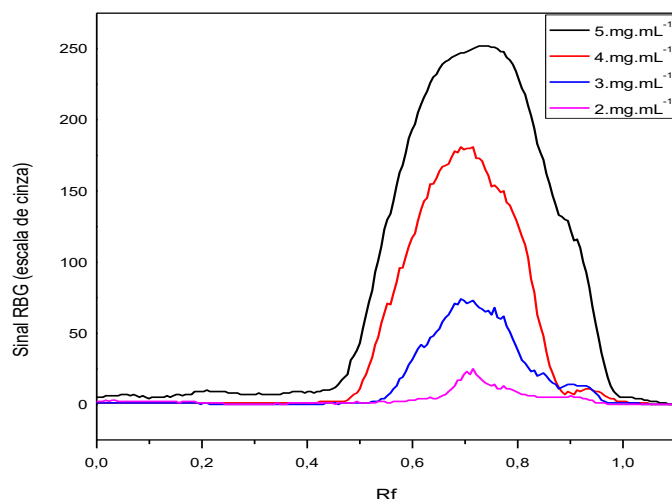
Como pode ser observado os valores de RF variaram pouco, sendo obtido, um valor médio de 0,83 com precisão, estimada pelo coeficiente de variação, de apenas 1,2 %, o que mostra que o procedimento é bastante reproduzível no que se refere ao RF. Entretanto, a precisão para as medidas de área variaram mais (CV = 23,1 %) o que certamente pode afetar as medidas quantitativas. Apesar disso, aplicando-se o teste Q aos dados de área, foi constatado que o valor para o pico 1 é anômalo, de modo que, com a exclusão desse valor, obtêm-se uma área média de 7,7 com desvio padrão de 1,0; fazendo com que o coeficiente de variação seja estimado em 13,0 %. Pode-se afirmar que este valor de precisão para a área é aceitável para aplicações

semi-quantitativas, porém acredita-se que melhorias na aplicação dos padrões e na uniformidade da iluminação da câmara relevadora possam tornar a técnica quantitativa.

Em outro estudo, procurou-se construir curvas analíticas realizando corridas com diferentes concentrações de Levamisol (2-5 mg/mL). Conforme ilustra a Figura 18, houve variações significativas nas intensidades da escala de cinza, aumentando gradativamente com o aumento da concentração e na Figura 19 observa-se o mesmo comportamento na variação dos picos dos padrões com concentrações entre 2 e 5 mg/mL, sendo que a resposta para o padrão com 5 mg/mL quase atingiu o máximo em Y (255), indicando uma possível saturação do sinal para concentrações maiores que 5 mg/mL.



**Figura 18.** Imagem da placa de CCD após a corrida com os padrões de Levamisol de 2 - 5 mg/mL.



**Figura 19.** Cromatogramas obtidos após a corrida com Levamisol variando as concentrações de 2 mg/mL a 5 mg/mL.

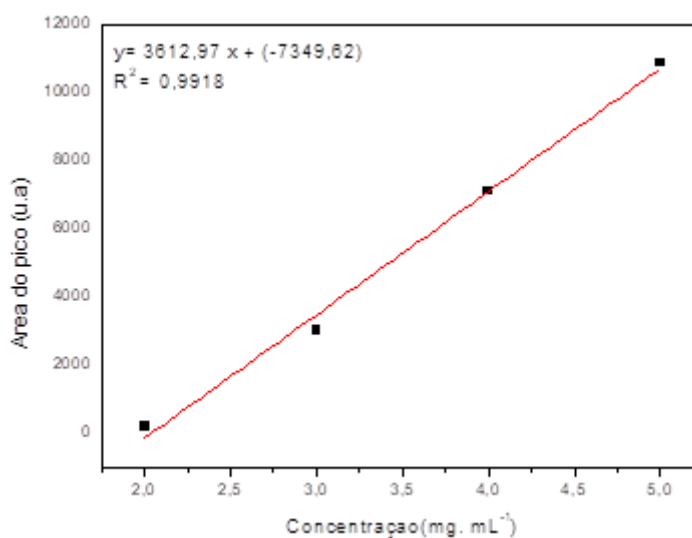
Com os sinais analíticos obtidos para os quatro padrões avaliados, construiu-se duas curvas analíticas, sendo uma baseada nas áreas dos picos (Figura 20) e a outra baseada nas alturas dos picos (Figura 21) empregando-se os valores listados na Tabela 2. O coeficiente de determinação encontrado com base na área dos picos foi de  $R^2 = 0,9918$  e com base na altura dos picos  $R^2 = 0,9926$ , indicando uma tendência linear dos dados, porém uma avaliação mais criteriosa, com maior número de padrões, deverá ser realizada para se estimar o potencial de aplicação da técnica proposta na determinação quantitativa do Levamisol.

É importante relatar que embora não tenha sido mostrado nas Figuras 14 e 18, a corrida obtida para aplicação da solução do branco não apresenta uma banda cromatográfica em escala de cinza na imagem, tampouco um pico detectável, de forma que o sinal para essa condição consiste basicamente em uma linha de base com variações ao redor do valor zero (sinal R G B). Considerando esse comportamento, estimou-se o limite de detecção apenas com base na curva analítica construída com as alturas dos picos, utilizando como sinal analítico mínimo detectável a média para o sinal da linha de base somada à três vezes o valor de seu desvio padrão. A partir dessa estratégia obteve-se o LD de 1,85 mg.mL.

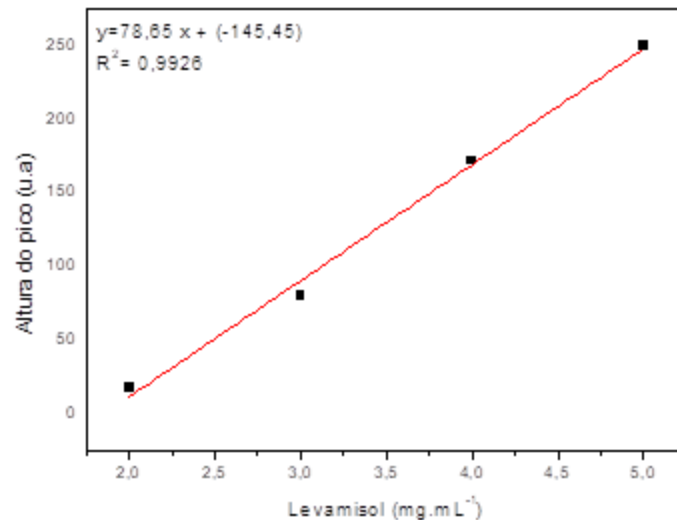
Com esses resultados pode-se afirmar que o método proposto apresenta um elevado potencial para aplicação na determinação de levamisol em amostras de cocaína. Entretanto, estudos com outros adulterantes além do levamisol deverão ser realizados para que seja melhor avaliado o uso dos dispositivos propostos.

**Tabela 2.** Valores de área e altura encontrados para os picos cromatográficos apresentados na Figura 18 e Figura 19

Concentração(mg/mL)	Área x 10 <sup>2</sup> (u.a)	Altura do Pico (u.a)
2	1,92	17,89
3	30,07	80,14
4	71,18	171,76
5	109	249,52



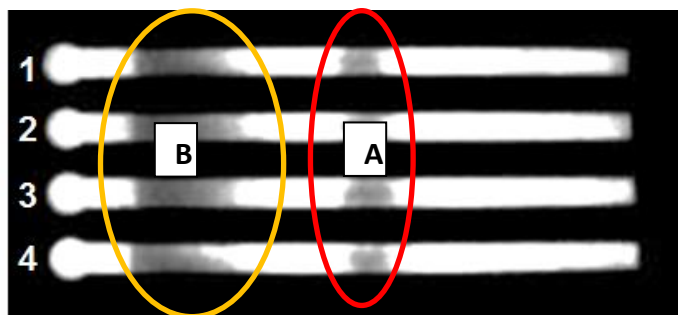
**Figura 20.** Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores de área apresentados na Tabela 2.



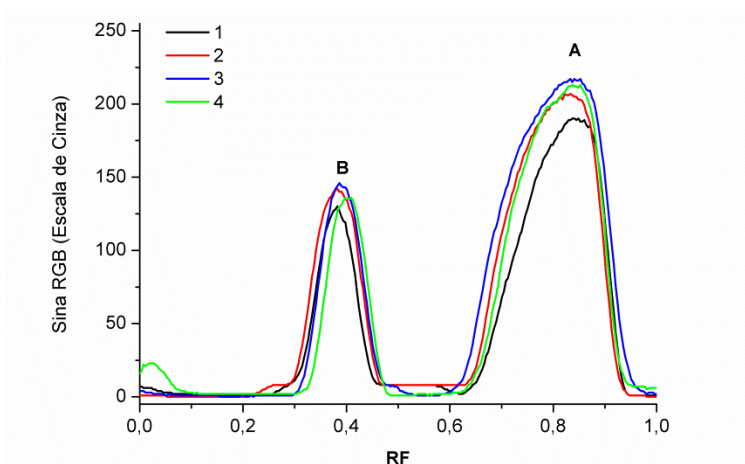
**Figura 21.** Curva analítica para determinação de Levamisol construída com os valores da altura do pico apresentados na Tabela 2.

A Figura 22 mostra uma fotografia para a separação de Cocaína base e Levamisol empregando-se uma placa com quatro canais, vale lembrar que os estudos mostrados na Figura 14 foram conduzidos com cocaína cloridrato. Como pode ser observado, a corrida com cocaína base e levamisol apresenta duas bandas cromatográficas, sendo uma delas possivelmente referente a cocaína, mais próxima do local de aplicação da amostra, e outra constituída por uma mistura de Levamisol com alguma impureza presente na amostra de cocaína analisada. De fato, o perfil de corrida obtido para aplicação de uma amostra contendo apenas cocaína base apresenta duas bandas similares à observada para a mistura de cocaína base com levamisol. Esse comportamento pode ter sido observado devido a uma possível ineficiência no processo de purificação da cocaína base pelo Instituto Nacional de Criminalística, porém isso deverá ser melhor investigado. De qualquer forma, em confirmando-se esse resultado poderá se obter uma resposta significativamente diferente para amostras de cocaína base e de cocaína cloridrato.





**Figura 22:** Imagem da placa de CCD proposta após a corrida para mistura de levamisol 5 mg/mL e cocaína 10 mg/mL. As manchas (A) são referente a cocaína e as manchas (B) são referentes ao levamisol.



**Figura 23:** Cromatograma obtido pelo programa desenvolvido *in lab* referente a Figura 22. O pico B se refere a cocaína e o pico A se refere ao levamisol.

Por fim, foi constatado novamente um bom desempenho em termos de RF e de áreas dos picos para a mistura com cocaína base e levamisol, sendo obtidos resultados semelhantes aos já destacados no início dessa seção. A Tabela 3 lista os dados que comprovam o relatado.

**Tabela 3.** Dados de área e RF referentes à Figura 23. Onde A é referente ao Levamisol e B é referente a cocaína.

Pico	Área Banda	Área Banda	RF Banda	RF Banda
	A	B	A	B
1	37,7	11,5	0,84	0,38
2	44,9	13,5	0,83	0,38
3	38,1	14,3	0,84	0,39
4	33,2	10,7	0,84	0,40
Média	38,5	12,5	0,84	0,39
Desvio padrão	4,8	17,0	0,01	0,01
CV(%)	12,6	13,6	1,2	2,6

## 5 – CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os dispositivos propostos para o desenvolvimento de CCD são uma alternativa viável para a fixação do material adsorvente ao substrato, facilitando todo o procedimento. Foi obtidos RFs satisfatórios para as placas feita com PLA, o que não pode ser observado ao tentarmos a separação com papel cromatografico. Apesar disso, substratos em PLA não são inertes à muitos solventes, de modo que, outros materiais deverão ser avaliados para sua substituição. As análises cromatográficas realizadas indicaram um desempenho satisfatório dos dispositivos para CCD e também do sistema de detecção baseado em imagens digitais com revelação por UV. Embora os resultados obtidos para a separação e quantificação de levamisol sejam ainda preliminares, pode-se afirmar que a estratégia proposta apresenta uma boa perspectiva para aplicação em amostras apreendidas de cocaína, com possibilidade de fornecer informações mais apuradas sobre esse material, de maneira simples, rápida e com baixo custo.

## 6 – BIBLIOGRAFIA

1. Karch SB. The history of cocaine toxicity. *Hum Pathol* 1989;20(11):1037-9
2. Bucher R. Drogas e drogadição no Brasil. Porto Alegre: Artes Médicas; 1992. p. 323.
3. Maia CRM, Juruena MFP. Cocaína: aspectos históricos, farmacológicos e psiquiátricos. *Rev AMRIGS* 1996;40(4):263-7
4. Nicastrí S. Fluxo sanguíneo cerebral em dependentes de cocaína. Relações entre psicopatologia e neuroimagem [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.
5. Haas LF. Coca shrub (*Erythroxylum coca*). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;50(1):25.
6. Moriarty KM, Alagna SW, Lake CR. Psychopharmacology. An historical perspective. *Psychiatr Clin North Am* 1984;7(3):411-33.
7. Laranjeira R, Nicastrí S. Abuso e dependência de álcool e outras drogas. In: Almeida OP, Dratcu L, Laranjeira R. *Manual de Psiquiatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p. 97-102.
8. Kopp P. A economia da droga. São Paulo: EDUSC; 1998. p. 274.
9. Gawin FH, Khalsa ME, Ellinwood E. Stimulantes. In: *Textbook of substance abuse treatment*. Ed. American Psychiatric Press Inc; 1994. p. 111-39
10. Coomber, R. the adulteration of drugs: what dealers do to illicit drugs, and what they think is done to them. *Addict. Res. Theory* 5, 297–306 (1997).
11. Schauben, J.L. Adulterants and substitutes. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 8, 595–611 (1990).
12. Brunt, t.M., Rigter, s., Hoek, J., Vogels, N., van Dijk, p. & Niesink, R.J. An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. *Addiction* 104, 798–805 (2009).
13. Chang, A & Osterloh, J & Thomas, J. (2010). Levamisole: A Dangerous New Cocaine Adulterant. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 88. 408-11. 10.1038/clpt.2010.156.
14. John, F. Casale, E.M.C., & Hays, p.A. Identification of levamisole impurities found in illicit cocaine exhibits. *Microgram* 6, 3–5 (2008).
15. Zhu, N.Y., Legatt, D.F. & turner, A.R. Agranulocytosis after consumption of cocaine adulterated with levamisole. *Ann. Intern. Med.* 150, 287–289 (2009).
16. El-DidamonyAM, Spectrophotometric determination of benzydamine HCl, levamisole HCl and mebeverine HCl through ion-pair complex formation with methyl range. *SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2008; 69(3):770-775
17. Garcia JJ, Diez MJ, Sierra M, Terán MT, Determination of levamisole by HPLC in plasma samples in the presence of heparin and pentobarbital. *Journal of Liquid Chromatography*, 1990; 13(4):743-749
18. deBukanski BW, Degroodt JM, Beernaert H, Determination of levamisole and thiabendazole in meat by HPLC and photodiode array detection. *ZeitschriftfürLebensmittelUntersuchung und Forschung*, 1991; 193(6):545-547.
19. Marriner S, Galbraith EA, Bogan JA, Determination of the anthelmintic levamisole in plasma and gastro-intestinal fluids by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 1980; 105(1255):993-996
20. Vandamme TF, Demoustier M, Rollmann B, Quantitation of levamisole in plasma using high performance liquid chromatography. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 1995; 20(2):145-149.
21. Sari P, Sun J, Razzak M, Tucker IG, HPLC assay of levamisole and abamectin in sheep plasma for application to pharmacokinetic studies. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 2006; 29(15):2277-2290.

22. Du Preez JL, Lötter AP, Solid-phase extraction and HPLC determination of levamisole hydrochloride in sheep plasma. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 1996; 63(3):209.
23. Sari P, Razzak M, Tucker IG, Rapid, simultaneous determination of levamisole and abamectin in liquid formulations using HPLC. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 2005; 27(2):351-364
24. Cannavan A, Blanchflower WJ, Kennedy DG, Determination of levamisole in animal tissues using liquid chromatographythermospray mass spectrometry. *Analyst*, 1995; 120(2):331- 333
25. Chappell CG, Creaser CS, Stygall JW, Shepherd MJ, On-line high-performance liquid chromatographic/gas chromatographic/tandem ion trap mass spectrometric determination of levamisole in milk. *Biological mass spectrometry*, 1992; 21(12):688-692.
26. Introdução a métodos cromatográficos / coord. Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. -- 7.ed. -- Campinas, SP : Editora UNICAMP, 1997.
27. C.H. Collins, *Sci. Chromatogr. (São Carlos)*, 1, no. 4, 7 (2009).
28. Tosato, Flávia, et al. "Direct quantitative analysis of cocaine by thin layer chromatography plus a mobile phone and multivariate calibration: a cost-effective and rapid method." *Analytical Methods* 8.42 (2016): 7632-7637.
29. M. L. Menezes, G. A. Muzardo, M. S. Chaves, *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.*, 27 (2004) 1799.
30. P. Fernandez, L. Morales, *Forensic Sci. Int.* 161 (2006) 31.
31. F. Tagliaro, R. Valentini et al., *Forensic Sci. Int.* 107 ( 2000) 121.
32. F. S. Romolo, M. Rotolo, et al., *Forensic Sci. Int.* 138 (2003) 17.
33. M. Montagna, A. Polentini et al. *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 79
34. L. Skender, V. Karacic, et al., *Forensic Sci. Int.* 125 (2002) 120.
35. O. Quintela, A. M. Bermejo et al., *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 273.
36. M. C. Ricossa, M. Bernini, F. De Ferrari, *Forensic Sci. Int.*, 107 (2000) 301.