



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Química e Biológica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES MINORITÁRIOS EM
AMOSTRAS DE COCAÍNA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR
DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)**

DINA RAQUEL DA SILVA

ORIENTADOR: Dr. ADRIANO OTÁVIO MALDANER

Brasília, DF

2016



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Química e Biológica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES MINORITÁRIOS EM AMOSTRAS DE COCAÍNA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)

DINA RAQUEL DA SILVA

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília, DF

2016

DINA RAQUEL DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES MINORITÁRIOS EM AMOSTRAS DE COCAÍNA POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA (CG-DIC)

Banca examinadora da
Dissertação para obtenção do grau de mestre em química.

Dr. Adriano Otávio Maldaner
orientador/presidente

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
1º examinador

Dr. Jorge Jardim Zacca
2º examinador

Brasília, DF

2016

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo presente da vida, cuidado e proteção.

Aos meus pais, irmãos e irmãs e aos amigos: Sou imensamente grata por minha enorme família: amo vocês.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Adriano Otávio Maldaner, por me aceitar em seu projeto, por me incentivar e animar, pela paciência, humildade e sabedoria com as quais me orientou e conduziu este trabalho. Obrigada mestre!

Agradeço ao chefe do SEPLAB/INC Élvio Dias Botelho por apoiar e possibilitar a realização deste trabalho, bem como à toda equipe do SEPLAB/INC.

Em especial, agradeço à Fernanda pelo apoio, interesse e disposição em colaborar; à Talita por auxiliar com reagentes e outros materiais de laboratório, disponibilizando-os com eficiência; ao Maurício, por contribuir com este trabalho com suas valiosas dicas sobre o equipamento, CG-DIC e sobre o método; à Diana, pelas conversas e trocas de experiências no laboratório; ao Giba, Marcão, Camargo, Leandro e Lúcio, por manterem sempre o ambiente leve e descontraído.

Agradeço à Millena e ao Fillipe por contribuírem com este projeto realizando parte das análises das amostras reais de cocaína.

Agradeço aos meus chefes no Laboratório Central da CAESB-DF, Cristine Cavalcanti e Bruno Dias, por flexibilizarem os meus horários, quando necessário.

Aos meus colegas de trabalho pelo suporte nas atividades diárias no laboratório da CAESB-DF neste período, pelo carinho e pela amizade. Em especial, agradeço à Márcia e à Ercília por me encorajar.

Agradeço às minhas amigas, colegas de trabalho e de mestrado Adrienne Fontinele e Karina Ferraz, pelo companheirismo, por suas sugestões e por proporcionarem discussões enriquecedoras.

Ao Instituto de Química, bem como aos professores, funcionários, colegas e membros da banca examinadora pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

À FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
<i>Keywords</i> : Validation. Gas chromatography (GC-FID). Cocaine. Minor alkaloids.	xiii
1 INTRODUÇÃO	11
1.1. Cocaína.....	11
1.1.1 Processos de obtenção da cocaína a partir das folhas de coca.....	12
1.1.2 Formas de Apresentação da cocaína.....	13
1.2 Caracterização e perfil químico da cocaína	14
1.3 Alcaloides minoritários da cocaína	18
1.4 Cromatografia gasosa na caracterização de drogas ilícitas	22
1.5 Derivatização química.....	23
1.6 Validação de métodos analíticos.....	27
1.7 Figuras de mérito.....	29
1.7.1 Seletividade.....	29
1.7.2 Linearidade e faixa linear	30
1.7.3 Limite de detecção (LD).....	31
1.7.4 Limite de quantificação (LQ)	33
1.7.5 Exatidão	33
1.7.6 Precisão.....	35
1.7.7 Robustez	36
1.7.8 Estabilidade.....	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES MINORITÁRIOS EM AMOSTRAS DE COCAÍNA	40

3.1	Materiais e métodos	40
3.1.1	Vidrarias e acessórios	40
3.1.2	Equipamento analítico	41
3.1.3	Reagentes, solventes e padrões de referência utilizados.....	41
3.2	Desenvolvimento do método analítico.....	42
3.2.1	Preparação da solução de padrão interno.....	42
3.2.2	Preparação das soluções dos pontos da curva analítica	43
3.2.3	Homogeneização das amostras reais	44
3.2.4	Preparação das amostras reais de cocaína e controles do método analítico e brancos .	44
3.2.5	Condições cromatográficas do método desenvolvido	45
3.2.6	Calibrações e manutenção	45
3.3	Validação do método analítico.....	47
3.3.1	Seletividade.....	47
3.3.2	Linearidade	48
3.3.3	Limite de detecção e limite de quantificação.....	49
3.3.4	Precisão.....	49
3.3.5	Exatidão	50
3.3.6	Robustez	51
3.3.7	Estabilidade.....	51
3.4	Resultado e discussão.....	52
3.4.1	Parâmetros de validação	52
3.4.2	Análise das amostras reais	79
4	CONCLUSÃO	80
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	ANEXO 1.....	86
	ANEXO 2.....	96
	ANEXO 3.....	97
	ANEXO 4.....	99
	ANEXO 5.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da cocaína	12
Figura 2- Conversão química entre cocaína base livre e cloridrato de cocaína	13
Figura 3-Principais alcaloides minoritários presentes nas folhas de coca.....	18
Figura 4- Alcaloides minoritários obtidos por oxidação da cocaína por KMnO ₄	19
Figura 5-Reações de hidrólise da cocaína	20
Figura 6 – Outros alcaloides obtidos por desidratação e hidrólise da cocaína	20
Figura 7 - Fluxograma DEA/EUA para determinação de origem geográfica da planta de coca	21
Figura 8 - Estrutura química dos reagentes sililantes	24
Figura 9 - Alcaloides minoritários derivatizados	26
Figura 10- Seletividade (1) fenacetina: tr = 7, 027; e para a (2) ecgonina.2TMS: tr= 7,117 .54	
Figura 11- Seletividade (LPS) para (1) fenacetina: tr = 4, 696 min.; e para a (2) ecgonina.2TMS: tr= 4,737 min.	56
Figura 12- Seletividade (1) levamisol: tr = 8, 802 min.; e para a (2) tropacocaína: tr= 8, 911 min.	56
Figura 13- Curva analítica da Anidroecgonina metil éster	59
Figura 14- Curva analítica da Anidroecgonina.TMS	59
Figura 15- Curva analítica da Metilecgonina.TMS	59
Figura 16- Curva analítica da Tropacocaína.....	60
Figura 17- Curva analítica da Norcocaína.TMS.....	60
Figura 18- Curva analítica da N-Formilcocaína	61
Figura 19- Curva analítica da 3,4,5-Trimetoxicocaína.....	61
Figura 20 - Curva analítica da Ecgonina.2TMS	62
Figura 21- Curva analítica da Benzoilecgonina.TMS	62
Figura 22- Curva analítica da <i>trans</i> -Cinamoilcocaína.....	63
Figura 23 - Resíduos para anidroecgonina metil éster	66
Figura 24- Resíduos para <i>trans</i> -cinamoilcocaína	66
Figura 25 – Gráficos de resíduos para alguns dos analitos em estudo	96
Figura 26 – Cromatograma típico de uma amostra de cocaína	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação robustez pelo teste de Youden	37
Tabela 2 - Comparação entre os parâmetros dos métodos de referência e do método desenvolvido.....	46
Tabela 3 - Amostras analisadas no ensaio de seletividade	47
Tabela 4 - Faixa de concentração dos analitos na curva analítica 1	49
Tabela 5 - Faixa de concentração dos analitos na curva analítica 2	49
Tabela 6 - Variação dos parâmetros para cada combinação ensaiada	51
Tabela 7 – Amostras para ensaio de estabilidade	52
Tabela 8 - Seletividade dos compostos minoritários de cocaína- método “DEA-EUA”	53
Tabela 9 - Seletividade dos compostos minoritários de cocaína - método “LPS-França”	55
Tabela 10 - Linearidade do método de quantificação de compostos minoritários	58
Tabela 11 - Resumo dos resultados da análise de variância das curvas analíticas	64
Tabela 12 - Resumo dos resultados da análise de variância das curvas analíticas	64
Tabela 13- Teste de Grubbs para resíduos.....	65
Tabela 14 – Limites de detecção e quantificação	67
Tabela 15 - Repetitividade do equipamento CG-DIC	68
Tabela 16 - Repetitividade do método analítico	68
Tabela 17- Avaliação de precisão intermediária	69
Tabela 18 - Avaliação da exatidão - nível alto de concentração	70
Tabela 19 - Avaliação da exatidão - nível médio de concentração	70
Tabela 20 – Avaliação da exatidão - nível baixo de concentração.....	71
Tabela 21- Teste t de Student para avaliação da exatidão do método.....	72
Tabela 22– Avaliação de significância dos efeitos das variações sobre o método analítico....	73
Tabela 23 - Comparação entre a concentração do método original e do método com variações	74
Tabela 24 - Comparação entre a concentração do método original e do método com variações	75
Tabela 25- Resoluções do método original e o método com variações	76

Tabela 26 – Avaliação da estabilidade das soluções à temperatura ambiente.....	77
Tabela 27 – Avaliação da estabilidade das soluções conservada em freezer	78
Tabela 28 - Curva analítica da Anidroecgonina metil éster	86
Tabela 29 - Curva analítica da Anidroecgonina.TMS	87
Tabela 30 - Curva analítica da Metilecgonina.TMS	88
Tabela 31- Curva analítica da Tropacocaína	89
Tabela 32-Curva analítica da Norcocaína.TMS	90
Tabela 33 - Curva analítica da N-formilcocaína	91
Tabela 34 - Curva analítica trimetoxicocaína.....	92
Tabela 35 - Curva analítica ecgonina	93
Tabela 36 - Curva analítica benzoilecgonina	94
Tabela 37- Curva <i>trans</i> -cinamoilcocaína	95
Tabela 38 - Valores críticos de Grubbs a 95% de confiança.....	97
Tabela 39 - Teste de Grubbs para os resíduos das curvas analíticas	98
Tabela 40 - Resultados das análises para amostras reais	99
Tabela 41 - Resultados das análises para amostras reais	100
Tabela 42 - Resultados das análises para amostras reais	101
Tabela 43 - Resultados das análises para amostras reais.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSTFA: [N, O-bis- (trimetilsilil) -trifluoroacetamida]

BSA: [N,O-bis-(trimetilsilil)-acetamida]

CG: Cromatografia gasosa

CG-EM : Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CG-DIC: Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV-visível

CV: Coeficiente de variação

DEA: *Drug Enforcement Administration*

DPR: Desvio padrão relativo

EURACHEM: *Analytical Chemistry in Europe* (organização Europeia dedicada à promoção da comparabilidade e qualidade de medições e exames em química)

FTIR-ATR: *Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

HPLC: *High performance liquid chromatography*

HS-GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando amostragem por *headspace*

ICH: *International conference on harmonization*

INC: Instituto Nacional de Criminalística

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO/IEC: *International Organization for Standardization /International Electrotechnical Commission*

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LPS: *Laboratoire de Police Scientifique*

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MINOR: Minoritários

MSTFA: [N-Metil-N-trimetilsililfluoroacetamida]

MRC: Material de referência certificado

NFI: *Netherlands Forensic Institute*

PEQUI: Projeto de perfil químico

POP: Procedimento Operacional Padrão

SEPLAB: Serviço de Perícias de Laboratório e Balística

TFA: trifluoroacetamida

TMSI: N-trimetilsililimidazol

TMCS: trimetilclorosilano

TMS: trimetilsilil

UNODC: *United Nations Office on Drugs and Crime*

RESUMO

A cocaína é uma das drogas mais usadas em todo o mundo e seu uso indiscriminado tem se tornado um grande problema de magnitude mundial. O uso abusivo da droga tem impulsionado estudos científicos sobre sua caracterização química. A análise dos alcaloides minoritários da cocaína pode ser utilizada para estabelecer conexões entre amostras de diferentes apreensões e, dessa forma, desempenhar um papel importante na obtenção de dados relacionadas ao perfil químico da droga. O estabelecimento de métodos analíticos para análises de drogas de abuso é uma tarefa de grande importância nos serviços de química forense, que os utilizam tanto para produção de provas materiais quanto na obtenção de dados de inteligência. Este trabalho apresenta o desenvolvimento e a validação de método para a identificação e quantificação de alcaloides minoritários em amostras de cocaína provenientes de apreensões policiais, utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC), após etapa de derivatização com solução de N-metil-N-TMS-trifluoroacetamida / Piridina (*MSTFA/Py*). Para assegurar que o método analítico de fato é adequado para o propósito para o qual foi desenvolvido, foi realizado o processo de validação conforme normatizado no sistema de gestão da qualidade do laboratório de química forense da Polícia Federal. O método mostra coeficientes de determinação acima de 0,999 para todos os analitos e seletividade satisfatória, por não apresentar coeluição significativa entre alcaloides minoritários. Apresentou precisão satisfatória, com coeficiente de variação (CV%) inferior a 5% tanto na análise no CG-DIC como do método analítico. Para a precisão intermediária, os valores de CV% ficaram abaixo de 10%. O método também se mostrou robusto diante das variações aplicadas em diversos parâmetros analíticos e apresentou boa exatidão. Para verificar a confiabilidade do método analítico foram aplicados testes estatísticos para verificar a existência de dados discrepantes para cada nível de concentração, homogeneidade das variâncias dos resíduos de regressão, significância da regressão e desvio da linearidade na faixa de trabalho. O método se mostrou capaz identificar e quantificar simultaneamente dez alcaloides minoritários em amostras de cocaína: anidroecgonina metil éster, anidroecgonina, metilecgonina, tropacocaína, norcocaína, N-formilcocaína, trimetoxicocaína, ecgonina, benzoilecgonina e *trans*-cinamoilcocaína.

Palavras-chave: Validação, Cromatografia gasosa (CG-DIC). Cocaína. Alcaloides minoritários.

ABSTRACT

Cocaine is one of the most used drug over the world and its indiscriminate use has become a worldwide problem of huge magnitude. The abuse of the drug of abuse has been propelling several scientific studies about cocaine chemical characterization. The cocaine minor alkaloids analysis can be used to stablish connections among samples from different seizures and can play an important role in the data acquisition related to the drug chemical profile. The establishment of analytical methods to drug analysis is an important task to the forensic chemistry services, which makes use of them to both obtain evidences and intelligence data. This work presents the development and validation of a methodology to identify and quantitate minor alkaloids in cocaine samples seized by the police, using gas chromatography with flame inducted detector (GC-FID), after a derivatization step using N-Trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide/Pyridine (MSTFA/Py) solution. To assure that the analytical method is indeed suited to the purpose it was developed, a validation process was conducted following the normative of the quality management system of the Federal Police forensic chemistry laboratory. The method presents determination coefficients above 0.999 to all analytes and satisfactory selectivity, since there is no coelution between minor alkaloids. The precision was considered adequate, with coefficient of variation (CV%) below 5% both to the GC-FID analysis and analytical method. To the intermediate precision the CV% are below 10%. The method is also rugged face to analytical parameter variations and also showed good accuracy. To verify the analytical method reliability, there were applied statistical tests to verify the occurrence of discrepant data to each level of concentration, variance homogeneity of the regression residues, significance of the regression and shift of the linearity within the working range. The method proves to be capable to identify and quantitate ten minor alkaloids at the same time in cocaine samples: anhydroecgonine methyl ester, anhydroecgonine, methylecgonine, tropacocaine, norcocaine, N-formylcocaine, trimethoxycocaine, ecgonine, benzoylecgonine and *trans*-cinnamoylcocaine.

Keywords: Validation. Gas chromatography (GC-FID). Cocaine. Minor alkaloids.

1 INTRODUÇÃO

O relatório mundial sobre drogas de 2015, do *United Nations Office On Drugs And Crime*, UNODC, evidencia uma diminuição no cultivo dos arbustos de coca em comparação à década de 1980, quando as primeiras estimativas se tornaram disponíveis. Segundo o relatório cerca de 246 milhões de pessoas, equivalente a um pouco mais de 5% da população mundial entre 15 e 64 anos de idade, usaram drogas ilícitas em 2013, dentre as quais está a cocaína.

Na América do Sul, estimou-se um aumento na taxa anual do uso de cocaína de 0,7% em 2010 (1,84 milhões de usuários) para 1,2% em 2012 (3,34 milhões de usuários). Tais números são equivalentes a três vezes o nível de consumo médio global estimado, que se manteve no mesmo nível em 2013. No Brasil, por meio da extrapolação de dados de uma pesquisa entre os estudantes universitários, o UNODC estimou o uso de cocaína por 1,75% entre os adultos população do país.

Ainda segundo o relatório do UNODC 2015, o Brasil é o maior mercado de cocaína na América do Sul, onde o consumo de cocaína tem aumentado e, por conseguinte, impulsionado o aumento do consumo da droga em países como o Chile e a Costa Rica. Devido à sua posição geográfica, o Brasil desempenha um papel estratégico também no tráfico internacional de cocaína. O relatório mostra que o número de apreensões no país dobrou em 2013, chegando a mais de 40 toneladas de cocaína.¹

1.1. Cocaína

A cocaína é um alcaloide de origem natural extraído das folhas de plantas do gênero *Erythroxylum*, Figura 1. Esse gênero contém aproximadamente 230 espécies de árvores tropicais e arbustos, sendo que aproximadamente 187 são nativas da região neotropical, que inclui a parte sul da América do Norte e as Américas Central e do Sul. As demais espécies estão distribuídas em outras regiões tropicais da África e Madagascar.² Apesar de 200 espécies serem encontradas na América do Sul, onde ocorre o maior cultivo da planta para a produção da droga, apenas quatro variedades produzem teores significativos de cocaína, *Erythroxylum coca var. coca*, *Erithroxylum coca var. ipadu*, *Erithroxylum novogranatense var. novogranatense* e *Erithroxylum var. novogranatense var. truxillense*.^{3,4}

As folhas destas quatro variedades, conhecidas como “folhas de coca”, apresentam teores de alcaloides totais (cerca de 20 substâncias químicas diferentes) que variam de 0,5% a 1,5% na folha seca, dos quais aproximadamente 75% são correspondentes à cocaína.

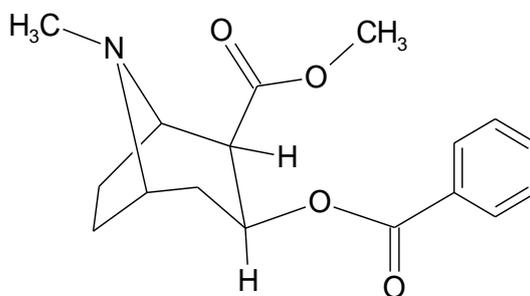


Figura 1- Estrutura química da cocaína

1.1.1 Processos de obtenção da cocaína a partir das folhas de coca⁵⁻⁸

A obtenção de cocaína a partir das folhas de coca envolve três etapas:

- I. Extração da pasta base de cocaína a partir das folhas de coca;
- II. Purificação da pasta base de cocaína;
- III. Conversão de cocaína base em cloridrato de cocaína;

As folhas secas ao sol do gênero *Erythroxylum coca* são misturados com uma substância alcalina, tal como carbonato de cálcio, e extraída com querosene (ou outro hidrocarboneto). Subsequentemente, a fase orgânica é filtrada e misturada com ácido sulfúrico diluído. Após a separação dos solventes imiscíveis, a fase ácida é tornada básica com hidróxido de amônio, de sódio, ou outra substância alcalina, para precipitação dos alcalóides. O precipitado é isolado e seco e o produto final desta etapa será a pasta base de cocaína ou pasta de coca.

A preparação da cocaína base a partir de pasta base é feita por reação de oxidação, onde ela é redissolvida em solução de ácido sulfúrico e uma solução de permanganato de potássio é adicionada. O precipitado é filtrado e os alcaloides são precipitados novamente na solução resultante por adição de uma substância alcalina. As cinamoilcocaínas, após a oxidação de suas duplas ligações com KMnO₄, são hidrolisadas para ecgonina, que é removida após a precipitação de cocaína base, por diferença de solubilidade.

A cocaína base é convertida em cloridrato de cocaína (cocaína.HCl) pela dissolução em solvente orgânico, como éter dietílico, seguido da adição de HCl concentrado em acetona ou etanol. A cocaína cloridrato, que é um precipitado branco, é filtrado e seco.

A cocaína, por ser uma base orgânica fraca, é capaz de reagir com soluções aquosas de ácidos orgânicos ou inorgânicos formando sais como o cloridrato de cocaína que, por sua vez, é facilmente convertido em base livre pela adição de bases inorgânicas como NaOH ou Na_2CO_3 (Figura 2).^{2,9}

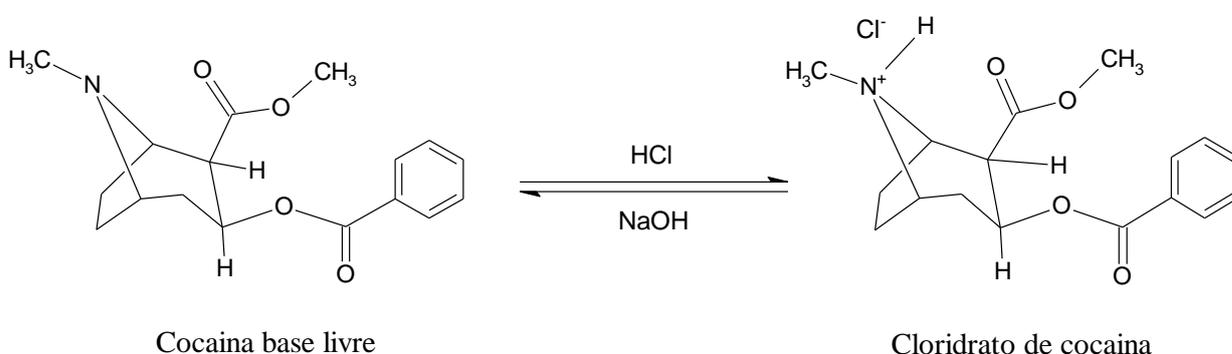


Figura 2- Conversão química entre cocaína base livre e cloridrato de cocaína

Há uma grande variedade de produtos químicos capazes de atuar com eficiência nas etapas de extração, purificação e refino (conversão da cocaína base livre em cloridrato de cocaína). A produção ilícita de cocaína envolve, preferencialmente, solventes e produtos químicos mais baratos e de pronta disponibilidade. Com a escassez de um reagente, os traficantes podem utilizar outro com características químicas semelhantes.⁹

1.1.2 Formas de Apresentação da cocaína

A cocaína tem diferentes formas de apresentação, que dependem da etapa de produção da droga e/ou do tipo de consumo a que se destina. Algumas das formas mais relevantes para este trabalho são:

- Pasta base

Cocaína na forma de base livre, corresponde ao primeiro produto obtido a partir da extração de folhas de coca, onde as folhas são imersas em soluções ácidas como ácido sulfúrico ou alcalinas, como óxido de cálcio ou carbonato de sódio. Apresenta normalmente coloração bege ou pardacenta mais escura e presença significativa de alcaloides como *cis* e *trans*-cinamoilcocaína.

- Cocaína Base

Cocaína na forma de base livre, é a pasta base refinada, isto é, que sofreu processos de oxidação com permanganato de potássio ou lavagens com ou etanol, por exemplo, que removem impurezas coloridas e alcaloides como *cis* e *trans*-cinamoilcocaína.

- Cloridrato de cocaína

Cocaína na forma de sal preparado pela reação de cocaína base com ácido clorídrico e precipitado em solventes orgânicos (éter etílico, acetona, acetatos de etila e n-butila, por exemplo) e normalmente apreendida na forma de pó de coloração branca.

1.2 Caracterização e perfil químico da cocaína

As drogas ilícitas são misturas complexas que de maneira geral contém, além da droga principal, diversas substâncias em sua composição que estão relacionadas à maneira como foram produzidas. Durante a produção da cocaína ilícita as etapas de extração e purificação/refino demandam o uso diversos insumos químicos como ácidos, bases, oxidantes e solventes, que podem deixar traços no produto final, ou mesmo produzir alterações específicas na estrutura química de alguns dos componentes da droga.¹⁰

Métodos tradicionais de caracterização de perfil químico convencionais baseiam-se na determinação e na quantificação de analitos presentes na droga, identificando, por exemplo, as impurezas orgânicas presentes.

Segundo a UNODC,¹¹ drogas ilícitas, que são produzidas em laboratórios clandestinos, possuem uma grande variabilidade em sua composição podendo ter até três tipos de componentes principais:

Componentes naturais estão presentes em matérias-primas (folha de coca, ópio, etc.), usado para a produção de certas drogas de origem vegetal, como a cocaína ou heroína, que são co-extraídos durante a produção da droga e não são completamente removidos do produto final.

Subprodutos são substâncias geradas durante a produção, transporte e armazenamento da droga e estão relacionadas com o método de fabricação utilizado.

Adulterantes e Diluentes podem ser adicionados em qualquer ponto da cadeia de distribuição, posterior ao processo de produção da droga. Algumas dessas substâncias não possuem efeitos farmacológicos e são adicionadas apenas para aumentar o volume do produto final (diluente). Outras possuem efeitos farmacológicos e alteram ou potencializam os efeitos da droga (adulterantes).

A análise de todos os componentes de uma amostra, em teoria, proporciona uma "história" completa do material, e pode, por conseguinte, desempenhar um papel chave na caracterização de seus perfis químicos. Como as autoridades policiais muitas vezes demandam evidências que liguem traficantes de drogas e usuários ou informações sobre redes de distribuição locais, os laboratórios forenses são solicitados a determinar se as amostras de drogas apreendidas estão relacionadas por um perfil químico comum.^{12,13}

Ao estabelecer o perfil químico da cocaína por meio da identificação e/ou quantificação de outros analitos nela contidos, seria possível inferir, por exemplo, em que país da América do Sul a folha de coca cresceu, como e onde a folha foi transformada em uma pasta e, finalmente, em cocaína cloridrato. As plantas do gênero *Erythroxylum* podem adquirir características do solo no qual foram cultivadas, como maior incidência de alguns metais. Outras variáveis, como altura acima do nível do mar, clima e distância da costa podem afetar o metabolismo da planta e, conseqüentemente, a composição química dos alcaloides de interesse. Isso se reflete na natureza e concentração de certos compostos principais marcadores encontrados após uma investigação detalhada do produto final. Dessa forma, um cloridrato de cocaína gerado a partir de folhas de coca cultivadas na Colômbia terá características químicas diferentes de outra droga obtida a partir das folhas produzidas e processadas em outros locais e, portanto, terá "impressão digital" ou "assinatura química" também diferentes.^{14-16,17}

Moore e Casale,^{4,18} relatam como principais objetivos do desenvolvimento de perfis químicos,

- **Comparação entre amostras** que, apreendidas em uma ou diferentes regiões, possam apresentar características químicas similares, que as identifique como oriundas da mesma fonte. Esta informação é particularmente relevante para respaldar eventuais investigações criminais.

- **Identificar origem geográfica**, cujas impurezas presentes no produto final podem permitir a determinação de origem geográfica da droga
- **Rastreamento de rotas de distribuição de drogas**, logo que seja determinada a origem geográfica de uma amostra, é possível estabelecer conexão entre o ponto de partida e o destino final da droga.
- **Avaliação dos reagentes químicos utilizados na produção da droga** que permite o acompanhamento e controle da aquisição de tais produtos químicos para determinar se seu uso é para fins legítimos ou ilícitos.
- **Diferenciar entre uma droga produzida de forma ilegal ou para fins farmacêuticos** por meio da presença de alguns compostos minoritários, esta diferença pode ser estabelecida. No Brasil este tipo de investigação não se aplica, uma vez que não há no país produção de cocaína para fins farmacêuticos ou terapêuticos.
- **Identificar a presença de adulterantes**, que são encontrados comumente presentes nas drogas de abuso e que podem acarretar também sérias implicações para a saúde do usuário. A caracterização de tais compostos pode auxiliar no controle e combate ao uso de tais substâncias, diminuindo os efeitos de toxicidade delas provenientes em usuário de cocaína.

Além dos trabalhos por análise de compostos minoritários, também podem ser encontrados na literatura outras formas de se determinar perfis químicos pelo intermédio da análise teor de truxilinas, da razão isotópica e por análise de solventes oclusos.

As truxilinas, que também são alcaloides minoritários encontrados na folha de coca e formados pela condensação de duas moléculas de cinamoilcocaína, tem os seus teores dependes da variedade e das condições ambientais nas quais a planta de *Erythroxylum* foi cultivada. A determinação quantitativa desta família de alcaloides, é utilizada como uma ferramenta importante na determinação da origem geográfica da cocaína.^{15,16}

Os perfis químicos por análise da razão isotópica se baseiam na determinação das proporções relativas dos isótopos estáveis de carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio, para a determinação da origem geográfica da planta da qual a droga foi originada. Diversos trabalhos têm sido publicados descrevendo o sucesso da técnica em identificar com segurança a origem da planta de coca.^{16,19}

Durante as etapas no procedimento de extração, purificação e refino da cocaína são empregados diversos solventes. Quando a cocaína base é convertida em cloridrato de cocaína

(cocaína.HCl) pela dissolução em solventes orgânicos em meio ácido, vertígios significativos de solventes ficam oclusos na matriz cristalina do precipitado.^{20,21} Em 2013, Zacca e colaboradores realizaram um estudo de perfil químico de solventes oclusos em amostras de cloridrato de cocaína de diferentes apreensões realizadas pela Polícia Federal, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando amostragem por *headspace*, HS-CG-MS. Com o auxílio de análises estatísticas, o perfil de solventes oclusos permitiu que fossem estabelecidas correlações significativas entre as amostras analisadas.²²

O conceito de perfil químico não é recente. Segundo Collins,¹⁴ a maioria das nações desenvolvidas possuem ao menos uma instituição forense com capacidade para análises aprofundadas e detalhadas de drogas. Nos Estados Unidos este trabalho é desenvolvido no *Special Testing & Research Laboratory* do *Drug Enforcement Administration* (DEA), o departamento antidrogas americano, na França pelo laboratório de polícia científica do *Institut National de Police Scientifique* (LPS), na Alemanha a *Bundeskriminalamt* (BKA), na Holanda o *National Forensic Institut* (NFI).

Particularmente, o Brasil conta com os trabalhos desenvolvidos pela Polícia Federal, por meio do projeto Pequi (perfil químico de drogas), implementado no ano de 2006. Este projeto foi concebido para fornecer ferramentas estatísticas com base técnico-científicas em relação ao cenário de drogas no Brasil, informações de inteligência policial, resultados forenses de origem da droga e correlação entre apreensões pelo intermédio da análise química detalhada e de métodos estatísticos.⁵ O projeto Pequi é desenvolvido no Laboratório Central do Instituto Nacional de Criminalística (INC) em Brasília.

Segundo Maldaner e colaboradores,²³ um dos principais objetivos do Projeto Pequi é desenvolver e validar metodologias analíticas para a quantificação de cocaína e *cis* e *trans*-cinamoilcocaína, bem como fármacos mais frequentemente utilizados como agentes adulterantes (benzocaína, fenacetina, cafeína, lidocaína, aminopirina, levamisol, hidroxizina, procaína e diltiazem) no INC.

O estabelecimento de perfis químicos complexos para cada amostra de droga analisada é uma ferramenta útil e adequada para fornecer medidas relativas dos componentes presentes nas amostras da droga, sejam eles majoritários, minoritários ou aqueles presentes somente em traços. Esses dados gerados podem tanto estabelecer e detectar conexões entre amostras e materiais provenientes diferentes apreensões de drogas, como delinear redes de distribuição por meio de possíveis ligações entre fornecedores, usuários e traficantes de drogas.^{2,9,24}

1.3 Alcaloides minoritários da cocaína^{3,10,25}

Parte dos compostos minoritários da cocaína são também alcaloides que ocorrem naturalmente nas folhas de coca, gerados como consequência da taxionomia da planta, das condições climáticas às quais foi submetida durante o cultivo, da região ou tipo de solo. Também podem ser produzidos durante as etapas de fabricação clandestina, armazenamento e transporte da droga. Com todas essas peculiaridades, os alcaloides minoritários são fontes importantes de informação para a construção de perfil químico da cocaína.

São considerados minoritários, compostos que estão presentes com abundância relativa menor que 1% em relação à cocaína. Dependendo da metodologia analítica empregada, eles podem ser detectados no produto final, mesmo que a cocaína tenha sofrido rigoroso processo de purificação.

As similaridades nas estruturas e propriedades físico-químicas entre alcaloides minoritários e a própria cocaína resultam na co-extração destes compostos, fazendo com que alcaloides presentes na folha resistam à todas as etapas do processo de produção, sendo detectados no produto final.

Alguns dos principais alcaloides encontrados nas folhas de coca, como cocaína, cinamoilcocaína, benzoilecgonina e metilecgonina são derivados da ecgonina. A Figura 3 ilustra alguns desses alcaloides que são relevantes para este trabalho.

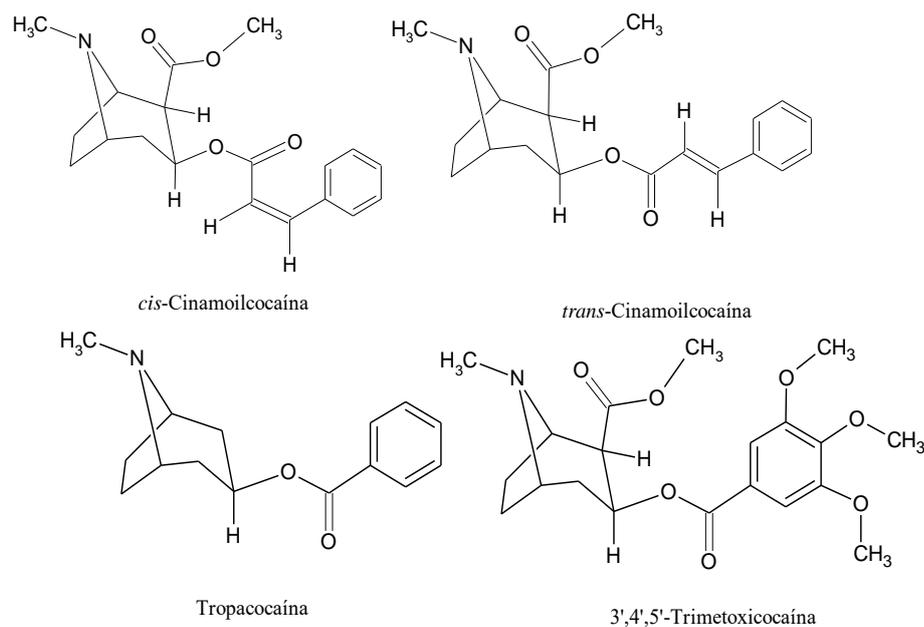


Figura 3-Principais alcaloides minoritários presentes nas folhas de coca

Alguns alcaloides minoritários como *cis* e *trans*-cinamoilcocaína, tropacocaína, trimetoxicocaína ocorrem naturalmente na folha de coca (Figura 3). A presença de tropacocaína e trimetoxicocaína em amostras de cocaína está ligada à taxionomia da planta da qual a droga foi extraída, variando de uma espécie para outra.¹⁰

N-formilcocaína e norcocaína (Figura 4) são obtidas a partir do processo de oxidação da cocaína, quando se usa permanganato de potássio para remoção das impurezas. Dessa forma, a não detecção de N-formilcocaína e norcocaína indica que a etapa de oxidação por permanganato não foi realizada.^{8,26}

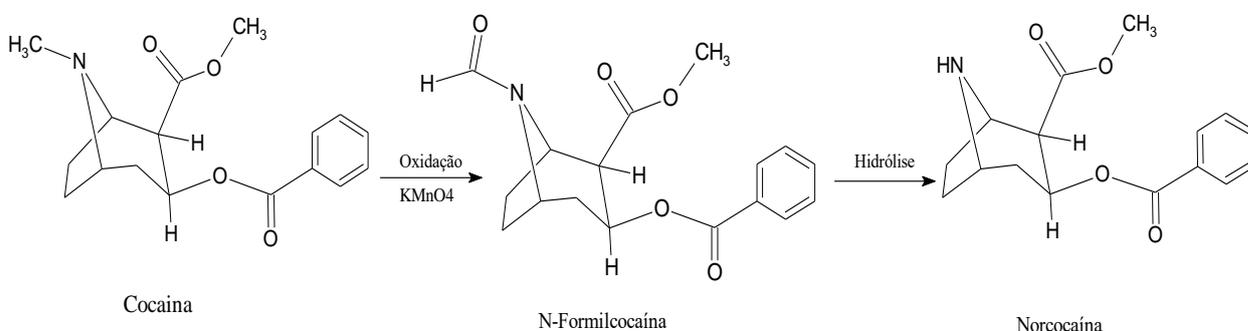


Figura 4- Alcaloides minoritários obtidos por oxidação da cocaína por KMnO_4

Os principais alcaloides minoritários identificados em amostras de cocaína ilícita e utilizados em trabalhos de determinação do perfil químico da cocaína são ecgonina, benzoilecgonina, metilecgonina, norcocaína, n-formilcocaína, *cis* e *trans*-cinamoilcocaína, tropacocaína e trimetoxicocaína.

Ecgonina, benzoilecgonina e metilecgonina são produtos de hidrólise da cocaína, que geralmente ocorre por meio da quebra nas ligações dos grupos éster. Os produtos de hidrólise podem ser produzidos mesmo durante o processo de purificação, mas também serem originados durante transporte e estocagem da droga.²⁷

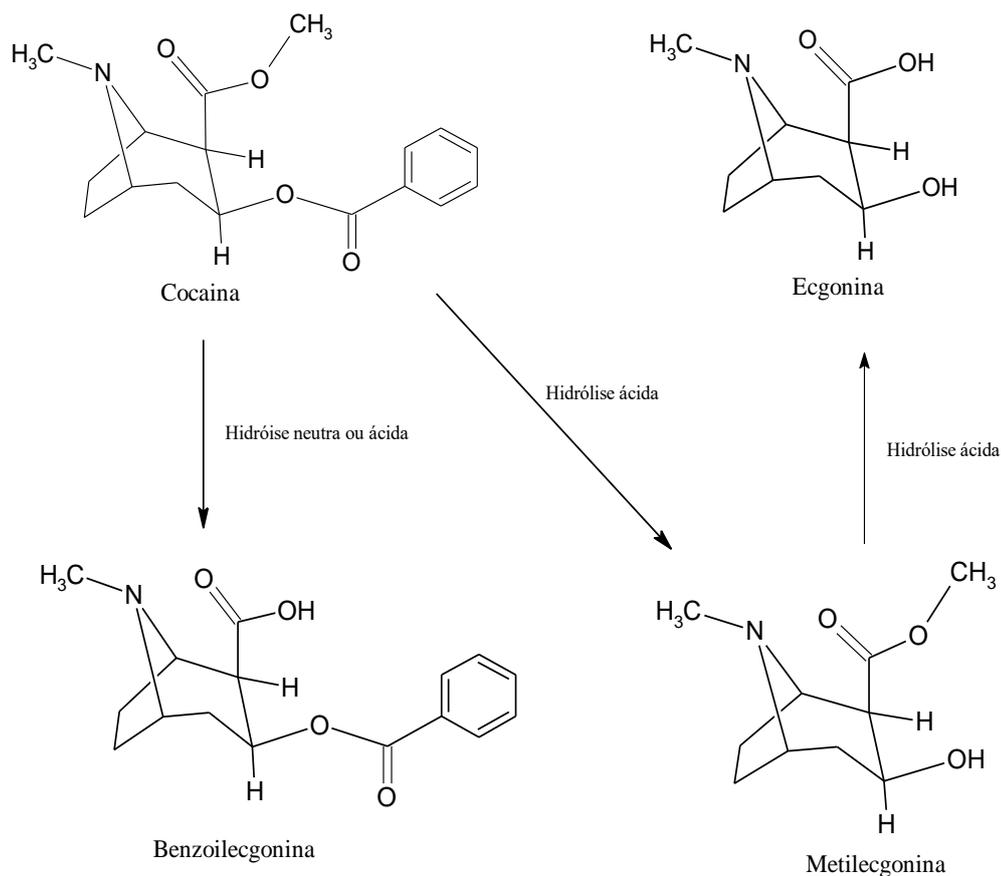


Figura 5-Reações de hidrólise da cocaína

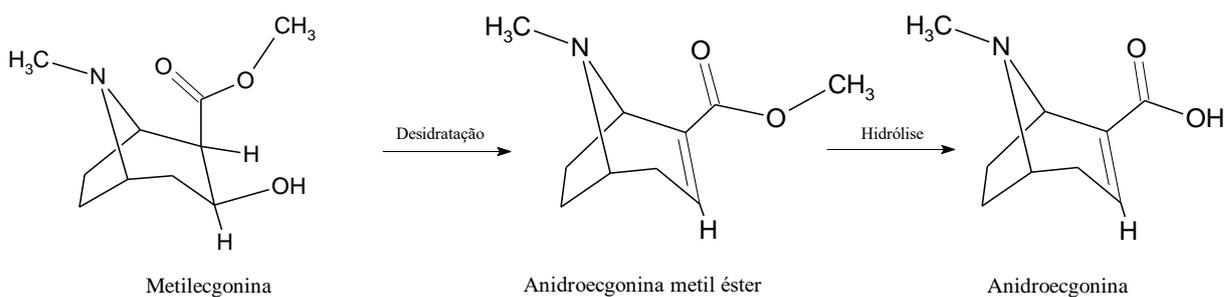


Figura 6 – Outros alcaloides obtidos por desidratação e hidrólise da cocaína

A identificação de alcaloides minoritários em amostras de cocaína refinada foi descrita na literatura em 1973, por Moore,²⁸ que identificou a presença dos isômeros *cis* e *trans*-cinamoilcocaína em análise de amostras de cocaína ilícita. Moore,²⁷ em 1974, publicou novo

trabalho em que desenvolveu método para análise de ecgonina e benzoilecgonina. Além dos trabalhos de Moore citados anteriormente, em 1988, Lebel e colaboradores,²⁹ compararam amostras de cocaína por intermédio da análise de metilecgonina e tropacocaína.

Muitos trabalhos relevantes de criação de perfis químicos por análise de alcaloides minoritários têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, como o trabalho de caracterização de alcaloides presentes na folha de coca, bem como produtos de degradação da cocaína realizado por Moore e Casale,⁴ em 1994. Nesse trabalho, os alcaloides minoritários determinados foram metilecgonina, tropacocaína, cusco-higrina, *cis* e *trans*-cinamoilcocaína.

Em recente trabalho publicado por grupo do DEA/EUA em 2016, Mallette e colaboradores,¹⁶ analisaram os alcaloides tropacocaína, trimetoxicocaína e truxilinas na criação de perfil químico completo de amostras de cocaína produzida na América do Sul e de amostras traficadas nos Estados Unidos. O método de análise de alcaloides minoritários utilizada no trabalho do DEA, se baseia na observação dos teores relativos à cocaína, de tropacocaína e trimetoxicocaína para determinação de origem geográfica do cultivo da planta de coca, conforme a Figura 7.

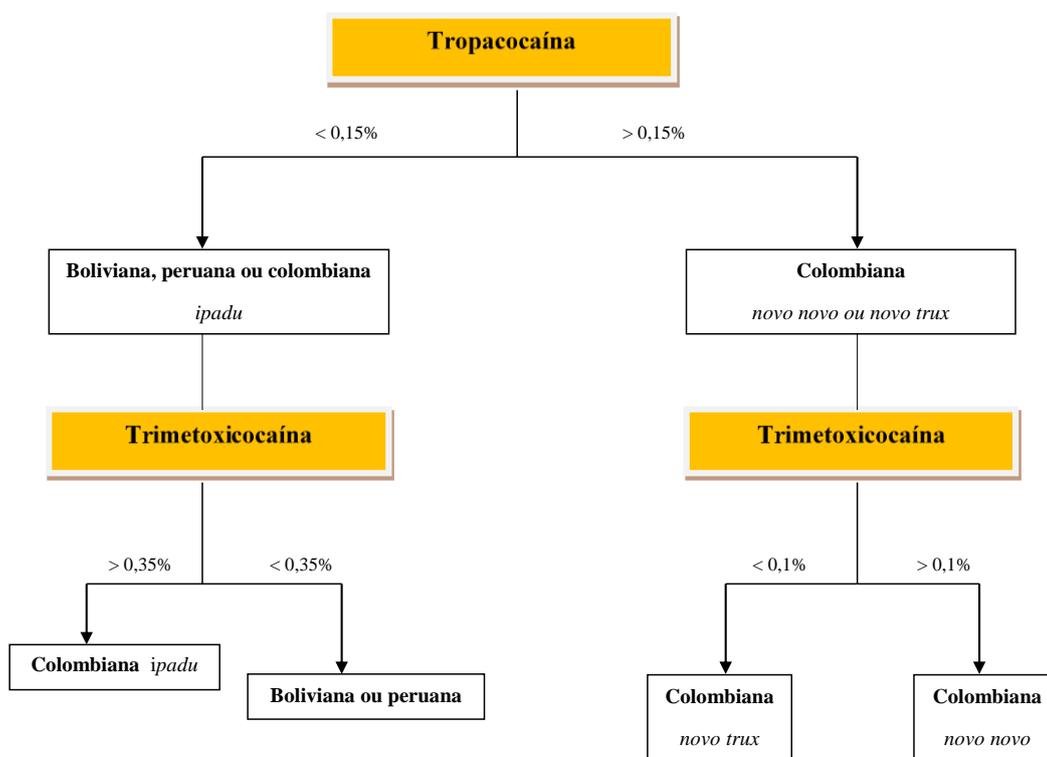


Figura 7 - Fluxograma DEA/EUA para determinação de origem geográfica da planta de coca

1.4 Cromatografia gasosa na caracterização de drogas ilícitas

A cromatografia gasosa tem sido a técnica mais utilizada para análise de produtos e impurezas de drogas ilícitas e será mais amplamente discutida, por ser a técnica analítica instrumental mais relevante para o desenvolvimento deste trabalho. Esta técnica tem sido parte central de diversos procedimentos operacionais em laboratórios de ciências forenses nas últimas décadas.³⁰

A cromatografia gasosa é uma técnica analítica utilizada para separar compostos orgânicos voláteis ou que se volatilizam em altas temperaturas sem se degradarem.

Segundo o manual *Method for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine* das Nações Unidas,¹³ estudos de perfil de heroína foram iniciadas pela primeira vez durante a década de 1960 e, na metade de 1970, esses estudos estavam em andamento em vários laboratórios nos Estados Unidos. Em contraste, um dos primeiros trabalhos que descrevem um método de perfil químico de cocaína foi publicada por Lebel e colaboradores em 1988,²⁹ desenvolveram um método para comparação de amostras provenientes de apreensões da polícia canadense por CG-EM e CLAE-UV. Em 1991, Casale e Waggoner também caracterizam amostras de cocaína utilizando método baseado em CG-DIC e CG-EM.

O método já existente para perfis de impurezas de heroína, como descrita por Moore e Bena, em 1972,³¹ em que analisam diluentes em amostras de heroína ilícita por CG-DIC, facilitou o desenvolvimento de diversas técnicas de caracterização de impurezas de cocaína e comparação de amostras que foram publicadas nos anos seguintes.

Em 1992 Janzen e colaboradores,³² desenvolveram um método rápido para a análise e comparação de amostras de cocaína ilícitas, com base em cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo. Foram analisados tropacocaína, norcocaína, *cis trans*-cinamoilcocaína. No mesmo ano, outro trabalho de perfil químico também utilizando cromatografia gasosa foi publicado por Ensing e seus colaboradores.³³ Para estabelecer o perfil químico dos alcaloides neste trabalho foram selecionados os alcaloides: anidroecgonina, tropacocaína, benzoilecgonina, *cis* e *trans*- cinamoilcocaína, norcocaína e N-formilcocaína. A altura de cada pico foi medida e ao maior pico foi dado um valor de referência. O valor de todos os outros picos foi calculado como a sua razão pelo pico mais alto multiplicado por 10. Os valores para cada pico *versus* seu tempos de retenção foram plotados em um gráfico para comparar amostras similares.

Metodologias analíticas desenvolvidas utilizando cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) associada ao uso da cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, também tiveram seu uso reportado em diversos trabalhos, como publicados por Casale.^{3,6}

Andersson e colaboradores³⁴, ao desenvolverem um método de cromatografia gasosa para perfil de anfetaminas, após comparar diversos métodos nas mesmas condições, concluíram que a técnica analítica baseada em CG-EM oferece desempenho analítico (repetibilidade, linearidade, estabilidade, reprodutibilidade, poder de resolução, sensibilidade, etc.) comparável ou melhor do que CG-DIC, o que também a torna uma boa escolha para a criação de perfis de drogas ilícitas, como a cocaína.

Esseiva e colaboradores,³⁵ em 2011 relatam o processo de mudança de um método de CG-DIC para obtenção de perfis químicos de compostos minoritários da cocaína, para um novo método baseado na CG-EM. Foram identificados os alcaloides ecgonina, metilecgonina, tropacocaína, benzoilecgonina, norcocaína, *cis*-cinamoilcocaína, *trans*-cinamoilcocaína e trimetoxicocaína, além de diversos compostos adulterantes ou diluentes da cocaína. No trabalho, argumentam que o fato de cada alcaloide identificado nos cromatogramas CG-EM ter sido quantificado com um íon específico, seria um aspecto que justificaria a mudança para o CG-EM, principalmente para contornar a problemática co-eluição de compostos e consequente aumento da seletividade da quantificação do analito desejado.

Em um trabalho de 2015, Monfreda e colaboradores,³⁶ analisam compostos minoritários de cocaína por CG-EM e por CG-DIC em apreensões realizadas em portos italianos. Neste trabalho foram usadas outras técnicas além da cromatografia gasosa, tais como a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (*FTIR/ATR*) e ferramentas quimiométricas, como análise de componentes principais (PCA). Os alcaloides identificados foram ecgonina, metilecgonina, tropacocaine, benzoilecgonina, norcocaína, *cis*-cinamolcocaína, *trans*-cinamoilcocaína e trimetoxicocaína.

1.5 Derivatização química

Para a análise de amostras por cromatografia gasosa, os analitos de interesse devem ser voláteis, termicamente estáveis, capaz de suportar temperaturas elevadas (tipicamente entre

Apesar dos três reagentes possuírem reatividades similares, compostos derivatizados provenientes da reação com MSTFA são mais voláteis, que os resultantes das reações com os demais reagentes citados anteriormente.⁴²

A derivatização tem particular importância para o desenvolvimento de metodologias analíticas de quantificação de analitos orgânicos polares (como alcaloides de origem natural) por cromatografia gasosa. Segundo Molnár e Molnár,⁴³ a demora do processo foi e continua sendo considerada como a principal desvantagem da aplicação da técnica em amostras como as de drogas ilícitas. No entanto, esta chamada "desvantagem" pode ser considerada pequena se comparada com as diversas vantagens associadas à análise de compostos derivatizados por CG, como maior seletividade, sensibilidade e a possibilidade de identificar e quantificar de numerosas espécies simultaneamente.

Diversos trabalhos relevantes de identificação e quantificação de compostos minoritários da cocaína utilizando derivatização com MSTFA estão descritos na literatura especializada.

Em 2007, Casale e colaboradores,⁶ identificaram quatro estereoisômeros derivados da oxidação incompleta das cinamoilcocaínas por meio de análises baseadas em cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o MSTFA como derivatizante para o preparo de amostras para a CG. No mesmo ano, Lociciro e colaboradores⁴⁴ publicaram trabalho para harmonizar métodos analíticos entre dois laboratórios diferentes voltadas para criação de perfis químicos de cocaína, analisando inclusive os alcaloides metilecgonina, ecgonina, tropacocaína, benzoilecgonina, norcocaína, cis- and trans-cinamoilcocaína e 3,4,5-trimetoxicocaína. O trabalho teve como objetivo melhorar a análise cromatográfica de amostras de cocaína e, para tal, parâmetros de validação foram testados para diversos métodos diferentes, utilizando MSTFA, BSA, TMSI e BSTFA + TMCS 1% como agentes derivatizantes. As análises realizadas com MSTFA apresentaram um excelente coeficiente de determinação na reprodutibilidade, sendo então classificado como mais adequado para as análises propostas pelo grupo.

Trabalhos posteriores, como o de Esseiva,³⁵ publicado em 2011 e os de Monfreda³⁶ e Broséus,⁴⁵ ambos publicados em 2015, também relatam o uso do MSTFA como derivatizante na análise de amostras de cocaína por cromatografia gasosa.

Alguns dos compostos minoritários de cocaína a serem analisados durante o desenvolvimento e validação do método analítico propostometo neste trabalho, serão produtos da sua reação com o derivatizante MSTFA, que confere a eles um grupo TMS, como mostra a Figura 9.

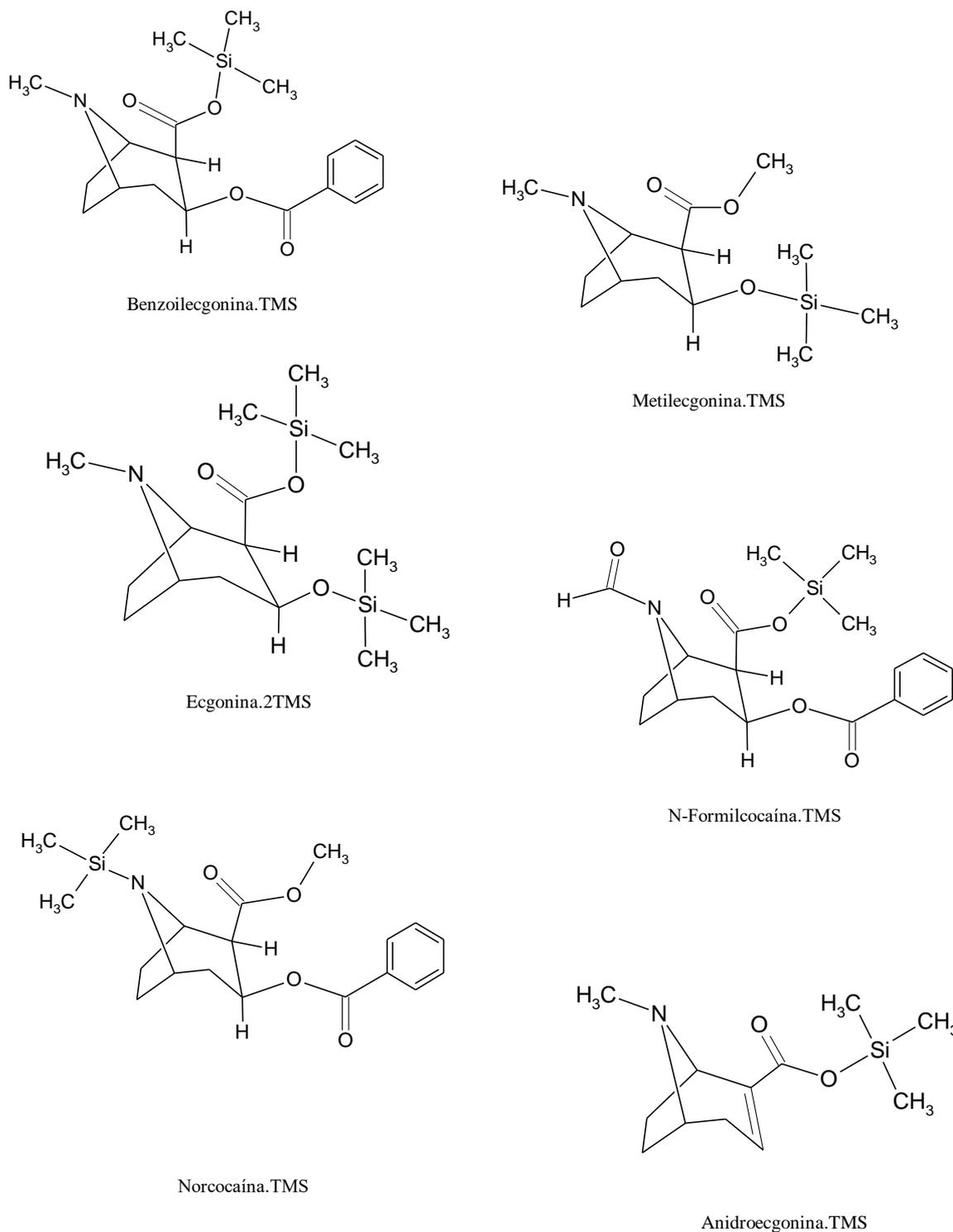


Figura 9 - Alcaloides minoritários derivatizados

1.6 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é parte extremamente relevante de um processo de emissão de resultados em um ambiente regulado, como os acreditados na ISO/IEC 17025.⁴⁶ A validação visa garantir, por meio de estudos laboratoriais, que as características de desempenho de um método atendem aos requisitos de uma aplicação analítica de interesse e que fornece garantias de confiabilidade durante execuções rotineiras. Dessa forma, a validação pode ser entendida como um processo que deverá prover documentação e evidências laboratoriais de que o método realmente faz aquilo que ele se propõe a fazer.

Laboratórios que produzem resultados analíticos em um ambiente regulado precisam executar validações de métodos analíticos para atender as exigências das normas da qualidade e, ao mesmo tempo, garantir que estejam produzindo resultados embasados em boas práticas e cientificamente corretos. Um processo de validação bem definido e documentado não produz somente evidências de que o sistema e o método são adequados para um determinado fim, mas também auxiliam no desenvolvimento futuro do laboratório e de seu pessoal.⁴⁷

A comprovação da capacidade técnica, a rastreabilidade, a comparabilidade e a confiabilidade dos resultados produzidos por um laboratório de química analítica é realizada por intermédio de normas estabelecidas por agências de regulamentação. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁴⁸ e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)⁴⁹ desempenham este papel, por meio dos guias para procedimentos de validação de métodos analíticos. A Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 03/2003 são os principais documentos disponíveis nessa área e estão em concordância com protocolos de validação aceitos internacionalmente de agências como: *International conference on harmonization (ICH)*,⁵⁰ *EURACHEM*,⁵¹ *International Union Of Pure And Applied Chemistry (IUPAC)* e *International Organization for Standardization (ISO)*⁴⁶.

Segundo o INMETRO,⁴⁹ os métodos analíticos que devem ser validados pelo laboratório são os métodos não normalizados, métodos criados e/ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e as ampliações e modificações de métodos normalizados. São considerados métodos normalizados de calibração ou ensaio aqueles que forem publicados em normas internacionais,

nacionais ou regionais. Considera-se também como normalizados os métodos publicados por organizações técnicas respeitáveis, em textos ou jornais científicos relevantes ou especificados pelo fabricante do equipamento. Já os métodos não normalizados são aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptados a partir de outros métodos.

Segundo a ANVISA, será considerada validada metodologia analítica descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela agência.

O guia para validação de métodos EURACHEM⁵¹ recomenda realizar a validação inclusive para métodos normalizados e para o desenvolvimento de novos métodos, revisão de métodos normalizados e quando o controle de qualidade interno indicar alterações significativas sofridas pelo método com o passar do tempo.

Segundo o manual de garantia analítica da qualidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA),⁵² é essencial que o processo de validação seja realizado levando-se em conta o procedimento analítico efetivo, exatamente da forma que ele será executado na rotina do laboratório.

O planejamento, a preparação e a execução de processos de validação devem seguir protocolos detalhados contemplando tanto a adequação ao uso pretendido, quanto a finalidade e o âmbito de aplicação da metodologia analítica. São partes integrantes do planejamento e execução da validação:

- 1) Definição prévia de um responsável técnico pelo projeto,
- 2) Designação pessoal técnico envolvido com as respectivas responsabilidades,
- 3) Identificação das unidades em que o método será implementado,
- 4) Equipamentos/instrumentos que serão utilizados,
- 5) Redação de Procedimento Operacional Padrão (POP) inicial para execução do procedimento analítico da pré-validação,
- 6) Registro e avaliação crítica de parâmetros de desempenho e critérios de aceitação,
- 7) Devem ser realizados experimentos de pré-validação, se necessário, para efetuar ajustes nos parâmetros do método analítico a ser validado e após sua conclusão e avaliação, executar os experimentos da validação propriamente dita,
- 8) Registro e avaliação crítica de características de desempenho dos equipamentos/instrumentos,
- 9) Qualificação dos materiais (padrões, reagentes, amostras e alíquotas, entre outros),
- 10) Redação do POP definitivo para a execução do procedimento analítico na rotina
- 11) Redação e avaliação crítica do relatório de validação.^{52,53}

Na literatura especializada que aborda a validação de métodos analíticos, são descritos dois tipos de validação. No primeiro, a “validação no laboratório” (*in house validation*), consiste na realização de todas as etapas de validação em procedimentos realizados em um único laboratório. A validação no laboratório é utilizada principalmente nas etapas preliminares do desenvolvimento de um método e na publicação de artigos para revistas científicas. Na validação completa (*full validation*) são avaliadas cuidadosamente tanto as características de desempenho intralaboratório, quanto as características de reprodutibilidade, que se baseia em estudos Inter laboratoriais. Esta etapa verifica como o método se comporta quando uma determinada matriz é analisada em diferentes laboratórios, assegurando a sua aceitabilidade como um método oficial para uma determinada aplicação.⁵⁴⁻⁵⁶

Os procedimentos de desenvolvimento de método e validação descritos neste trabalho fazem parte do processo de gestão da qualidade do Laboratório de Química Forense do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, uma vez que se pretende que possam ser incorporados à rotina de análise de cocaína no contexto do projeto Pequi e na produção de laudos periciais no escopo da acreditação ISO/IEC 17025⁴⁶ em utilização neste laboratório.

1.7 Figuras de mérito

Os parâmetros analíticos de validação, também conhecidos como figuras de mérito são variáveis avaliadas no decorrer do processo de validação de um método analítico. Um método só será considerado validado, desde que sejam formalmente definidos e documentados alguns parâmetros de desempenho analítico críticos, tais como especificidade e seletividade, linearidade, intervalo ou faixa de trabalho, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez.

1.7.1 Seletividade

A seletividade pode ser definida como a capacidade do método de identificar as substâncias a serem analisadas de outros componentes que podem estar presentes na amostra, incluindo as impurezas. A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam

estar porventura presentes. No caso da cromatografia, a seletividade busca garantir que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.⁵⁷

Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de outros picos na região do tempo de retenção do analito de interesse injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada. Nesse caso, devem-se analisar várias amostras contendo os compostos alvos e possíveis interferentes, e para se garantir a seletividade do método, a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do analito de interesse deve ser observada.⁵⁸

A seletividade pode ser avaliada por intermédio de alguns parâmetros experimentais, tais como fator de retenção (k) e resolução (R_s).

1.7.2 Linearidade e faixa linear

Linearidade relaciona-se à capacidade de um método analítico em demonstrar que os sinais instrumentais medidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.^{48,53}

O intervalo linear de um método refere-se a faixa de concentração que pode ser determinada com uma curva analítica linear descrita por uma equação.

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica ou curva de calibração.⁵⁶

A linearidade pode ser estimada por métodos de padronização interna ou externa. A equação da reta relaciona as duas variáveis⁴⁹ e pode ser expressa pela equação:

$$y = a + bx \quad (1)$$

Onde y é a resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.), x é a concentração, a é interseção com o eixo y , quando $x = 0$ e b inclinação da curva analítica, corresponde à sensibilidade.

Geralmente, a linearidade de um método analítico é avaliada pelo coeficiente de correlação linear (r), que é obtido a partir da regressão e dos coeficientes de regressão (**a**, **b**). O (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada uma reta como modelo matemático. Quanto mais próximo de 1,0 for o valor de (r), menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA⁴⁸ recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,990 e o INMETRO⁴⁹ valores acima de 0,90. O coeficiente de correlação linear pode ser obtido a partir da equação:

$$r(X, y) = \frac{\frac{\sum(X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})}{S_x}}{N - 1} \frac{S_y}{S_y} \quad (2)$$

O coeficiente de determinação ou coeficiente de correlação múltipla (R^2) é a razão entre a soma quadrática explicada pela regressão e a soma quadrática total. É também comumente chamada de variação percentual explicada pelo modelo. A capacidade explicativa do modelo está incluída no intervalo $0 \leq R^2 \leq 1$. Assim, quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , mais o modelo consegue descrever a variação em y .

$$R^2 = \frac{SQR}{SQT} = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum(y - \bar{y})^2} \quad (3)$$

Os dois coeficientes indicam o grau de ajuste dos dados à curva, mas no contexto deste trabalho, os valores considerados aceitos para este parâmetro foram de $R^2 \geq 0,998$.

1.7.3 Limite de detecção (LD)^{48-50,56}

Limite de detecção refere-se à menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

1.7.3.1 Método visual

É utilizado para determinar o limite de detecção utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável).

Este procedimento também pode ser feito por meio do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração.

1.7.3.2 Método da relação sinal-ruído

Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

1.7.3.3 Método baseado em parâmetros da curva analítica

O limite de detecção (LD) pode ser expresso como,

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (4)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e b é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Para calcular estes dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

1.7.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão, exatidão e incerteza aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.⁴⁸

Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência, a precisão e a exatidão conseguidas são satisfatórias.⁴⁹

Os mesmos critérios para determinação de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (b), em níveis próximos ao LQ, a partir da equação 5.⁵⁶

$$LD = 10 \times \frac{s}{b} \quad (5)$$

O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a medição do ruído não é trivial e às vezes subjetiva, podendo ser afetadas pelas condições cromatográficas. O melhor caminho para o cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. Neste caso, a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ.^{56,59}

1.7.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico reflete a proximidade entre o valor medido (X_i) e um valor de referência considerado verdadeiro (X_v), e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida.⁴⁸ Vale ressaltar que a exatidão é difícil de ser determinada porque o valor verdadeiro é geralmente desconhecido. Então um valor aceito como verdadeiro precisa ser utilizado em seu lugar.⁶⁰

A exatidão pode ser obtida mediante uso de material de referência certificado (MRC), comparação de métodos ou ensaios de recuperação.

1.7.5.1 Materiais de Referência Certificados ⁴⁸

São materiais que possuem um valor de concentração de uma dada substância e uma incerteza associada acompanhados de um certificado. Os valores da média e da estimativa do desvio padrão obtidos pelo laboratório para uma série de replicatas da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método.

1.7.5.2 Comparação de métodos ^{49,61}

Baseia-se na comparação entre resultados obtidos por meio de um método em desenvolvimento e os resultados conseguidos por meio de um método de referência, avaliando o grau de concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, quão exato é o novo método em relação ao de referência. Assume-se então que a incerteza do método de referência é conhecida. As análises são realizadas em replicatas, utilizando os dois métodos separadamente sobre as mesmas amostras, em uma faixa de concentrações em que se pretende validar o método.

1.7.5.3 Recuperação ^{56,59}

A recuperação, R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. As amostras são fortificadas com soluções contendo o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta da faixa de uso do método. O resultado é expresso em percentual de recuperação da quantidade do analito adicionado, que pode ser calculado pela equação abaixo:

$$R(\%) = \frac{\textit{média do valor obtido}}{\textit{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (6)$$

1.7.6 Precisão

A precisão de um método cromatográfico refere-se ao quão próximo da concordância estão os resultados de múltiplas análises, ou seja, a dispersão entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio; assegurando que os resultados não foram obtidos de forma aleatória, podendo ser repetidos e reproduzidos.

A precisão é comumente expressa por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo que o último parâmetro é avaliado apenas quando há um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como o método se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade do método e a incerteza expandida associada ao método como um todo.^{57,62}

Usualmente são expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$CV(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (7)$$

Onde DP o desvio-padrão e CMD, a concentração média determinada.

1.7.6.1 Repetitividade

A Repetitividade do método pode ser verificada por intermédio de ensaios feitos com o mesmo procedimento de medição, o mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo laboratório e repetições no menor espaço de tempo possível.^{62,63}

1.7.6.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária refere-se a variações dentro de um mesmo laboratório, como diferentes dias, diferentes instrumentos, e diferentes analistas⁶⁴ e, em tais condições, descreve a capacidade do método em fornecer os mesmos resultados. Refere-se à precisão avaliada sobre

a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

Na maioria dos casos, o valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após a eliminação dos resultados discrepantes. Existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro, que podem ser usados de acordo com o tipo do ensaio e aplicação do estudo da precisão intermediária, tais como: gráfico de controle do desvio padrão, que poderá ser aplicado para replicatas de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo; expressões matemáticas que apresentem resultados numéricos e critérios de aceitação definidos.⁶²

1.7.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em permanecer estável diante de pequenas e controladas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento de um método analítico, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.^{49,51}

A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.

Para determinar a robustez de um método, o INMETRO⁴⁹ recomenda o teste de Youden. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Por este teste são realizados oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos e verifica-se qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentam variações.⁵⁶ Por este método são realizados oito ensaios separadamente para determinar os efeitos de até sete fatores, em dois níveis diferentes do procedimento analítico, como mostra a Tabela 1. As oito medições devem ser realizadas em ordem aleatória.

Tabela 1- Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação robustez pelo teste de Youden

Parâmetros	Combinação fatorial ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados	s	t	u	v	w	x	y	z

Onde, as letras **A, B, C, D, E, F, G** correspondem aos níveis superiores ensaiados e as letras **a, b, c, d, e, f, g** aos níveis inferiores. A quantidade de ensaios corresponde aos números **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8** e os resultados obtidos são representados pelas letras minúsculas **s, t, u, v, w, x, y, z**.

Para determinar a influência das variações de cada parâmetro no resultado final, a média dos quatro valores correspondentes às letras maiúsculas (condições originais) é comparada com a média dos quatro valores correspondentes às letras minúsculas (condições alteradas). Por exemplo, para avaliar o efeito do parâmetro **B** ou **b** no resultado final das análises, calcula-se a diferença da média dos valores obtidos pelos níveis superiores e inferiores, como expressa a equação 8.

Por intermédio do teste de Youden é também possível ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações sobre o resultado final. É importante destacar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse em relação à sua precisão.^{49,65}

$$Efeito B/b = \frac{s + t + w + x}{4} - \frac{u + v + y + z}{4} \quad (8)$$

1.7.8 Estabilidade

Parâmetro que tem como objetivo determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz, sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

Para verificação da estabilidade de curta duração utilizam-se, no mínimo, três amostras nos níveis de concentração baixa, média e alta na validação do método analítico. Cada uma delas deverá permanecer à temperatura ambiente de quatro a vinte e quatro horas, baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente e analisadas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.⁶³

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico para identificação e quantificação de compostos minoritários em cocaína em amostras da droga apreendidas pela Polícia Federal, utilizando derivatização seguida por análise por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e padronização interna.

2.2 Objetivos específicos

- Adequar metodologias disponíveis na literatura às condições de análise a serem implantadas no laboratório de Química Forense da Polícia Federal, no Instituto Nacional de Criminalística.
- Validar método analítico quantitativo que inclui preparo de amostras, derivatização e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC) com padronização interna.
- Demonstrar a aplicabilidade do método em amostras reais de cocaína apreendidas pela Polícia Federal em diferentes Estados do Brasil.

3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES MINORITÁRIOS EM AMOSTRAS DE COCAÍNA

O método analítico deste trabalho foi desenvolvido por cromatografia gasosa com detector com ionização de chama, tendo como referência métodos de análise de cocaína em uso no *Special Testing & Research Laboratory do Drug Enforcement Administration* (DEA), o departamento antidrogas americano e pelo laboratório de polícia científica do *Institut National de Police Scientifique* (LPS) da França, em Lyon, cujos parâmetros estão dispostos na Tabela 2 (seção 3.2.5).

Para a validar o método desenvolvido, foram avaliados os parâmetros seletividade, precisão, exatidão, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Para avaliar cada parâmetro foram adotados os critérios de aceitabilidade descritos na literatura nacional e internacional especializada em validação e, no Procedimento Operacional Padrão (POP-I-SEPLAB-11 Validação de Métodos de Análises Cromatográficas Quantitativas) do laboratório de química forense, do Instituto Nacional de Criminalística (INC) da Polícia Federal.

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Vidrarias e acessórios

- Alicates para lacrar vials
- Almofariz de vidro de 100 mL com pistilo
- Almofariz de porcelana de 100 mL com pistilo
- Balão volumétrico de 50 mL
- Balões volumétricos de 10 mL
- Bloco aquecedor (*thermoblock*) Boekel Scientific.
- Erlenmeyer de vidro de 25 mL
- Frascos de vidro âmbar para descarte de solventes clorados
- Frascos de vidro âmbar para armazenagem da solução de padrão interno
- Frascos de *head space* com tampa para armazenagem das soluções estoque
- Seringa de 10 µL para amostrador automático
- *Vials* de 2 mL para amostrador automático dotados de tampas de crimpagem com septos

3.1.2 Equipamento analítico

- Balança analítica: XP 205, Mettler Toledo, resolução de 0,01 mg.
- CG-DIC: Cromatógrafo Gasoso Agilent Technologies® 6890N com detector de ionização em chama, colunas RXI-1MS ou DB-1MS Agilent Technologies®, 25 m × 0,2 mm × 0,33 μm, injetor do tipo *split/splitless* e amostrador automático para líquidos Agilent Technologies® série 7693A com seringa de 10 μL. Os gases utilizados, da Praxair, foram: ar sintético grau 5.0, gás hélio grau 5.0; gás hidrogênio grau 5.0; gás nitrogênio grau 5.0. O cromatógrafo foi acoplado a uma estação de trabalho com os *softwares* MSD ChemStation e Enhanced Data Analysis, ambos da Agilent Technologies®, instalados para controle do sistema e análise de dados respectivamente.
- CG-EM: Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, utilizando cromatógrafo Agilent Technologies® 6890N, detector seletivo de massas (energia de ionização de 70 eV) Agilent Technologies® 5973 Inert, injetor automático Agilent Technologies 7693A Series Coluna RXI-1MS Agilent Technologies®, 25 m × 0,2 mm × 0,33 μm, injetor do tipo *split/splitless* e amostrador automático para líquidos Agilent Technologies® série 7693A com seringa de 10 μL. O gás utilizado foi Hélio 5.0 (Praxair). O cromatógrafo foi acoplado a uma estação de trabalho com os *softwares* MSD ChemStation e Enhanced Data Analysis, ambos da Agilent Technologies®, instalados para controle do sistema e análise de dados respectivamente
- FTIR-ATR: Espectrofotômetro de Infravermelho (FTIR-ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) iS10, Thermo Nicolet, com acessório de ATR Smart iTR diamante, 16 *scans*, resolução 4 cm⁻¹, espectro 4000-525 cm⁻¹. A estação de trabalho que estava conectada ao FTIR-ATR continha o *software* OMNIC 8 da Termo Fischer Scientific®.
- Pipetas automáticas P100 e P1000: Gilson®.

3.1.3 Reagentes, solventes e padrões de referência utilizados

- Anidroecgonina. HCl: NMI, 95,9%
- Anidroecgonina metil éster: UFRGS, 99,3%
- Benzoilecgonina.4H₂O: NMI, 79,4%
- Benzoilecgonina: Lipomed, 99,87%

- *trans*-cinamoilcocaína base: DEA-EUA, 99,8%
- Cloridrato de cocaína purificado e autenticado pelo Laboratório SEPLAB/INC (CCS)
- Clorofórmio: Tedia, grau de pureza adequado à cromatografia gasosa.
- Derivatizante, MSTFA (N-Methyl-N-TMS-trifluoroacetamide) Sigma-Aldrich, P.A
- Dietilamina: Sigma-Aldrich, P.A
- Ecgonina. HCl: NMI, 99,3%
- N-formilcocaína: NMI, 96,3%
- N-heneicosano: Acros Organics, 98%
- Metilecgonina. HCl: NMI, 92%
- Metilecgonina: Lipomed, 83%
- Norcocaína. HCl: NMI, 90,9%
- Piridina, VETEC, P.A.
- 3,4,5-Trimetoxicocaína.HCl: NMI, 94%
- Tropacocaína. HCl: NMI, 99,7%

3.2 Desenvolvimento do método analítico

3.2.1 Preparação da solução de padrão interno

Para análise das amostras reais e controles do método de análise, foi preparada uma solução de concentração 0,3 mg/mL de n-heneicosano dissolvido em clorofórmio / piridina 5:1(v/v). Para produção de 50 mL de solução de padrão interno, são pesados 15 mg de n-heneicosano, que foi diluído em balão volumétrico de 50 mL com aproximadamente 25 mL de clorofórmio. Foram adicionados aproximadamente 8,3 mL de piridina e o volume foi completado com clorofórmio. A solução foi transferida para frasco âmbar e mantida em geladeira

Para a construção de uma das curvas analíticas, a solução do padrão interno n-heneicosano foi preparada na concentração de 0,6 mg/mL, com proporção clorofórmio/piridina 5:2 (v/v), conforme descrito na próxima sessão.

Dessa forma, independentemente da solução utilizada, toda a metodologia foi baseada na avaliação das concentrações e resultados dos analitos em relação à concentração e resultados obtidos para o padrão interno.

3.2.2 Preparação das soluções dos pontos da curva analítica

No processo de desenvolvimento do método, foram preparadas soluções estoques para a construção de duas curvas analíticas, utilizando materiais de referência certificados (MRC) de todos os analitos a serem analisados neste trabalho.

A primeira solução, para a curva contendo os analitos que deveriam ser observados em concentrações menores, como anidroecgonina metil éster, anidroecgonina, metilecgonina, tropacocaína, norcocaína, N-formilcocaína e 2,3,4-trimetoxicocaína, foi preparada pesando-se aproximadamente 3 mg (+/- 0,01mg) dos padrões certificados de cada analito em balão volumétrico calibrado de 10,0 mL e solubilizando-os em clorofórmio. Para a dissolução completa de todos os padrões se fez necessário a adição de 200µL de dietilamina. A partir da solução estoque foram preparadas soluções em triplicatas, em 8 faixas de concentração, entre 1 e 100 µg/mL

Uma segunda curva foi preparada com os materiais de referência certificados (MRC) para os analitos que já se esperava concentrações maiores, como benzoilecgonina, ecgonina e *trans*-cinamoilcocaína. Foram pesados aproximadamente 8 mg (+/- 0,01mg) do padrão de ecgonina, 15 mg (+/- 0,01mg) de *trans*-cinamoilcocaína e 45 mg (+/- 0,01mg) de benzoilecgonina em balão volumétrico calibrado de 10,0 mL e solubilizados com solução de padrão interno ⁴⁶. As diluições dos estoques foram feitas em triplicatas para cada um dos dez pontos da curva, que foi preparada em uma faixa de concentração entre 2,0 e 500 µg/mL para a ecgonina, entre 13,0 e 3.000,0 µg/mL para a benzoilecgonina e entre 5 e 1200 µg/mL para a *trans*-cinamoilcocaína. A diluição dos pontos da curva a partir da solução estoque foi realizada segundo os fatores apresentados na

O preparo das soluções para os pontos das curvas analíticas, foi realizado de duas maneiras.

- a. A partir da solução estoque, cujos padrões foram dissolvidos em clorofórmio.

Para cada ponto da curva adicionou-se volumetricamente ao *vial* de vidro lacrável de 2mL, 250 µL da solução estoque contendo os padrões, 250 µL de solução de padrão interno n-heneicosano/ piridina 5:2, com pipeta automática. Adicionou-se volumetricamente 100 µL de solução de derivatizante (MSTFA) para os vials, com pipeta automática. Os *vials* foram lacrados e colocados em aquecedores próprios (*thermoblock*), a 80 °C, por 60 minutos. Após este procedimento, as soluções das amostras foram injetadas no equipamento.

- b. A partir da solução estoque, cujos padrões foram dissolvidos em solução de heneicosano 0,3 mg/mL (clorofórmio/piridina 5:1)

Para cada ponto da curva adicionou-se volumetricamente ao *vial* de vidro lacrável de 2mL, 500 µL da solução estoque contendo os padrões e 100 µL de solução de derivatizante (MSTFA) para os vials, com pipeta automática. Os *vials* foram lacrados e colocados em aquecedores próprios (*thermoblock*), a 80 °C, por 60 minutos. Após este procedimento, as soluções das amostras foram injetadas no equipamento.

Após a fase de desenvolvimento do método, a forma de preparação a) foi abandonada, uma vez que inclui um número maior de pipetagens, o que pode conferir mais incertezas aos resultados das análises. A forma b) foi adotada como padrão para construção de novas curvas analíticas ou análise de amostras e controles.

3.2.3 Homogeneização das amostras reais

Para homogeneização de amostras de cocaína sob a forma de sal cloridrato, foram utilizados, almofariz e pistilo de vidro. Já para amostras de cocaína sob a forma de base livre, foram utilizados almofariz e pistilo de porcelana, sendo em alguns casos, necessária a adição de pequenas quantidades de nitrogênio líquido para vitrificar a amostra e tornar o processo mais eficiente. As amostras foram pulverizadas até obter consistência de pó fino e homogêneo e foram transferidas para frascos plásticos devidamente identificados.

3.2.4 Preparação das amostras reais de cocaína e controles do método analítico e brancos

Para o preparo das soluções para injeção no CG-DIC foi realizada a pesagem de 10,00 a 10,50 mg de cada amostra e/ou controle diretamente em *vial* de vidro incolor lacrável de 2 ml. Adicionou-se 500 µL de solução de padrão interno n-heneicosano/piridina 5:1 para os *vials*, com pipeta automática. Adicionou-se 100 µL de solução de derivatizante (MSTFA) em cada *vials*, com pipeta automática. Os *vials* foram lacrados e colocados em aquecedores próprios (*thermoblock*), a 80 °C, por 60 minutos. As soluções derivatizadas foram injetadas no equipamento de CG-DIC. Um branco do método foi preparado da mesma forma, mas sem a adição da amostra e injetado a cada três amostras para verificar a ocorrência de interferências ou *carry overs*.

3.2.5 Condições cromatográficas do método desenvolvido

Neste método, a temperatura mantida pelo injetor foi de 230 °C. O volume de amostra injetado foi de 1 µL, com razão de *split* de 50:1. O gás hélio, utilizado como gás de arraste, teve um fluxo constante de 1,2 mL/min. A programação do forno foi feita de modo a manter a temperatura inicial de 160 °C por 1 minuto, seguido de uma rampa de aquecimento de 30 °C/min até atingir 325 °C, mantida por 11 minutos, tendo como tempo total da análise de 30 minutos. O detector por ionização em chama foi mantido a 320 °C, com fluxo de hidrogênio (H₂) de 35,0 mL/min, fluxo de ar de 350,0 mL/min e fluxo de nitrogênio de 35,0 mL/min.

A Tabela 2 apresenta outros parâmetros e condições importantes do método cromatográfico desenvolvido, além de mostrar os parâmetros dos métodos utilizados como referência para o desenvolvimento e validação no SEPLAB/INC.

3.2.6 Calibrações e manutenção

O trabalho foi desenvolvido no contexto do Sistema de Gestão da Qualidade do SEPLAB/INC, o que pressupõe que todos equipamentos de medição, como os volumétricos, balanças, pipetas automáticas, termômetros encontravam-se calibrados. Os equipamentos utilizados foram avaliados e encontravam-se em condições de uso adequadas.

Tabela 2 - Comparação entre os parâmetros dos métodos de referência e do método desenvolvido

PARÂMETRO	Métodos		
	DEA	LPS	SEPLAB/INC
Padrão Interno	p-fluorococaína	n-heneicosano/ piridina	n-heneicosano/ piridina
Derivatizante	MSTFA	MSTFA	MSTFA
Tempo de derivatização (min)	30	60	60
Temperatura de derivatização (°C)	75	80	80
Volume do MSTFA (µm)	250	100	100
Tipo de Coluna	DB-1701	DB-1	DB-1
Comprimento x diâmetro x largura do filme	30m x 0,25mm x 0,25µm	30m x 0,25mm x 0,25µm	25 m x 0,2 mm x 0,33 µm
Temperatura do Injetor	230°C	230°C	230°C
Programa do Forno	170°C; 1min 4 °C/min a 200 °C	160°C;1min 4 °C/min a 275°C	160°C;1min 4 °C/min a 200 °C
	6 °C/min a 275°C 275°C, 9min	275°C; 2,5min	6 °C/min a 275°C 275°C, 6,5min
Volume de Injeção	1µL	2µL	1µL
Vazão do gás de arraste	1,2 mL/min	1,2 mL/min	1,2 mL/min
Razão de split	33:1 ou 34:1	20:01	50:01:00
Detector	FID	FID	FID
Equipamento	Agilent 6890N ou Agilent 7890A	Agilent 6850 GC Series	Agilent 6890N GC series

3.3 Validação do método analítico

3.3.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade na separação por cromatografia gasosa dos alcaloides minoritários presentes em amostras de cocaína (*cis* e *trans*-cinamoilcocaína, tropacocaína, trimetoxicocaína, anidroecgonina metil éster, anidroecgonina, ecgonina, metilecgonina, benzoilecgonina, norcocaína, N-formilcocaína), dos principais fármacos utilizados como adulterantes na cocaína (benzocaína, cafeína, fenacetina, lidocaína, aminopirina, levamisol) e do padrão interno (PI) do método (n-heneicosano), foram preparadas soluções para análises partir de amostras de cloridrato de cocaína (cocaína controle SEPLAB, CCS) e cocaína base livre (1696-4-MS) e de uma mistura dos adulterantes acima citados (MIX), preparada previamente, como apresentado na Tabela 3. Foram injetados brancos de CHCl₃ e brancos derivatizados, CHCl₃/PI/Piridina.

O cromatograma de uma amostra derivatizada de cloridrato de cocaína (CCS) está ilustrado no ANEXO 5.

Tabela 3 - Amostras analisadas no ensaio de seletividade

Nº	Amostra	Descrição da amostra
1	1696-4-MS	100% 1696-4-MS
2	CCS	100% CCS
3	Mix de adulterantes	100% Mix
4	1696-4-MS + Mix	1:1 m\m
5	CCS + Mix	1:1 m\m

Mix = mistura de adulterantes; para as amostras de cocaína 1696-4-MS e CCS: 100%= amostra sem mix de adulterantes e 1:1 m\m refere-se às amostras com iguais proporções em massa da amostra de cocaína e do mix de adulterantes

Os cromatogramas obtidos a partir da análise das amostras foram comparados pela observação dos tempos de retenção de cada analito presente. Também foram calculados as resoluções e os fatores de retenção (k'), que se referem respectivamente, à medida da separação nos tempos de retenção e a medida de quanto o pico de interesse elui em relação ao tempo de eluição de compostos não retidos. Para atenderem aos requisitos do POP-I-SEPLAB-11

(Validação de Métodos de Análises Cromatográficas Quantitativas) o método deve apresentar resoluções e fatores de retenção de 2 e 1,5, respectivamente.

Determinou-se a resolução com objetivo de observar a separação de cada pico na linha de base, de acordo com a equação,

$$R_s = 2 \times \frac{t_{r1} - t_{r2}}{w_{b1} - w_{b2}} \quad (9)$$

Onde, R_s é a resolução, t_{r1} e t_{r2} são os tempos de retenção do analito 1 e analito 2, respectivamente; w_1 e w_2 são as larguras das bases dos picos dos analitos 1 e 2.

E o fator de retenção (k'), segundo a equação,

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (10)$$

Onde, t_r é o tempo de retenção do analito e t_m é o tempo de eluição do solvente.

3.3.2 Linearidade

A linearidade foi demonstrada por intermédio do coeficiente de determinação, R^2 , proveniente da análise de variância (ANOVA) obtida na regressão linear simples de diversas concentrações, utilizando sinais relativos à concentração e sinal analítico para cada analito e padrão interno.

Foram preparadas duas curvas analíticas a partir das soluções estoque de padrões de pureza conhecida e descrita nos respectivos certificados disponíveis. As faixas de concentração dos analitos (pontos das curvas) estão descritas na Tabela 4 e na Tabela 5. Como as análises são feitas com etapa de derivatização, em algumas partes deste trabalho os alcaloides minoritários identificados serão referidos aos seus derivados.TMS, porém as curvas analíticas foram construídas considerando as massas dos analitos não derivatizados e assim são expressas todas as concentrações.

Tabela 4 - Faixa de concentração dos analitos na curva analítica 1

Analito	Faixas de concentração ($\mu\text{g} / \text{mL}$)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
anidroecgonina metil éster	1,4	2,3	5,9	12	31	61,4	91,4	122,4
anidroecgonina	1,2	2	5,2	10,5	27,2	53,8	80	107,2
metilecgonina	1,2	2	5	10,1	26,2	51,7	77	103
tropacocaína	1,4	2,3	5,8	11,9	30,7	60,5	90,2	120,7
norcocaína	1,3	2,1	5,4	11	28,5	56,3	83,9	112,3
N-formilcocaína	1,4	2,3	5,8	11,8	30,6	60,3	89,9	120,3
trimetoxicocaína	1,5	2,4	6	12,4	32	63,2	94,2	126,1

Tabela 5 - Faixa de concentração dos analitos na curva analítica 2

Analito	Faixa de trabalho ($\mu\text{g} / \text{mL}$)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ecgonina	2,6	3,7	5,5	10,5	27,7	57	141	290,5	436,6	584
benzoilecgonina	13,7	19,6	29,5	56,6	148,7	306,2	757,8	1560,4	2345	3137,2
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	5,5	7,9	11,9	22,9	60	123,6	305,9	629,8	946,4	1266,1

3.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados por meio dos parâmetros das curvas analíticas do método desenvolvido,⁵⁹ conforme descrito nas sessões 1.7.3.3 e 1.7.4

3.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada em níveis de repetitividade e precisão intermediária. Para a repetitividade do método foi utilizada uma amostra de cocaína cloridrato (CCS) e uma amostra

de cocaína base livre (1694-4-MS), que passaram por processo de homogeneização e são representativas dos tipos de matriz que deverão ser objeto das análises do método.

Para cada uma das amostras foram preparadas e analisadas 6 replicatas por um único analista, por intermédio de pesagens individuais, resultando em 12 preparações em um único dia (06 para cada amostra de cocaína). Este parâmetro foi avaliado pelos coeficientes de variação (CV %), que devem ser iguais ou inferiores a 10% em cada amostra avaliada para atenderem aos requisitos do POP-I-SEPLAB-11 (Validação de Métodos de Análises Cromatográficas Quantitativas).

A precisão ainda foi verificada em termos de repetitividade do equipamento e precisão intermediária. Na repetitividade do equipamento utilizado para as análises de CG-DIC desenvolvidas neste trabalho (SEPLAB/CG-05) foram realizadas seis injeções consecutivas de um dos *vials* das soluções preparadas para a repetitividade do método, para cada uma das amostras de cocaína (1696-4-MS e CCS). O coeficiente de variação (CV%) deve ser menor que 5% em cada amostra avaliada para atenderem aos requisitos do POP-I-SEPLAB-11.

Para a avaliação da precisão intermediária foram feitos dois ensaios independentes. O primeiro compreende análises feitas pelo mesmo analista, em dias diferentes, no mesmo equipamento. O segundo foi realizado por analistas diferentes e em dias diferentes, no mesmo equipamento. Em cada ensaio foram preparadas e analisadas 6 replicatas das amostras 1696-4-MS e CCS, totalizando vinte e quatro preparações. O coeficiente de variação (CV %) deve igual ou inferior a 10% em cada amostra avaliada para atenderem aos requisitos do POP-I-SEPLAB-11.

3.3.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada como porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de analito (padrão) adicionada à amostra de cocaína controle do SEPLAB (CCS), em três níveis de concentração diferentes (alto, médio e baixo) e dentro da faixa linear do método. Para cada nível, foram feitas três pesagens independentes da amostra CCS e foram adicionadas soluções dos padrões certificados dos compostos minoritários de cocaína. Assim, os resultados da exatidão foram avaliados e expressos em porcentagem de recuperação (R%), como médias de triplicatas em cada nível de concentração, segundo a equação 11.

$$R(\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (11)$$

3.3.6 Robustez

A robustez do método para determinação e quantificação de compostos minoritários de cocaína foi verificada pela aplicação do teste de Youden.

Para este ensaio foram propostas cinco variações controladas de parâmetros críticos do método cromatográfico e duas variações do método de preparo das amostras, em dois níveis (acima e abaixo do parâmetro original). Foram variados fluxo/vazão do gás de arraste, temperatura do injetor, temperatura do forno, razão do *split* do injetor, volume de amostra injetado, tempo e temperatura de derivatização. Cada ensaio foi realizado em triplicata, totalizando 24 preparações individuais.

Tabela 6 - Variação dos parâmetros para cada combinação ensaiada

Parâmetros variados	Parâmetros originais	Ensaio							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Fluxo (mL.min ⁻¹)	1,2	1,1	1,3	1,1	1,3	1,1	1,3	1,1	1,3
T _{injetor} (°C)	230	225	225	235	235	225	225	235	235
T _{forno} (°C)	160	155	155	155	155	165	165	165	165
Razão <i>Split</i>	50	55	45	45	55	55	45	45	55
V _{injeção} (µL)	1	1,2	0,8	1,2	0,8	0,8	1,2	0,8	1,2
T _{derivatização} (°C)	80	85	85	75	75	75	75	85	85
Tempo derivatização (min)	60	55	65	65	55	65	55	55	65

3.3.7 Estabilidade

Para verificar a estabilidade dos analitos de interesse nas amostras de cocaína, foram preparados, a partir da matriz de cocaína 1696-4-MS dois grupos de amostras, cada um composto de três amostras, que foram pesadas, dissolvidas na solução de padrão interno e derivatizadas. O primeiro grupo foi chamado “bancada” (1B, 2B, 3B) e o segundo grupo chamado de “freezer” (1F, 2F, 3F). As amostras “bancada” permaneceram sobre a bancada do laboratório à temperatura ambiente e foram analisadas após 24 horas, 48 horas, 06 dias, 12 dias

e 20 dias. Já as amostras “freezer” foram mantidas no congelador, à aproximadamente -15°C, e foram analisadas após 24 horas, 06 dias e 20 dias do preparo (Tabela 7).

Tabela 7 – Amostras para ensaio de estabilidade

Amostras	T (°C)	Tempo zero	24 horas	48 horas	06 dias	12 dias	20 dias
Bancada	20	1B	1B	2B	-	2B	3B
Freezer	-15	-	1F	-	2F	-	3F

B= bancada e F= freezer

Antes do início do estudo de estabilidade, uma amostra (1B - Tabela 7) foi analisada para obtenção das concentrações no tempo zero, que foram comparadas com aquelas resultantes das análises posteriores, nas duas condições de armazenamento propostas.

3.4 Resultado e discussão

3.4.1 Parâmetros de validação

3.4.1.1 Seletividade

A Tabela 8 apresenta os tempos de retenção, fatores de retenção e resolução para as análises realizadas com condições cromatográficas, baseadas no método do DEA-EUA.

Além de apresentar os analitos de interesse (alcaloides minoritários da cocaína, adulterantes e padrão interno), também mostra os resultados para compostos não determinados ou não identificados, provenientes da matriz ou do processo de preparação de amostras com derivatização. Foi realizada análise de tais analitos por espectrometria de massas, revelando que não se tratam de compostos de eventual interesse do método e não foram tomadas outras ações para identifica-los inequivocamente

Também são apresentados na Tabela 8 valores de resolução 1 (determinada considerando o pico anterior ao pico do analito em questão) e resolução 2 (considerando o pico posterior).

Tabela 8 - Seletividade dos compostos minoritários de cocaína- método “DEA-EUA”

Analito	Tempo de retenção (min.)	Fator de retenção (k')	Resolução 1 (Rs)	Resolução 2 (Rs)
Composto não retido	1, 243	-	-	-
nd	2, 530	1,0	-	12,9
nd	3, 250	1,6	12,9	12,8
anidroecgonina metil éster	3, 644	1,9	12,8	4,6
nd	3, 887	2,1	4,6	19,1
anidroecgonina.TMS	4, 892	2,9	19,1	4,6
nd	5, 198	3,2	4,6	10,5
metil ecgonina-TMS	5, 766	3,6	10,5	4,7
fenacetina-TMS	6, 023	3,8	4,7	11,7
fenacetina	7, 027	4,7	11,7	1,2
ecgonina-2TMS	7, 117	4,7	1,2	27,2
benzocaína.N-TMS	8, 809	6,1	27,2	1,2
lidocaína.TMS	8, 905	6,2	1,2	9,1
cafeína	9, 494	6,6	9,1	14,7
lidocaína	11, 062	8,0	14,7	6,9
aminopirina	11, 635	8,4	6,9	5,9
levamisol	12, 345	8,9	5,9	1, 7
tropacocaína	12, 563	9,1	1,7	25,6
nd	14, 309	10,5	25,6	17,1
heneicosano	15, 364	11,7	17,1	14,2
nd	16, 849	12,6	14,2	8,1
benzoilecgonina.TMS	18, 005	13,5	8,1	3,8
norcocaína.TMS	18, 334	13,8	3,8	17,3
<i>cis</i> - cinamoilcocaína*	19, 497	14,7	17,3	1,9
nd	19, 609	14,8	1,9	16,2
<i>cis</i> -cinamoilecgonina-TMS*	20, 412	15,4	16,2	8,8
N-formilcocaína	20, 964	15,9	8,8	5,5
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	21, 392	16,2	5,5	8,7
<i>trans</i> -cinamoilecgonina-TMS*	22, 246	16,9	8,7	30, 9
trimetóxicocaína	24, 941	19,1	30,9	11,3
nd	25, 884	19,8	11,3	-

Resolução 1 - resolução em relação ao pico anterior; Resolução 2 – resolução em relação ao pico posterior; * analito não quantificado pelo método; nd- composto não determinado.

Os resultados obtidos a partir dos dados contidos nas tabelas mostram que os critérios de aceitação de 2,0 para o fator de retenção (k') e 1,5 para a resolução (Rs), foram atingidos por praticamente todos os analitos.

O par de analito ecgonina.2TMS / fenacetina apresentou problema de seletividade para o método em desenvolvimento, uma vez que possuem tempos de retenção próximos e resoluções abaixo do critério de aceitação (1,2 e), conforme ilustrado na Tabela 8 e na figura 9. Ainda pode-se notar que a benzocaína. N-TMS e a lidocaína.TMS possuem baixa resolução uma em relação à outra (1,2), mas tal proximidade não se configura um problema de seletividade para os analitos em estudo, por estes dois se tratarem de dois adulterantes da cocaína.

Portanto, o método se mostrou seletivo para a grande maioria dos analitos de interesse, sendo necessário avaliar em cada caso a conveniência de se quantificar ecgonina.2TMS e tropacocaína caso haja adulterantes na amostra (fenacetina e levamisol, respectivamente). Como as análises de compostos majoritários (como pureza de cocaína e dosagem de tais adulterantes) é rotineiramente realizada no escopo do projeto PeQui no SEPLAB/INC, pode-se realizar uma integração mais cuidadosa a fim de minimizar tais problemas de seletividade.

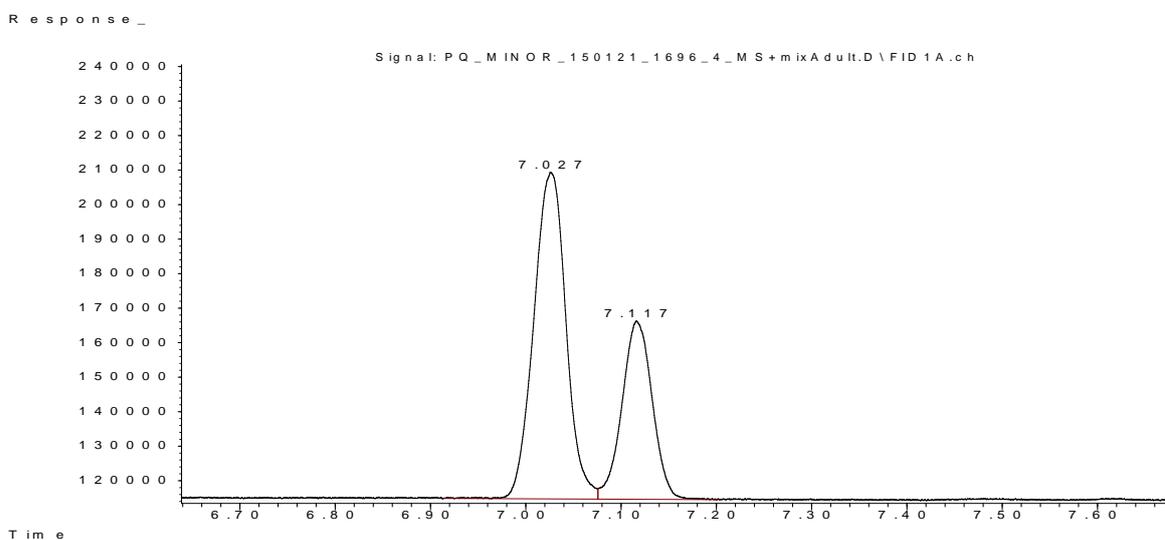


Figura 10- Seletividade (1) fenacetina: $tr = 7,027$; e para a (2) ecgonina.2TMS: $tr = 7,117$

A Tabela 9 mostra os resultados da seletividade para os compostos minoritários de cocaína testada por meio do método baseadas no trabalho do LPS-França.

Tabela 9 - Seletividade dos compostos minoritários de cocaína - método “LPS-França”

Analito	Tempo de retenção (min.)	Fator de retenção (k')	Resolução1 (Rs)	Resolução 2 (Rs)
Composto não retido	1, 208	-	-	-
nd	2, 503	0,6	-	14,2
nd	2, 503	1,1	14,2	2,7
anidroecgonina metil éster	2, 628	1,2	2,7	2,9
nd	2, 750	1,3	2,9	2,7
nd	2, 891	1,4	2,7	9,1
anidroecgonina.TMS	3, 333	1,8	9,1	7,4
metilecgonina.TMS	3, 870	2,2	7,4	2,5
fenacetina-TMS	4, 010	2,3	2,5	10,8
fenacetina	4, 696	2,9	10,8	0,9
ecgonina-2-TMS	4, 737	2,9	0,9	27,2
benzocaína. n-TMS	5, 913	3,9	27,2	1,0
lidocaína.TMS	5, 978	4,0	1,0	6,1
nd	6, 345	4,3	6,1	3,2
cafeína	6, 510	4,4	3,2	10,6
lidocaína	7, 663	5,3	10,6	5,0
aminopirina	8, 136	5,7	5,0	4,3
levamisol	8, 802	6,3	4,3	1,0
tropacocaína	8, 911	6,4	1,0	11,3
nd	9, 568	6,9	11,3	27,0
heneicosano	11, 538	8,6	27,0	15,6
nd	13, 267	10,0	15,6	8,0
nd	14, 547	11,0	8,0	2,5
benzoilecgonina.TMS	14, 642	11,1	2,5	4,6
norcocaína.TMS	15, 043	11,5	4,6	16,9
<i>cis</i> - cinamoilcocaína*	16, 510	12,7	16,9	2,2
nd	16, 686	12,8	2,2	1,9
nd	16, 845	12,9	1,9	15,8
<i>cis</i> -cinamoilecgonina-TMS*	17, 891	13,8	15,8	
nd	9, 568	6,9	11,3	27,0
N-formilcocaína	18, 470	14,3	-	-
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	19, 018	14,7	4,8	12,2
<i>trans</i> -cinamoilecgonina-TMS	20, 197	15,7	12,2	27,6
trimetoxicocaína	23, 869	18,7	27,6	7,3
nd	24, 870	19,6	7,3	-

Resolução 1 - resolução em relação ao pico anterior; Resolução 2 – resolução em relação ao pico posterior; * analito não quantificado pelo método; nd- composto não determinado.

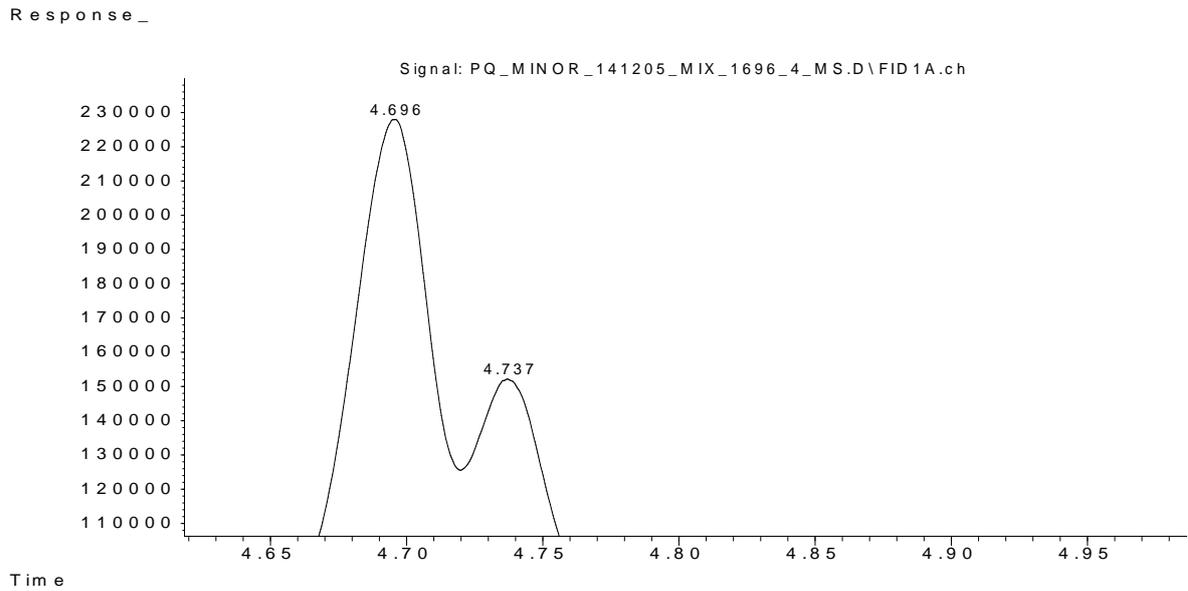


Figura 11- Seletividade (LPS) para (1) fenacetina: $tr = 4,696$ min.; e para a (2) ecgonina.2TMS: $tr = 4,737$ min.

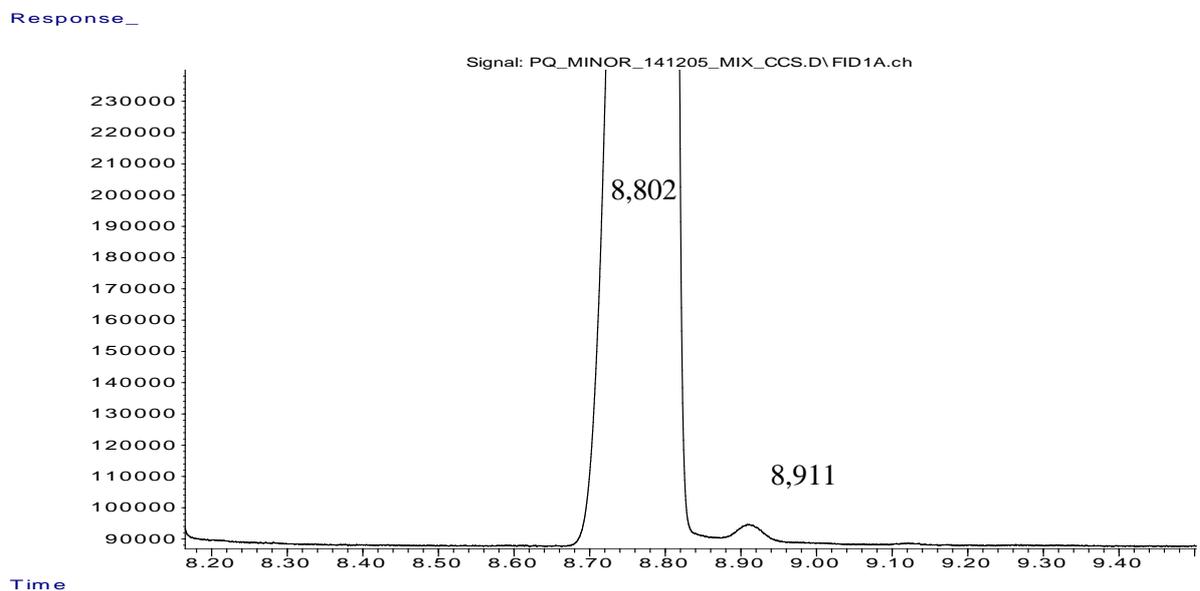


Figura 12- Seletividade (1) levamisol: $tr = 8,802$ min.; e para a (2) tropacocaína: $tr = 8,911$ min.

Comparando a Tabela 8 com a Tabela 9 pode-se observar que apesar dos problemas de seletividade entre dois analitos de interesse e dois compostos utilizados como adulterantes

de cocaína, o teste de seletividade que utilizou parâmetros baseados no método do DEA-EUA apresenta melhores resultados. Dessa forma foi definido como aquele que seria utilizado nas demais etapas da validação, após ajustes, dando origem ao método SEPLAB/INC.

É oportuno também registrar que nos cromatogramas do branco não foram observados picos nos tempos de retenção dos analitos.

3.4.1.2 Linearidade

O tratamento dos dados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos das curvas analíticas, mostra resultados satisfatórios para a linearidade em todos analitos. Segundo a RE 899 / 2003 da ANVISA,⁴⁸ o critério de aceitação mínimo para o coeficiente de correlação é 0,99 e o INMETRO,⁴⁹ recomenda que o valor mínimo de 0,90 seja obtido. Já nos critérios adotados no POP de validação do laboratório de química forense da Polícia Federal (SEPLAB/INC), o valor mínimo proposto é de 0,999. Além disso, os valores de coeficientes de variação entre as replicatas estão de acordo com os critérios de aceitação [CV(%) igual ou inferior a 5%] para a maioria dos analitos.⁴⁸ Os coeficientes de variação excederam 5% somente para pontos de menor concentração das curvas das curvas analíticas, como mostrado no anexo 1.

Os resultados para as curvas analíticas obtidas (concentração e sinal analítico relativos – analito/padrão interno), estão ilustrados na Tabela 10. Eles demonstraram que o método é linear na faixa estudada. A regressão linear se mostrou estatisticamente significativa para todos os analitos em estudo, com R^2 variando entre 0,9990 e 0,9999, o que indica que de 99,90% a 99,99% dos valores calculados estão sendo em torno da média, acarretando em resíduos pouco relevantes. A pequena diferença entre os coeficientes de determinação dos dois grupos de alcaloides minoritários de cocaína pode estar relacionada à maneira como foram preparadas as soluções estoque para as duas curvas, descrita no 3.2.2.

Tabela 10 - Linearidade do método de quantificação de compostos minoritários

Analito	Intercepto (a)	Inclinação (b)	Faixa de trabalho ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Coefficiente de determinação linear (R^2)
anidroecgonina metil éster	0,0005	0,4796	1,40 - 122	0,9993
anidroecgonina	0,00003	0,8379	1,20- 107	0,9994
metilecgonina	0,00002	0,7513	1,20 - 103	0,9993
tropacocaína	0,0004	0,705	1,40- 120	0,9993
norcocaína	0,0003	0,6991	1,30- 112	0,9993
N-formilcocaína	0,0019	0,6832	1,40- 120	0,9990
trimetoxicocaína	-0,0001	0,4875	1,40- 126	0,9992
ecgonina	-0,0005	1,0031	2,50- 584	0,9999
benzoilecgonina	-0,0068	0,7051	13,00- 3.000	0,9999
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	-0,0009	0,6683	5,00- 1.260	0,9999

Os gráficos para as curvas analíticas apresentam no eixo **y** (ordenadas) os resultados das respostas analíticas relativas (áreas dos picos) para analitos divididos pela resposta do padrão interno (Área relativa – an/PI). No eixo **x** (abscissas) são apresentadas concentrações relativa das soluções analisadas, através da a razão entre a concentração dos analitos e a concentração de padrão interno (Concentração relativa – an/PI).

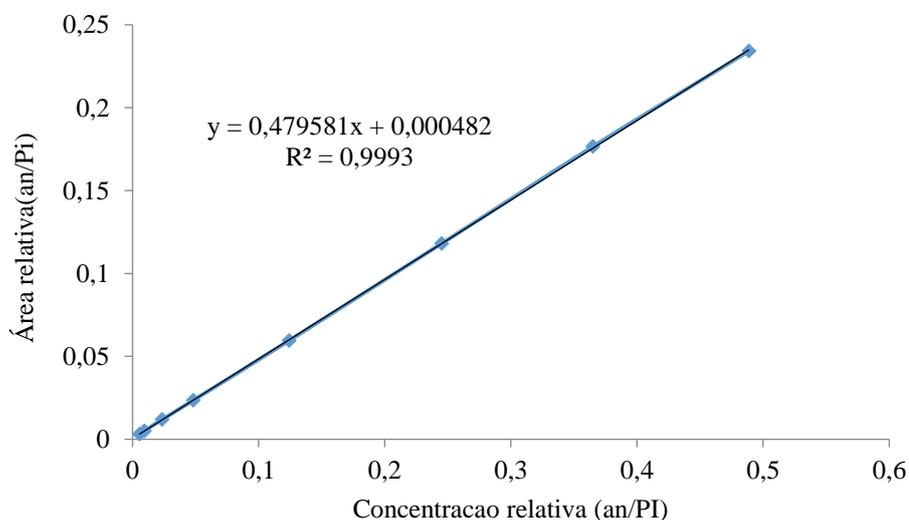


Figura 13- Curva analítica da Anidroecgonina metil éster

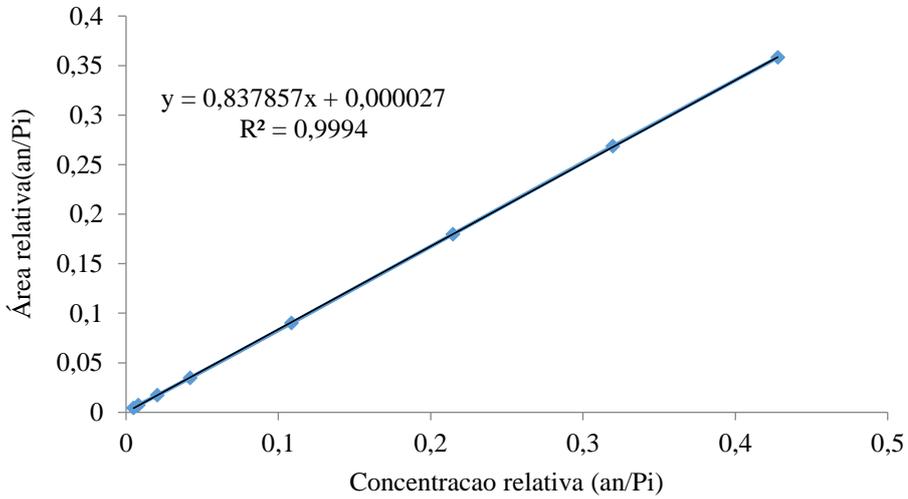


Figura 14- Curva analítica da Anidroecgonina.TMS

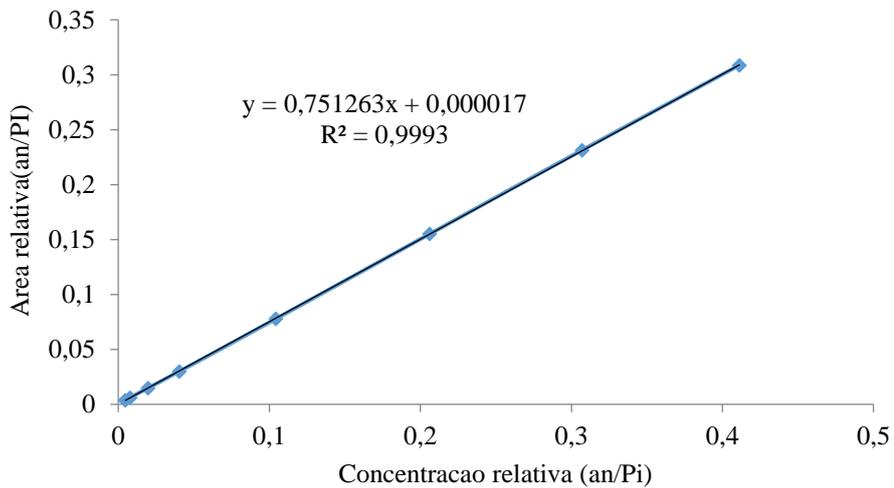


Figura 15- Curva analítica da Metilecgonina.TMS

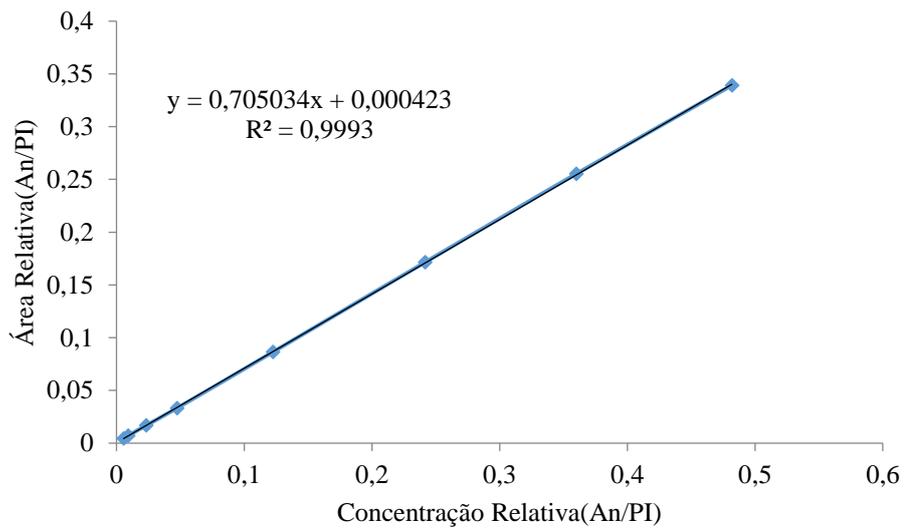


Figura 16- Curva analítica da Tropacocaína

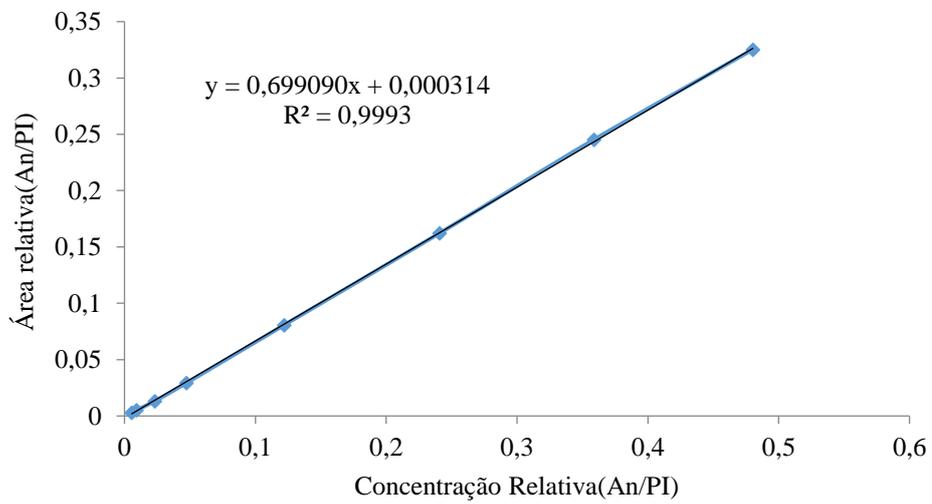


Figura 17- Curva analítica da Norcocaína.TMS

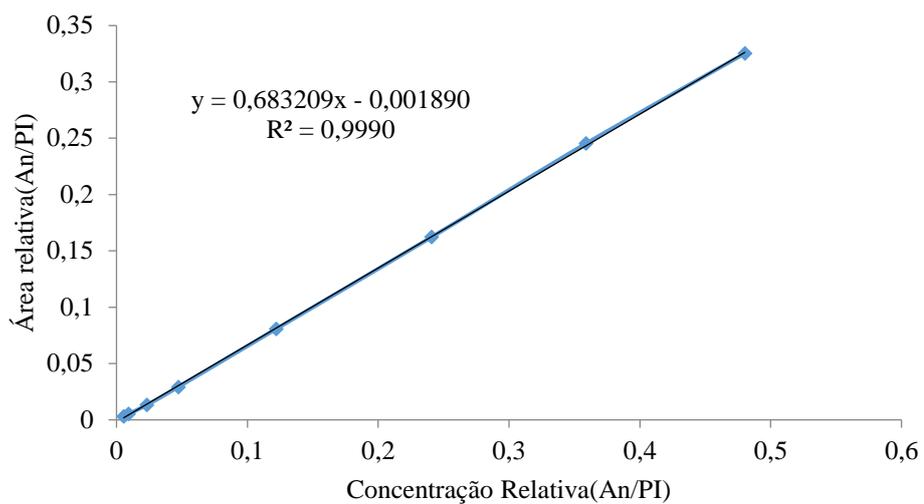


Figura 18- Curva analítica da N-Formilcocaína

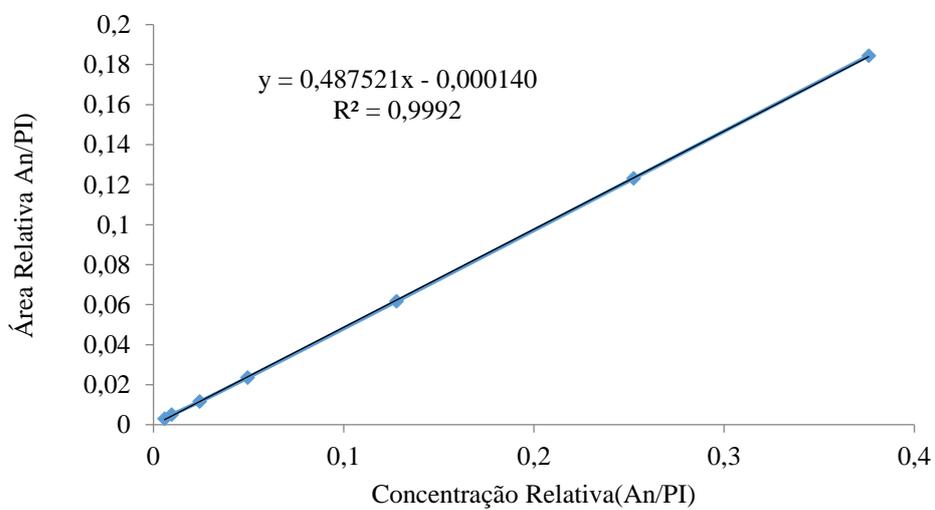


Figura 19- Curva analítica da 3,4,5-Trimetoxicocaína

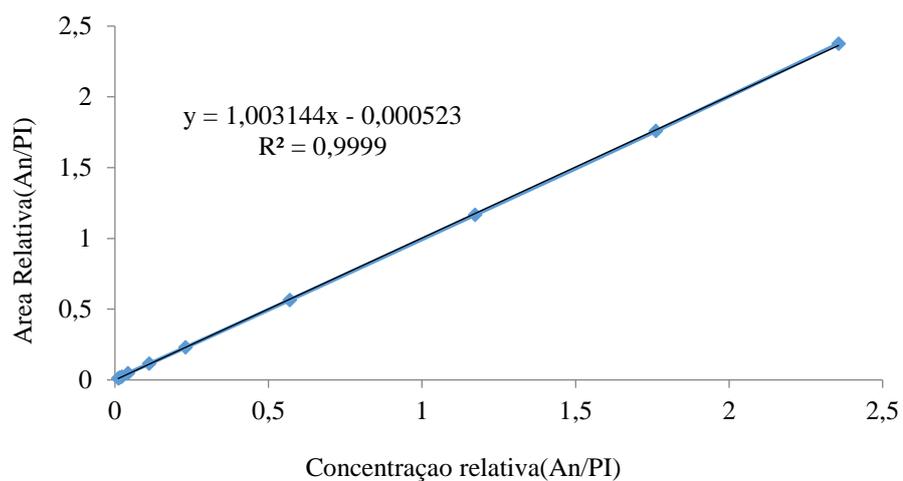


Figura 20 - Curva analítica da Ecgonina.2TMS

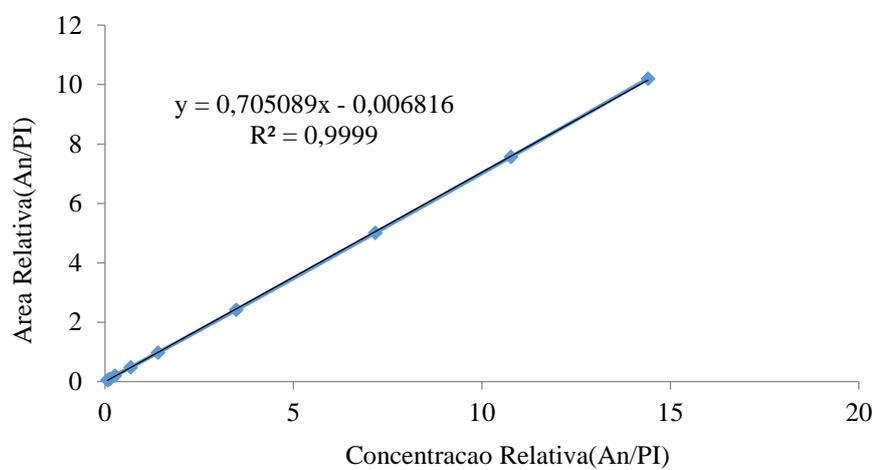


Figura 21- Curva analítica da Benzoilecgonina.TMS

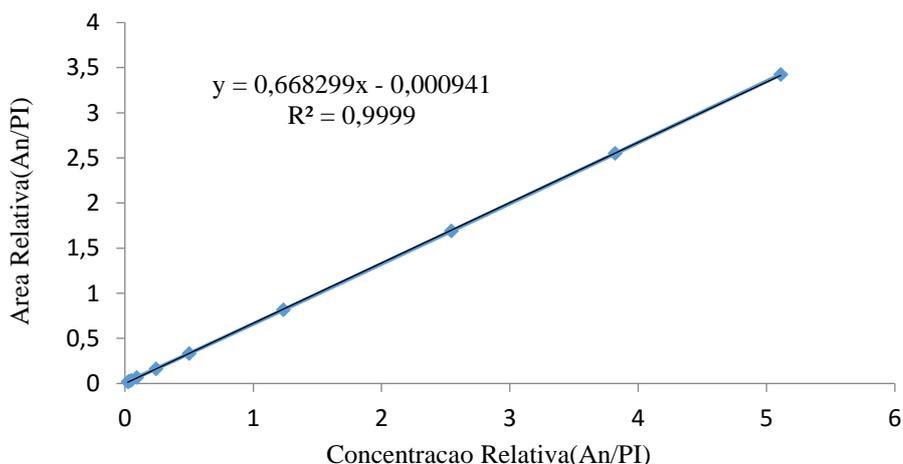


Figura 22- Curva analítica da *trans*-Cinamoilcocaína

Os gráficos incluem os valores individuais de todas as replicatas e permitem visualizar o comportamento de todos os pontos das curvas analíticas nos intervalos de concentração estudados.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada como ferramenta adicional na avaliação das regressões (Tabela 11 e Tabela 12). Na distribuição F, utilizada no teste de hipótese da equação da reta de regressão, a hipótese nula (H_0) é de que o coeficiente angular $\mathbf{b} = 0$ e a hipótese alternativa (H_1) é que $\mathbf{b} \neq 0$.

Como o F-calculado se mostrou maior que F-crítico a hipótese nula deve ser rejeitada e aceita a hipótese alternativa, $\mathbf{b} \neq 0$, e assim pode-se confirmar e aceitar a regressão. O F calculado é 10 vezes maior que o F crítico com 95% de confiança, confirmando assim a regressão.⁶⁶ O valor de F, é dado por,

$$\frac{MQR}{MQr} \quad (12)$$

Onde MQR é média quadrática devida à regressão e MQr é a média quadrática residual. Quanto maior for o valor de F, maior será a relação linear entre as variáveis \mathbf{y} e \mathbf{x} , o modelo de regressão linear pode ser considerado estatisticamente significativo.⁶⁷

Tabela 11 - Resumo dos resultados da análise de variância das curvas analíticas

Analito	Regressão		Falta de ajuste	
	F _{reg}	F _{crítico} (0,05;1;23)	F _{faj}	F _{crítico} (0,05;6;16)
anidroecgonina metil éster	39007,05	4,28	0,00202	2,74
anidroecgonina	55221,58	4,28	0,0002	2,74
metilecgonina	48523,96	4,28	0,00016	2,74
tropacocaína	44442,98	4,28	0,00093	2,74
norcocaína	48287,54	4,28	0,00092	2,74
N-formilcocaína	16014,14	4,28	0,01419	2,74
trimetoxicocaína	44313,61	4,28	0,00076	2,74

Para $F_{reg} > F_{crítico}$ 95% de confiança e graus de liberdade, implica em regressão significativa; $F_{faj} < F_{crítico}$, o modelo apresenta bom ajuste

Tabela 12 - Resumo dos resultados da análise de variância das curvas analíticas

Analito	Regressão		Falta de ajuste	
	F _{reg}	F _{crítico} (0,05;1;29)	F _{faj}	F _{crítico} (0,05;8;20)
ecgonina	646082	4,18	0,00078	2,45
benzoilecgonina	557620	4,18	0,00091	2,45
trans-cinamoilcocaína	1444039	4,18	0,00032	2,45

Para $F_{reg} > F_{crítico}$ 95% de confiança e graus de liberdade, implica em regressão significativa; $F_{faj} < F_{crítico}$, o modelo apresenta bom ajuste.

Ainda observando a Tabela 11 e a Tabela 12 nota-se que o F de falta de ajuste é muito menor que o F crítico para todos os analitos, demonstrando que o modelo está ajustado às observações. O F de falta de ajuste é dado por,

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \quad (13)$$

Sendo a MQ_{faj} a média quadrática da falta de ajuste e MQ_{ep} a média quadrática do erro puro.

A determinação dos resíduos para a resposta analítica em cada faixa de concentração foi realizada para todos os analitos pela diferença entre a resposta experimental obtida e a resposta esperada ou estimada, a partir da curva analítica.

Para a identificação de possíveis valores discrepantes (*outliers*) nos resíduos, realizou-se o teste de Grubbs para todos os analitos⁴⁹, por meio da equação,

$$|G| = \left| \frac{(x_i - \bar{x})}{s} \right| \quad (14)$$

Onde x_i é valor suspeito de ser aberrante, \bar{x} é a média e s é o desvio padrão dos valores obtidos. Os resultados obtidos para a anidroecgonina metil éster e ecgonina podem ser observados na Tabela 13. Os resultados para os demais analitos estão apresentadas no anexo 3 deste trabalho.

Tabela 13- Teste de Grubbs para resíduos

Níveis de concentração	Anidroecgonina metil éster		Níveis de concentração	Ecgonina	
	G_{calc}	$G_{95\%}$		G_{calc}	$G_{95\%}$
1	1,114	1,155	1	0,426	1,155
2	1,095	1,155	2	0,274	1,155
3	0,875	1,155	3	0,360	1,155
4	0,603	1,155	4	0,481	1,155
5	0,983	1,155	5	0,974	1,155
6	1,109	1,155	6	1,131	1,155
7	0,671	1,155	7	0,224	1,155
8	0,868	1,155	8	1,140	1,155
			9	1,092	1,155
			10	1,119	1,155

Para $n=3$ e 95% de confiança $G_{tabelado} = 1,155$

Os valores de Grubbs, $G_{calculado}$ para todos os analitos foram inferiores ao valor $G_{crítico}$, portanto não há evidência de valores discrepantes no conjunto de dados.

Para avaliar a homogeneidade das variâncias, foi aplicado o teste de Cochran, que é obtido pela relação entre a maior variância e o somatório das demais variâncias:⁶⁸

$$C_{calculado} = \frac{s_{max}^2}{\sum S^2} \quad (15)$$

Os valores de $C_{calculado}$, em todos os casos, foram maiores que o valor tabelado para $n=8$ e $n=10$, que são os números de pontos das curvas para 2 graus de liberdade, referentes aos ensaios realizados em triplicata. Os resultados sugerem que as variâncias não são suficientemente homogêneas, o que pode ser inclusive visualizado pela análise gráfica dos resíduos. Por essa razão, os resultados para o teste de Cochran não foram incluídos neste trabalho

Os gráficos de resíduos para anidroecgonina metil éster, anidroecgonina, metilecgonina, norcocaína, N-formilcocaína e 3,4,5-trimetoxicocaína apresentam a maioria dos resíduos distribuídos aleatoriamente em torno da reta $x=0$, mas com uma tendência de aumento do resíduo para valores maiores de concentração.

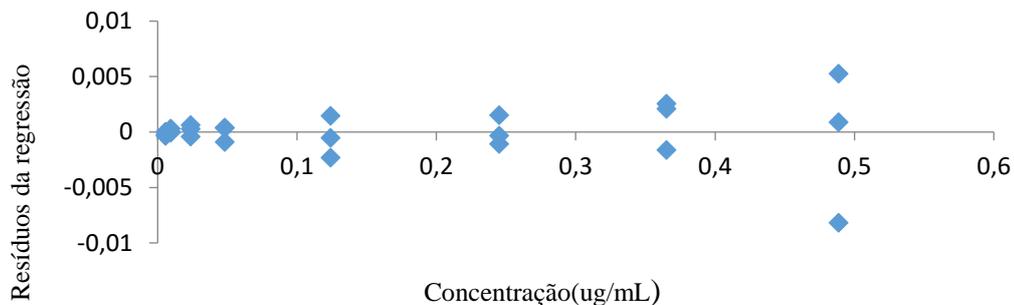


Figura 23 - Resíduos para anidroecgonina metil éster

Onde os resíduos da regressão são dados pela diferença entre as respostas analíticas obtidas e as repostas analíticas estimadas pela equação da reta.

Os gráficos para ecgonina, benzoilecgonina e *trans*-cinamoilcocaína apresentam resíduos com tendência curvilínea, sendo também menores em concentrações mais baixas e crescentes em faixas maiores de concentração. Essa leve tendência de crescimento do resíduo em alguns pontos, indica violação da hipótese de homogeneidade ou homocedasticidade das variâncias.

Porém, como os resíduos também se mostraram muito pequenos em toda faixa estudada, acabam não afetando significativamente outras figuras de mérito cruciais, como a precisão e a exatidão. No entanto, esses resíduos podem sugerir incertezas associadas à calibração.

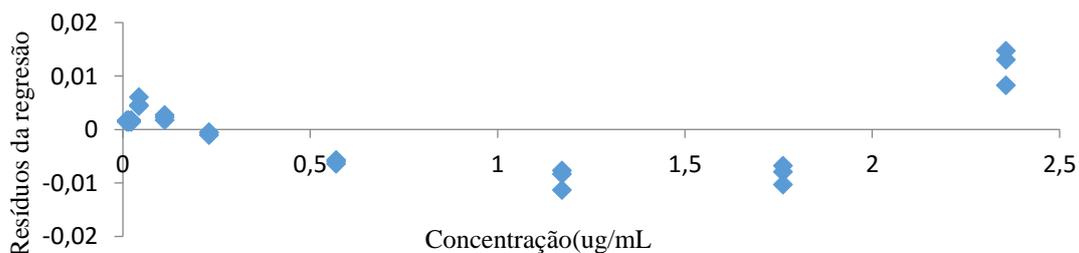


Figura 24- Resíduos para *trans*-cinamoilcocaína

Os gráficos de resíduos para os demais analitos estão apresentadas no anexo 2.

3.4.1.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ foram calculados considerando os parâmetros das curvas analíticas, conforme ilustrado na Sessão 1.7.3.3. Tabela 14 apresenta os valores de LD e LQ para cada um dos alcaloides minoritários de cocaína em ppm na amostra, considerando-se que a análise é realizada utilizando-se uma massa igual a 10, 25mg da amostra de cocaína. Também apresenta os valores de LD e LQ em µg/mL na solução analisada.

Tabela 14 – Limites de detecção e quantificação

Analito	Solução		Amostra	
	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	LD (ppm)	LQ (ppm)
anidroecgonina metil éster	1	4	61	203
anidroecgonina	1	3	48	161
metilecgonina	1	3	50	165
tropacocaína	1	3	59	196
norcocaína	1	3	53	177
N-formilcocaína	1	4	68	226
trimetoxicocaína	1	4	63	210
ecgonina	1	4	64	215
benzoilecgonina	7	22	380	1268
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	2	5	90	301

3.4.1.4 Precisão

Os ensaios de precisão apresentaram resultados satisfatórios para todos analitos quando avaliados em termos de coeficientes de variação, que se encontram dentro dos limites estabelecidos pelo POP de validação do laboratório de química forense do Instituto de Criminalística da Polícia Federal.

Para a repetitividade do equipamento (Tabela 15) o maior valor de CV (%) foi de 2,76 % e, para a repetitividade do método (Tabela 16), de 2,85%. Para a precisão intermediária

(Tabela 17), apesar de um sensível aumento, os valores de CV (%) também ficaram dentro dos critérios de aceitação para todos os analitos.

Tabela 15 - Repetitividade do equipamento CG-DIC

Analito	Concentração média (µg/mL)	Desvio padrão	CV (%)
anidroecgonina metil éster	598,22	8,38	1,40
anidroecgonina	37,70	1,04	2,76
metilecgonina.	536,47	0,65	0,12
tropacocaína	112,45	1,10	0,98
norcocaína	550,69	2,98	0,54
N-formilcocaína	<LQ	-	-
trimetoxicocaína	431,11	6,49	1,50
ecgonina	369,40	2,46	0,67
benzoilecgonina	3231,84	23,34	0,72
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	3168,39	5,76	0,18

Critérios de aceitação SEPLAB/INC: CV (%) menor ou igual a 5%; <LQ: analito em concentração inferior ao limite de quantificação do método;

Tabela 16 - Repetitividade do método analítico

Analito	Concentração da média (µg/mL)	Desvio padrão	CV (%)
anidroecgonina metil éster	592,26	8,50	1,43
anidroecgonina	37,79	1,08	2,85
metilecgonina	537,73	4,74	0,88
tropacocaína	112,71	1,03	0,92
norcocaína	551,97	4,16	0,75
N-formilcocaína	<LQ	-	-
trimetoxicocaína	426,83	7,68	1,80
ecgonina	370,26	4,09	1,11
benzoilecgonina	3239,37	32,32	1,00
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	3175,77	22,56	0,71

Critérios de aceitação SEPLAB/INC: CV (%) menor ou igual a 5%; <LQ: analito em concentração inferior ao limite de quantificação do método;

Tabela 17- Avaliação de precisão intermediária

Analito	Diferentes dias/mesmo analista			Diferentes dias/analistas		
	Conc.média (µg/mL)	DP	CV (%)	Conc. Média (µg/mL)	DP	CV (%)
anidroecgonina metil éster	594,17	10,70	1,80	2655,32	89,57	3,37
anidroecgonina	55,72	5,12	9,18	174,52	8,07	4,62
metilecgonina	465,70	6,97	1,50	101,72	8,18	8,04
tropacocaína	309,13	6,40	2,07	1041,94	35,67	3,42
norcocaína	540,13	40,71	7,54	194,55	18,98	9,76
N-formilcocaína	< LQ	-	-	< LQ	-	-
trimetoxicocaína	422,94	8,91	2,11	1211,72	27,89	2,30
ecgonina	1149,32	13,77	1,20	3677,70	70,01	1,90
benzoilecgonina	7950,38	98,83	1,24	35100,87	759,34	2,16
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	7959,27	118,26	1,49	21848,31	524,76	2,40

Critérios de aceitação SEPLAB/INC: CV (%) menor ou igual a 10%; <LQ: analito em concentração inferior ao limite de quantificação do método;

3.4.1.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela recuperação percentual da quantidade de analito acrescentada através de fortificação, de acordo com a equação 11, (Sessão 3.3.5). Para o laboratório de química forense do instituto de criminalística da Polícia Federal, o erro relativo entre os valores teóricos e os valores obtidos deve ser igual ou inferior a 10%. Esses valores foram atingidos para praticamente todos os analitos, com recuperação variando entre 90 e 108%. Somente a ecgonina, no nível baixo de concentração, apresentou valor levemente fora do critério de aceitação (113% de recuperação).

Tabela 18 - Avaliação da exatidão - nível alto de concentração

Analito	Concentração/Recuperação		
	Concentração esperada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
anidroecgonina metil éster	117,8	114,1	96
anidroecgonina	17,8	17,5	98
metilecgonina.	84,8	83,7	98
tropacocaína	45,6	44,2	96
norcocaína.	69,4	59,4	98
N-formilcocaína	29,1	28,8	98
trimetoxicocaína	43,8	43,3	99
ecgonina	75,8	76,0	101
benzoilecgonina.	558,7	567,5	98
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	455,4	470,4	103

Tabela 19 - Avaliação da exatidão - nível médio de concentração

Analito	Concentração/Recuperação		
	Concentração esperada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
anidroecgonina metil éster	37,6	37,2	98
anidroecgonina	6,1	5,9	97
metilecgonina.	27,8	27,3	98
tropacocaína	15,2	14,9	98
norcocaína.	24,8	18,7	97
N-formilcocaína	9,4	10,0	98
trimetoxicocaína	17,4	16,9	97
ecgonina	14,1	14,5	105
benzoilecgonina.	165,3	174,5	105
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	135,1	146,4	108

Tabela 20 – Avaliação da exatidão - nível baixo de concentração

Analito	Concentração/Recuperação		
	Concentração esperada (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)
anidroecgonina metil éster	10,4	10,3	99
anidroecgonina	1,7	1,7	99
metilecgonina.	7,9	7,6	96
tropacocaína	4,7	4,2	90
norcocaína.	8,6	5,1	99
N-formilcocaína	3,3	3,3	96
trimetoxicocaína	9,4	9,5	101
ecgonina	5,7	6,1	113
benzoilecgonina.	71,3	80,2	98
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	60,3	65,0	108

A Tabela 21 apresenta os coeficientes de variação e valores calculados para o teste de significância t de Student, que foi realizado a fim de comprovar a exatidão do método, calculados a partir da equação,⁶⁹

$$t = \frac{Rec - 100}{\frac{S_{Rec}}{\sqrt{n - 1}}} \quad (14)$$

Onde Rec. é a média das recuperações obtidas para n repetições, 100 é a recuperação percentual desejada, n é o número de determinações S_{Rec} é o desvio padrão das recuperações e n-1 é número de graus de liberdade para as repetições, em cada nível de concentração.

Tabela 21- Teste t de Student para avaliação da exatidão do método

Analito	t_s calculado*	t_s tabelado (0,05,2)
anidroecgonina metil éster	2,532	4,303
anidroecgonina	2,740	4,303
metilecgonina.	3,641	4,303
tropacocaína	1,739	4,303
norcocaína.	2,740	4,303
N-formilcocaína	3,641	4,303
trimetoxicocaína	0,686	4,303
ecgonina	1,389	4,303
benzoilecgonina.	0,233	4,303
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	3,285	4,303

* valores em módulo

O valor de t de Student calculado se apresentou dentro do intervalo estabelecido pelo valor tabelado para as recuperações de todos analitos, com 95% de confiança, demonstrando que não há erro sistemático significativo no método.

3.4.1.6 Robustez

A robustez foi avaliada com o auxílio do teste de Youden.^{65,70} Foram feitos 8 ensaios, segundo a combinação de 7 parâmetros, como mostrado anteriormente na tabela 4.

Para a avaliação dos valores dos efeitos foram construídos intervalos de confiança, usando a distribuição de Student,⁶⁷

$$\eta = \hat{\eta} \pm S_{efeito} \times t_{v,\alpha} \quad (15)$$

Onde letra grega η representa o verdadeiro valor de um efeito, isto é, o valor populacional, e $\hat{\eta}$ indica a estimativa desse valor obtida a partir dos ensaios realizados no experimento e o $t_{v,\alpha}$ é t da tabela de Student.

Tabela 22– Avaliação de significância dos efeitos das variações sobre o método analítico

Alcaloides minoritários	Efeito dos parâmetros							S _{efeito}	IC (95%)	t (0,05;16)
	1	2	3	4	5	6	7			
anidroecgonina metil éster	0,28	1,21	-0,19	-1,01	-2,61	0,12	-0,53	1,22	2,59	2,12
anidroecgonina	0,08	0,22	0,41	-1,15	-1,19	-0,93	0,16	0,56	1,19	2,12
metilecgonina.	0,12	0,76	0,17	-0,94	-1,73	0,07	-0,62	1,03	2,19	2,12
tropacocaína	0,12	0,53	-1,35	-0,09	-1,13	-0,24	0,01	0,87	1,85	2,12
norcocaína.	0,83	1,03	-1,17	-0,99	-1,15	0,40	0,21	1,52	3,23	2,12
N-formilcocaína	0,30	0,62	-1,02	0,29	-0,18	0,90	1,47	1,37	2,91	2,12
trimetoxicocaína	0,75	0,79	1,22	-0,42	-0,44	-0,42	-0,27	1,32	2,79	2,12
ecgonina	0,53	0,73	-0,14	-0,54	-0,90	-0,16	0,11	0,25	0,54	2,12
benzoilecgonina.	0,71	0,65	-0,60	0,10	0,17	-0,30	0,13	0,71	1,50	2,12
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	0,30	0,65	-1,06	0,01	-0,10	0,60	0,46	0,81	1,72	2,12

Se $\hat{\eta} < IC_{(95\%)}$, efeito não é estatisticamente significativo

A partir dos valores dispostos na Tabela 22, foi possível avaliar a significância dos efeitos de todas as variações a que o método foi submetido, para cada analito, através da comparação do desvio padrão dos efeitos e com intervalo de confiança em 95% ($S_{efeito} \times t_{(0,05;16)}$). O desvio padrão dos efeitos foi calculado a partir da equação,

$$S_{efeito} = \sqrt{\frac{s^2}{2}} \quad (16)$$

Onde $\frac{s^2}{2}$ é a média da estimativa conjunta das variâncias dos oito ensaios e três repetições.

Os efeitos são considerados estatisticamente significativos quando suas estimativas (obtidas no experimento) forem superiores em valor absoluto ao intervalo de confiança.⁶⁷ Neste estudo, os valores dos efeitos para todos os analitos foram inferiores ao intervalo de confiança, IC_{95%}.

Para o ensaio de robustez foram avaliadas as concentrações dos analitos em comparação com suas concentrações no método original sem variações (tabela 23 e 24). Também foi avaliada a resolução cromatográfica (Rs) dos picos dos analitos (tabela 25), segundo os critérios estabelecidos e aceitos pelo POP de validação do laboratório de química forense do Instituto de Criminalística da Polícia Federal. Para este estudo, o erro relativo (%) para a comparação entre as concentrações do método original e do método com variação de parâmetros, para todos os casos foi inferior 4%.

Tabela 23 - Comparação entre a concentração do método original e do método com variações

Analito	Método Original	Ensaio							
		1		2		3		4	
		Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)
anidroecgonina metil éster	12,11	11,72	-3,22	12,13	-0,16	11,92	-1,58	12,21	0,82
anidroecgonina.TMS	10,72	10,34	-3,54	10,61	0,98	10,62	-0,93	10,61	-0,97
metilecgonina.TMS	10,32	10,12	-2,01	10,34	-0,16	10,24	-0,84	10,39	0,69
Tropacocaína	11,83	11,82	-0,12	11,98	-1,22	11,96	1,09	12,10	2,25
norcocaína.TMS	11,02	10,93	-0,87	11,28	-2,26	11,03	0,03	11,11	0,81
N-formilcocaína	12,78	12,75	-0,24	12,96	-1,41	12,85	0,52	12,76	-0,17
Trimetoxicocaína	13,04	12,77	-2,09	12,94	0,76	12,96	-0,62	13,09	0,42
ecgonina.2TMS	37,19	36,29	-2,40	37,07	0,32	36,81	-1,01	37,10	-0,23
benzoilecgonina.TMS	64,14	63,44	-1,10	63,81	0,52	64,24	0,15	64,56	0,66
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	59,99	59,99	0,00	59,40	1,00	59,40	-0,99	59,37	-1,03

Critérios de aceitação SEPLAB/INC: Er (%) menor ou igual a 10%

Tabela 24 - Comparação entre a concentração do método original e do método com variações

Analito	Ensaaios									
	Método Original	5			6		7		8	
	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)	Conc. Média ($\mu\text{g/mL}$)	Er(%)	
anidroecgonina metil éster	12,11	11,94	-1,44	11,84	-2,24	12,30	1,50	11,83	-2,38	
Anidroecgonina	10,72	10,62	-0,86	10,61	-0,97	10,67	-0,42	10,45	-2,51	
Metilecgonina	10,32	10,24	-0,80	10,24	-0,85	10,50	1,74	10,18	-1,43	
Tropacocaína	11,83	11,82	-0,08	11,71	-1,01	11,91	0,62	11,78	-0,46	
Norcocaína	11,02	10,91	-1,07	10,96	-0,61	11,05	0,20	10,92	-0,91	
N-formilcocaína	12,78	12,71	-0,51	12,50	-2,15	12,67	-0,89	12,91	0,99	
Trimetoxicocaína	13,04	13,00	-0,28	13,13	0,72	13,15	0,88	13,11	0,51	
Ecgonina	37,19	36,68	-1,36	36,70	-1,31	37,00	-0,51	36,70	-1,32	
Benzoilecgonina	64,14	63,22	-1,44	63,64	-0,79	63,47	-1,05	64,18	0,06	
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	59,99	58,23	-2,94	58,07	-3,21	58,91	-1,81	59,31	-1,13	

Critérios de aceitação SEPLAB/INC: Er (%) menor ou igual a 10%

Tabela 25- Resoluções do método original e o método com variações

Alcaloides minoritários	Ensaio								
	Método original	1	2	3	4	5	6	7	8
	Resolução	Resolução	Resolução	Resolução	Resolução	Resolução	Resolução	Resolução	Resolução
anidroecgonina metil éster	61,6	72,0	65,2	66,00	51,17	58,5	34,5	54,6	38,5
anidroecgonina	35,4	37,3	38,8	36,56	39,65	35,8	34,2	37,3	33,6
metilecgonina	31,1	33,2	32,3	32,62	13,53	30,1	28,5	29,6	29,1
Tropacocaína	150,7	153,9	149,4	158,08	66,83	151,5	146,1	149,2	150,5
Norcocaína	8,6	8,9	9,1	8,91	17,89	8,8	9,0	8,9	8,7
N-formilcocaína	71,1	71,5	73,6	69,63	55,82	70,4	73,3	68,6	71,3
trimetoxicocaína	61,1	86,1	87,9	91,47	66,33	86,6	93,1	85,5	87,3
Ecgonina	43,9	46,1	44,4	45,40	32,86	43,5	40,1	42,7	41,6
benzoilecgonina	44,1	43,9	39,5	44,08	50,91	43,9	19,4	42,7	12,8
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	9,5	11,6	12,0	11,62	34,00	11,1	12,3	11,0	11,8

Critérios de aceitação SEPLAB/INC: Resolução maior ou igual a 2,0

Os resultados das resoluções dos picos foram superiores a 2,0 para todos os analitos, em todas as condições testadas, como mostra a Tabela 25

Os critérios de aceitação foram atingidos para todos os analitos e o método pode ser considerado robusto nas variações avaliadas, tanto em relação à separação dos analitos quanto nas diferenças de concentração.

3.4.1.7 Estabilidade

Os resultados obtidos para o ensaio de estabilidade, expressos em termos de erro relativo (%), estão apresentados na Tabela 26 e na Tabela 27.

Tabela 26 – Avaliação da estabilidade das soluções à temperatura ambiente

Alcaloides minoritários	Bancada								
	concentração Referência ($\mu\text{g/mL}$)	24 horas		48 horas		12 dias		20 dias	
		concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Er (%)						
anidroecgonina metil éster	588,4	589,9	0,2	573,6	-2,5	575,6	-2,2	560,5	-4,7
anidroecgonina	55,5	58,6	5,6	55,8	0,6	58,3	5,0	64,3	15,9
metilecgonina	25,5	24,3	-4,4	24,5	-3,8	26,8	5,2	31,6	24,0
tropacocaína	314,9	305,4	-3,0	312,5	-0,7	302,1	-4,1	264,3	-16,1
norcocaína	< LQ	< LQ	-						
n-formilcocaína	109,6	104,9	-4,3	115,6	5,5	78,3	-28,6	59,7	-45,5
trimetoxicocaína	513,9	451,2	-12,2	434,0	-15,6	423,8	-17,5	445,5	-13,3
ecgonina	1169,2	1152,7	-1,4	1153,2	-1,4	1125,4	-3,7	1048,7	-10,3
benzoilecgonina	8060,9	8019,5	-0,5	7907,4	-1,9	7797,8	-3,3	7558,0	-6,2
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	7780,2	7915,7	1,7	7809,9	0,4	7943,9	2,1	7862,6	1,1

Crítérios de aceitação SEPLAB/INC: Er (%) menor ou igual a 5%; <LQ: analito em concentração abaixo do limite de quantificação;

Para a análise das amostras deixadas sobre a bancada em até 12 dias, a maioria dos analitos apresentou erros relativos $\leq 5\%$. Apenas os analitos anidroecgonina metil éster e *trans*-cinamoilcocaína mostraram boa estabilidade até o 20º dia.

Tabela 27 – Avaliação da estabilidade das soluções conservada em freezer

Alcaloides minoritários	Conc. referência (µg/mL)	Freezer					
		24 horas		05 dias		20 dias	
		Conc. (µg/mL)	Er (%)	Conc. (µg/mL)	Er (%)	Conc. (µg/mL)	Er (%)
anidroecgonina metil éster	588,4	587,2	-0,2	591,7	0,6	593,1	0,8
anidroecgonina	55,5	56,3	1,4	58,2	4,9	53,0	-4,4
metilecgonina	25,5	23,1	-9,2	24,1	-5,5	25,4	-0,2
tropacocaína	314,9	314,6	-0,1	314,4	-0,1	311,1	-1,2
norcocaína	< LQ	< LQ	-	< LQ	-	< LQ	-
n-formilcocaína	109,6	105,8	-3,4	102,9	-6,1	114,6	4,6
trimetoxicocaína	513,9	476,1	-7,4	433,8	-15,6	422,6	-17,8
ecgonina	1169,2	1163,3	-0,5	1138,7	-2,6	1163,1	-0,5
benzoilecgonina	8060,9	7842,9	-2,7	8014,2	-0,6	8049,3	-0,1
<i>trans</i> -cinamoilcocaína	7780,2	8009,1	2,9	7853,3	0,9	7886,1	1,4

Critérios de aceitação SEPLAB/INC: Er (%) menor ou igual a 5%; <LQ: analito em concentração abaixo do limite de quantificação;

As análises das amostras armazenadas em freezer mostraram que a maioria dos analitos possuem boa estabilidade até o 20º dia, sendo seus erros relativos inferiores a 5%. O analito trimetoxicocaína mostrou estabilidade abaixo dos critérios de aceitação nas duas condições verificadas, o que pode sugerir dificuldades na quantificação desse alcaloide se a amostra não for analisada logo após o preparo.

3.4.2 Análise das amostras reais

A avaliação do novo método analítico desenvolvido e validado se deu por meio da sua aplicação na análise de 78 amostras reais de cocaína, apreendidas pela Polícia Federal e oriundas de diversos estados do Brasil.

As amostras de cocaína analisadas foram apreendidas nos estados de Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Acre e Amazonas entre os anos de 2009 e 2015. No conjunto analisado, 22 amostras (28%) se encontravam na forma de apresentação cloridrato de cocaína (sal) e as demais 56 amostras (72%) na forma cocaína base livre (base).

O método se mostrou capaz de analisar simultaneamente os alcaloides minoritários da cocaína, identificando-os e quantificando-os. As tabelas do anexo 4 deste trabalho listam os resultados obtidos na análise das amostras de cocaína.

Pode-se observar, por exemplo, que a maioria das amostras apresenta um teor relativamente elevado de benzoilecgonina, variando na faixa de 1.300 a 172.000 ppm. Destaca-se que nas amostras de base livre os teores variam de 11.000 a 172.000 ppm, enquanto que nas de cloridrato de cocaína variam de 1.300 ppm a 9.000 ppm. Esta característica está de acordo com o esperado, uma vez que amostras de cocaína na forma de base livre são mais sujeitas a degradação por hidrólise que amostras de cocaína na forma de sal cloridrato.

Em relação a possíveis diferenças regionais entre as amostras, é possível observar, por exemplo, que as amostras do Mato Grosso apresentam teores de tropacocaína entre 600 ppm a 1.700 ppm, mas não se detecta a trimetoxicocaína na maioria das amostras deste estado. Por sua vez, em as amostras de Goiás, Mato Grosso do Sul e Paraná é possível observar teores elevados tanto de trimetoxicocaína (médias de 400 ppm, 800 ppm e 1000 ppm, respectivamente) quanto de tropacocaína (teores médios similares aos de trimetoxicocaína). Por sua vez, nas amostras provenientes do Acre e do Amazonas o teor desses dois alcaloides é muito baixo para a maioria das amostras.

Por fim, alcaloides N-formilcocaína e Norcocaína, que evidenciam a utilização de permanganato de potássio ou outros oxidantes fortes no processamento da droga, foram quantificados em amostras de diversas origens e formas de apresentação.

4 CONCLUSÃO

O método de análise por CG-DIC desenvolvido neste trabalho é adequado para identificação e quantificação dos alcaloides minoritários anidroecgonina metil éster, anidroecgonina, metilecgonina, tropacocaína, norcocaína, N-formilcocaína, trimetoxicocaína, ecgonina, benzoilecgonina e *trans*-cinamoilcocaína em amostras de cocaína base ou sal cloridrato. O método apresentou boa linearidade em toda a faixa de concentração, seletividade satisfatória para a maioria dos analitos, exatidão e precisão adequadas, além permanecer estável diante de pequenas variações aplicadas nos parâmetros do CG-DIC e de preparo de amostras, sendo considerado robusto. A maioria dos analitos alvos apresentou boa estabilidade em condições de rotina do laboratório e de execução do método.

Embora tenha se mostrado um método complexo, uma vez que os compostos alvos estão presentes numa faixa de concentração muito baixa em relação ao teor de cocaína das amostras e seja necessária uma etapa de derivatização no preparo das amostras, foi capaz de analisar com eficiência todos alcaloides minoritários testados. Porém, deve-se destacar a necessidade de se realizar, caso a caso, cuidadosa avaliação dos resultados das replicatas e das integrações dos picos cromatográficos identificados.

A aplicação do método na análise de amostras reais de cocaína apreendidas pela Polícia Federal entre os anos de 2009 e 2015 nos estados de Goiás, São Paulo, Acre, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná e Amazonas, foi realizada com êxito. Os resultados para análise de aproximadamente 80 amostras demonstram a capacidade do método em identificar e quantificar os principais alcaloides minoritários em amostras de cocaína.

O método desenvolvido por CG-DIC para identificação e quantificação de alcaloides minoritários em amostras de cocaína, pode ser considerado tanto validado considerando as figuras de mérito estudadas, quanto adequado à finalidade pela qual foi proposto, uma vez que atende satisfatoriamente os critérios de aceitação estabelecidos pelas normas nacionais e internacionais em uso no sistema de gestão da qualidade do laboratório de química forense do INC/PF.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho deve ter continuidade principalmente na tarefa de consolidar a interpretação dos resultados e no uso de ferramentas estatísticas para classificação de amostras reais em relação a possíveis locais de produção, processos de refino e correlação entre amostras.

Também pretende-se ampliar a base de dados disponível, aplicando o método para amostras de cocaína de outras regiões e origens e incorporando-o à rotina de análises do sistema da qualidade do laboratório de química forense da PF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) United Nations Office On Drugs And Crime. *World drug report*: New York, United Nations, **2015**. Disponível em: <http://www.unodc.org/wdr2015>. Acesso em: 18.05.2016.
- (2) Bruni, A. V., J. A.; Oliveira, M. F. *Fundamentos de Química Forense-Uma Análise Prática da Química que Soluciona Crimes*. Campinas, **2012**.
- (3) Casale, J. F.; Klein, R. F. X. *Forensic Science Reviews* **1993**, 5, 95.
- (4) Moore, J. M.; Casale, J. F. *Journal of Chromatography A* **1994**, 674, 165.
- (5) Zacca, J. J.; Botelho, É. D.; Vieira, M. L.; Almeida, F. L. A.; Ferreira, L. S.; Maldaner, A. O. *Science & Justice* **2014**, 54, 300.
- (6) Casale, J. F; Hays, P. A.; Toske, S. G.; Berrier, A.L. *Journal of Forensic Sciences* **2007**, 52, 860.
- (7) Brewer, L. M.; Allen, A. *Journal of Forensic Sciences* **1991**, 36, 697.
- (8) Botelho, E. D. *Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)*. Brasília, 2011. Dissertação. Programa de Pós-Graduação – Instituto de Química, Universidade de Brasília.
- (9) Chiarotti, M.; Fucci, N. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1999**, 733, 127.
- (10) United Nations Office on Drugs and Crime. *Drug Characterization/ Profiling background and concepts*: New York, United Nations, 2001. Disponível em: <https://www.unodc.org/pdf/publications/st-nar-32-rev1.pdf>. Acesso em: 25.10.2015
- (11) United Nations Office on Drugs and Crime, *Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials*: New York, United Nations, 2012. Disponível em: https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_Manual_Rev_1.pdf. Acesso em: 01.11.2015
- (12) United Nations Office on Drugs and Crime, *Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine*; New York, United Nations, 2005. Disponível em: https://www.unodc.org/pdf/publications/report_st-nar-35.pdf. Acesso em: 25.10.2015
- (13) Collins, M. H. J. E. I. R., *Australian Journal of Forensic Sciences* **2007**, 39, 25.
- (14) Ehleringer, J. R.; Casale, J. F.; Lott, M. J.; Ford, V. L. *Nature* **2000**, 408, 311.

- (15) Mallette, J. R.; Casale, J. F.; Jordan, J.; Morello, D. R.; Beyer, P. M. *Scientific Reports* **2016**, *6*.
- (16) Pagano, B.; Lauri, I.; De Tito, S.; Persico, G.; Chini, M. G.; Malmendal, A.; Novellino, E.; Randazzo, A. *Forensic Science International* **2013**, *231*, 120.
- (17) Moore, J. M. C., J.F. *Forensic Science International* **1998**, *10*, 01.
- (18) Ehleringer, J. R.; Cooper, D. A.; Lott, M. J.; Cook, C. S. *Forensic Science International* **1999**, *106*, 27.
- (19) Dujourdy, L.; Besacier, F. *Forensic Science International* **2008**, *179*, 111.
- (20) Mallette, J. R.; Casale, J. F. *Journal of Forensic Sciences* **2015**, *60*, 45.
- (21) Zacca, J. J.; Groberio, T. S.; Maldaner, A. O.; Vieira, M. L.; Braga, J. W. B. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 2457.
- (22) Maldaner, A. O. B., E. D.; Zacca, J. J.; Melo, R. C. A.; Costa, J. L.; Zancanaro, I.; Oliveira, C. S. L.; Kasakoff, L. B.; Paixão, T. R. L. C. *Journal Brazilian Chemistry Society* **2016**, *27*, 719.
- (23) Garzón, M. W. F. P., F.A.; Florián, N. M. R. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica* **2009**, *16*, 228.
- (24) Casale, J. F.; Waggoner, R. W. *Journal of Forensic Sciences* **1991**, *36*, 1312.
- (25) Kumar, A.; Kiser, W. O. *Journal of Forensic Sciences* **1995**, *40*, 464.
- (26) Moore, J. M. *Journal of Chromatography A* **1974**, *101*, 215.
- (27) Moore, J. M. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **1973**, *56*, 1199.
- (28) Lebelle, M.; Lauriault, G.; Callahan, S.; Latham, D.; Chiarelli, C.; Beckstead, H. *Journal of Forensic Sciences* **1988**, *33*, 662.
- (29) Groves, M. C. D., J. R. *Forensic applications of gas chromatography*; CRC Press: New York, 2013.
- (30) Moore, J. M.; Bena, F. E. *Analytical Chemistry* **1972**, *44*, 385.
- (31) Janzen, K. E.; Walter, L.; Fernando, A. R. *Journal of Forensic Sciences* **1992**, *37*, 436.
- (32) Ensing, J. G.; Racamy, C.; Dezeeuw, R. A. *Journal of Forensic Sciences* **1992**, *37*, 446.
- (33) Andersson, K.; Jalava, K.; Lock, E.; Finnon, Y.; Huizer, H.; Kaa, E.; Lopes, A.; Poortman-van der Meer, A.; Cole, M. D.; Dahlén, J.; Sippola, E. *Forensic Science International* **2007**, *169*, 50.

- (34) Esseiva, P.; Gaste, L.; Alvarez, D.; Anglada, F. *Forensic Science International* **2011**, *207*, 27.
- (35) Monfreda, M.; Varani, F.; Cattaruzza, F.; Ciambrone, S.; Proposito, A. *Science & Justice* **2015**.
- (36) Wang, Q.; Ma, L.; Yin, C.-r.; Xu, L. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1296*, 25.
- (37) Wells, R. J. *Journal of Chromatography A* **1999**, *843*, 1.
- (38) Orata, F. *Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis*; INTECH Open Access Publisher, 2012.
- (39) Lin, D. L.; Wang, S. M.; Wu, C. H.; Chen, B. G.; Lu, R. H. *Journal of Food and Drug Analysis* **2008**, *16*, 1.
- (40) Little, J. L. *Journal of Chromatography A* **1999**, *844*, 1.
- (41) Poole, C. F. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1296*, 2.
- (42) Molnar, B.; Molnar-Perl, I. *Microchemical Journal* **2015**, *118*, 101.
- (43) Locicero, S.; Hayoz, P.; Esseiva, P.; Dujourdy, L.; Besacier, F.; Margot, P. *Forensic Science International* **2007**, *167*, 220.
- (44) Broséus, J.; Huhtala, S.; Esseiva, P. *Forensic Science International* **2015**, *251*, 87.
- (45) ABNT NBR ISO/IEC 17025, *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2005.
- (46) Swartz, M. E.; Krull, I. S. *Handbook of analytical validation*. New York 2012.
- (47) ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE nº 899 de 29/05/2003*. Brasília, 2003. Disponível em: <http://novoportal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 24.01.2016.
- (48) INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003*, Brasil, 2003. Disponível em: disponível em <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em: 24.01.2016.
- (49) (CH-Q2B, *Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1996. Disponível em: www.fda.gov. Acesso em 20.12.2015.
- (50) Eurachem Guide: *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, **2014**. Disponível em <https://www.eurachem.org>. Acesso em: 24.01.2016.
- (51) MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Manual da Garantia analítica, 2011. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 28.06.2015.

- (52) Bliesner, D. M. *Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide* 2006.
- (53) Taverniers, I. D. L., M.; Van Bockstaele, E. *Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23.
- (54) Thompson, M. E., S. L. R.; Wood, R. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835.
- (55) Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Química nova* **2004**, 27, 771.
- (56) Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C *Química nova* **2004**, 27, 771.
- (57) Lanças, M. F. *Validação De Métodos Cromatográficos De Análise*,: Brasil, 6º ed 2004.
- (58) Ribani, M.; Collins, C. H.; Bottoli, C. B. G. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1156, 201.
- (59) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de química analítica*; 8ª ed. São Paulo, 2006.
- (60) Mazur, L.; Peralta-Zamora, P. G.; Demczuk Jr, B.; Hoffmann Ribani, R. *Journal of Food Composition and Analysis* **2014**, 35, 55.
- (61) INMETRO; Revisão 03 ed. 2007; Vol. DOQ-CGCRE-008, p20. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em: 24.01.2016.
- (62) ANVISA & BIREME: Brasília, Brasil, **2003**; Vol. DOQ-CGCRE-008 R03, p 15. Disponível em: <http://novoportal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12.04.2016.
- (63) Bliesner, D. M. *Validating Chromatographic Methods: A practical guide*; John Wiley & Sons Inc. Publication: New Jersey, **2006**.
- (64) César, I. C. P., G. A. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 45.
- (65) Benício de Barros Neto, I.; Spacino Scarminio, R. E. B. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*; Bookman: Campinas-SP, 2010.
- (66) Bahia Filho, O.; Prada, P. R.; Meneghesso, C.; Lanças, F. M.; *Scientia Chromatographica* **2011**, 3, 251.
- (67) Brito, N. M.; Amarante Jr, O. P; Polese, L.; Ribeiro, M. L. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2003**, 13, 129.
- (68) Karageorgou, E.; Samanidou, V. *Journal of Chromatography A* **2014**, 1353, 131.
- (69) Leite, F. *Validação em análise química*; 5º ed. Campinas-SP 2008.

ANEXO 1

Tabela 28 - Curva analítica da Anidroecgonina metil éster

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	1,4	0,0028	0,003	6,3
		0,0032		
		0,0029		
2	2,3	0,0049	0,0051	3,8
		0,0053		
		0,0050		
3	5,9	0,0113	0,0119	4,4
		0,0124		
		0,0120		
4	12,0	0,0239	0,0235	3,1
		0,0239		
		0,0226		
5	31,1	0,0614	0,0595	3,1
		0,0577		
		0,0595		
6	61,4	0,1169	0,118	1,1
		0,1176		
		0,1195		
7	91,4	0,1739	0,1765	1,3
		0,1776		
		0,1781		
8	122,4	0,2266	0,2341	2,9
		0,2357		
		0,2401		

Tabela 29 - Curva analítica da Anidroecgonina.TMS

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	1,2	0,0045	0,0046	6,2
		0,0044		
		0,0049		
2	2,0	0,0076	0,0073	4,0
		0,0072		
		0,0071		
3	5,2	0,0175	0,0173	5,7
		0,0182		
		0,0162		
4	10,5	0,0355	0,0348	2,9
		0,0353		
		0,0337		
5	27,2	0,0927	0,0901	2,7
		0,0878		
		0,0900		
6	53,7	0,1782	0,1797	1,6
		0,1780		
		0,1830		
7	80,1	0,2665	0,2686	0,7
		0,2700		
		0,2693		
8	107,2	0,3472	0,3582	2,7
		0,3616		
		0,3658		

Tabela 30 - Curva analítica da Metilecgonina.TMS

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	1,2	0,0038	0,0047	1,4
		0,0039		
		0,0039		
2	2,0	0,0059	0,0078	4,1
		0,0063		
		0,0063		
3	5,0	0,0147	0,0198	3,7
		0,0155		
		0,0145		
4	10,1	0,0307	0,0404	2,6
		0,0300		
		0,0292		
5	26,2	0,0807	0,1044	3,4
		0,0755		
		0,0775		
6	51,7	0,1538	0,2062	1,3
		0,1540		
		0,1574		
7	77,0	0,2279	0,3072	1,4
		0,2338		
		0,2326		
8	103,0	0,2987	0,4112	2,8
		0,3121		
		0,3150		

Tabela 31- Curva analítica da Tropacocaína

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	1,4	0,0043	0,0043	0,5
		0,0043		
		0,0043		
2	2,3	0,0072	0,0071	1,8
		0,0069		
		0,0071		
3	5,8	0,0172	0,0168	5,4
		0,0175		
		0,0158		
4	11,9	0,0345	0,0332	3,6
		0,0329		
		0,0322		
5	30,7	0,0888	0,0863	2,6
		0,0843		
		0,0858		
6	60,5	0,1702	0,1715	1,3
		0,1701		
		0,1741		
7	90,2	0,2520	0,2553	1,1
		0,2575		
		0,2563		
8	120,7	0,3281	0,3391	2,9
		0,3420		
		0,3473		

Tabela 32-Curva analítica da Norcocaína.TMS

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	1,3	0,0041	0,004	3,7
		0,0040		
		0,0043		
2	2,1	0,0063	0,006	0,6
		0,0064		
		0,0063		
3	5,4	0,0149	0,015	6,5
		0,0164		
		0,0144		
4	11,0	0,0311	0,031	1,6
		0,0303		
		0,0303		
5	28,5	0,0818	0,080	2,6
		0,0778		
		0,0789		
6	56,3	0,1561	0,158	1,4
		0,1573		
		0,1605		
7	83,9	0,2327	0,236	1,1
		0,2377		
		0,2369		
8	112,3	0,3027	0,312	2,8
		0,3153		
		0,3192		

Tabela 33 - Curva analítica da N-formilcocaína

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	1,4	0,0027	0,003	10,3
		0,0034		
		0,0030		
2	2,3	0,0047	0,0053	12,4
		0,0060		
		0,0053		
3	5,8	0,0132	0,0131	6
		0,0139		
		0,0123		
4	11,8	0,0289	0,0292	3,9
		0,0282		
		0,0304		
5	30,6	0,0842	0,0807	3,8
		0,0793		
		0,0786		
6	60,3	0,1569	0,003	3,4
		0,1618		
		0,1679		
7	89,9	0,2417	0,2452	1,3
		0,2469		
		0,2471		
8	120,3	0,3149	0,3252	2,9
		0,3277		
		0,3331		

Tabela 34 - Curva analítica trimetoxicocafina

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	1,4	0,0029	0,0029	3,2
		0,0028		
		0,0029		
2	2,4	0,0050	0,005	2,7
		0,0048		
		0,0051		
3	6,1	0,0114	0,0114	7,7
		0,0123		
		0,0106		
4	12,4	0,0243	0,0235	3,1
		0,0232		
		0,0229		
5	32	0,0640	0,0617	3,2
		0,0604		
		0,0607		
6	63,2	0,1214	0,003	1,5
		0,1227		
		0,1251		
7	94,2	0,1820	0,1844	1,2
		0,1860		
		0,1853		
8	126,1	0,2365	0,2444	2,9
		0,2465		
		0,2501		

Tabela 35 - Curva analítica ecgonina

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	2,6	0,0115	0,0114	0,9
		0,0113		
2	3,6	0,0113	0,0159	1,1
		0,0157		
		0,0159		
3	5,5	0,0160	0,0233	0,8
		0,0231		
		0,0234		
4	10,5	0,0235	0,0471	1,9
		0,0465		
		0,0482		
5	27,7	0,0467	0,1138	0,4
		0,1142		
		0,1138		
6	57,0	0,1133	0,0030	0,1
		0,2297		
		0,2296		
7	141,1	0,2292	0,5646	0,1
		0,5649		
		0,5642		
8	290,5	0,5647	1,1664	0,2
		1,1678		
		1,1672		
9	436,5	1,1642	1,7585	0,1
		1,7589		
		1,7600		
10	584,0	1,7565	2,3758	0,1
		2,3768		
		2,3785		
		2,3721		

Tabela 36 - Curva analítica benzoilecgonina

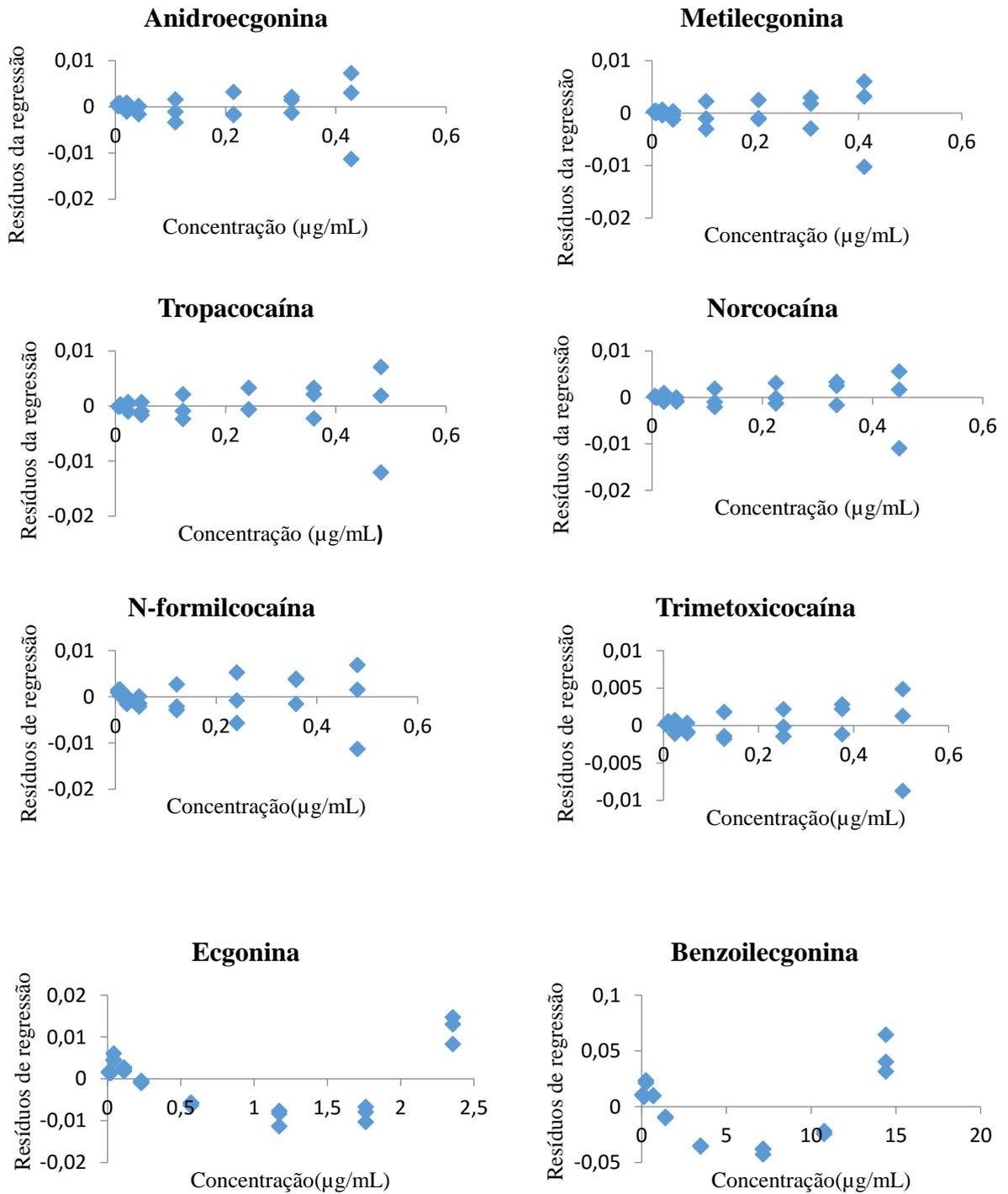
Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	15,6	0,0482	0,0483	0,4
		0,0482		
2	22,3	0,0486	0,0664	0,5
		0,0661		
		0,0663		
3	33,6	0,0668	0,0978	0,1
		0,0979		
		0,0979		
4	64,4	0,0976	0,1991	0,6
		0,1977		
		0,1998		
5	169,2	0,1998	0,4846	0,004
		0,4848		
		0,4846		
6	348,3	0,4844	0,0030	0,005
		0,9755		
		0,9745		
7	862,2	0,9751	2,4117	0,01
		2,4122		
		2,4115		
8	1775,5	2,4114	5,0063	0,1
		5,0076		
		5,0031		
9	2668,1	5,0082	7,5628	0,02
		7,5620		
		7,5643		
10	3569,4	7,5620	10,1965	0,2
		10,2156		
		10,1911		
		10,1827		

Tabela 37- Curva *trans*-cinamoilcocaína

Ponto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Razão da área	Média	CV (%)
1	5,5	0,0164	0,0164	3,5
		0,0159		
		0,0170		
2	7,9	0,0221	0,0223	2,1
		0,0228		
		0,0219		
3	11,9	0,0332	0,0328	1,3
		0,0327		
		0,0324		
4	22,8	0,0661	0,0663	0,6
		0,0661		
		0,0668		
5	60,0	0,1623	0,1626	0,8
		0,1615		
		0,1640		
6	123,6	0,3303	0,0030	0,1
		0,3301		
		0,3310		
7	305,9	0,8167	0,8165	0,0
		0,8166		
		0,8162		
8	629,8	1,6910	1,6886	0,1
		1,6869		
		1,6879		
9	946,4	2,5478	2,5481	0,1
		2,5503		
		2,5462		
10	1266,1	3,4316	3,4234	0,2
		3,4170		
		3,4216		

ANEXO 2

Figura 25 – Gráficos de resíduos para alguns dos analitos em estudo



ANEXO 3

Tabela 38 - - Valores críticos de Grubbs a 95% de confiança⁶⁹

Número de resultados (n)	G 95%
3	1,155
4	1,481
5	1,715
6	1,887
7	2,020
8	2,126
9	2,215
10	2,290

Tabela 39 - Teste de Grubbs para os resíduos das curvas analíticas

<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">anidroecgonina</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>1,144</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>1,091</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>0,899</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>0,664</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>1,029</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>1,154</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>0,750</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>0,780</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	anidroecgonina		G_{calc.}	G_{95%}	1	1,144	1,155	2	1,091	1,155	3	0,899	1,155	4	0,664	1,155	5	1,029	1,155	6	1,154	1,155	7	0,750	1,155	8	0,780	1,155	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">metilecgonina</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>-0,020</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>0,586</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>1,123</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>0,987</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>1,070</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>1,153</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>0,755</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>0,735</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	metilecgonina		G_{calc.}	G_{95%}	1	-0,020	1,155	2	0,586	1,155	3	1,123	1,155	4	0,987	1,155	5	1,070	1,155	6	1,153	1,155	7	0,755	1,155	8	0,735	1,155												
Níveis de concentração	anidroecgonina																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	1,144	1,155																																																																									
2	1,091	1,155																																																																									
3	0,899	1,155																																																																									
4	0,664	1,155																																																																									
5	1,029	1,155																																																																									
6	1,154	1,155																																																																									
7	0,750	1,155																																																																									
8	0,780	1,155																																																																									
Níveis de concentração	metilecgonina																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	-0,020	1,155																																																																									
2	0,586	1,155																																																																									
3	1,123	1,155																																																																									
4	0,987	1,155																																																																									
5	1,070	1,155																																																																									
6	1,153	1,155																																																																									
7	0,755	1,155																																																																									
8	0,735	1,155																																																																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">tropacocaína</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>0,817</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>0,412</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>0,742</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>1,111</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>1,094</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>1,155</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>0,768</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>0,822</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	tropacocaína		G_{calc.}	G_{95%}	1	0,817	1,155	2	0,412	1,155	3	0,742	1,155	4	1,111	1,155	5	1,094	1,155	6	1,155	1,155	7	0,768	1,155	8	0,822	1,155	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">norcocaína</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>1,124</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>1,111</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>1,117</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>1,152</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>1,115</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>1,116</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>0,727</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>0,791</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	norcocaína		G_{calc.}	G_{95%}	1	1,124	1,155	2	1,111	1,155	3	1,117	1,155	4	1,152	1,155	5	1,115	1,155	6	1,116	1,155	7	0,727	1,155	8	0,791	1,155												
Níveis de concentração	tropacocaína																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	0,817	1,155																																																																									
2	0,412	1,155																																																																									
3	0,742	1,155																																																																									
4	1,111	1,155																																																																									
5	1,094	1,155																																																																									
6	1,155	1,155																																																																									
7	0,768	1,155																																																																									
8	0,822	1,155																																																																									
Níveis de concentração	norcocaína																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	1,124	1,155																																																																									
2	1,111	1,155																																																																									
3	1,117	1,155																																																																									
4	1,152	1,155																																																																									
5	1,115	1,155																																																																									
6	1,116	1,155																																																																									
7	0,727	1,155																																																																									
8	0,791	1,155																																																																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">N-formilcocaína</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>1,074</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>1,003</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>0,974</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>1,102</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>1,146</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>1,035</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>0,610</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>0,840</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	N-formilcocaína		G_{calc.}	G_{95%}	1	1,074	1,155	2	1,003	1,155	3	0,974	1,155	4	1,102	1,155	5	1,146	1,155	6	1,035	1,155	7	0,610	1,155	8	0,840	1,155	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">Trimetoxicocaína</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>0,623</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>1,015</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>1,015</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>1,139</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>1,150</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>1,083</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>0,716</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>0,812</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	Trimetoxicocaína		G_{calc.}	G_{95%}	1	0,623	1,155	2	1,015	1,155	3	1,015	1,155	4	1,139	1,155	5	1,150	1,155	6	1,083	1,155	7	0,716	1,155	8	0,812	1,155												
Níveis de concentração	N-formilcocaína																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	1,074	1,155																																																																									
2	1,003	1,155																																																																									
3	0,974	1,155																																																																									
4	1,102	1,155																																																																									
5	1,146	1,155																																																																									
6	1,035	1,155																																																																									
7	0,610	1,155																																																																									
8	0,840	1,155																																																																									
Níveis de concentração	Trimetoxicocaína																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	0,623	1,155																																																																									
2	1,015	1,155																																																																									
3	1,015	1,155																																																																									
4	1,139	1,155																																																																									
5	1,150	1,155																																																																									
6	1,083	1,155																																																																									
7	0,716	1,155																																																																									
8	0,812	1,155																																																																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">benzoilecgonina</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>-0,419</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>-0,231</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>0,590</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>0,584</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>1,028</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>0,133</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>-0,706</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>0,681</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>9</td><td>-0,571</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>10</td><td>-0,807</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	benzoilecgonina		G_{calc.}	G_{95%}	1	-0,419	1,155	2	-0,231	1,155	3	0,590	1,155	4	0,584	1,155	5	1,028	1,155	6	0,133	1,155	7	-0,706	1,155	8	0,681	1,155	9	-0,571	1,155	10	-0,807	1,155	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Níveis de concentração</th> <th colspan="2">trans-cinamoilcocaína</th> </tr> <tr> <th>G_{calc.}</th> <th>G_{95%}</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>-0,986</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>2</td><td>1,114</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>3</td><td>-0,121</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>4</td><td>1,154</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>5</td><td>-0,256</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>6</td><td>1,120</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>7</td><td>-1,143</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>8</td><td>-0,318</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>9</td><td>-0,924</td><td>1,155</td></tr> <tr><td>10</td><td>-0,242</td><td>1,155</td></tr> </tbody> </table>			Níveis de concentração	trans-cinamoilcocaína		G_{calc.}	G_{95%}	1	-0,986	1,155	2	1,114	1,155	3	-0,121	1,155	4	1,154	1,155	5	-0,256	1,155	6	1,120	1,155	7	-1,143	1,155	8	-0,318	1,155	9	-0,924	1,155	10	-0,242	1,155
Níveis de concentração	benzoilecgonina																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	-0,419	1,155																																																																									
2	-0,231	1,155																																																																									
3	0,590	1,155																																																																									
4	0,584	1,155																																																																									
5	1,028	1,155																																																																									
6	0,133	1,155																																																																									
7	-0,706	1,155																																																																									
8	0,681	1,155																																																																									
9	-0,571	1,155																																																																									
10	-0,807	1,155																																																																									
Níveis de concentração	trans-cinamoilcocaína																																																																										
	G_{calc.}	G_{95%}																																																																									
1	-0,986	1,155																																																																									
2	1,114	1,155																																																																									
3	-0,121	1,155																																																																									
4	1,154	1,155																																																																									
5	-0,256	1,155																																																																									
6	1,120	1,155																																																																									
7	-1,143	1,155																																																																									
8	-0,318	1,155																																																																									
9	-0,924	1,155																																																																									
10	-0,242	1,155																																																																									

ANEXO 4

Tabela 40 - Resultados das análises para amostras reais

N°	Amostras	Forma	Estado	AEME		AE		ME		TROP		NORC		NFC		TMC		EC		BE		TCC			
				Conc.	CV	Conc.	CV	Conc	CV	Conc	CV	Conc.	CV	Conc.	CV	Conc.	CV								
				(ppm)	(%)	(ppm)	(%)	(ppm)	(%)	(ppm)	(%)														
1	373_14_1	Base	GO	1060	3	nd	*	252	4	449	5	<LQ	*	268	3	545	3	3620	3	16378	4	17578	1		
2	373_14_2	Base	GO	1054	3	nd	*	273	3	370	4	<LQ	*	<LQ	*	551	6	3702	5	15801	6	16238	0		
3	373_14_3	Base	GO	962	3	nd	*	248	1	379	2	177	6	241	6	601	4	3600	1	15958	2	16607	0		
4	1051_14_1	Base	GO	11959	1	1576	2	259	4	720	2	304	0	<LQ	*	<LQ	*	16461	1	172790	1	1605	3		
5	1051_14_2	Base	GO	7682	2	1257	2	270	3	717	1	302	6	376	8	<LQ	*	15256	2	160052	1	1595	5		
6	060_09_1	Base	SP	4753	1	367	3	192	6	1205	1	130	9	312	18	215	1	14515	2	54973	1	7814	2		
7	2717_09_2	Base	SP	1386	1	948	4	<LQ	*	736	1	nd	*	601	5	<LQ	*	19810	2	54242	1	4142	0		
8	221_09_44	HCl	PR	341	6	291	2	8811	1	3701	1	7337	1	227	9	1066	2	7235	1	7094	1	2134	1		
9	221_09_14_45	HCl	PR	<LQ	*	nd	*	9855	3	853	3	8932	3	<LQ	*	2126	3	7013	3	5409	3	1759	3		
10	221_09_14_47_2	HCl	PR	<LQ	*	55	4	9287	2	820	1	8351	2	<LQ	*	2166	2	8500	2	9205	1	1726	2		
11	221_09_14_48	HCl	PR	<LQ	*	<LQ	*	9530	3	816	3	8495	3	<LQ	*	2146	3	8810	3	8876	3	1719	3		
12	221_09_10_B4_1	HCl	PR	285	3	<LQ	*	8493	1	540	1	8264	1	<LQ	*	2940	1	5662	1	8477	1	695	3		
13	221_09_10_B4_2	HCl	PR	454	7	<LQ	*	7155	2	1374	1	nd	*	<LQ	*	2360	1	6864	2	4461	1	1070	1		
14	2861_13_mix	Base	PR	430	1	<LQ	*	7203	1	1415	3	nd	*	<LQ	*	2366	2	6720	1	5077	0	1064	0		
15	1214_13_mix	Base	PR	<LQ	*	nd	*	637	0	211	3	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	420	2	2323	11	7298	0		
16	1459_13_mix	Base	PR	633	8	<LQ	*	386	3	1492	1	<LQ	*	236	10	853	3	12908	1	6646	1	36823	1		
17	1459_13_04	Base	PR	1271	3	<LQ	*	306	2	1498	2	213	8	289	5	854	1	5979	1	14909	1	37486	1		
18	1800_14_03	Base	PR	1528	1	<LQ	*	274	4	1277	0	<LQ	*	<LQ	*	628	2	6633	2	17142	3	29313	1		
19	1800_14_04	Base	PR	838	4	<LQ	*	465	4	1586	1	<LQ	*	<LQ	*	678	3	8745	2	9297	2	36555	2		
20	1800_13_02	Base	PR	541	9	<LQ	*	238	1	1188	0	nd	*	<LQ	*	819	4	8307	1	6437	1	43308	1		
21	2213_14_10	Base	PR	528	3	<LQ	*	229	11	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	352	7	21175	2	2145	1	45444	1		

AEME= anidroecgonina metil éster; AE= anidroecgonina; ME= metilecgonina; TROP=Tropacocaína; NORC= norcocaína; NFC= N-formilcocaína; TMC= trimetoxicocaína; EC= ecgonina; BE= benzoilecgonina; TCC= *trans*-cinamoilcocaína; nd= não determinado; <LQ = abaixo do limite de quantificação

Tabela 41 - Resultados das análises para amostras reais

Nº	Amostras	Forma	Estado	AEME		AE		ME		TROP		NORC		NFC		TMC		EC		BE		TCC	
				Conc.	CV	Conc.	CV	Conc	CV	Conc	CV	Conc.	CV	Conc.	CV								
				(ppm)	(%)	(ppm)	(%)	(ppm)	(%)														
22	2213_14_07	Base	PR	1127	2	<LQ	*	<LQ	*	395	10	<LQ	*	<LQ	*	362	10	3296	1	16858	1	11947	1
23	856_12_02	HCl	AC	1163	1	<LQ	*	273	1	1344	1	<LQ	*	<LQ	*	769	3	6486	2	16275	1	33291	1
24	36_13_02	HCl	AC	<LQ	*	nd	*	1233	4	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	217	7	556	1	4055	1	18404	0
25	693_13_03	HCl	AC	403	2	nd	*	314	3	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	386	0	6256	1	11287	0
26	693_13_05	HCl	AC	251	4	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	8790	0	18705	0
27	693_13_06	HCl	AC	228	5	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	7803	1	18636	0
28	856_13_05	HCl	AC	219	1	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	nd	*	<LQ	*	7526	1	18719	1
29	856_13_07	HCl	AC	<LQ	*	nd	*	340	1	198	1	193	3	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	1324	2	16661	1
30	223_12_05	Base	AC	<LQ	*	nd	*	334	1	197	3	186	3	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	1128	1	16731	0
31	223_12_06	Base	AC	5787	0	685	4	<LQ	*	nd	*	nd	*	<LQ	*	nd	*	11417	0	86012	1	4197	0
32	441_14_03	Base	AC	6345	1	859	4	<LQ	*	nd	*	nd	*	<LQ	*	nd	*	13771	1	115407	1	3911	2
33	223_12_09	Base	AC	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	2787	1	10873	1
34	567_13_01	Base	AC	5930	2	749	2	<LQ	*	403	3	nd	*	<LQ	*	nd	*	11911	2	88893	1	4245	1
35	567_13_10	Base	AC	6791	2	567	2	<LQ	*	872	0	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	11687	2	125548	2	2265	2
36	36_13_05	HCl	AC	5967	4	685	4	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	11449	3	129582	1	2213	6
37	441_14_02	HCl	AC	529	2	nd	*	397	2	<LQ	*	185	0	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	8948	0	11367	0
38	1171_11_2	HCl	MS	<LQ	*	nd	*	223	3	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	4143	2	8505	1
39	1889_12_2	Base	MS	413	7	nd	*	410	2	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	528	1	10371	1	13525	1
40	1696_13_1	Base	MS	1401	1	<LQ	*	<LQ	*	1083	4	196	3	<LQ	*	1451	1	3281	1	11591	1	32192	2
41	1696_13_2	Base	MS	2547	1	277	7	<LQ	*	267	1	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	4998	1	32382	1	5337	1
42	1696_13_3_1	Base	MS	2913	1	188	7	<LQ	*	878	4	<LQ	*	<LQ	*	1085	2	3836	1	30850	1	21247	2
43	1696_13_4_1	Base	MS	3409	3	450	3	<LQ	*	867	3	<LQ	*	307	4	<LQ	*	7809	1	51081	1	5349	1

AEME= anidroecgonina metil éster; AE= anidroecgonina; ME= metilecgonina; TROP=Tropacocaína; NORC= norcocaína; NFC= N-formilcocaína; TMC= trimetoxicocaína; EC= ecgonina; BE= benzoilecgonina; TCC= trans-cinamoilcocaína; nd= não determinado; < LQ = abaixo do limite de quantificação

Tabela 42 - Resultados das análises para amostras reais

N°	Amostras	Forma	Estado	AEME		AE		ME		TROP		NORC		NFC		TMC		EC		BE		TCC			
				Conc.	CV	Conc.	CV	Conc.	CV	Conc.	CV														
				(ppm)	(%)	(ppm)	(%)	(ppm)	(%)	(ppm)	(%)														
44	1696_13_5_1	Base	MS	2020	1	174	6	<LQ	*	976	6	<LQ	*	<LQ	*	1354	3	3913	1	25986	1	25726	2		
45	1696_13_6_2	Base	MS	3426	3	462	6	<LQ	*	872	3	<LQ	*	466	17	<LQ	*	7694	3	50570	2	5361	4		
45	1696_13_7_1	Base	MS	2572	3	195	1	<LQ	*	956	5	<LQ	*	324	2	1203	1	3588	1	35395	0	21739	1		
47	1696_13_8_1	Base	MS	3227	1	428	3	179	3	906	3	<LQ	*	260	4	217	3	7713	1	39904	1	7710	1		
48	1696_13_8_2	Base	MS	1768	3	86	1	<LQ	*	999	1	<LQ	*	<LQ	*	1960	1	2858	1	17920	2	28178	1		
49	1696_13_9_1	Base	MS	1608	1	96	2	<LQ	*	1000	2	<LQ	*	<LQ	*	1901	1	2935	0	18368	1	28548	0		
50	1696_13_9_2	Base	MS	2238	3	164	2	<LQ	*	921	1	<LQ	*	<LQ	*	1242	1	4061	1	29911	1	27368	0		
51	1696_13_10_1	Base	MS	2034	1	180	10	<LQ	*	911	2	202	3	<LQ	*	1277	3	3846	1	29477	1	28768	1		
52	1696_13_10_2	Base	MS	3152	1	286	2	<LQ	*	1002	2	<LQ	*	310	2	673	2	5666	1	41890	1	14998	1		
53	2142_13_1	Base	MS	2879	1	273	5	<LQ	*	1018	2	200	7	242	1	711	3	5548	2	42131	2	16744	1		
54	1095_09_1	Base	MT	1772	3	158	3	194	8	1787	2	<LQ	*	233	4	664	20	10304	0	16798	0	49493	0		
55	1098_09_5	Base	MT	13437	0	507	6	1718	1	890	1	276	0	251	17	<LQ	*	15649	0	271004	1	15252	0		
56	1014_13_1	Base	MT	1485	4	<LQ	*	184	6	352	4	<LQ	*	307	14	214	4	4914	0	21310	2	21454	2		
57	1014_13_2	Base	MT	4501	1	432	6	266	5	609	7	178	13	497	57	<LQ	*	6783	1	58335	1	5762	2		
58	1014_13_3	Base	MT	4465	2	434	7	272	3	621	5	<LQ	*	447	0	<LQ	*	6802	1	60025	1	5361	3		
59	1014_13_4	Base	MT	4773	0	402	2	283	4	626	0	<LQ	*	316	4	<LQ	*	7086	0	62142	0	5205	1		
60	1014_13_5	Base	MT	4919	4	440	6	278	4	659	5	<LQ	*	336	6	<LQ	*	7255	4	62911	3	5413	3		
61	1014_13_6	Base	MT	4902	2	413	4	296	3	595	2	<LQ	*	499	4	<LQ	*	7131	1	59588	0	5215	2		
62	1014_13_7	Base	MT	4955	2	438	3	283	2	660	4	<LQ	*	418	6	<LQ	*	7185	2	57088	2	5775	1		
63	1014_13_8	Base	MT	4882	0	419	2	286	7	631	5	<LQ	*	408	27	<LQ	*	7014	1	57835	1	5771	2		
64	1014_13_9	Base	MT	4479	2	412	3	272	4	623	3	<LQ	*	310	4	<LQ	*	6840	1	56989	1	5390	1		
65	1014_13_10	Base	MT	5102	2	490	6	283	1	698	0	<LQ	*	410	23	<LQ	*	7547	0	61718	0	5654	4		

AEME= anidroecgonina metil éster; AE= anidroecgonina; ME= metilecgonina; TROP=Tropacocaína; NORC= norcocaína; NFC= N-formilcocaína; TMC= trimetoxicocaína; EC= ecgonina; BE= benzoilecgonina; TCC= trans-cinamoilcocaína; nd= não determinado; < LQ = abaixo do limite de quantificação

Tabela 43 - Resultados das análises para amostras reais

N°	Amostras	Forma	Estado	AEME		AE		ME		TROP		NORC		NFC		TMC		EC		BE		TCC			
				Conc.	CV																				
				(ppm)	(%)																				
66	1014_13_11	Base	MT	5515	0	462	4	308	3	689	1	<LQ	*	316	18	<LQ	*	7528	0	59638	1	5884	0		
67	1014_13_12	Base	MT	4766	1	468	4	260	7	630	1	<LQ	*	468	6	<LQ	*	7179	1	64436	0	5008	3		
68	1014_13_13	Base	MT	4887	0	504	1	260	1	685	2	<LQ	*	334	9	<LQ	*	7611	0	64429	2	5182	1		
69	215_15_1	HCl	AM	1975	1	99	10	283	1	1469	0	893	7	511	4	2151	2	2922	2	17249	2	30491	0		
70	215_15_2	HCl	AM	nd	*	nd	*	1575	2	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	1806	2	7045	3	21403	2		
71	299_15_1	Base	AM	nd	*	nd	*	613	1	198	3	nd	*	nd	*	nd	*	356	3	1673	1	10047	1		
72	300_15_1	Base	AM	2440	2	240	11	336	2	1359	1	225	7	<LQ	*	927	6	6206	1	33383	2	46388	1		
73	300_15_2	Base	AM	333	2	nd	*	226	1	770	0	401	13	269	9	1440	1	827	2	2414	2	70708	1		
74	567_15_1	Base	AM	<LQ	*	nd	*	194	3	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	305	1	2128	4	20880	1		
75	005_15_4	HCl	AM	125	5	nd	*	182	1	420	2	367	2	<LQ	*	<LQ	*	374	4	3587	3	15955	0		
76	005_15_5	HCl	AM	nd	*	nd	*	705	1	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	nd	*	543	2	2520	1	15469	1		
77	005_15_6	HCl	AM	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	<LQ	*	1487	0	12545	0		
78	005_15_7	HCl	AM	222	1	nd	*	174	5	<LQ	*	<LQ	*	nd	*	<LQ	*	299	2	4668	1	17770	0		

AEME= anidroecgonina metil éster; AE= anidroecgonina; ME= metilecgonina; TROP=Tropacocaína; NORC= norcocaína; NFC= N-formilcocaína; TMC= trimetoxicocaína; EC= ecgonina; BE= benzoilecgonina; TCC= *trans*-cinamoilcocaína; nd= não determinado; < LQ = abaixo do limite de quantificação

ANEXO 5

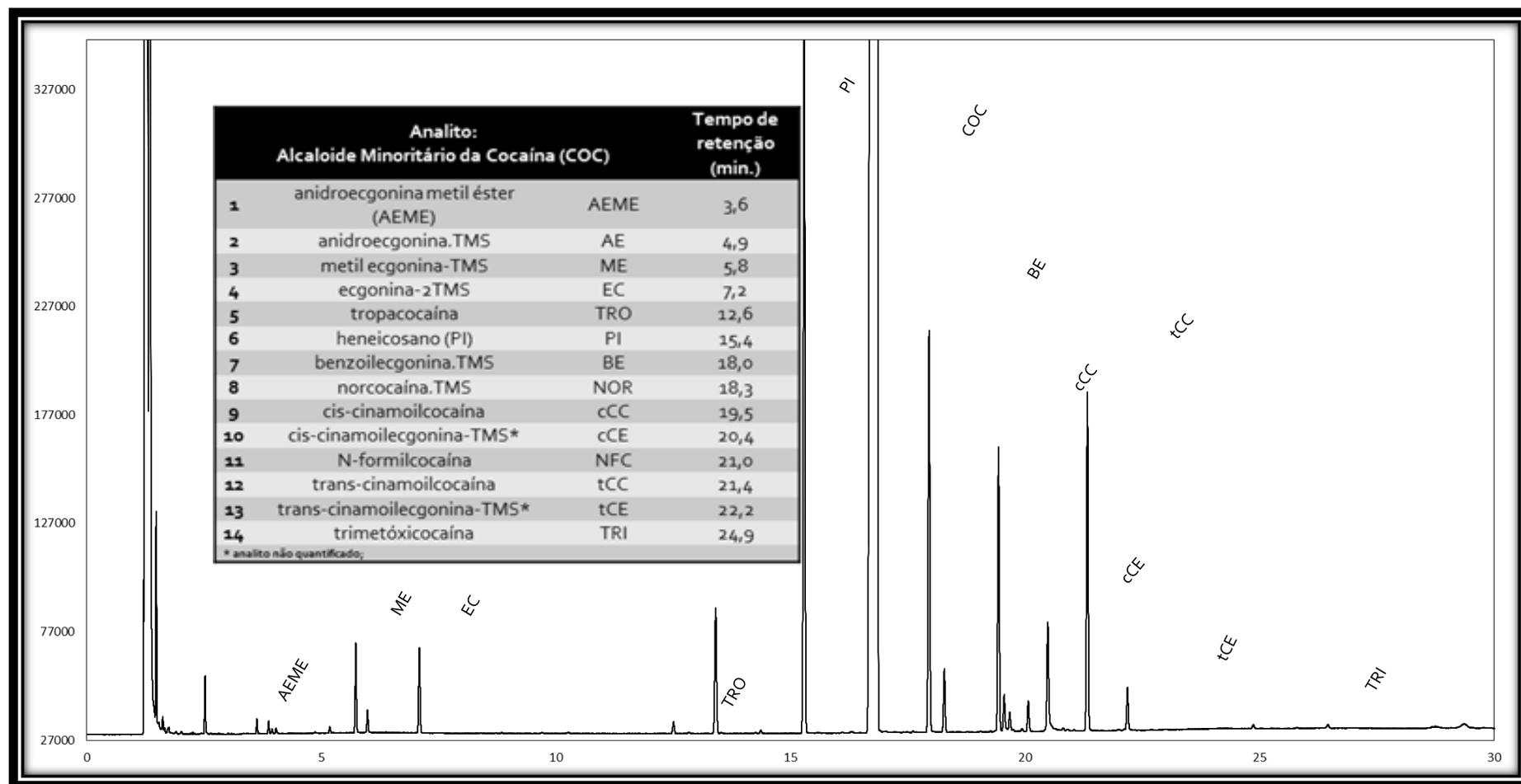


Figura 26 – Cromatograma típico de uma amostra de cocaína cloridrato (CCS)