



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

Caracterização de Amostras de Cocaína por Ressonância Magnética
Nuclear de ^1H

Aluno: Luiz Eduardo Celino Benedito

Orientador: Profa. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno

Co-Orientador: Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília, DF

2018

LUIZ EDUARDO CELINO BENEDITO

CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE COCAÍNA POR RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Aline Lima de Oliveira Paterno

Coorientador Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília - DF

2018

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) Luiz Eduardo Celino Benedito, matrícula nº 14/0192000, intitulada "*Caracterização de Amostras de Cocaína por Ressonância Magnética Nuclear de 1H* ", apresentada no (a) Auditório Lauro Morhy do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 27 de agosto de 2018.

Prof.^a Dra. Aline Lima de Oliveira
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Gláucia Braz Alcantara
Membro Titular (UQ/UFMS)

Prof. Dr. Carlos Martin Infante Córdova
Membro Titular (FS/UnB)

Prof. Dr. Jez William Batista Braga
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 27 de agosto de 2018.

À minha filha Luísa, pelo amor e pela incrível alegria que me proporciona todos os dias.

À minha esposa e companheira Olívia, pelo amor e pela paciência.

Aos meus pais e meus avós, por todo o amor e educação que me deram.

À toda minha família pelo apoio e carinho.

Aos amigos, pela amizade sincera e pelos momentos de descontração.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Aline Lima de Oliveira Paterno, pelo suporte e confiança depositados tanto na elaboração deste trabalho quanto nos desafios encontrados na rotina diária do LRMN.

Ao Dr. Adriano Otávio Maldaner, meu coorientador neste projeto sempre com muito entusiasmo e disposição.

Aos companheiros Alan, Cleber e Lennine, da Central Analítica do IQ/UnB, por todo o suporte durante a execução deste trabalho e pelos inúmeros momentos de descontração.

Aos ex-coordenadores da CAIQ, Fernando Sodré e José Linares pelo apoio e compreensão ao longo de todo o doutorado.

Às colegas de RMN Nathália, Júlia e Michele pelo apoio na parte experimental e nas discussões.

Aos professores do IQ/UnB, que contribuíram para minha formação profissional e acadêmica desde a graduação.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacognosia da FS/UnB, as professoras Laila, Lorena e Mariana, os(as) colegas Renata, Raquel, Daniel, Laís, Heidi e todos os outros que me acolheram nesse grupo extraordinário.

Ao Instituto Nacional de Criminalística do Departamento de Polícia Federal e ao U.S.A. Drug Enforcement Administration's Special Testing and Research Laboratory.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, ao CNPq e à CAPES pelos projetos que permitem a aquisição de equipamentos e insumos indispensáveis para a realização deste trabalho: FINEPCTINFRA (1/2009), CNPq (422168/2016-5), FINEP/MCT (01.09.0275-00) e INCTAA/CNPq.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Siglas e Abreviações.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract	xiv
Introdução.....	1
Capítulo 1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de RMNq para determinação de alcaloides em amostras de cocaína	6
1. Técnicas Quantitativas de RMN.....	6
1.1. Origem do sinal	6
1.2. Determinação do tempo de relaxação longitudinal (T_1).....	8
1.3. Relação Sinal-Ruído	9
1.4. Técnicas quantitativas de RMN	10
1.4.1. Cálculo da pureza utilizando um padrão interno.....	11
1.4.2. Método PULCON.....	12
2. Materiais e métodos.....	13
2.1. Reagentes e amostras de cocaína.....	13
2.2. CG-DIC.....	13
2.3. Preparo das soluções de calibração para análise de RMNq.....	14
2.4. RMN	15
2.5. Processamento dos espectros de RMN	16
2.6. Cálculo da relação Sinal-Ruído.....	16
2.7. Cálculo da pureza utilizando PULCON.....	17
3. Resultados e discussão.....	18

3.1.	Características espectroscópicas dos analitos	18
3.1.1.	Características espectroscópicas da benzoilmetilecgonina	18
3.1.2.	Características espectroscópicas da benzoilecgonina	20
3.1.3.	Características espectroscópicas da <i>trans</i> -cinamoilcocaína e <i>cis</i> -cinamoilcocaína	21
3.1.4.	Características espectroscópicas dos alcalóides da cocaína em solvente DMSO-d ₆	21
3.2.	Validação do método de RMNq	22
3.3.	Exatidão e recuperação	23
3.4.	Precisão	25
3.5.	Incerteza	26
3.6.	Limites de detecção e quantificação	27
3.7.	Estabilidade	29
3.8.	Robustez.....	30
3.9.	Seletividade	32
3.10.	Amostras de cocaína.....	33
4.	Conclusões	42
Capítulo 2. Desenvolvimento e aplicação de modelo de análise de componentes principais (PCA) em amostras de cloridrato de cocaína apreendidas utilizando dados de RMN de ¹ H		
		43
1.	Introdução.....	43
2.	Materiais e métodos.....	45
2.1.	Amostras de cocaína	45
2.2.	Preparo de amostras.....	46
2.3.	Obtenção e processamento dos espectros de RMN.....	46
2.4.	Análise de Componentes Principais e Análise Hierárquica de Agrupamentos.....	49
3.	Resultados	49
3.1.	Pré-processamento.....	50
3.2.	Análise dos escores da PCA.....	51
3.3.	Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)	55

3.4. Análise dos coeficientes das PCs	57
4. Conclusões	60
Referências	62
Apêndice A - Espectros de ¹³ C, DEPT135, HSQC, HMBC e COSY para amostra de cloridrato de cocaína	65
Apêndice B – Dados brutos para amostras de cocaína analisadas	68
Apêndice C – <i>Script</i> em R utilizado para processamento dos dados.....	74
Apêndice D – Gráfico de escores, pesos das PCs e dendrograma para dados centrados na média e autoescalados.....	82

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da molécula de cocaína (benzoilmetilecgonina).....	2
Figura 2. Apreensões de produtos de cocaína para o ano de 2014. Valores em kg de material bruto apreendido e porcentagem do total mundial ¹⁵	3
Figura 3. Principais alcaloides presentes nas folhas de <i>Erythroxylum coca</i> e <i>Erythroxylum novogranatense</i>	4
Figura 4. Representação do momento magnético (μ) de um núcleo e dos estados energéticos possíveis em função do número quântico de spin (I) ²⁴	7
Figura 5. Representação esquemática do comportamento do momento magnético dos núcleos durante um experimento de RMN.....	8
Figura 6. Sequência de inversão-recuperação ²⁴	9
Figura 7. Exemplo de experimento de inversão-recuperação para sinal do TSP em solução de D ₂ O a 28 °C, obtido em equipamento operando a 600 MHz para a frequência do ¹ H.	9
Figura 8. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) da amostra RTI (cocaína na forma cloridrato) em solução de D ₂ O/TSP à 28°C e respectiva atribuição dos sinais.....	19
Figura 9 Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) do padrão de benzoilecgonina em solução de D ₂ O/TSP à 28°C e respectiva atribuição dos sinais na molécula.....	20
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) do padrão de trans-cinamoilcocaína em solução de D ₂ O/TSP à 28°C e respectiva atribuição dos sinais na molécula.	21
Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) de amostra de cocaína base em solução de DMSO-d ₆ /TMS à 28°C.	22
Figura 12. Erro relativo em função da concentração de DMS em solução para os métodos de padrão interno e PULCON.	23
Figura 13. Diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa) para cálculo de incerteza do método de determinação de pureza baseado em RMNq.	26
Figura 14. Valor dos contrastes para os fatores estudados no planejamento fatorial 2 ⁷ -4III.	31
Figura 15. Espectro da amostra de cocaína na forma cloridrato e dos principais interferentes encontrados nas amostras.	33
Figura 16. Gráfico da pureza de cocaína determinada por RMNq (PULCON) versus pureza de cocaína determinada por CG-DIC para 26 amostras de cocaína apreendidas.....	34
Figura 17. Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de cocaína em amostras apreendidas.....	34

Figura 18. Gráfico da pureza de benzoilecgonina determinada por RMNq (PULCON) <i>versus</i> pureza de benzoilecgonina determinada por CG-DIC para 24 amostras apreendidas de cocaína.	35
Figura 19. Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de benzoilecgonina em amostras apreendidas.	35
Figura 20. Gráfico da pureza de <i>cis</i> -cinamoilcocaína determinada por RMNq (PULCON) <i>versus</i> pureza de <i>cis</i> -cinamoilcocaína determinada por CG-DIC para 26 amostras reais de cocaína.	36
Figura 21 Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de <i>cis</i> -cinamoilcocaína em amostras apreendidas.	36
Figura 22. Gráfico da pureza de <i>trans</i> -cinamoilcocaína determinada por RMNq (PULCON) <i>versus</i> pureza de <i>trans</i> -cinamoilcocaína determinada por CG-DIC para 26 amostras reais de cocaína.	37
Figura 23. Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de <i>trans</i> -cinamoilcocaína em amostras apreendidas.	37
Figura 24 Grau de oxidação determinado por RMNq e CG-DIC para amostras de cloridrato de cocaína (HC) e cocaína base (FB).	39
Figura 25. Origem dos principais alcaloides e compostos de interesse presentes em amostras de cocaína ⁴³	44
Figura 26. Gráfico de escores para a primeira e segunda PCs do modelo PCA com rótulos dos códigos das apreensões.	52
Figura 27. Gráfico de escores para a primeira e segunda PCs do modelo PCA com rótulos dos Estados da apreensão.	53
Figura 28 Gráfico de resíduos com valores de Q-residual e distância de Hotelling T^2 para as amostras utilizadas no modelo PCA.	54
Figura 29. Dendrograma construído com base em distâncias Euclidianas e método de ligação Ward.	56
Figura 30. Valores dos coeficientes calculados <i>versus</i> centro da integral (ppm) para as quatro primeiras componentes principais (PCs) do conjunto de dados utilizando dados centrados na média e autoescalados.	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros de CG-DIC utilizados nas análises de cocaína.	14
Tabela 2. Parâmetros de aquisição relevantes para desenvolvimento do método de RMNq.....	15
Tabela 3. Valores de T_1 determinados e descritos na literatura para padrões e analitos estudados. ...	16
Tabela 4. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra de cocaína RTI em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$ à 28°C : deslocamento químico, multiplicidade, constantes de acoplamento e valor aproximado da integral.....	19
Tabela 5. Resultados do experimento de exatidão para determinação de alcaloides presentes em amostras de cocaína.	24
Tabela 6. Resultados do ensaio de recuperação por fortificação de amostra para os analitos benzoilecgonina e trans-cinamoilcocaína.	24
Tabela 7. Condições do ensaio e coeficientes de variação para ensaios de precisão: repetitividade e precisão intermediária.	25
Tabela 8. Fonte de incerteza, unidade, tipo de estimativa e valor da contribuição individual para a determinação de incerteza do método baseado em RMNq.	27
Tabela 9. Amostra, analito, teor determinado do analito na amostra, coeficiente de variação e relação S/R mínima do sinal analítico para amostras reais.	28
Tabela 10. Resultados do experimento de estabilidade para amostra controle de cocaína da forma de cloridrato.	29
Tabela 11. Fatores a serem estudados e seus respectivos níveis.	31
Tabela 12. Teor de cis e trans-cinamoilcocaína em relação a cocaína e grau de oxidação da amostra determinados com base nos resultados de GC-DIC e RMNq.	40
Tabela 13. Parâmetros de aquisição utilizados na obtenção dos espectros de RMN.	46
Tabela 14. Regiões de deslocamento químico selecionadas e os respectivos valores de integral obtidos para amostra 2770-MS-16-2.	48
Tabela 15, Parâmetros de pré-processamento dos dados e proporção da variância explicada para as quatro primeiras PCs.....	50

Lista de Siglas e Abreviações

^1H - ^{13}C HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
^1H - ^{13}C HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
^1H - ^1H COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
AM	Ácido Maléico
CG	Cromatografia Gasosa
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização em Chama
CG-EM,	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
<i>DEA</i>	<i>Drug Enforcement Administration</i>
DEPT135	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer 135°</i>
DMS	Dimetilsulfona
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
ERETIC	<i>Electronic Reference To Access In Vivo Concentrations</i>
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos (do inglês, <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
MDMA	Metilenedioximetanfetamina
MDMA.HCl	Cloridrato de Metilenedioximetanfetamina
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
ONU	Organização das Nações Unidas
PC	Componente Principal (do inglês, <i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
PI	Padrão Interno
PULCON	<i>Pulse Length Based Concentration Determination</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa
SEPLAB	Serviços de Perícia de Laboratório
TMS	Tetrametilsilano
TSP	Sal de Sódio do Ácido trimetilsililpropanóico-d4

Resumo

Neste trabalho, um método de referência externa de RMNq-¹H foi desenvolvido e validado para determinação de alcaloides (benzoilmetilecgonina, benzoilecgonina, *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína) presentes em amostras de cocaína nas formas de base livre e de cloridrato de cocaína. O método foi aplicado a um conjunto de 26 amostras apreendidas pela Polícia Federal, permitindo a determinação destes alcaloides com um tempo de análise de aproximadamente 15 minutos. Os teores de cocaína e de cinamoilcocaínas nas amostras variaram de aproximadamente 63% a 94% (m/m) e de 0,33% a 5,82% (m/m), respectivamente. O método permitiu a determinação destes alcaloides com excelente exatidão (erro relativo < 5% comparado ao material de referência certificado) e precisão (CV < 3%). Algumas figuras de mérito são apresentadas: exatidão, recuperação, repetitividade, precisão intermediária, estabilidade, robustez, incerteza e limites de detecção e quantificação. O grau de oxidação das amostras também foi determinado. Os resultados mostraram uma excelente correlação quando comparados ao método de referência (CG-DIC) e o método pode ser facilmente adaptado para aplicação a outros analitos. Posteriormente, o potencial da técnica de RMN de ¹H aliada a ferramentas de análise multivariada para a análise exploratória das amostras de cocaína apreendidas foi avaliado. Analisaram-se 77 amostras de cloridrato de cocaína apreendidas pela Polícia Federal. Os espectros de ¹H das amostras foram processados e submetidos a Análise de Componentes Principais e a Análise Hierárquica de Agrupamentos, numa tentativa de estabelecer correlações entre conjuntos de amostras. O método apontou algumas possíveis correlações entre amostras, no entanto, a confirmação destas correlações por outras técnicas seria necessária para uma conclusão definitiva. Alguns dos sinais que apresentaram os maiores pesos foram identificados, dentre eles sinais relativos as moléculas de *cis* e *trans*-cinamoilcocaína, benzoilecgonina e acetato de etila. No entanto, uma investigação mais aprofundada tanto acerca de quais sinais podem ser relevantes para classificação, bem como suas identidades, são necessários para aprimoramento do método.

Palavras-chave: RMN, RMNq, PULCON, cocaína, benzoilmetilecgonina, cinamoilcocaína

Abstract

In this work, an external reference ^1H qNMR method is developed and validated for the determination of alkaloids (benzoylmethylecgonine, benzoylecgonine, cis-cinnamoylcocaine and trans-cinnamoylcocaine) in free base cocaine and cocaine hydrochloride samples. The method was applied to a set of 26 cocaine samples seized by Brazilian Federal Police, enabling the determination of these alkaloids with an analysis time of approximately 15 minutes. Cocaine and cinnamoylcocaine content in samples ranged from approximately 63% to 94% (w/w) and from 0,33% to 5,82% (w/w), respectively. The method allowed determination of these alkaloids with excellent accuracy (relative error $< 5\%$ compared to the reference material certificate) and precision (RSD $< 3\%$). Some figures of merit are presented, including accuracy, recovery, repeatability, intermediate precision, stability, robustness, uncertainty and limits of detection and quantification. Degree of oxidation of the samples was also determined. The results showed excellent correlation compared to the reference GC-FID methodology. The method can be readily adapted to other analytes. Secondly, the potential of ^1H NMR combined with multivariate analysis to exploratory data analysis of cocaine seizures was assessed. Seventy-seven samples of cocaine hydrochloride samples apprehended by Brazilian Federal Police were analyzed. The ^1H NMR spectra of samples were processed and submitted to Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis, in an attempt to establish correlations between groups of samples. Method pointed to possible correlations between some samples, however, confirmation of these correlations by other techniques would be necessary to achieve a definitive conclusion. Some of the signals that presented higher loading values were identified, namely signals related to cis and trans-cinnamoylcocaine, benzoylecgonine and ethyl acetate. However, more investigation towards signals that might be relevant to establish these correlations, as well as their identities, are necessary to a reliable application.

Keywords: NMR, qNMR, PULCON, cocaine, benzoylmethylecgonine, cinnamoylcocaine

Introdução

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica extremamente eficiente na elucidação de estruturas de moléculas orgânicas. No entanto, nas últimas décadas observa-se um aumento sensível no interesse por técnicas quantitativas de RMN (RMNq), com reflexo no aumento de aplicações em diversas áreas: biologia¹, metabolômica^{2, 3}, análise de alimentos⁴, produtos naturais^{5, 6}, ciências ambientais^{7, 8}, etc.

Apesar do custo elevado de aquisição e manutenção dos equipamentos, a RMNq é uma análise não destrutiva e, em muitos casos, não requer a prévia separação do analito da mistura a ser analisada. Porém, a principal vantagem na utilização de técnicas de RMNq se deve ao fato de que, ao contrário de outras técnicas utilizadas na quantificação de compostos orgânicos, como CG-EM, CG-DIC e CLAE-DAD, as técnicas RMNq dispensam a presença de um material de referência (MR) que contenha o analito de interesse. Isso se deve ao fato de que o sinal do grupo funcional observado (o núcleo de um átomo de hidrogênio não lábil, por exemplo) possui um coeficiente de resposta molar de valor igual a 1 independentemente do composto, desde que se respeitem alguns parâmetros de aquisição e processamento dos espectros⁹.

Levando-se em consideração o que foi exposto acima, pode-se constatar que a RMNq é uma técnica extremamente atraente para a determinação de analitos em aplicações forenses, especialmente drogas ilícitas e seus adulterantes, já que a grande variedade e o constante aparecimento de novas substâncias faz com que nem sempre seja possível adquirir MRs adequados no mercado ou que os custos envolvidos nessas aquisições sejam acessíveis⁹. Além de permitir uma quantificação absoluta de moléculas de interesse, a possibilidade de se obter sinais dos vários componentes de uma amostra de maneira simultânea, faz da RMN de ¹H uma excelente fonte de dados para métodos baseados em análise multivariada, como a análise de componentes principais (do inglês, PCA), atendendo a demandas que variam desde a análise de alimentos¹⁰ até a classificação de espécies vegetais¹¹.

Neste trabalho, foi investigado o potencial da técnica de RMN de ¹H na caracterização de amostras de cocaína apreendidas pela Polícia Federal, com os seguintes objetivos: (i) desenvolver e validar um método para quantificação de cocaína (benzoilmetilecgonina), benzoilecgonina, *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína em amostras de cocaína por RMNq utilizando uma referência externa (PULCON) sem a necessidade de padrões que contenham os analitos de interesse; (ii) demonstrar a aplicação do método de quantificação por RMN de ¹H para amostras de cocaína,

comparando os resultados com o método cromatográfico de referência e (iii) desenvolver e aplicar método de classificação com base em ferramentas de análise quimiométrica multivariada a partir de espectros de RMN de ^1H para conjuntos de amostras apreendidas.

A cocaína (também chamada benzoilmetilecgonina, figura 1) é um alcaloide cristalino branco obtido das folhas de plantas da família *Erythroxylum*. Duas espécies contêm quantidades significativas de cocaína: *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novogranatense*. A cocaína possui propriedades anestésicas e é utilizada como droga recreativa, pois consumida em pequena quantidade provoca sensação de poder e euforia¹².

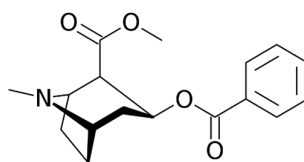


Figura 1. Estrutura da molécula de cocaína (benzoilmetilecgonina).

As primeiras convenções para regulamentar a produção e comercialização de cocaína foram realizadas no início do século XX, porém, apenas em 1988, na Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Entorpecentes e Substâncias Psicotrópicas, foi instituído o controle sobre os insumos químicos utilizados no refino clandestino.

Os principais produtores mundiais de cocaína são Colômbia, Peru e Bolívia¹³. O Brasil, por sua posição geográfica, aparece em destaque na rota do tráfico internacional de cocaína. A grande extensão territorial de fronteira do Brasil com países produtores faz com que a infraestrutura do país seja uma rota atraente para que a cocaína chegue na Europa e na África¹⁴. Isso contribui para que o Brasil ocupe a 5ª posição mundial em termos de volume de apreensão de produtos baseados em cocaína, como mostrado na figura 2:

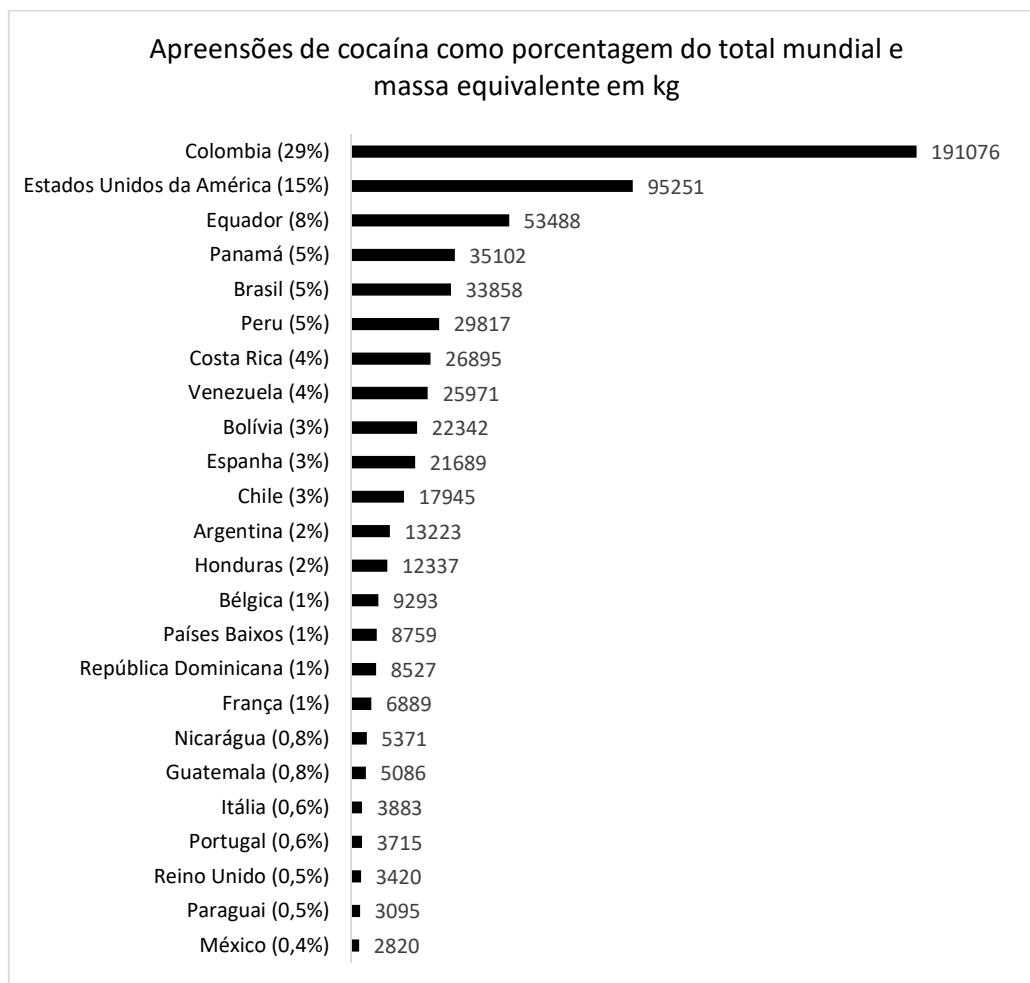


Figura 2. Apreensões de produtos de cocaína para o ano de 2014. Valores em kg de material bruto apreendido e porcentagem do total mundial¹⁵.

Por se tratar de um mercado não regulado e ilícito, as etapas de extração e refino da cocaína podem variar bastante, o que faz com que haja diversas formas de apresentação da cocaína: pasta base, cocaína base, crack, cloridrato de cocaína, etc. Estes produtos apresentam diversos alcaloides em sua composição: benzoilmetilecgonina, benzoilecgonina, *cis*-cinamoilcocaína, *trans*-cinamoilcocaína, 3,4,5-trimetoxicocaína, tropacocaína, truxilinas, dentre outros¹⁶. O teor de alcaloides minoritários presentes na cocaína pode ser utilizado para fornecer informações acerca do processo de refino, idade e condição de armazenamento de apreensões¹⁷.

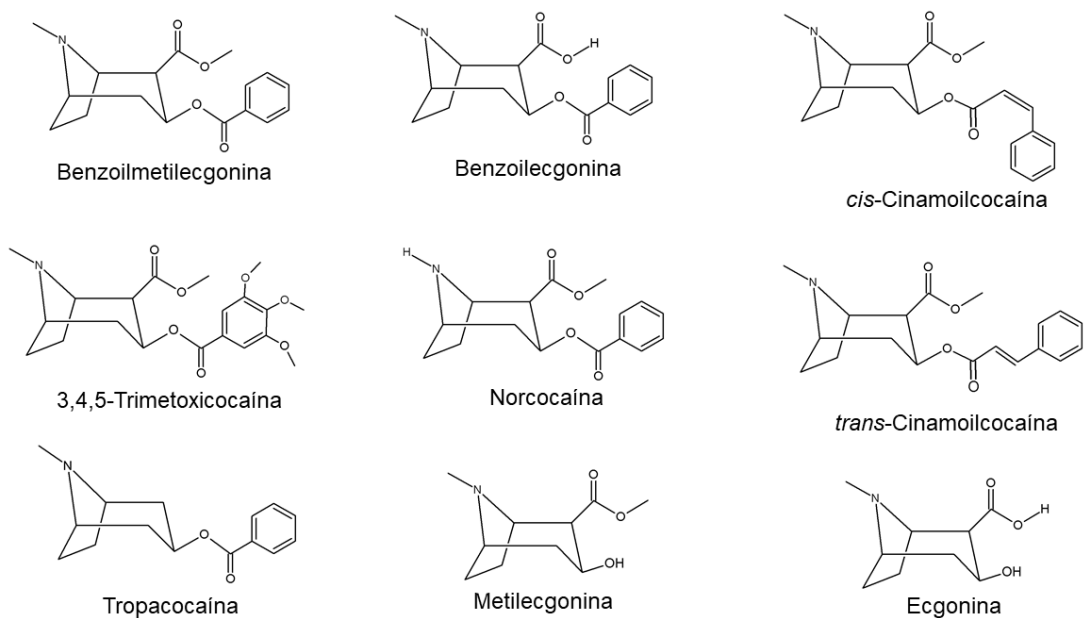


Figura 3. Principais alcaloides presentes nas folhas de *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novogranatense*.

Neste trabalho foram selecionadas amostras na forma de cocaína base e cloridrato de cocaína, cuja principal característica é o processo de refino (oxidação e/ou lavagens) aos quais são submetidas com a finalidade de remover outros alcaloides presentes na planta – mais especificamente a *cis* e a *trans*-cinamoilcocaina – que se encontram no primeiro produto da extração, denominado pasta base de cocaína¹². Apesar da existência do grande número de alcaloides presentes nas folhas da planta de coca este trabalho, em um primeiro momento, foca na determinação de quatro alcaloides que se encontram em concentrações relativamente altas nas amostras: cocaína, benzoilecgonina, *cis*-cinamoilcocaina e *trans*-cinamoilcocaina. O teor destes alcaloides nas amostras permite fazer inferências a respeito dos processos de refino e da taxa de degradação das amostras¹⁶.

A determinação do teor de *cis* e *trans*-cinamoilcocaina em relação ao teor de cocaína apresenta uma particularidade interessante do ponto de vista da química forense: permite classificar as amostras segundo o grau de oxidação que determinada amostra sofreu durante seu processo de refino. Assim, amostras de cocaína onde os teores relativos de cinamoilcocainas são <2%, >2% e <6% ou >6% podem ser consideradas como tendo um alto, médio ou baixo grau de oxidação, respectivamente¹⁶.

Além dos alcaloides naturalmente presentes na planta de coca, é comum encontrar substâncias utilizadas como adulterantes e diluentes nas amostras de cocaína. Estes materiais são

adicionados com a finalidade de aumentar a massa do produto e, conseqüentemente, a margem de lucro da atividade. Os adulterantes se diferem dos diluentes por possuírem um efeito farmacológico. Dentre os adulterantes mais comumente encontradas estão fenacetina, cafeína, lidocaína, aminopirina, levamisol e benzocaína. Já na categoria de diluentes, podem estar presentes desde açúcares (lactose, sacarose, amido) até sais inorgânicos (bicabornato de sódio, cloreto de sódio, ácido bórico, etc)^{18,19}.

Apesar da importância dessas substâncias na caracterização de amostras de cocaína, tanto para questões relacionadas a políticas públicas de saúde quanto para fornecer subsídios para os setores de inteligência das forças policiais, este trabalho deixou de abordar a determinação destas substâncias – que já se encontram exaustivamente descrita na literatura^{18,20} – para se concentrar na determinação dos alcaloides presentes naturalmente nas plantas de coca. Essa decisão foi fundamentada diante do interesse em se investigar o potencial da RMNq aliada a ferramentas de análise multivariada para determinação de origens comuns e correlação entre amostras. Estas análises são usualmente feitas com base nos teores relativos de alcaloides presentes nas amostras^{17,21}. Além disso, diferentemente do que se espera para amostras de rua, mais próximas do consumidor final, um estudo já demonstrou que mais de 50% das amostras apreendidas pela Polícia Federal entre 2009-2012 não apresentaram adulteração²².

Capítulo 1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de RMNq para determinação de alcaloides em amostras de cocaína

A caracterização adequada de amostras de cocaína ilícita apreendidas pelas forças policiais é extremamente relevante para o aperfeiçoamento de políticas públicas tanto na área de repressão quanto de saúde. Apesar do custo elevado, a Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq) é uma alternativa extremamente atraente para determinação de analitos de interesse forense, especialmente drogas ilícitas e seus metabólitos e adulterantes. A RMNq pode ser considerada um método de razão primário: mede o valor de uma razão desconhecida em relação a um padrão²³. A resposta depende do número de núcleos contribuindo para uma determinada linha de ressonância, não requerendo um material de referência que contenha o analito de interesse para quantificação absoluta.

Assim, considerando a atual demanda por métodos rápidos e confiáveis para caracterização de amostras ilícitas de cocaína e o grande potencial da RMNq neste campo, o objetivo desta etapa do trabalho é de apresentar pela primeira vez a validação e aplicação de um método de referência externa de RMNq-¹H utilizando PULCON para determinação dos alcaloides presentes de maneira mais abundante em amostras de cocaína apreendidas pela Polícia Federal: benzoilmetilecgonina (cocaína), benzoilecgonina, *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína.

1. Técnicas Quantitativas de RMN

1.1. Origem do sinal

O sinal de RMN é consequência da propriedade descrita pela mecânica quântica como spin nuclear. O núcleo de qualquer átomo pode ser caracterizado por um número quântico de spin (I) que pode assumir um valor maior ou igual a zero e é múltiplo de 1/2. Um átomo de Hidrogênio, por exemplo, apresenta spin nuclear 1/2 e é o núcleo com sinal de RMN mais facilmente observável. Núcleos com spin nuclear zero (I=0), como o carbono-12, não apresentam sinal de RMN pois não possuem spin nuclear.

A carga do núcleo em movimento dá origem a um momento magnético (μ) que pode ser descrito por:

$$\mu = \gamma P \quad (1)$$

Onde P é o momento angular e γ a razão magnetogírica, que é constante para um determinado núcleo. Na presença de um campo magnético externo (B_0), a população desses momentos magnéticos se distribui em um número discreto de orientações possíveis, definidas por estados energéticos quantizados. Assim, para um determinado núcleo com número quântico de spin I existem $2I+1$ estados possíveis (Figura 4).

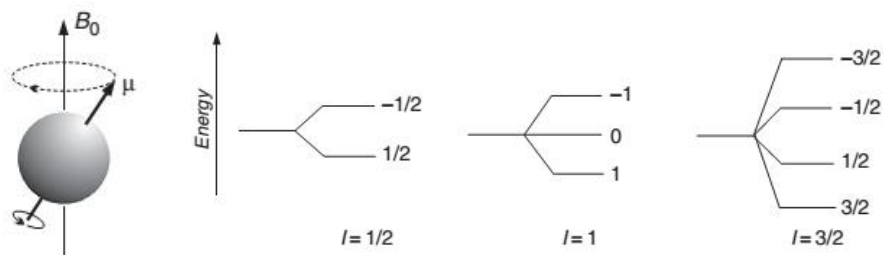


Figura 4. Representação do momento magnético (μ) de um núcleo e dos estados energéticos possíveis em função do número quântico de spin (I)²⁴.

A presença de um campo magnético estático gera um torque sobre o momento magnético do núcleo, dando origem a um movimento de precessão do momento magnético em relação ao campo magnético estático. A frequência da precessão é conhecida como frequência de Larmor do núcleo. O fenômeno de RMN ocorre quando um núcleo absorve uma determinada quantidade de energia na forma de radiação eletromagnética e é excitado de um estado de spin menos energético para um mais energético. A energia (ΔE) envolvida para essa transição é dada por:

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (2)$$

Onde h é a constante de Planck, γ a razão magnetogírica e B_0 é o campo magnético externo. Vale ressaltar que como os valores de ΔE são tipicamente pequenos a diferença entre as populações com diferentes estados de spin também é relativamente pequena. Isso explica a baixa sensibilidade da RMN quando comparada a técnicas como a espectroscopia na região de IR ou UV-Vis, onde há maior diferença entre os estados energéticos.

Na figura 5 encontramos representado o comportamento do momento magnético dos núcleos durante as etapas de um experimento de RMN de ^1H . Na ausência do campo magnético externo (1) a população dos momentos magnéticos encontra-se distribuída de maneira aleatória. Na presença de um campo magnético externo B_0 (2) verifica-se que essa população se distribui em dois estados energéticos quantizados ($+1/2$ e $-1/2$). Após a aplicação de um pulso de radiofrequência com

características apropriadas (3) os núcleos absorvem energia e os momentos magnéticos são deslocados de sua posição de equilíbrio (4). Ao retornar para sua posição de equilíbrio (6) os núcleos emitem um sinal denominado decaimento livre de indução (5) que consiste no sinal observável de RMN e é comumente chamada de FID (do inglês *Free Induction Decay*).

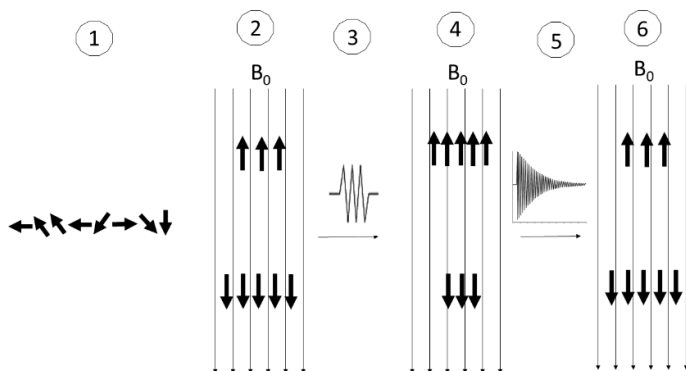


Figura 5. Representação esquemática do comportamento do momento magnético dos núcleos durante um experimento de RMN.

1.2. Determinação do tempo de relaxação longitudinal (T_1)

Um aspecto fundamental no desenvolvimento de métodos quantitativos de RMN consiste na correta determinação do tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos núcleos/sinais de interesse. Através da constante T_1 , é possível estabelecer o tempo necessário para que a população de spins nucleares excitados pelo pulso de radiofrequência retorne ao estado de equilíbrio do sistema, geralmente 5 vezes o valor de T_1 . Esta condição é necessária para que a constante do espectrômetro (k_s), que também pode ser descrita como o coeficiente de resposta molar para determinado núcleo, adquira um valor igual para todos os sinais no espectro^{24, 25}. Pequenas diferenças nos valores das constantes podem gerar distorções significativas nas áreas utilizadas para as análises por RMNq. Para moléculas orgânicas os valores de T_1 de seus prótons variam usualmente de 0,5 a 5 segundos e dependem de fatores experimentais como solvente e temperatura²⁴.

O experimento usual para se calcular os valores das constantes T_1 de um sistema é a sequência de inversão-recuperação (Figura 6). Esse experimento consiste basicamente em um pulso de radiofrequência de 180° seguido por um pulso de rádio frequência de 90° após um intervalo de tempo τ . Para um valor de τ igual a zero observa-se o espectro com a fase invertida e à medida que o valor de τ aumenta é possível monitorar a intensidade dos sinais e acompanhar a inversão da fase e o

aumento de intensidade dos sinais. Quando os sinais atingem a máxima intensidade, esse é o tempo correspondente a completa relaxação dos spins.

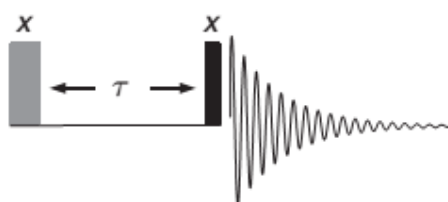


Figura 6. Sequência de inversão-recuperação²⁴.

Esse comportamento pode ser descrito pela equação apresentada no gráfico da figura 7 e o ajuste com valores experimentais pode ser utilizado para determinação dos valores de T_1 para cada um dos sinais de interesse do espectro. O gráfico representa a intensidade do sinal em função do intervalo τ . A linha representa o ajuste feito com a equação apresentada na área do gráfico utilizando o software Topspin 3.2, onde I é a intensidade do sinal, t é o intervalo entre pulsos e T_1 o tempo de relaxação longitudinal.

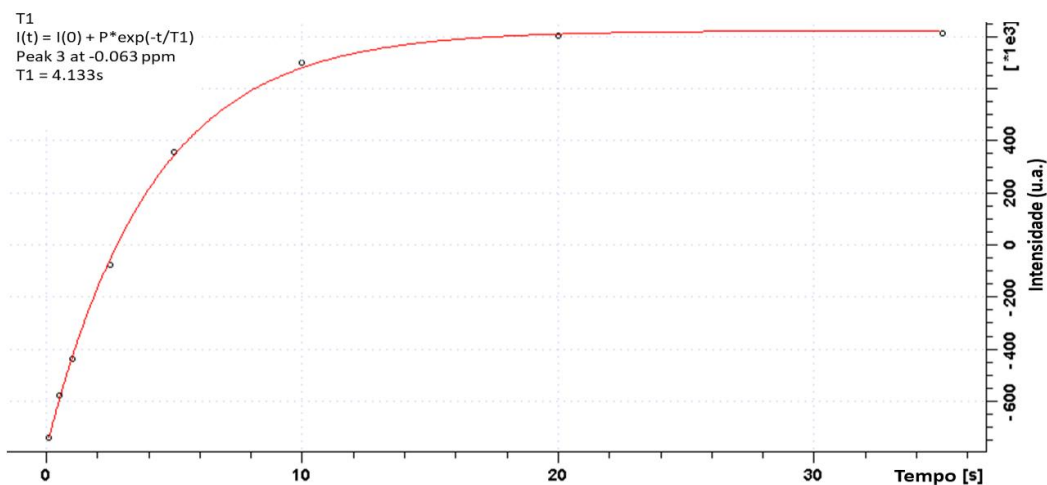


Figura 7. Exemplo de experimento de inversão-recuperação para sinal do TSP em solução de D_2O a $28^\circ C$, obtido em equipamento operando a 600 MHz para a frequência do 1H .

1.3. Relação Sinal-Ruído

Além de conhecer a dinâmica de cada núcleo da amostra ao ser submetida a um experimento de RMN, para aplicação da RMNq na determinação direta de substâncias orgânicas é fundamental compreender os parâmetros que afetam a relação sinal-ruído de um experimento de RMN. A relação

sinal-ruído de um experimento de RMN realizado em temperatura ambiente pode ser representada através da seguinte expressão:

$$\frac{S}{N} \quad (3)$$

$$\propto NAT_s^{-1} B_0^{3/2} \gamma^{5/2} T_2^* (NS)^{1/2}$$

Onde N é o número de moléculas no volume observado de amostra, A representa a abundância do núcleo observado, T_s é a temperatura da amostra e da bobina de radiofrequência, B_0 é o campo magnético estático, γ é a razão magnetogírica do núcleo, T_2^* é o tempo de relaxação transversal efetivo e NS é o número de transientes acumulados. Assim, é possível recorrer a vários artifícios que permitem aumentar a relação sinal-ruído em um experimento de RMN: dar preferência a isótopos com elevada abundância natural e/ou razão magnetogírica (o que explica a popularidade da RMN de ^1H), aumentar a concentração da amostra, aumentar a intensidade do campo magnético externo (alternativa cara, que envolve mudança de equipamento, mas que também aumenta a resolução dos sinais). Além disso, uma peculiaridade interessante da técnica de RMN, é a possibilidade de se aumentar a relação sinal-ruído de uma medida apenas aumentando o número de transientes, ou seja, o tempo de aquisição.

1.4. Técnicas quantitativas de RMN

Nas técnicas de RMNq, a correlação entre o sinal analítico e a concentração absoluta do analito pode ser facilmente realizada através de um padrão interno²⁶, de um padrão externo²⁷ ou de um sinal de referência sintético, gerado eletronicamente²⁸. O padrão interno deve ser uma substância quimicamente estável, não higroscópica, não volátil e inerte frente aos componentes da amostra. Na escolha do padrão interno, dois parâmetros importantes devem ser considerados: a solubilidade do composto no solvente da matriz e o deslocamento químico dos sinais, para que não haja sobreposição com sinais da amostra.

Sinais de referência gerados eletronicamente, chamados genericamente de *ERETIC* (*Electronic REference To access In vivo Concentrations*), surgiram como uma alternativa à utilização de padrão interno na determinação de analitos em matrizes complexas, especialmente as de origem biológica^{28,28}, em que a contaminação da amostra com o padrão interno é, em muitos casos, indesejável, e onde nem sempre é possível encontrar um padrão interno inerte e que apresente sinal em uma região adequada do espectro²⁸. Entretanto, a configuração do sinal e seu processamento são procedimentos trabalhosos e nem sempre disponíveis para todos os equipamentos de RMN em termos de *hardware*²⁹.

As vantagens obtidas com utilização do sinal ERETIC também podem ser alcançadas com a utilização de métodos de referência externa, uma vez que o sinal gerado por RMN é bastante estável ao longo do tempo. Neste caso as áreas de sinais em diferentes espectros são calculadas com base em sua intensidade absoluta e comparadas. Isso é possível utilizando, por exemplo, o algoritmo PULCON (*PULse length based CONcentrarion determination*), capaz de correlacionar intensidades de sinais em dois espectros distintos¹.

1.4.1. Cálculo da pureza utilizando um padrão interno

De acordo com Malz²⁵, a relação mais importante para compreender a técnica de RMNq é a que relaciona a área de um sinal (I_x) ao número relativo de núcleos envolvidos na geração deste sinal (N_x) através de uma constante do espectrômetro (k_s):

$$I_x = k_s N_x \quad (4)$$

O valor de k_s pode ser constante para sinais de moléculas distintas desde que se respeitem certas condições de aquisição (intervalo entre transientes deve ser no mínimo 5 vezes superior ao maior valor de T1 dos sinais envolvidos) e processamento dos espectros. Quando k_s assume um valor constante para dois sinais distintos, x e y por exemplo, podemos escrever a seguinte relação:

$$\frac{I_x}{I_y} = \frac{N_x}{N_y} \quad (5)$$

A razão molar de x e y (n_x/n_y) pode ser calculada diretamente:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x N_y}{I_y N_x} \quad (6)$$

Para determinação da pureza de um composto basta expandir a expressão acima para que esta inclua os termos de massa e pureza da amostra e do material utilizado como padrão interno:

$$P_x = \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m} P_{std} \quad (7)$$

Onde os índices x e std referem-se, respectivamente, a amostra e ao padrão, I é a área integrada do sinal, N o número de prótons relacionados ao sinal, M a massa molar da substância, m a massa gravimétrica e P a pureza.

1.4.2. Método PULCON

Quando se utiliza uma referência externa, a quantificação pode ser feita com procedimento *PULCON* (*pulse length based concentration determination*), um método capaz de correlacionar as intensidades absolutas de dois espectros distintos. Esse procedimento se baseia no princípio da reciprocidade: o comprimento do pulso de 90° para uma amostra inserida em uma determinada bobina é inversamente proporcional à sensibilidade que pode ser obtida. Assim, conhecendo a concentração de uma amostra de referência e garantindo que o pulso de 90° para a referência e para a amostra esteja corretamente calibrado, as concentrações desconhecidas das amostras podem ser obtidas pela seguinte equação¹:

$$C_x = k C_{std} \frac{I_x}{I_{std}} \frac{T_x}{T_{std}} \frac{\theta_x^{90}}{\theta_{std}^{90}} \frac{n_{std}}{n_x} \quad (8)$$

Onde os índices x e std representam a amostra e a referência respectivamente, C é a concentração, T é a temperatura, θ^{90} é o valor do pulso de 90°, n é o número de transientes e k é um fator de correção que considera diferenças no ganho do detector. Essa equação é válida quando todos os experimentos são obtidos com a mesma sonda desde que ela esteja corretamente sintonizada.

Ao contrário das técnicas de RMNq que utilizam padrão interno, que já estão muito bem consolidadas e exaustivamente descritas na literatura²⁹⁻³¹, as técnicas que utilizam PULCON ainda aparecem de maneira tímida, com poucas referências que apresentem métodos devidamente validados, especialmente no caso de estudos que envolvam amostras reais. A viabilidade dessa metodologia no contexto de controle oficial de medicamentos³², mais especificamente na determinação de ácido ibandronico, amantidina-HCl, ambroxol-HCl e lercanidipina já foi reportada. Os autores demonstraram que o método de referência externa com base em PULCON é capaz de fornecer, rapidamente, resultados com exatidão e precisão iguais ou melhores do que métodos de RMNq que utilizam padrão interno e de métodos baseados em CLAE-DAD.

Frank e colaboradores desenvolveram um método com base em PULCON para determinação quantitativa de moléculas de baixa massa molecular em materiais de referência e extratos naturais³³. O método foi validado e os resultados comparados com valores obtidos por gravimetria. Diversas moléculas de interesse na área de alimentos foram analisadas com taxas de recuperação variando de 98,1% a 101,1%, dentre elas: mistura das sapogeninas diosgenina e sarsasapogenina, ciclinopeptídeo C (octapeptídeo cíclico presente no óleo de semente de linhaça) e até mesmo compostos de referência sintéticos marcados com isótopos estáveis (tyramine-d2, S-

methylmethionine-d3). Os autores ressaltam a vantagem de obter resultados com boa exatidão em análises rápidas (15 minutos aproximadamente).

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e amostras de cocaína

Como materiais de referência certificados (MRC) foram utilizados dimetilsulfona (DMS, 99,73%±0,01%) e ácido maleico (AM, 99,99%±0,01%) TraceCERT® da Sigma-Aldrich. Todas as soluções foram preparadas com óxido de deutério (D₂O) 99,9% da Sigma-Aldrich contendo aproximadamente 0,01% de sal de sódio do ácido tetrametilsililpropanóico-d4 (TSP) ou com dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) 99,9% da CIL contendo aproximadamente 0,01% de tetrametilsilano (TMS). Amostras de cocaína na forma cloridrato, benzoilecgonina e de trans-cinamoilcocaína fornecidas pelo *Drug Enforcement Administration's Special Testing and Research Laboratory* foram usadas como materiais de referência para obter algumas das figuras de mérito na etapa de validação.

As amostras de cocaína foram escolhidas dentro de um conjunto de amostras apreendidas entre os anos de 2011 e 2015 nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso do Sul e Paraná. Foram escolhidas 15 amostras na forma de apresentação cloridrato e 11 amostras de cocaína na forma de apresentação base livre com teores de alcaloides que representassem toda a faixa de concentração tipicamente encontrada em cada uma das formas de apresentação. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em almofariz e pistilo de porcelana com auxílio de Nitrogênio líquido e o pó resultante foi armazenado em tubos plásticos guardados em dessecador para serem analisados posteriormente por GC-FID e RMN. Todas as amostras foram preparadas no laboratório SEPLAB do Instituto Nacional de Criminalística (INC) sob a supervisão do perito Dr. Adriano O. Maldaner.

2.2. CG-DIC

As amostras de cocaína foram analisadas no laboratório do Instituto Nacional de Criminalística (ISO/IEC 17025). As análises foram feitas em um cromatógrafo Agilent 6890N (CG-DIC) equipado com amostrador automático para líquidos Agilent série 7693B com seringa de 10 µL. Os dados foram processados com auxílio dos *softwares* MSD ChemStation e Enhanced Data Analysis. Os parâmetros cromatográficos utilizados foram determinados de acordo com as metodologias já validadas^{18, 34} pelo INC para análise de rotina de alcaloides majoritários

(benzoilmetilecgonina, cis-cinamoilcocaína e trans-cinamoilcocaína) e adulterantes em amostras de cocaína. Os parâmetros utilizados nas análises de CG-DIC estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de CG-DIC utilizados nas análises de cocaína.

Parâmetro	Cocaína
Coluna	RXi-1MS methyl siloxane, 25m x 200um (i.d.) x 0,33 um film thickness
Temperatura do injetor	280 °C
Volume de injeção	1 µL
Split	50:1
Gás de arraste	He 5.0
Fluxo do gás de arraste	1,0 mL/min
Temperatura inicial (tempo/hold)	150 °C (2 min)
Rampa	40 °C/min
Temperatura final (tempo/hold)	315 °C (4,5 min)
Temperatura do detector	320 °C
Fluxo de H ₂ 5.0 do detector	35,0 ml/min
Fluxo de ar 5.0 do detector	350,0 ml/min
Fluxo de N ₂ 5.0 do detector	35,0 ml/min
Tempo total de corrida	~11 min

2.3. Preparo das soluções de calibração para análise de RMNq

Para determinar a pureza através do método PULCON foram utilizadas soluções controle: aproximadamente 12 mg AM e de DMS foram pesados ($\pm 0,01$ mg) em *eppendorfs* utilizando uma balança XP205 da Mettler Toledo. Aos *eppendorfs* foram adicionados 600 µL de solução D₂O/TSP ou 600 µL de solução DMSO-d₆/TMS. A massa exata de solvente adicionada foi registrada e utilizada posteriormente no cálculo do PULCON, utilizando o AM e a DMS como padrões externos. As amostras foram colocadas em agitação vortex por aproximadamente 1 minuto para garantir completa dissolução do material.

Para as amostras de cocaína pesou-se 50 mg ($\pm 0,01$ mg) de amostra e foram adicionados aproximadamente 600 µL da solução apropriada: D₂O/TSP para amostras na forma de cloridrato e DMSO/TMS para amostras na forma de base livre. A agitação em vortex por aproximadamente 1 minuto foi suficiente para completa dissolução das amostras.

Aproximadamente 600 μL das soluções foram transferidos para tubos Norell Standard Series™ 600 MHz de 5 mm. Para minimizar erros oriundos de diferenças nos diâmetros interno e externo dos tubos, foi utilizado um único conjunto de tubos do mesmo lote ao longo das análises²⁷.

2.4. RMN

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III HD 600 MHz equipado com sonda do tipo *Broadband Observe* (BBFO) 5 mm, situado no Laboratório de RMN, no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília. Além dos procedimentos usuais de *lock* e *shimming*, antes de cada aquisição, a sonda foi cuidadosamente sintonizada manualmente e o pulso de 90° (P90) calibrado automaticamente (comando *pulseval*). Para evitar a presença de artefatos do tipo *sidebands* e diminuir a possibilidade de sobreposição de sinais, os espectros foram obtidos com o *spinner* desligado e com desacoplamento de ^{13}C durante a etapa de aquisição do espectro (sequência *zgig30*). Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros foram escolhidos de modo a garantir a obtenção de um espectro quantitativo e uma relação sinal-ruído acima de 10 para os sinais utilizados na quantificação, e estão apresentados na Tabela 2. Parâmetros de aquisição relevantes para desenvolvimento do método de RMNq..

Tabela 2. Parâmetros de aquisição relevantes para desenvolvimento do método de RMNq.

Parâmetro	Símbolos (Bruker)	Valor
Nº de pontos no domínio de tempo	TD	64k
Largura da janela espectral	SW	20 ppm
Centro da janela espectral	O1	6 ppm
Tempo de espera entre cada transiente	D1	15 s
<i>Dummy scans</i>	DS	4
Número de transientes	NS	32
Ganho do detector	RG	32
Modo de digitalização	DIGMOD	baseopt
<i>Pre-scan delay</i>	DE	10 μs
Correção do filtro	FILCOR	1,5 μs
Tempo total de experimento	expt	~11 min

Os valores de T_1 foram calculados (Tabela 3. Valores de T_1 determinados e descritos na literatura para padrões e analitos estudados.) para todos os sinais utilizados nas determinações, sendo que as aquisições dos espectros foram feitas com um intervalo entre transientes de, no mínimo, 7

vezes o valor da maior constante T_1 determinada para garantir total recuperação do equilíbrio antes de cada pulso. Os valores obtidos encontram-se em boa concordância com os valores encontrados na literatura. Esses resultados foram utilizados para o cálculo do tempo de espera entre cada transiente.

Tabela 3. Valores de T_1 determinados e descritos na literatura para padrões e analitos estudados.

Molécula	Sinal (ppm)	T_1 determinado (s) / solvente / temperatura	T_1 literatura (s) / solvente / temperatura
Dimetilsulfona	3,0 ppm	6,29 s / D ₂ O / 28 °C	6,5 s / D ₂ O / 25 °C ³⁵
Ácido maléico	6,3 ppm	6,42 s / D ₂ O / 28 °C	6,3 s / D ₂ O / 25 °C ³⁵
Cocaína	5,57 ppm	1,11 s / D ₂ O / 28 °C	Não encontrado
<i>Cis</i> -cinamoilcocaína	5,98 ppm	1,51 s / D ₂ O / 28 °C	Não encontrado
<i>Trans</i> -cinamoilcocaína	6,54 ppm	1,26 s / D ₂ O / 28 °C	Não encontrado

2.5. Processamento dos espectros de RMN

Os espectros foram processados com o software TopSpin 3.2. Uma função exponencial do tipo *line broadening* (LB = 0,15 Hz) foi aplicada previamente à transformada de Fourier com aproximadamente 64 mil pontos (SI = 64 k), ou seja, com preenchimento com zeros (*1x Zero filling*). Ajustou-se automaticamente o parâmetro de fase de ordem zero (comando *apk0*) e a linha de base com função polinomial de quinta ordem. Ajustes manuais de fase e linha de base foram feitos quando necessário e os espectros foram referenciados em relação ao sinal do TMS ou TSP (0 ppm). Os intervalos de integração foram definidos manualmente sendo que os limites da integral eram definidos pelo ponto em que o sinal interceptava a linha base do espectro na intensidade zero.

2.6. Cálculo da relação Sinal-Ruído

Um dos aspectos fundamentais para obtenção de resultados precisos utilizando RMNq é garantir que os sinais utilizados para quantificação tenham uma relação sinal-ruído (S/N) adequada. Neste trabalho, os parâmetros foram escolhidos de maneira a garantir uma relação S/N de pelo menos 10:1 para os sinais de interesse. Alguns autores afirmam ainda que é necessária uma relação S/N de pelo menos 150:1 para obter resultados com incerteza inferior a 1%²⁵.

Os valores da relação S/N nesse trabalho foram calculadas com o software TopSpin 3.2 (Bruker) com a seguinte expressão:

$$R(S/N) = \frac{\maxval}{2 NOISE} \quad (9)$$

Onde $maxval$ é o valor mais intenso do sinal e fator $NOISE$ é calculado de acordo com o algoritmo do software.

2.7. Cálculo da pureza utilizando PULCON

Para calcular a pureza da amostra através da equação 10, é necessário expandir os termos das concentrações:

$$\frac{m_x^{grav} P_x N_x}{M_x V_x} = k \frac{m_{std}^{grav} P_{std} N_{std}}{M_{std} V_{std}} \frac{I_x}{I_{std}} \frac{T_x}{T_{std}} \frac{\theta_{90}^x}{\theta_{90}^{std}} \frac{n_{std}}{n_x} \quad (10)$$

Onde os novos termos são: a massa gravimétrica (m^{grav}), a pureza (P), o número de prótons relacionados ao sinal (N), a massa molar da substância (M) e o volume de solvente (V).

Resolvendo para o termo de pureza do analito temos:

$$P_x = k \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m_x^{grav}} P_{std} \frac{V_x}{V_{std}} \frac{T_x}{T_{std}} \frac{\theta_{90}^x}{\theta_{90}^{std}} \frac{n_{std}}{n_x} \quad (11)$$

Nesse trabalho, com o intuito de minimizar a incerteza do método, utilizou-se a massa e densidade do solvente no lugar do volume:

$$P_x = k \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m_x^{grav}} P_{std} \frac{m_x^{solv}/d_x^{solv}}{m_{std}^{solv}/d_{std}^{solv}} \frac{T_x}{T_{std}} \frac{\theta_{90}^x}{\theta_{90}^{std}} \frac{n_{std}}{n_x} \quad (12)$$

Onde m_{solv} e d_{solv} referem-se à massa e à densidade do solvente, respectivamente. Como a mesma solução de D₂O/TSP ou DMSO/TMS foi utilizada para preparar tanto as soluções contendo as amostras quanto os padrões de uma determinada bateria de análises a razão das densidades é igual a 1 e a equação pode ser simplificada:

$$P_x = \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m_x^{grav}} P_{std} k \left(\frac{m_x^{solv}}{m_{std}^{solv}} \frac{T_x}{T_{std}} \frac{\theta_{90}^x}{\theta_{90}^{std}} \frac{n_{std}}{n_x} \right) \quad (13)$$

Assim, a equação 13 foi utilizada para calcular a pureza do analito para os resultados de PULCON ao longo deste trabalho, Onde P é a pureza (% m/m), I é a área do sinal analítico, N o número de núcleos envolvidos na geração do sinal, M é a massa molecular, m a massa gravimétrica, m^{solv} a massa gravimétrica de solvente, T é a temperatura de aquisição, θ_{90} é o valor calculado do pulso de 90°, n é o número de varreduras e k um fator de correção associado a diferenças no ganho do detector. Os subscritos x e std referem-se a amostra/analito e ao padrão, respectivamente.

Como todos espectros foram adquiridos sempre com o mesmo valor de ganho do detector a constante k assume o valor de 1. Mesmo assim a linearidade do ganho do detector foi verificada

através da análise do ajuste da curva em um gráfico de área de um sinal *versus* o ganho do detector para um conjunto de espectros adquiridos com diferentes valores de ganho para uma solução de DMS.

Vale ressaltar que, embora o *software* Topspin 3.2 ofereça uma ferramenta de quantificação para utilização do método PULCON, todos os resultados apresentados neste trabalho foram calculados com auxílio de planilha eletrônica. Para fins de comparação, alguns resultados também foram calculados com a ferramenta oferecida no Topspin 3.2 e os resultados se mostraram sempre idênticos ou muito próximos aos obtidos por meio da planilha eletrônica.

3. Resultados e discussão

3.1. Características espectroscópicas dos analitos

A quantificação de um analito requer a seleção de um sinal adequado proveniente do analito de interesse, para integração e obtenção da área do sinal analítico. Sinais do tipo simpleto são preferíveis em função da maior relação sinal-ruído. No entanto, isso nem sempre é possível, uma vez que o sinal do analito de interesse também não pode apresentar sobreposição com sinais provenientes de outros componentes da matriz - ver seção 3.9. Assim, a atribuição inequívoca dos sinais no espectro de RMN de ^1H do analito é fundamental para o desenvolvimento de métodos de quantificação por RMN.

Para garantir a correta atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H , foram realizados experimentos monodimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT135) e bidimensionais (^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC e ^1H - ^1H COSY) de amostras de cocaína na forma cloridrato e dos padrões de benzoilecgonina e de *trans*-cinamoilcocaína. Os espectros dos experimentos de *spiking* dos padrões em amostras reais também foram utilizados para confirmar a identidade dos sinais.

3.1.1. Características espectroscópicas da benzoilmetilecgonina

Apenas a análise do espectro de RMN de ^1H monodimensional não permitiu a completa atribuição dos sinais da molécula de cocaína, sendo necessário recorrer aos espectros bidimensionais ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC (apêndice A) para realizar a atribuição completa dos sinais. O espectro de RMN de ^1H da molécula de cocaína bem como a atribuição dos sinais está apresentado na Figura 8 e resumido na Tabela 4.

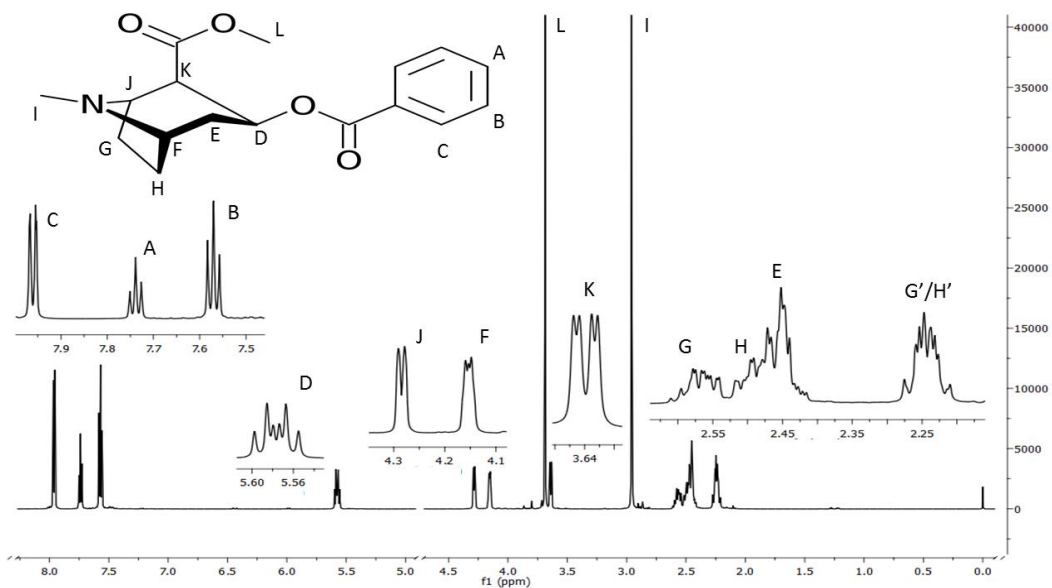


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra RTI (cocaína na forma cloridrato) em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$ à 28°C e respectiva atribuição dos sinais.

Tabela 4. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra de cocaína RTI em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$ à 28°C : deslocamento químico, multiplicidade, constantes de acoplamento e valor aproximado da integral.

Sinal	Deslocamento Químico (ppm)	Multiplicidade	Constantes de acoplamento (J)	Integral
A	7,74	Tripleto	7,9 Hz	1
B	7,57	Tripleto	7,9 Hz	2
C	7,96	Dupleto	7,9 Hz	2
D	5,57	Dupleto de tripletos	11,1 Hz / 7,2 Hz	1
E	2,45	Multipleteo	-	-
F	4,15	Multipleteo	-	1
G	2,57	Multipleteo	-	1
G'/ H'	2,24	Multipleteo	-	2
H	2,48	Multipleteo	-	-
I	2,96	Simpleto	-	3
J	4,28	Dupleto	7,4 Hz	1
K	3,64	Dupleto de dupletos	7,5 Hz / 2,5 Hz	1
L	3,69	Simpleto	-	3

Com base nessa atribuição, o duplete de tripletos em 5,57 ppm foi escolhido para quantificação da cocaína. A análise dos espectros bidimensionais revelou que tanto o par de prótons G quanto o par de prótons H não são quimicamente equivalentes entre si (hidrogênios diastereotópicos), diferenciando-se conforme sua posição (axial ou equatorial).

3.1.2. Características espectroscópicas da benzoilecgonina

A atribuição dos sinais da benzoilecgonina foi feita com base na atribuição já realizada para a molécula de cocaína, uma vez que as duas moléculas se distinguem apenas pela hidrólise do grupo metil éster da cocaína. Apesar da similaridade estrutural, essa reação de hidrólise faz com que o próton K sofra uma alteração de aproximadamente 0,5 ppm em seu deslocamento químico – de 3,64 para 3,17 ppm – e o torna um excelente candidato para quantificação deste analito na presença de cocaína. O espectro de RMN de ^1H da molécula de benzoilecgonina bem como a atribuição dos sinais está apresentado na figura 9.

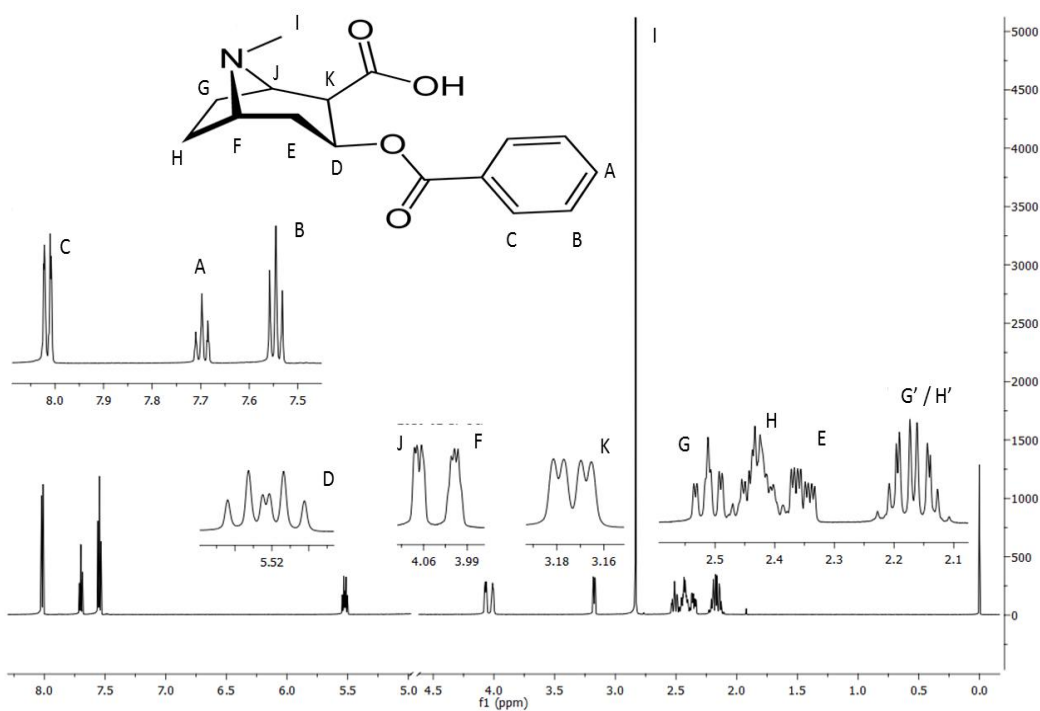


Figura 9 Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do padrão de benzoilecgonina em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$ à 28°C e respectiva atribuição dos sinais na molécula.

3.1.3. Características espectroscópicas da *trans*-cinamoilcocaína e *cis*-cinamoilcocaína

O espectro de RMN de ^1H da molécula de *trans*-cinamoilcocaína bem como a atribuição dos sinais está apresentado na Figura 10. A molécula de *trans*-cinamoilcocaína apresenta perfil espectral similar ao da cocaína, porém com a presença de sinais de hidrogênios olefinicos, referentes aos prótons D e E. Assim, o sinal do próton D (6,54 ppm, duplete, $J = 16,0$ Hz) foi escolhido para quantificação da *trans*-cinamoilcocaína em amostras de cocaína.

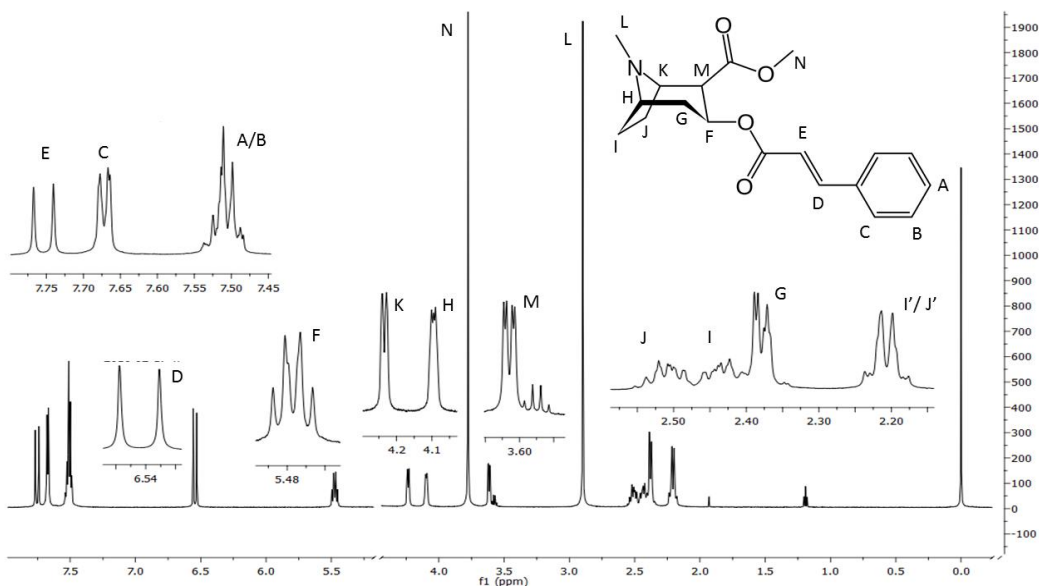


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do padrão de *trans*-cinamoilcocaína em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$ à 28°C e respectiva atribuição dos sinais na molécula.

Para a molécula *cis*-cinamoilcocaína, como já era esperado, alterações no deslocamento químico e na constante de acoplamento foram observadas para os hidrogênios olefinicos D e E, que foram atribuídos aos sinais 5,98 ppm (duplete, $J = 12,4$ Hz) e 7,22 ppm (duplete, $J = 12,4$ Hz), respectivamente. O sinal em 5,98 ppm foi escolhido como sinal analítico para determinação de *cis*-cinamoilcocaína nas amostras.

3.1.4. Características espectroscópicas dos alcalóides da cocaína em solvente DMSO-d_6

As amostras de cocaína na forma base livre foram analisadas em solução de DMSO/TMS por não serem solúveis em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$. O espectro de RMN de ^1H da molécula de cocaína na forma base livre está apresentado na Figura 11.

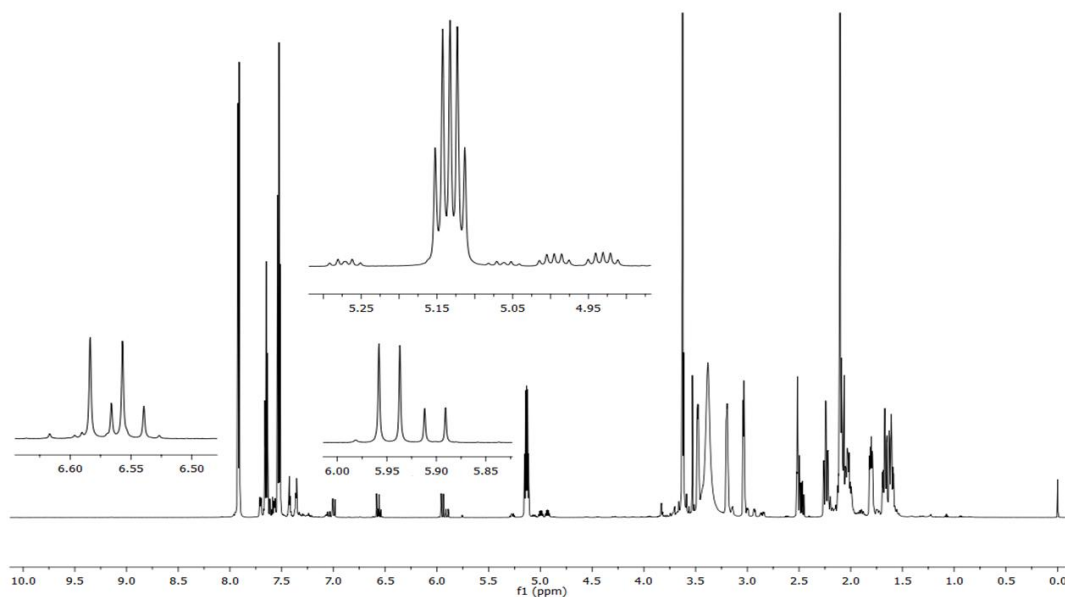


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) de amostra de cocaína base em solução de $\text{DMSO-d}_6/\text{TMS}$ à 28°C .

A mudança de solvente causa um deslocamento significativo de alguns sinais. A atribuição dos sinais foi novamente confirmada com auxílio de experimentos bidimensionais e experimentos de *spike* (benzoilecgonina e *trans*-cinamoilcocaína). A nova configuração do espectro permitiu que os sinais em 5,08 ppm (duplete de tripleto, $J = 11,6$ e $5,9$ Hz); 5,27 ppm (duplete de tripleto, $J = 11,3$ e $6,5$ Hz); 5,95 ppm (duplete, $J = 12,7$ Hz) e 6,58 ppm (duplete, $J = 16$ Hz) sejam utilizados para a quantificação de cocaína, benzoilecgonina, *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína, respectivamente. Devido a sobreposição de sinais em 6,58 ppm, a integração deste sinal foi realizada utilizando apenas o lado esquerdo do duplete e a área encontrada foi multiplicada por 2 para representar a área total do sinal.

3.2. Validação do método de RMNq

A validação de um método consiste em garantir que o método é adequado para a finalidade proposta. Isso geralmente é feito através da verificação das figuras de mérito aplicáveis.

Inicialmente, as figuras de mérito obtidas utilizando soluções de AM e DMS foram utilizadas para verificar a validade do método proposto para determinação de núcleos de hidrogênio não-lábeis de uma maneira geral. Uma vez que resultados satisfatórios foram atingidos, figuras de mérito para o método proposto foram avaliadas utilizando os analitos de interesse, materiais de referência e

amostras de alta pureza. Para algumas figuras de mérito os resultados de validação de um método similar de RMNq utilizando padrão interno³⁷ foram utilizados para fins de comparação.

Para a validação do método RMNq e referência externa (PULCON), foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: exatidão e recuperação, precisão, estabilidade, robustez, incerteza, seletividade e limites de detecção e quantificação.

3.3. Exatidão e recuperação

A exatidão de um método analítico pode ser definida como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio (valor medido) e o valor de referência aceito (valor verdadeiro)³⁶. O critério de aceitação adotado neste trabalho foi baseado na avaliação dos erros relativos, sendo considerados aceitáveis valores inferiores a 10%, valor utilizado pelo Serviço de Perícias de Laboratório (SEPLAB).

Inicialmente, a exatidão do método de RMNq utilizando PULCON foi avaliada com soluções de AM e DMS em 3 níveis de concentração, sendo realizadas 6 repetições para cada nível (Figura 12). Verificou-se um erro relativo menor quando a fração molar de DMS se encontrava próxima a 60%. No entanto, mesmo para relações molares próximas a 10% e 80% foram obtidos valores de erro relativo inferiores a 5% e, portanto, dentro dos valores aceitáveis. Ao se comparar os resultados de exatidão do método com padrão interno³⁷ e PULCON, foi possível constatar que os valores de erro relativo obtidos estão muito próximos.

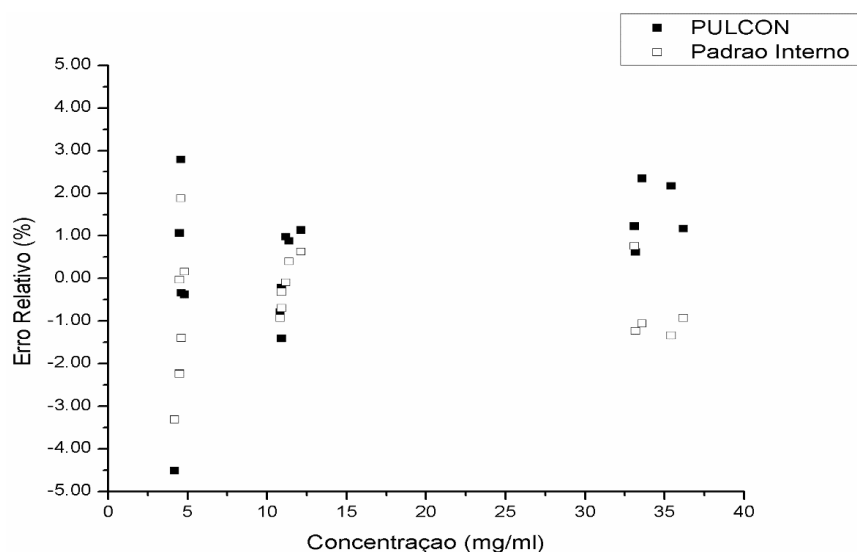


Figura 12. Erro relativo em função da concentração de DMS em solução para os métodos de padrão interno e PULCON.

Para os alcaloides presentes na cocaína, a exatidão do método PULCON foi verificada a partir da análise de um material de referência de cocaína na forma cloridrato (RTI) fornecido pelo órgão *Drug Enforcement Administration* dos Estados Unidos da América. As análises foram realizadas em triplicata e os valores de erro relativo para todos os analitos analisados foram inferiores a 5%, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Resultados do experimento de exatidão para determinação de alcaloides presentes em amostras de cocaína.

Analito	Amostra RTI		Erro relativo (%)
	Pureza média – PULCON (%)	Valor de referência (%)	
cocaína.HCl	80,56	83,40	3,41
cis-cinamoilcocaína.HCl	2,55	2,63	2,92
trans-cinamoilcocaína.HCl	3,17	3,19	0,43

A amostra RTI não apresenta valor de referência para o analito benzoilecgonina. Para este analito foi realizado um ensaio de recuperação utilizando uma amostra controle de cocaína na forma de sal cloridrato (CCS) com baixo teor de benzoilecgonina (aproximadamente 1%). A amostra foi preparada conforme procedimento descrito anteriormente e analisada antes e após a adição de uma alíquota de 50 µL de uma solução de benzoilecgonina em D₂O (aproximadamente 20 mmol/L). Este procedimento também foi utilizado para determinação da recuperação do analito *trans*-cinamoilcocaína. Ambos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Resultados do ensaio de recuperação por fortificação de amostra para os analitos benzoilecgonina e *trans*-cinamoilcocaína.

Analito	Amostra CCS (fortificada)	
	Recuperação (%)	CV (%)
benzoilecgonina.HCl	91,55	8,35
trans-cinamoilcocaína.HCl	98,57	3,00

Para o analito benzoilecgonina observou-se um valor de recuperação ligeiramente baixo, acompanhado de um coeficiente de variação relativamente alto se comparado aos valores obtidos para a *trans*-cinamoilcocaína. Esse resultado pode ser atribuído à baixa relação sinal-ruído obtido

para o sinal da benzoilecgonina e será discutido com a profundidade apropriada na seção de limites de detecção e quantificação (seção 3.6).

3.4. Precisão

A precisão é a maneira de estimar a dispersão dos resultados fornecidos por um método. Neste trabalho foram avaliadas a repetitividade do equipamento e do método e a precisão intermediária com analistas diferentes (2 analistas) e em dias diferentes (2 dias diferentes). Os ensaios com DMS foram realizados utilizando material de referência em solução de D₂O/TSP. Os ensaios para os analitos de cocaína foram realizados com amostra controle na forma de sal cloridrato. O parâmetro verificado foi o coeficiente de variação das medidas sendo que todos os ensaios apresentaram valores inferiores a 5% e, portanto, dentro do valor aceitável. As condições de cada ensaio e o valor do coeficiente de variação se encontram sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Condições do ensaio e coeficientes de variação para ensaios de precisão: repetitividade e precisão intermediária.

PRECISÃO		Analito	Repetições	Concentração alvo do analito (mg/mL)	CV (%)
Repetitividade	Equipamento	DMS	6	11	0,28
	Método	DMS	6	6	0,74
		DMS	6	11	1,06
		DMS	6	28	2,53
		Cocaína.HCl	3	70	0,73
		Benzoilecgonina.HCl	3	0,8	4,39
		<i>cis</i> -Cinamoilcocaína.HCl	3	0,6	2,69
		<i>trans</i> -Cinamoilcocaína.HCl	3	0,8	1,22
Intermediária	Dias diferentes	DMS	3	6	0,37
			3	11	0,40
			3	28	1,52
	Analistas diferentes	DMS	3	6	0,52
			3	11	0,43
			3	28	1,72

3.5. Incerteza

A incerteza do método foi estimada utilizando o método *Bottom-Up*. Esse método consiste na quantificação ou estimativa das fontes de incerteza de todas as medições que compõem o método proposto seguida do cálculo de propagação desses valores para gerar uma incerteza padrão combinada que pode ser atribuída ao método proposto³⁶. Neste trabalho, a incerteza do método foi estimada para o sistema de DMS (analito) e AM (referência) em solução de D₂O/TSP considerando a equação 11. As contribuições que provêm da equação estão ilustradas no diagrama de Ishikawa (Figura 13).

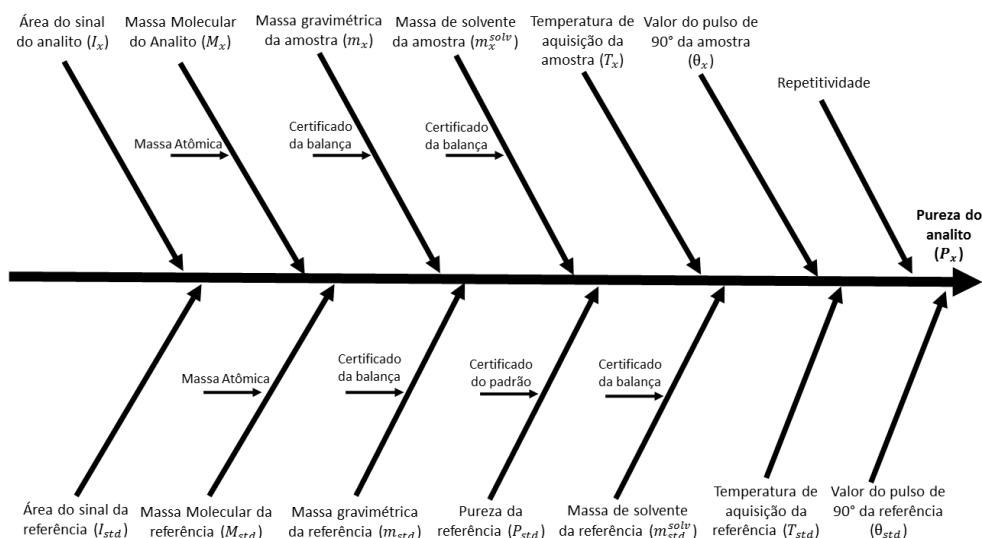


Figura 13. Diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa) para cálculo de incerteza do método de determinação de pureza baseado em RMNq.

O valor de incerteza combinada para determinação de DMS foi calculado e apresentou valor de aproximadamente $4,57 \times 10^{-3}$. Para obter o valor de incerteza expandida para a amostra ($U_{amostra}$) este valor foi multiplicado pelo fator de abrangência k ($k_{95\%}=2$) e pela pureza determinada da amostra (99,64%), resultando em $U = 0,91\%$. Na tabela abaixo, estão sumarizadas as contribuições individuais de cada fonte de incerteza do método. As incertezas foram obtidas com estimativa do Tipo A (análise estatística de medições repetidas feitas durante o processo) ou estimativa do Tipo B (informações fornecidas pelas características do equipamento, certificados de calibração, MRCs, etc).

Tabela 8. Fonte de incerteza, unidade, tipo de estimativa e valor da contribuição individual para a determinação de incerteza do método baseado em RMNq.

Fonte de incerteza	Unidade	Tipo	Contribuição
Massa gravimétrica (referência)	mg	B	3,3165%
Massa gravimétrica (amostra)	mg	B	3,3165%
MM (referência)	g/mol	B	0,0030%
MM (analito)	g/mol	B	0,0115%
Pureza (referência)	-	B	0,9689%
Área do sinal (referência)	-	A	0,9488%
Área do sinal (analito)	-	A	0,9484%
Repetitividade	-	A	90,0641%
Massa de solvente (refência)	mg	B	0,0019%
Massa de solvente (amostra)	mg	B	0,0019%
Temperatura de aquisição (referência)	K	A	0,0016%
Temperatura de aquisição (padrão)	K	A	0,0016%
Valor do pulso de 90° (referência)	μs	A	0,2076%
Valor do pulso de 90° (amostra)	μs	A	0,2076%

Com base nos valores da tabela foi possível verificar que a maior contribuição para incerteza do método está associada a repetitividade (precisão intermediária).

3.6. Limites de detecção e quantificação

Existem na literatura diversas definições e maneiras de se estimar os limites de detecção e quantificação de um método analítico. Neste trabalho adotamos a seguinte definição: limite de quantificação é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável³⁶.

A relação sinal-ruído (S/R) do sinal analítico é o principal aspecto ligado a detectabilidade do analito. Para muitos autores os valores mínimos de relação S/R de 3:1 e 10:1 são considerados aceitáveis para definição dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), respectivamente³⁸. Nesse aspecto, técnicas de RMNq possuem uma característica muito peculiar: a relação S/R de um sinal analítico em um espectro guarda relação com o número de varreduras acumuladas, podendo ser

aumentado com a elevação do tempo de aquisição, conforme a conveniência ou necessidade de cada situação.

Alguns autores relatam a necessidade de se obter uma relação S/R superior a 250:1 para a obtenção de espectros quantitativos em métodos onde se deseja uma incerteza inferior a 1%²⁵. Isso nem sempre é possível ou conveniente, já que o tempo de cada experimento seria proibitivo para implementação do método em análises de rotina. Assim, neste trabalho, buscou-se garantir sempre uma relação S/R superior a 10:1 para os sinais analíticos de interesse. Na tabela abaixo estão sumarizadas as relações S/R mínimas para os sinais utilizados na quantificação das amostras reais analisadas neste trabalho.

Tabela 9. Amostra, analito, teor determinado do analito na amostra, coeficiente de variação e relação S/R mínima do sinal analítico para amostras reais.

Amostra	Analito	Teor do analito na amostra (%)	CV (%)	Relação S/R (mín)
COC152-14-MS	Cocaína.HCl	67,29	2,08	3043
COC152-14-MS	Benzoilecgonina.HCl	0,16	4,45	10
COC215-15-AM	Cis-cinamoilcocaína.HCl	0,91	0,25	160
COC152-14-MS	Trans-cinamoilcocaína.HCl	0,65	2,73	101
COC107-12-AC	Cocaína	71,60	0,08	2500
COC1214-13-PR	Benzoilecgonina	0,87	3,26	46
COC567-13-AC	Cis-cinamoilcocaína	0,60	5,71	50
COC107-12-AC	Trans-cinamoilcocaína	0,33	3,27	38

As menores relações S/R foram verificadas para o analito benzoilecgonina nas amostras de cocaína na forma de cloridrato. Dois fenômenos explicam essa observação: os teores de benzoilecgonina, produto de hidrólise da cocaína, são relativamente baixos nesse tipo de amostra por estas serem naturalmente mais estáveis que amostras de cocaína na forma base livre. Além disso, a multiplicidade do sinal analítico da benzoilecgonina (duplete de dupletos) contribui para diminuição da intensidade do sinal analítico já que o sinal do próton se apresenta dividido em quatro estados energéticos distintos com proporção 1:1:1:1.

Uma maneira de se estimar valores aproximados para LQ e LD consiste em utilizar a equação 3. Para minimizar os efeitos que uma baixa relação sinal-ruído possa ter na incerteza do método, valores de S/R de 30 e 10 foram definidos como limites para se obter uma estimativa segura dos

valores de LQ e LD, respectivamente. Para as amostras de cloridrato de cocaína os valores de LQ foram 0,67%, 0,20%, 0,19% e LD 0,22%, 0,06%, 0,06% para cocaína, *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína, respectivamente. Para as amostras na forma de base livre, foram estimados valores de LQ de 0,53%, 0,25%, 0,33% e LD de 0,18%, 0,08%, 0,11% para cocaína, *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína, respectivamente.

No entanto, considerando que a largura de linha dos sinais depende muito da homogeneidade do campo magnético e que ajustes de *shimming* não são um parâmetro facilmente reproduzível em experimentos de RMN, vale ressaltar que analistas deveriam sempre verificar (e reportar) o valor de S/R dos sinais de interesse em análise de RMNq para garantir que o método está trabalhando dentro de limites validados ou aceitáveis.

3.7. Estabilidade

Além da estabilidade química em solução tanto das substâncias analisadas quanto daquelas utilizadas como referência, outro fator que pode afetar a estabilidade de métodos de RMNq utilizando PULCON refere-se à evaporação do solvente, uma vez que, ao contrário de métodos utilizando padrão interno, o volume final de solução deve ser controlado já que analito e padrão encontram-se em soluções distintas.

Para amostras de cocaína a estabilidade do método foi demonstrada utilizando uma amostra controle de cocaína na forma sal (CCS). A amostra foi analisada em triplicata 16 horas após o preparo da solução, acondicionada no próprio tubo de RMN (ambiente escuro, 22°C) e analisada novamente após 24 horas (40h após o preparo).

Tabela 10. Resultados do experimento de estabilidade para amostra controle de cocaína da forma de cloridrato.

Analito	Amostra CCS		
	Pureza 16h (%)	Pureza 40h (%)	Erro relativo (%)
cocaína.HCl	92,14	92,08	0,06
<i>cis</i> -cinamoilcocaína.HCl	0,81	0,81	0,00
<i>trans</i> -cinamoilcocaína.HCl	1,06	1,06	-0,24
benzoilecgonina.HCl	1,02	1,04	-2,25

Foram observados valores de erro relativo tipicamente baixos, o que denota que não há degradação significativa dos alcaloides analisados dentro do período estudado. Vale ressaltar que o intervalo curto (apenas 24 horas) foi escolhido em razão da preocupação em relação a possibilidade de hidrólise de grupos éster em meio aquoso. Esse mecanismo de degradação já foi descrito na literatura e é responsável, por exemplo, pela degradação da cocaína (produzindo benzoilecgonina e metanol) e da benzoilecgonina (produzindo ácido benzoico e ecgonina).

3.8. Robustez

A robustez do método foi avaliada utilizando um planejamento fracionário saturado. Esse procedimento permite investigar uma grande quantidade de fatores utilizando um número reduzido de experimentos^{39, 40}. Devido ao grande número de variáveis a serem estudadas, optou-se por realizar um planejamento fracionário saturado para estudar os 7 fatores em 2 níveis (planejamento 2^{7-4}_{III}). Além disso, o conhecimento prévio sobre o sistema apontava como improvável a existência de fatores binários significativos. Na tabela abaixo estão sumarizados os fatores estudados.

Tabela 11. Fatores a serem estudados e seus respectivos níveis.

	Fatores	-1	1
1	Número de scans (NS)	8	16
2	Ganho do detector (RG)	16	32
3	Temperatura de aquisição (Temp)	30	28
4	Qualidade dos tubos (Tb)	Economy	Standard
5	Software de processamento (S)	Topspin	ACD
6	Critério de integração (CInt)	64xFWHH	Manual
7	Função Line Broadening (LB)	0,3 Hz	0 Hz

Para o estudo da robustez optou-se por utilizar o sistema de soluções controle contendo DMS e AM em solução de D₂O/TSP, onde o DMS foi utilizado como referência externa e o AM como o analito. O objetivo desse procedimento foi verificar se a mudança de alguma das variáveis dentro dos níveis estudados provoca uma alteração significativa na resposta fornecida pelo procedimento de determinação envolvendo PULCON. O resultado de valores dos contrastes para os fatores estudados no planejamento fatorial 2⁷⁻⁴_{III} estão apresentados na *Figura 14*.

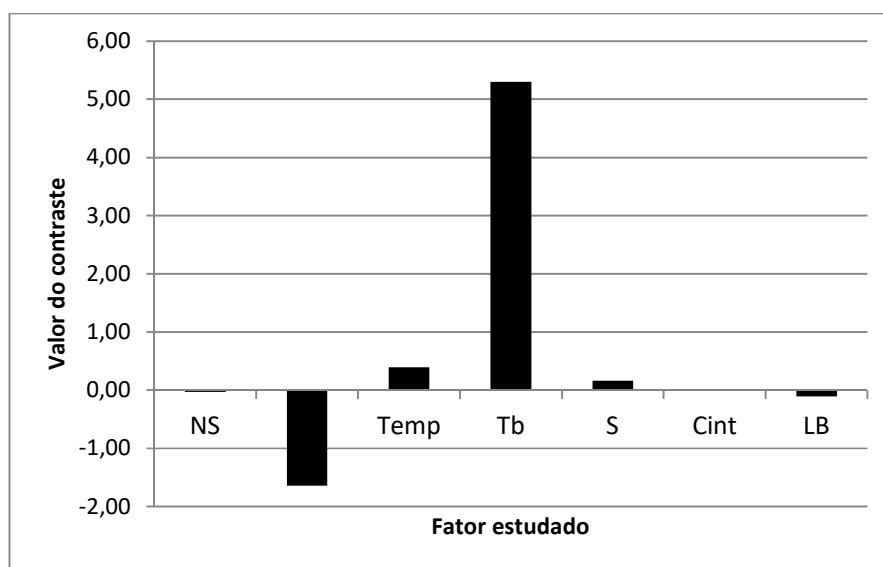


Figura 14. Valor dos contrastes para os fatores estudados no planejamento fatorial 27-4III.

O intervalo de confiança para os contrastes foi calculado e apresentou valor de 3,92 com 95% de confiança. Foi possível verificar que apenas a qualidade dos tubos utilizados pode ser considerada

significativa. Na literatura, já há relatos de que diferenças no diâmetro interno dos tubos podem ter efeitos significativos em métodos de RMNq utilizando referência externa²⁷. Assim, todas as determinações neste trabalho foram realizadas com um conjunto de tubos de qualidade superior e de um mesmo lote. Os valores de contraste para os outros fatores foram inferiores ao valor crítico determinado pelo intervalo de confiança. Curiosamente, os resultados de um ensaio semelhante de robustez para o método com utilização do padrão interno mostram que a resposta do método não é influenciada pela variação de nenhum dos fatores escolhidos dentro dos níveis estudados³⁴.

3.9. Seletividade

Um método pode ser chamado seletivo se, apesar de produzir resposta para analitos diversos, possui a capacidade de distinguir a resposta de um analito de outros³⁶. Por não se encontrar hifenada com métodos de separação (raramente encontramos disponíveis equipamentos de CLAE-RMN), em geral, a seletividade de métodos de RMNq se dá pela garantia de que não existem sinais de interferentes próximos ou sobrepostos aos sinais de interesse na delimitação do intervalo de integração. Neste trabalho, a seletividade do método foi verificada de duas maneiras: (I) análise dos espectros de materiais de referência dos componentes da matriz (principais diluentes e adulterantes) separadamente e na presença do analito de interesse e (II) análise de amostras reais contendo possíveis interferentes na presença do analito de interesse, sendo este último a maneira tradicionalmente aceita para assegurar a seletividade em métodos de referência.

A comparação dos espectros de RMN de ¹H obtidos para avaliação da seletividade das análises de cocaína está apresentada na *Figura 15*. Foi possível verificar que, no caso da cocaína, também não existe sobreposição de sinais dos possíveis interferentes com os sinais utilizados na quantificação dos analitos de interesse, descritos na seção 3.1. Porém, devido à complexidade da matriz da amostra estudada, dificilmente se encontraria uma substância adequada para utilização como padrão interno, ressaltando a importância do desenvolvimento de metodologias que empregam a utilização de referência externa.

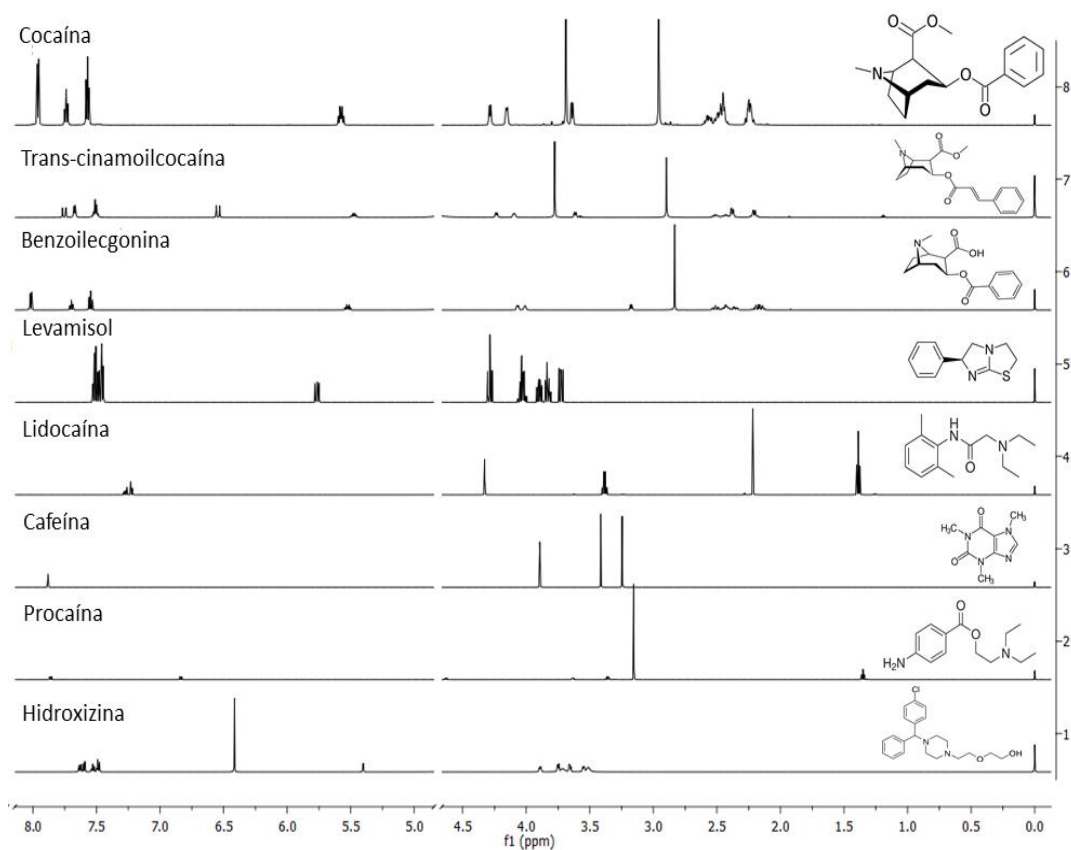


Figura 15. Espectro da amostra de cocaína na forma cloridrato e dos principais interferentes encontrados nas amostras.

3.10. Amostras de cocaína

A análise das amostras de cocaína foi realizada em triplicata tanto pela metodologia tradicional (CG-DIC) quanto pelo método de RMNq proposto. Foram determinados os analitos benzoilmetilecgonina (cocaína), benzoilecgonina, *cis*-cinamoilcocaína e *trans*-cinamoilcocaína. Todos os resultados estão expressos em pureza (teor) do analito no material. Os gráficos expressam a pureza do analito no material determinada por RMNq (PULCON) *versus* pureza do analito determinada por GC-DIC e foram ajustados utilizando o método regressão linear (Figura 16 a Figura 23). Os dados brutos estão apresentados no apêndice B.

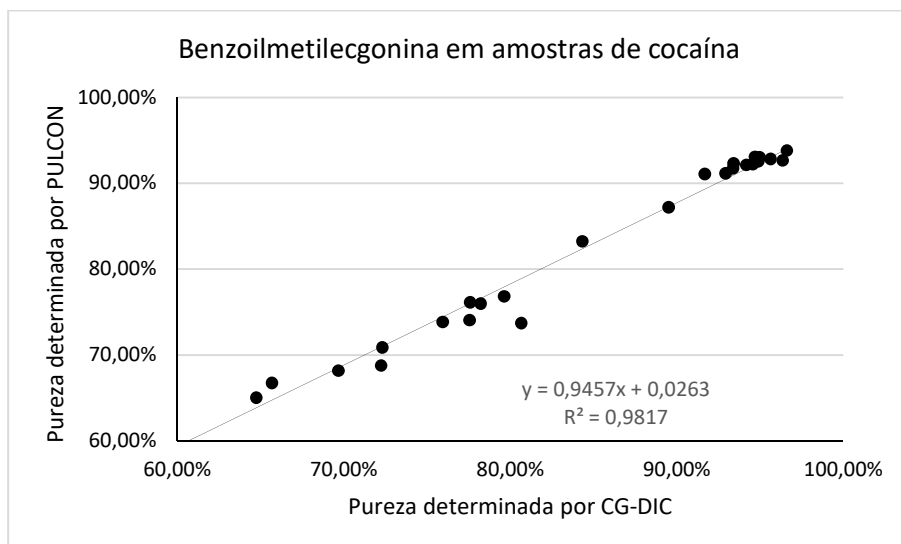


Figura 16. Gráfico da pureza de cocaína determinada por RMNq (PULCON) *versus* pureza de cocaína determinada por CG-DIC para 26 amostras de cocaína apreendidas.

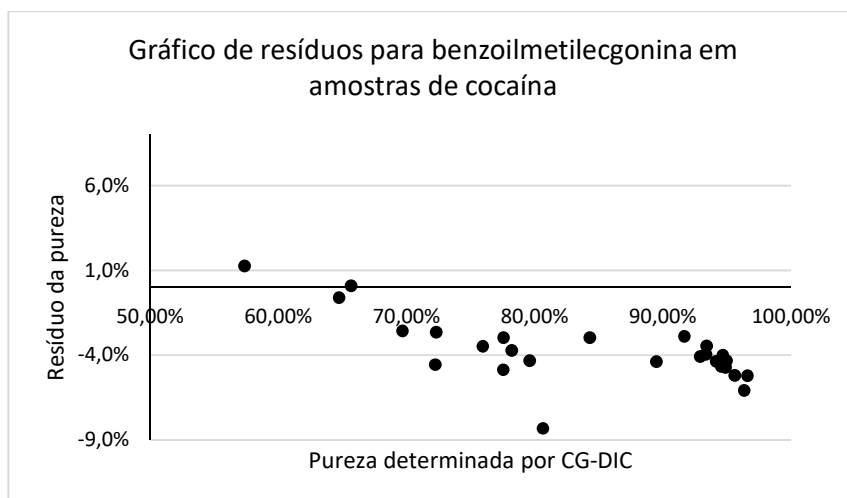


Figura 17. Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de cocaína em amostras apreendidas.

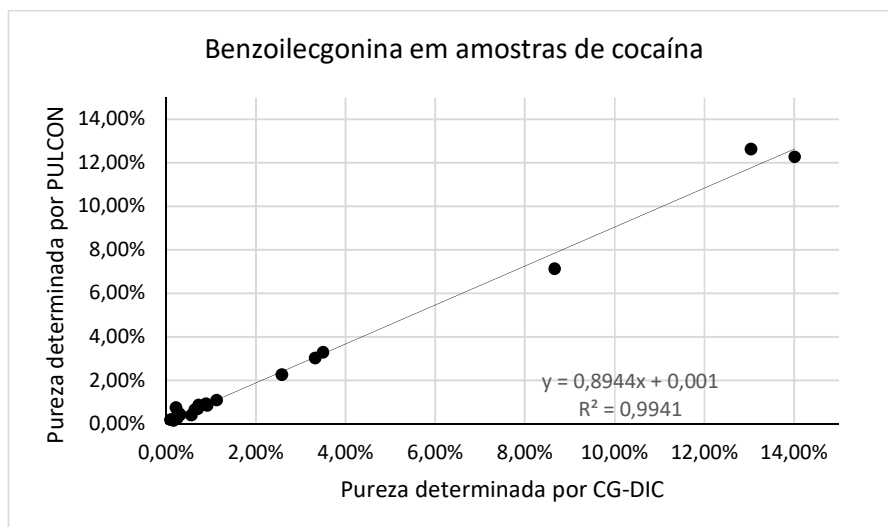


Figura 18. Gráfico da pureza de benzoilecgonina determinada por RMNq (PULCON) *versus* pureza de benzoilecgonina determinada por CG-DIC para 24 amostras apreendidas de cocaína.

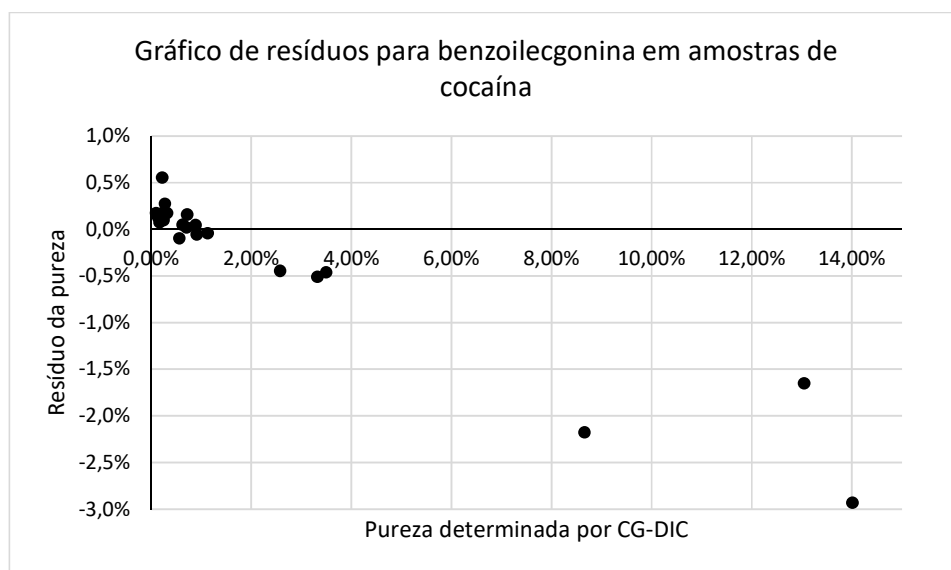


Figura 19. Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de benzoilecgonina em amostras apreendidas.

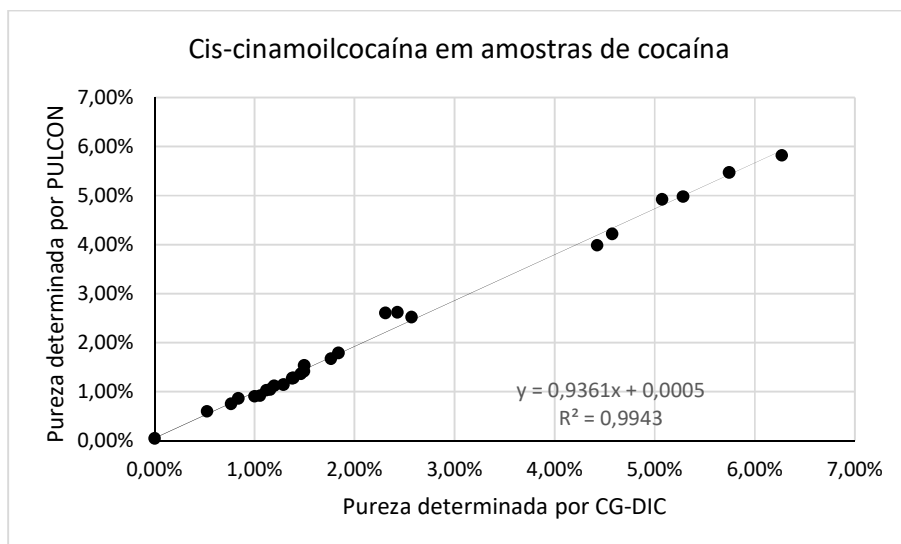


Figura 20. Gráfico da pureza de *cis*-cinamoilcofaína determinada por RMNq (PULCON) *versus* pureza de *cis*-cinamoilcofaína determinada por CG-DIC para 26 amostras reais de cocaína.

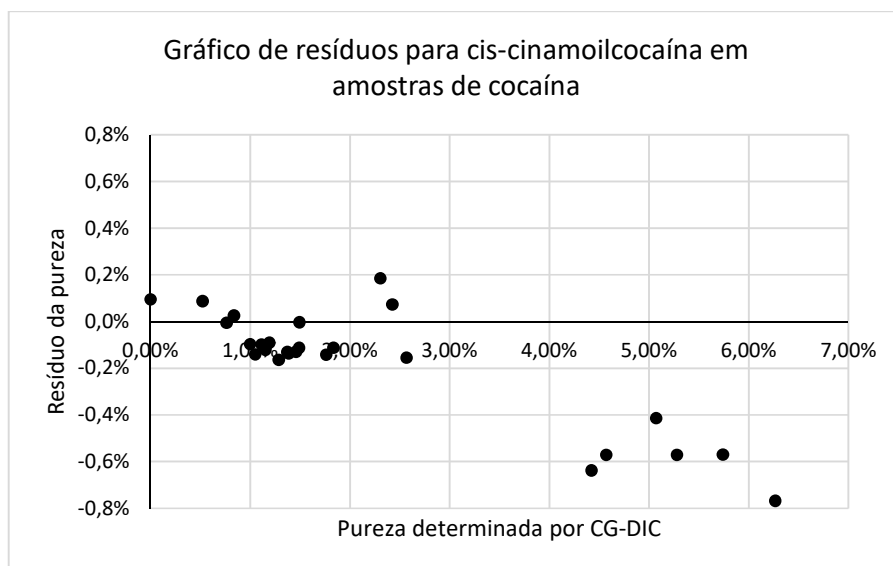


Figura 21 Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de *cis*-cinamoilcofaína em amostras apreendidas.

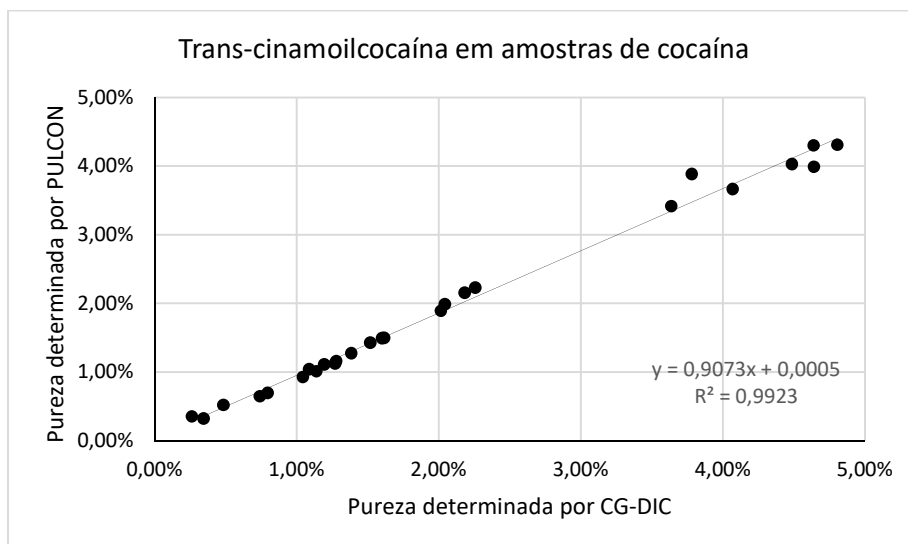


Figura 22. Gráfico da pureza de *trans*-cinamoilcocaína determinada por RMNq (PULCON) versus pureza de *trans*-cinamoilcocaína determinada por CG-DIC para 26 amostras reais de cocaína.

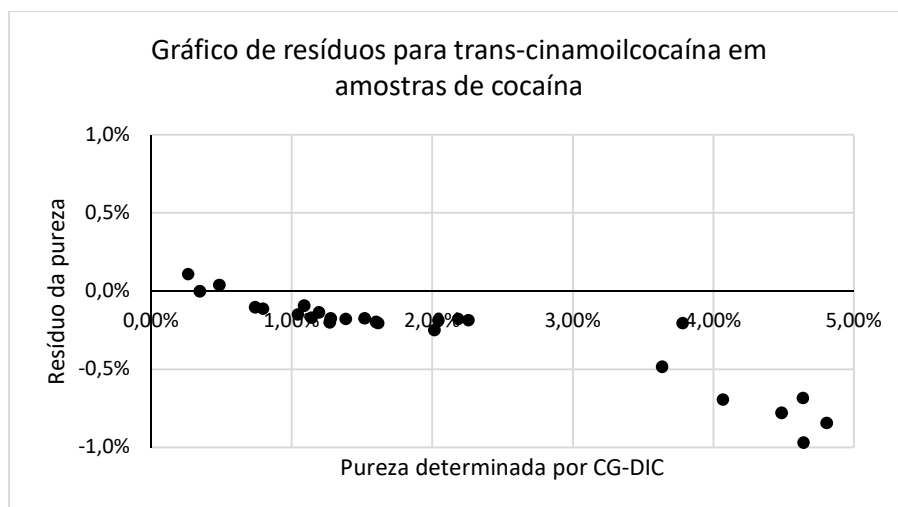


Figura 23. Gráfico de resíduos da regressão ajustada para comparação dos métodos aplicados à determinação de *trans*-cinamoilcocaína em amostras apreendidas.

Todos os analitos apresentaram uma boa correlação entre os métodos. Os gráficos de resíduo mostram que existe uma tendência de valores ligeiramente subestimados à medida que a pureza aumenta pelo método de RMNq em relação aos métodos cromatográficos.

Para a benzoilmetilecgonina (Figuras 16 e 17) o maior valor de resíduo encontrado foi de -8,32% para a amostra COC-259-MS-2011. Nesta amostra foi encontrada a maior diferença entre as médias de pureza determinada por CG-DIC (80,64%) e pureza determinada por RMNq (73,69%). Os

teores de benzoilmetilecgonina nas amostras variaram de 65,03% a 76,81% (média 71,14%) para amostras de cocaína na forma de base livre e de 66,74% a 93,83% (média 89,72%) para as amostras de cloridrato de cocaína. Os coeficientes de variação para os valores médios de teor de cocaína das amostras ficaram entre 0,13% e 6,15%, com um valor médio de 1,19%, para as determinações por RMNq.

A benzoilecgonina (Figuras 18 e 19) apresentou valores variando de 0,87% a 12,63% para amostras na forma de base livre e de 0,16% a 0,93% para amostras na forma de cloridrato de cocaína. Os valores de RSD variaram de 0,4% a 18,9% com valor médio de 5,3%. Esse analito apresentou os maiores valores relativos de resíduo, especialmente de amostras na forma cloridrato de cocaína, cujos teores de benzoilecgonina são tipicamente menores, com valores inferiores a 1%. Vale ressaltar que, dentro dos parâmetros escolhidos, a relação sinal-ruído para este analito apesar de estar acima do valor mínimo aceitável, ficou muito próxima a este limite, o que pode explicar essa discrepância dos resultados.

Para a *cis*-cinamoilcocaína (Figuras 20 e 21), as amostras apresentaram teor determinado por RMNq variando de 0,60% a 5,82% (média 3,35%) para cocaína na forma base livre e de 0,92% a 2,52% (média 1,27%) para cloridrato de cocaína. Os valores de CV para a determinação por RMNq variaram de 0,17% a 5,71% com um valor médio de 1,50%. Vale ressaltar que uma amostra de cloridrato de cocaína não apresentou *cis*-cinamoilcocaína detectável em sua composição, tanto pelo método de RMNq quanto pelo método de referência (CG-DIC).

Os resultados para *trans*-cinamoilcocaína (Figuras 22 e 23) foram similares aos do isômero *cis*, com pureza determinada por RMNq variando de 0,33% a 4,31% (média 2,79%) para cocaína na forma de base livre e de 0,65% a 2,23% (média 1,32%) para amostras de cloridrato de cocaína. Os valores de CV variaram de 0,11% a 6,65% com um valor médio de 1,60%.

Tanto para a determinação de *cis*-cinamoilcocaína quanto de *trans*-cinamoilcocaína foi possível verificar uma excelente correlação entre os métodos, evidenciada pelo excelente valor de R^2 obtido nas regressões lineares. No caso da *cis* e da *trans*-cinamoilcocaína o maior valor de resíduo foi observado para amostra COC299-AM-2015. Nesta amostra a média das determinações de *trans*-cinamoilcocaína por CG-DIC (4,64%) e por RMNq (3,99%) apresentou diferença de 0,65%. Para a *cis*-cinamoilcocaína a diferença entre CG-DIC (6,27%) e RMNq (5,82%) foi ainda menor: 0,45% (menos de 8% em termos relativos).

O grau de oxidação das amostras foi estimado tanto com os resultados obtidos pelo método de referência (CG-DIC) quanto com os resultados obtidos pelo método proposto (RMNq), sem diferenças de classificação para o conjunto de amostras analisadas (Figura 24, Tabela 12). Das amostras de cloridrato de cocaína analisadas, 15 apresentaram um grau de oxidação médio e apenas 1 amostra apresentou um alto grau de oxidação. As amostras de cocaína na forma de base livre apresentaram um baixo grau de oxidação (8 amostras) ou um alto grau de oxidação (3 amostras). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos focados na análise de apreensões realizadas pela Polícia Federal¹⁸.

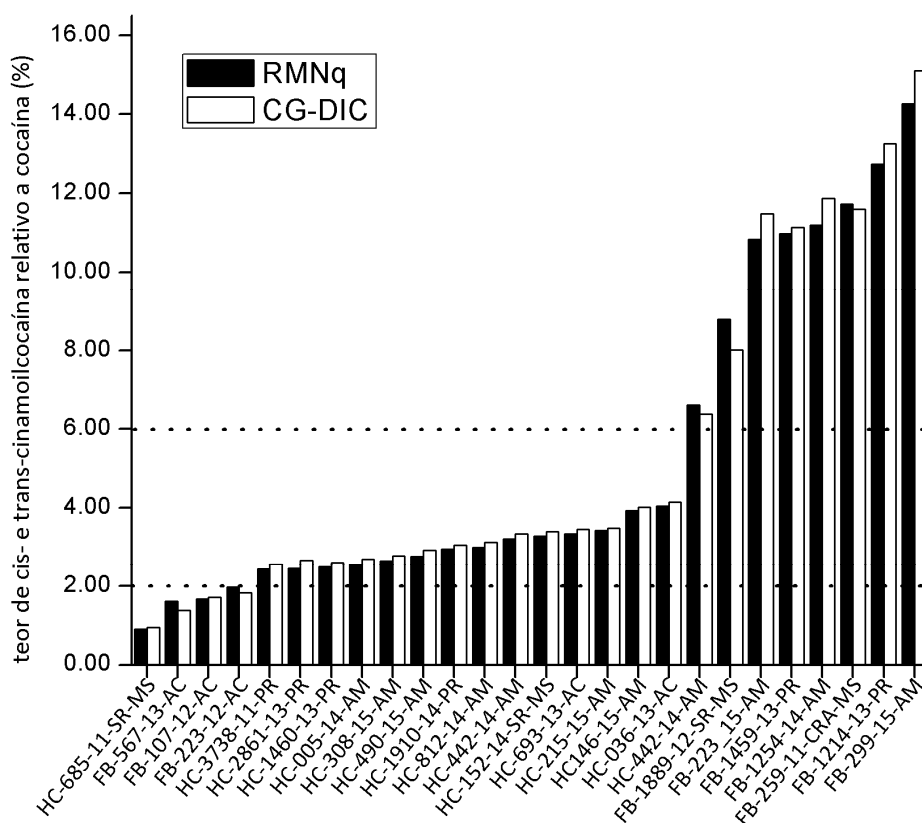


Figura 24 Grau de oxidação determinado por RMNq e CG-DIC para amostras de cloridrato de cocaína (HC) e cocaína base (FB).

Tabela 12. Teor de cis e trans-cinamoilcocaína em relação a cocaína e grau de oxidação da amostra determinados com base nos resultados de GC-DIC e RMNq.

Amostra	RMNq		CG-DIC	
	Teor relativo de cis e trans-cinamoilcocaína	Grau de oxidação	Teor relativo de cis e trans-cinamoilcocaína	Grau de oxidação
COC146_15-AM	3,93%	Médio	4,01%	Médio
COC215_15-AM	3,42%	Médio	3,49%	Médio
COC308_15-AM	2,64%	Médio	2,77%	Médio
COC490_15-AM	2,76%	Médio	2,92%	Médio
COC005_14-AM	2,54%	Médio	2,69%	Médio
COC442_14-AM	3,20%	Médio	3,34%	Médio
COC812_14-AM	2,99%	Médio	3,13%	Médio
COC1460_13-PR	2,49%	Médio	2,60%	Médio
COC1910_14-PR	2,95%	Médio	3,05%	Médio
COC2861_13-PR	2,45%	Médio	2,66%	Médio
COC3738_11-PR	2,42%	Médio	2,56%	Médio
COC036_13-AC	4,04%	Médio	4,14%	Médio
COC152_14-SR-MS	3,28%	Médio	3,40%	Médio
COC685_11-SR-MS	0,90%	Alto	0,95%	Alto
COC693_13-AC	3,34%	Médio	3,46%	Médio
COC107_12-AC	1,66%	Alto	1,72%	Alto
COC1214_13-PR	12,74%	Baixo	13,25%	Baixo

COC1254_14-AM	11,20%	Baixo	11,87%	Baixo
COC223_12-AC	1,96%	Alto	1,83%	Alto
COC567_13-AC	1,61%	Alto	1,37%	Alto
COC1459_13-PR	10,98%	Baixo	11,14%	Baixo
COC1889_12-SR-MS	8,79%	Baixo	8,01%	Baixo
COC259_11-CRA-MS	11,73%	Baixo	11,60%	Baixo
COC442_14-AM	6,61%	Baixo	6,38%	Baixo
COC223_15-AM	10,83%	Baixo	11,49%	Baixo
COC299_15-AM	14,26%	Baixo	15,10%	Baixo

4. Conclusões

O presente trabalho descreveu, pela primeira vez, o desenvolvimento e a validação de um método de RMNq de ^1H utilizando referência externa para amostras ilícitas. A análise das figuras de mérito descritas (exatidão, recuperação, precisão, incerteza, limites de detecção e quantificação, estabilidade, robustez e seletividade) demonstrou que o método proposto apresenta resultados satisfatórios quando comparado ao método de referência – CG-DIC – para determinação dos principais alcaloides presentes em amostras de cocaína na forma de cloridrato e de base livre, com um tempo de análise reduzido e um preparo de amostra extremamente simples, envolvendo apenas a pesagem e dissolução da amostra no solvente apropriado.

O método de RMNq ofereceu algumas vantagens que podem ser destacadas: (i) eliminou a possibilidade de sobreposição de sinais do padrão com sinais do analito ou da matriz e permite que uma grande variedade de substâncias (ou mais de uma se desejável) sejam utilizadas como referência para diferentes analitos; (ii) eliminou a possibilidade de interações indesejadas entre a substância usada como referência e o analito ou componentes da matriz; e (iii) pode ser realizada com uma pequena quantidade das substâncias utilizadas como padrão, o que reduz drasticamente o custo de cada análise.

Assim, o método proposto se apresenta como uma excelente alternativa para determinação de moléculas orgânicas em solução sem a necessidade de um padrão que contenha o analito de interesse. Isso torna a técnica extremamente atraente para o ramo da química forense, uma vez que a dificuldade e o alto custo envolvido na aquisição de materiais de referência adequados representam um grande empecilho para os analistas da área. Apesar de não ser uma técnica diretamente acessível para maior parte dos laboratórios das forças policiais, existe um grande potencial para que os centros de RMN das universidades desenvolvam parcerias para a prestação desse serviço, gerando benefícios e economia para ambas as partes.

Capítulo 2. Desenvolvimento e aplicação de modelo de análise de componentes principais (PCA) em amostras de cloridrato de cocaína apreendidas utilizando dados de RMN de

¹H

1. Introdução

A utilização de informações/dados de Ressonância Magnética Nuclear visando a classificação e/ou a determinação de origem de amostras já é bem descrita na literatura para resolução dos mais diversos problemas. Desde abordagens mais complexas, por exemplo, a utilização da razão isotópica de ¹³C e ²H em sítios específicos de uma molécula de etanol⁴¹ ou efedrina⁴², até a análise multivariada do conjunto de sinais presentes no espectro de hidrogênio de amostras mais complexas, como bebidas^{3, 43} e tomates¹⁰.

A tentativa de determinar a origem e a correlação de apreensões de cocaína através do perfil químico de amostras constitui um grande desafio para a química forense há pelo menos duas décadas. A principal finalidade de um método capaz de determinar o perfil químico de amostras de cocaína é auxiliar forças policiais e judiciárias, tanto no sentido de investigação quanto de geração de evidências ou provas. Assim, houve grande esforço no sentido de determinar quais seriam as características discriminantes de apreensões: informações acerca de alcaloides minoritários⁴⁴, especialmente trimetoxicocaina, tropacocaina e truxilinas¹⁷, passando pela presença de solventes residuais^{45, 46} resultantes do processo de extração/refino, e até mesmo medidas da razão isotópica de elementos leves (C, H, N, O) já foram utilizados com esta finalidade^{21, 47}, envolvendo tanto a análise de amostras apreendidas quanto de folhas de *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novogranatense*.

Em uma tentativa de otimizar e harmonizar procedimentos para a determinação do perfil químico de amostras de cocaína em diferentes laboratórios, Locicero et al. apresentaram um procedimento para determinação simultânea de adulterantes e de alcaloides de interesse presentes tanto nas folhas de coca quanto originários do processo de refino (Figura 25) por CG-DIC⁴⁴. Na sequência deste trabalho⁴⁸, o autor destaca a importância do pré-tratamento (normalização e autoescalamento) para o funcionamento adequado da análise discriminante com os dados de GC-DIC.

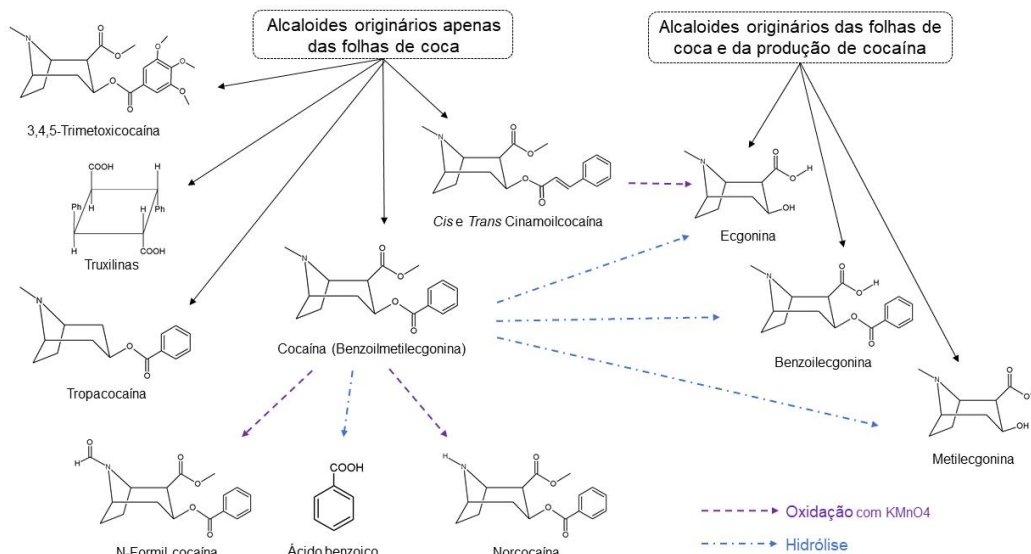


Figura 25. Origem dos principais alcalóides e compostos de interesse presentes em amostras de cocaína⁴³.

Nos Estados Unidos, Mallette et al. já demonstrou que, com uma amostragem adequada, é possível combinar a análise de alcalóides minoritários e análise de isótopos estáveis para diferenciar 19 regiões produtoras de cocaína espalhadas pelos países produtores na América do Sul²¹. Apesar de aplicada com sucesso, esta abordagem demonstrou ser, de acordo com os próprios autores, extremamente trabalhosa, já que tanto a análise de isótopos estáveis por Espectrometria de Massa de Razão Isotópica (EMRI) quanto a determinação de alcalóides minoritários de interesse em CG-DIC ou CG-DCE envolvem inúmeras etapas de preparo e derivatização das amostras.

A presença de solventes residuais decorrentes do processo de extração e refino das amostras, especialmente no caso de amostras na forma de cloridrato de cocaína, também podem ser considerados como importantes marcadores no que diz respeito à origem ou correlação de amostras apreendidas. Há pelo menos duas décadas, Cartier et. al. já haviam identificado mais de 16 solventes diferentes em um conjunto de 54 amostras distintas apreendidas na Suíça⁴⁵. Já no Brasil, Zacca et. al.⁴⁶ descreveram um novo método de classificação não-supervisionado baseado em análise quimiométrica. Neste trabalho, dados de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas utilizando *headspace* (HS-GC-MS) de mais de 250 amostras reais de cloridrato de cocaína apreendidas pela Polícia Federal foram utilizados para demonstrar a capacidade de correlacionar amostras distintas sem a necessidade de informação prévia a respeito das amostras.

Mais recentemente, foi realizada a quantificação de alcalóides minoritários por GC-DIC para mais de uma centena de amostras apreendidas no Brasil pela Polícia Federal⁴⁹. O autor analisou tanto

amostras de cocaína na forma base livre quanto na forma cloridrato, determinando, além da benzoilmetilecgonina (cocaína), 13 alcaloides minoritários: anidroecgonina metil éster, anidroecgonina, metilecgonina, tropacocaína, norcocaína, N-formilcocaína, trimetoxicocaína, ecgonina, benzoilecgonina, cis-cinamoilcocaína, trans-cinamoilcocaína, cis-cinamoilecgonina e trans-cinamoilecgonina. Neste trabalho, a análise dos dados através de modelos PCA e HCA revelou que um resultado mais coerente é obtido quando dados de concentração dos alcaloides minoritários são normalizados em relação aos seus produtos de hidrólise e ao teor de cocaína presente nas amostras.

A utilização de RMN combinada à métodos de análise estatística multivariada para classificação de amostras de cocaína já foi aplicada com sucesso para um conjunto de 54 amostras apreendidas na região de Nápoles, Itália, no ano de 2006. Pagano et al.⁵⁰ apresentaram uma abordagem que consistia em utilizar dados do espectro de RMN de ¹H de amostras apreendidas e análises quimiométricas para classifica-las pelo período (trimestre) e pela região onde ocorreu a apreensão. Nesse trabalho, foram excluídas da análise as regiões do espectro referentes a sinais de adulterantes, do solvente utilizado (CD₃OD) e do TMS, utilizando-se um dos sinais da cocaína (7,65 ppm, tripleto) como referência para as integrais. Além disso, as regiões responsáveis pela classificação das amostras são identificadas: 0,86-0,96; 1,50-1,56; 5,90-5,93; 6,48-6,52; 7,31-7,34; 7,61-7,63; 7,68-7,72 ppm. Alguns dos sinais presentes nessas regiões foram atribuídos a alcaloides minoritários presentes na cocaína, como é o caso da tropacocaína (7,32 ppm), da cis-cinamoilcocaína (7,62 e 5,91 ppm) e trans-cinamoilcocaína (6,50 ppm). Os sinais em 0,90; 0,93 e 0,95 ppm foram reconhecidos como relevantes para classificação, porém não foram identificados.

Tendo em vista o que foi exposto acima, o objetivo deste trabalho é de analisar um conjunto de amostras de cloridrato de cocaína apreendidas pela Polícia Federal, coletando espectros de RMN de ¹H para, com a aplicação de ferramentas de análise estatística multivariada, verificar o desempenho desta técnica na análise exploratória de apreensões de cocaína no Brasil.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras de cocaína

Foram selecionadas 77 amostras de cocaína não-adulteradas na forma de cloridrato. As amostras de cocaína foram escolhidas dentro de um conjunto de amostras apreendidas entre os anos de 2014 e 2017 nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em almofariz e pistilo de porcelana com

auxílio de Nitrogênio líquido e o pó resultante foi armazenado em tubos plásticos guardados em dessecador para serem analisadas posteriormente por RMN.

2.2. Preparo de amostras

Foram pesados aproximadamente 40 mg ($\pm 0,01$ mg) em *eppendorfs* utilizando uma balança XP205 da Mettler Toledo. Aos *eppendorfs* foram adicionados 550 μ L de solução D₂O/TSP. As amostras foram colocadas em banho ultrassônico por aproximadamente 1 minuto para garantir completa dissolução do material. As soluções foram transferidas para tubos Norell Standard Series™ 600 MHz de 5 mm. Todas as amostras foram preparadas no laboratório SEPLAB do Instituto Nacional de Criminalística sob a supervisão do perito Adriano O. Maldaner.

2.3. Obtenção e processamento dos espectros de RMN

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III HD 600 MHz equipado com sonda do tipo *Broadband Observe* (BBFO) 5 mm, situado no Laboratório de RMN, no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília. Além dos procedimentos usuais de *lock* e *shimming*, antes de cada aquisição, a sonda foi cuidadosamente sintonizada manualmente e o pulso de 90° (P90) calibrado automaticamente (comando *pulsecal*). Para evitar a presença de artefatos do tipo *sidebands* e diminuir a possibilidade de sobreposição de sinais, os espectros foram obtidos com o *spinner* desligado e com desacoplamento de ¹³C durante a etapa de aquisição do espectro (sequência *zgig30*). Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros foram escolhidos de modo a garantir a obtenção de um espectro quantitativo e estão sumarizados na tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros de aquisição utilizados na obtenção dos espectros de RMN.

Parâmetro	Símbolos (Bruker)	Valor
Pontos complexos do espectro	TD	64k
Largura da janela espectral	SW	20 ppm
Centro da janela espectral	O1	6 ppm
Tempo de espera entre cada transiente	D1	4 s
<i>Dummy scans</i>	DS	16
Número de transientes	NS	256
Ganho do detector	RG	32
Modo de digitalização	DIGMOD	baseopt
<i>Pre-scan delay</i>	DE	10 us

Correção do filtro	FILCOR	1,5 us
Tempo total de experimento	expt	~30 min

Os espectros foram processados com o software TopSpin 3.2. Uma função exponencial do tipo *line broadening* (LB = 0,15 Hz) foi aplicada previamente à transformada de Fourier com aproximadamente 64 mil pontos (SI = 64 k), ou seja, com preenchimento com zeros (*Zero filling*). Ajustou-se automaticamente o parâmetro de fase de ordem zero (comando *apk0*) e a linha de base com função polinomial de quinta ordem. Ajustes manuais de fase e linha de base foram feitos quando necessário e os espectros foram referenciados em relação ao sinal do TSP (0 ppm). Os espectros foram integrados manualmente, selecionando 80 regiões correspondentes a possíveis componentes minoritários ou impurezas remanescentes do processo de extração e refino das amostras (tabela 14). Os valores das integrais foram normalizados em relação a um sinal da metilbenzoilecgonina (cocaína) em 5,58 ppm, fazendo com que o teor das impurezas fosse representado de forma relativa ao teor de cocaína de cada amostra.

Tabela 14. Regiões de deslocamento químico selecionadas e os respectivos valores de integral obtidos para amostra 2770-MS-16-2.

	Região da integral			Valor da integral		Região da integral			Valor da integral
	Início (ppm)	Fim (ppm)	Centro (ppm)			Início (ppm)	Fim (ppm)	Centro (ppm)	
1	0,80	0,77	0,79	0,03	42	3,38	3,36	3,37	0,10
2	0,89	0,88	0,89	0,06	43	3,41	3,40	3,40	0,38
3	0,91	0,90	0,90	0,09	44	3,44	3,42	3,43	0,14
4	0,92	0,91	0,91	0,06	45	3,50	3,48	3,49	0,21
5	0,93	0,92	0,93	0,03	46	3,52	3,51	3,51	0,32
6	0,95	0,93	0,94	0,08	47	3,55	3,54	3,54	0,15
7	0,96	0,95	0,95	0,08	48	3,72	3,70	3,71	1,84
8	0,98	0,97	0,98	0,01	49	3,80	3,78	3,79	2,02
9	0,99	0,99	0,99	0,01	50	3,84	3,83	3,84	0,13
10	1,04	1,00	1,02	0,07	51	3,86	3,86	3,86	0,17
11	1,14	1,13	1,13	0,02	52	4,36	4,33	4,34	0,63
12	1,20	1,14	1,17	0,15	53	4,44	4,40	4,42	0,44
13	1,22	1,20	1,21	0,08	54	4,51	4,44	4,48	0,28
14	1,25	1,23	1,24	0,09	55	5,02	4,94	4,98	0,28
15	1,28	1,27	1,28	0,04	56	5,30	5,24	5,27	0,01
16	1,30	1,28	1,29	0,07	57	5,65	5,52	5,58	100
17	1,32	1,31	1,32	0,19	58	5,99	5,97	5,98	0,02
18	1,36	1,35	1,35	0,03	59	6,03	6,02	6,03	0,00
19	1,37	1,36	1,37	0,03	60	6,24	6,21	6,23	0,01
20	1,38	1,37	1,38	0,02	61	6,36	6,34	6,35	0,00
21	1,50	1,49	1,50	0,05	62	6,48	6,45	6,47	0,30
22	1,61	1,55	1,58	0,29	63	6,71	6,69	6,70	0,01
23	1,66	1,63	1,65	0,16	64	6,84	6,80	6,82	0,00
24	1,70	1,66	1,68	0,29	65	6,95	6,90	6,92	-0,03
25	1,74	1,70	1,72	0,22	66	7,04	6,99	7,01	0,37
26	1,77	1,74	1,76	0,15	67	7,14	7,11	7,13	0,19
27	1,79	1,77	1,78	0,08	68	7,15	7,14	7,15	0,06

28	1,93	1,92	1,93	0,16	69	7,20	7,15	7,17	0,33
29	2,12	2,10	2,11	0,48	70	7,32	7,29	7,30	0,16
30	2,16	2,15	2,16	0,78	71	7,32	7,32	7,32	0,03
31	2,81	2,80	2,80	0,26	72	7,35	7,32	7,34	0,25
32	2,83	2,82	2,82	0,11	73	7,39	7,36	7,38	0,24
33	2,84	2,83	2,83	0,35	74	7,43	7,39	7,41	0,37
34	2,84	2,84	2,84	0,22	75	7,51	7,45	7,48	2,73
35	2,87	2,85	2,86	0,90	76	7,54	7,51	7,52	1,28
36	2,89	2,87	2,88	1,13	77	7,68	7,66	7,67	0,44
37	2,91	2,89	2,90	1,25	78	7,69	7,68	7,68	0,14
38	3,12	3,08	3,10	0,44	79	7,70	7,69	7,70	0,24
39	3,25	3,17	3,21	0,26	80	8,14	8,11	8,13	0,40
40	3,30	3,27	3,29	0,09	81	8,51	8,27	8,39	0,52
41	3,32	3,32	3,32	0,03					

2.4. Análise de Componentes Principais e Análise Hierárquica de Agrupamentos

Para a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) os valores das integrais resultantes dos processamentos dos espectros foram organizados em uma matriz contendo as 77 observações (linhas) das 80 variáveis (colunas). Em razão da dificuldade em se conseguir um maior número de amostras, os dados não foram separados em conjuntos de modelagem e validação. O processamento dos dados foi realizado com o *software* RStudio (versão 1,1,383) e os respectivos pacotes necessários para o conjunto de análises realizadas: *devtools*, *ggfortify*, *ggplot2*, *cluster*, *ggdendro* e *graphics* e *pca3d*. O *script* desenvolvido e utilizado para processamento dos dados e geração dos gráficos apresentados neste trabalho encontra-se no apêndice C.

Vale ressaltar que, das 81 regiões de integral definidas inicialmente, a região referente ao sinal da cocaína (5,58 ppm) foi utilizada apenas para normalização dos sinais e, portanto, excluída da análise nesta etapa.

3. Resultados

3.1. Pré-processamento

A primeira etapa deste trabalho consistiu na seleção dos parâmetros para o pré-processamento dos dados. A influência de centrar na média (função *center*, subtrair a média dos valores dos dados para cada coluna/variável) e/ou escalar (função *scale*, dividir os valores dos dados pelo desvio padrão de cada coluna/variável para que as variáveis apresentem variância unitária) os dados foram verificados executando a PCA (função *prcomp*) e monitorando o impacto desses parâmetros na porcentagem da variância explicada (função *summary*), especialmente PC1 e PC2 (tabela 15).

Tabela 15, Parâmetros de pré-processamento dos dados e proporção da variância explicada para as quatro primeiras PCs.

		PC1	PC2	PC3	PC4
Condição 1 Center = True Scale = False	Desvio-padrão	7,01	3,66	2,48	1,40
	Proporção da variância explicada	65,11%	17,73%	8,19%	2,61%
	Proporção acumulada	65,11%	82,84%	91,02%	93,64%
Condição 2 Center = True Scale = True	Desvio-padrão	5,59	4,06	2,50	2,03
	Proporção da variância explicada	39,01%	20,57%	7,78%	5,14%
	Proporção acumulada	39,01%	59,58%	67,37%	72,51%
Condição 3 Center = False Scale = True	Desvio-padrão	7,30	3,09	1,90	1,70
	Proporção da variância explicada	66,56%	11,96%	4,52%	3,61%
	Proporção acumulada	66,56%	78,52%	83,04%	86,65%
Condição 4 Center = False Scale = False	Desvio-padrão	16,46	3,66	2,52	1,53
	Proporção da variância explicada	90,65%	4,48%	2,13%	0,78%
	Proporção acumulada	90,65%	95,13%	97,26%	98,04%

Na tabela 15 podemos observar que na condição 2, onde os dados são centrados na média e escalados, aproximadamente 60% da variância é explicada com as duas primeiras componentes principais. Na condição 3, onde os dados são apenas escalados, as duas primeiras PCs explicam 78,52% da variância. Porém, na primeira condição, onde os dados são apenas centrados na média, as PCs 1 e 2 explicam quase 83% da variância. Vale ressaltar que o alto valor de PC1 na condição 4 é consequência de não centrar os dados na média, uma vez que a PC1 estará explicando apenas a variância da média. A PC3 foi responsável por explicar uma parcela inferior a 10% da variância total independente do parâmetro de pré-processamento escolhido. Com base nestes resultados e também na análise do gráfico de escores, os parâmetros da condição 1 foram inicialmente escolhidos para realização das análises de PCA e HCA apresentados a seguir.

3.2. Análise dos escores da PCA

Uma vez escolhidos os parâmetros de pré-processamento, os gráficos de escores foram gerados (funções *autoplot* e *ggplot*) para visualizar o comportamento das amostras submetidas a PCA. Serão mostrados os resultados para as duas primeiras PCs, uma vez que a os gráficos de PC1 x PC3 e PC2 x PC3 demonstraram que essas componentes não foram capazes de separar as amostras de maneira significativa.

Em um primeiro momento, o código das apreensões foi utilizado para rotular os elementos no gráfico (figura 26). Essa rotulação serviu para verificar se objetos de uma mesma apreensão, a princípio com espectros e composição química semelhantes, apresentaram valores de escores similares. Como observado na figura 25, amostras de uma mesma apreensão apresentaram, em geral, valores de escores extremamente próximos, com exceção para as apreensões 2770-16-MS (4 objetos analisados de um total de 12 objetos apreendidos) e 1963-17-RJ (4 objetos analisados de um total de 16 apreendidos). Isto pode ser explicado pelo fato destas apreensões apresentarem um elevado número de objetos apreendidos e, conseqüentemente, uma menor homogeneidade entre os objetos da apreensão quando comparados as demais apreensões. Este fenômeno pode ser observado em outros aspectos: em apreensões de grande volume são observadas diferenças significativas inclusive na adulteração das amostras, com alguns objetos apresentando diferença tanto na presença ou ausência de determinados adulterantes quanto no teor destes.

Com base nisso, o resultado foi considerado satisfatório, uma vez que objetos de uma mesma apreensão apresentaram valores de escores próximos, indicando que o método é reprodutível no que diz respeito ao preparo de amostra, obtenção e processamento dos espectros.

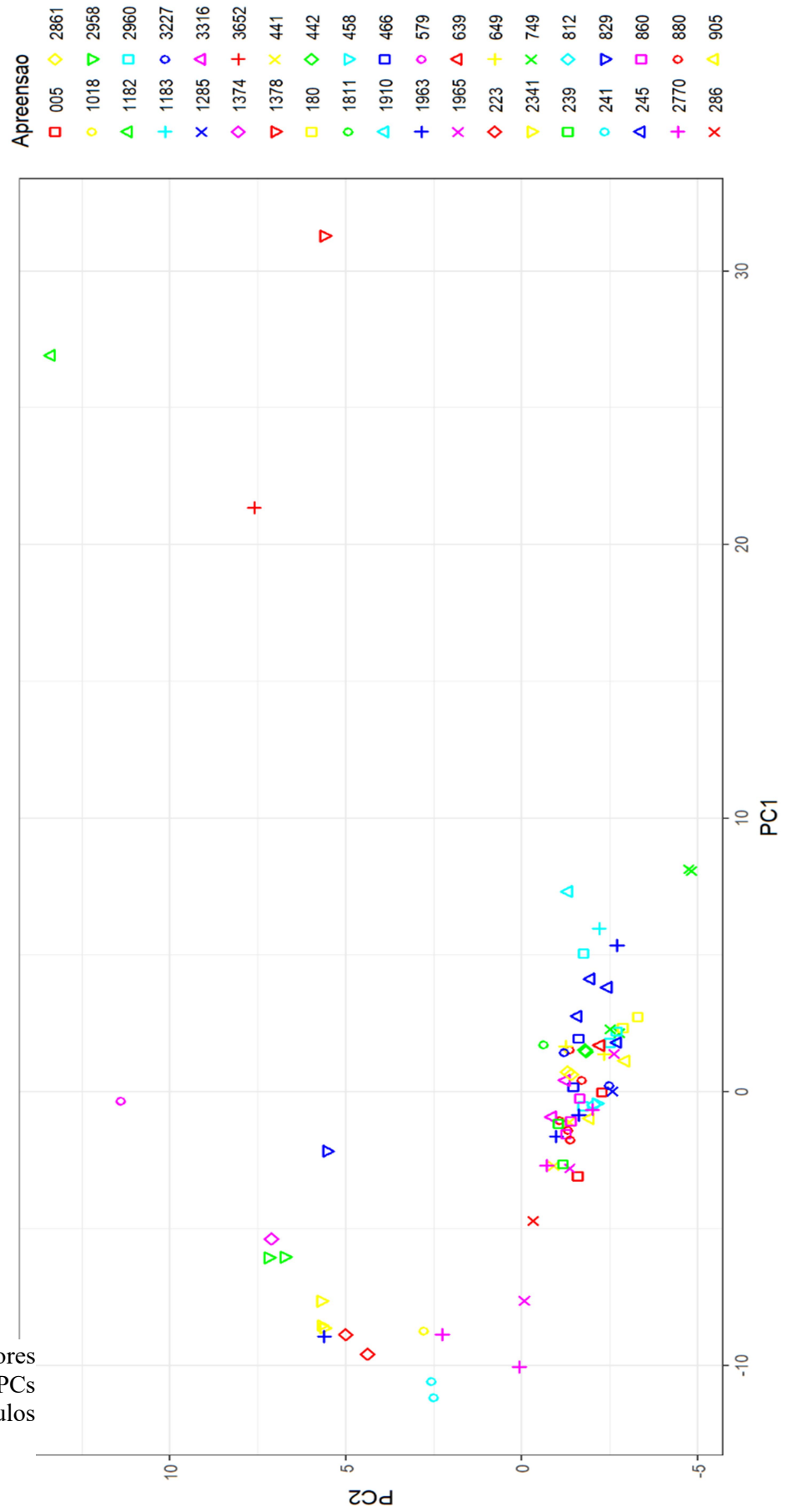


Figura 26. Gráfico de escores para a primeira e segunda PCs do modelo PCA com rótulos dos códigos das apreensões.

Uma vez demonstrado que o método apresentou uma reprodutibilidade adequada, os elementos foram rotulados de acordo com o Estado em que ocorreu a apreensão (figura 27), com intuito de verificar se amostras que estavam agrupadas pelo modelo PCA apresentavam correlação também com o Estado em que foram apreendidas.

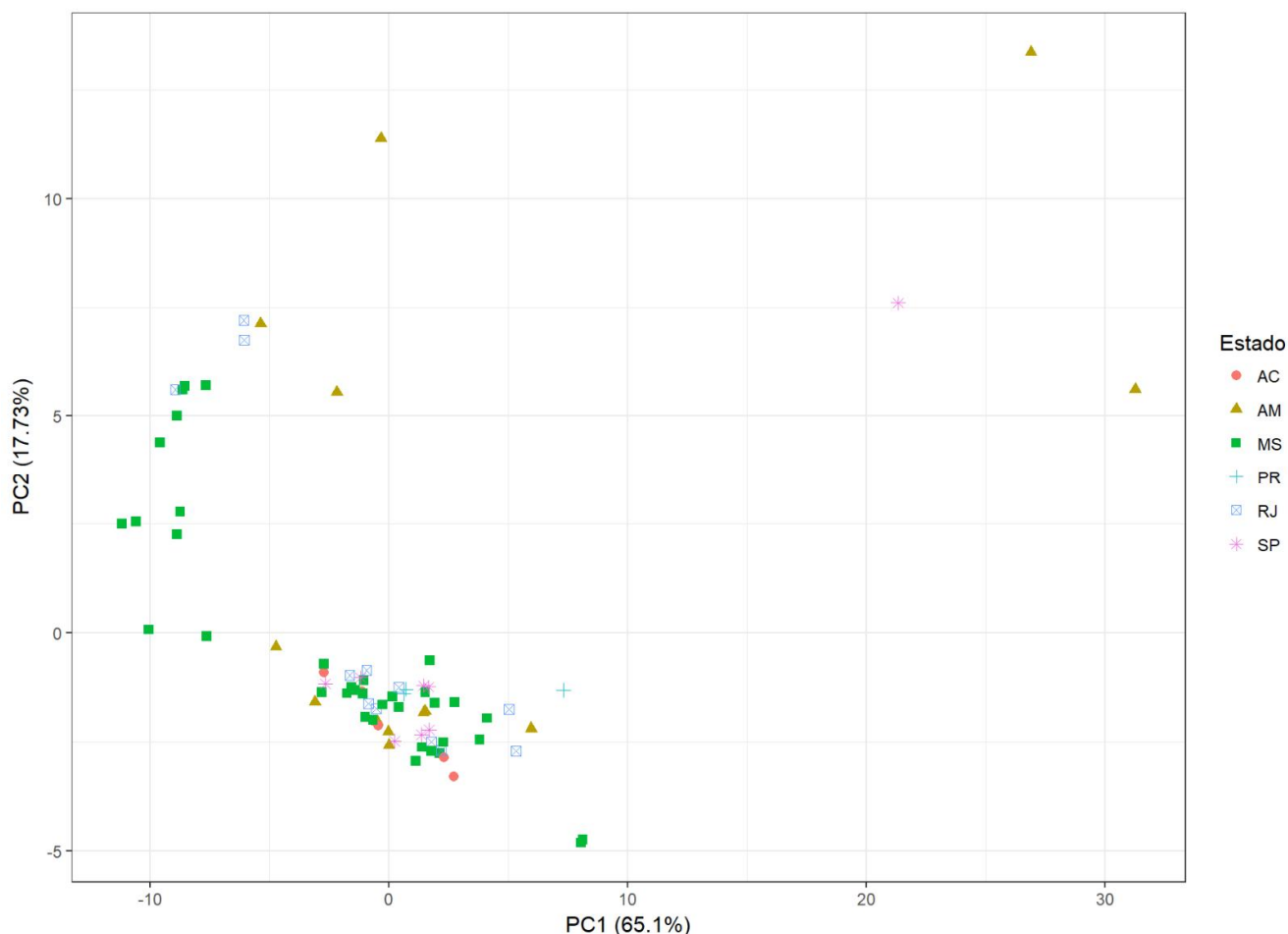


Figura 27. Gráfico de escores para a primeira e segunda PCs do modelo PCA com rótulos dos Estados da apreensão.

A princípio, alguns grupos parecem se destacar de uma região central extremamente congestionada. É possível verificar que um grupo de amostras de diferentes apreensões do Estado do Mato Grosso do Sul se destacou dos demais por apresentarem valores negativos de PC1 (menor que -5) e ligeiramente positivos da PC2 (entre 0 e 7). Neste grupo, verifica-se a presença de uma amostra do RJ (1963-17-RJ-9) muito próxima a amostras de duas apreensões distintas, ambas do estado do MS (223-16-MS e 2341-16-MS).

Já um grupo de 5 amostras do Estado do Amazonas, acompanhadas de uma amostra de SP e duas amostras do RJ, apresentaram valores elevados para a PC2 (>5) em relação as demais amostras.

Neste conjunto, 2 amostras do RJ pertencentes a uma mesma apreensão (2958-16-RJ) se encontram extremamente próximas a amostra 1374-15-AM (1 apreensão).

Apesar de separar alguns conjuntos de amostras, a maior parte das amostras se concentrou em uma região central sem que fosse possível visualizar uma separação pelo gráfico de escores.

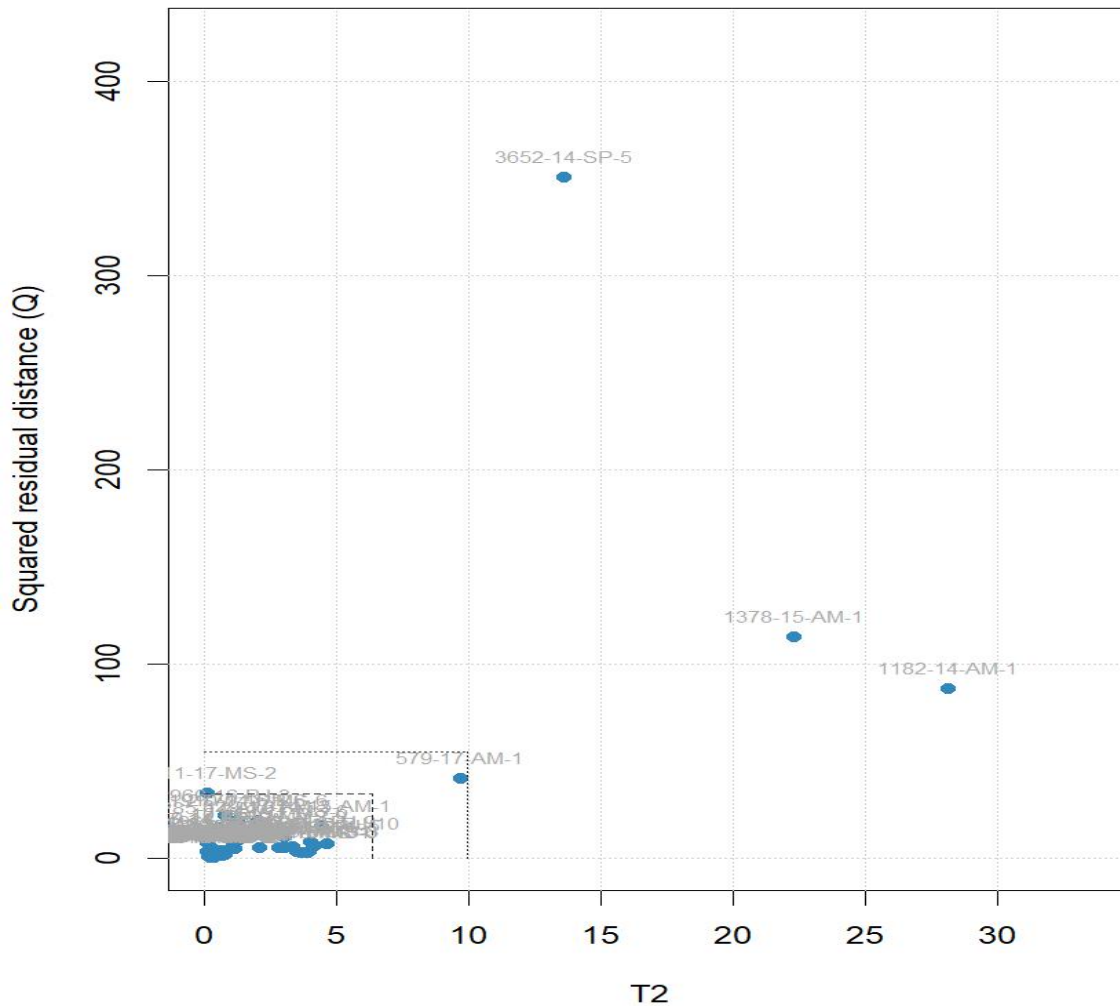


Figura 28 Gráfico de resíduos com valores de Q-residual e distância de Hotelling T^2 para as amostras utilizadas no modelo PCA.

O gráfico de resíduos (Figura 28) apresenta o valor de Q-residual, que é a raiz da distância Euclidiana Ortogonal da posição original de um objeto ao espaço da PC. Esta distância mostra o quão bem um objeto está ajustado ao modelo PCA e permite detectar objetos que não sigam uma tendência comum representada pelas PCs. Já o valor da distância de Hotelling T^2 mostra o quão distante está a projeção de um objeto até a PC, permitindo identificar objetos ou outliers em relação aos valores de variáveis. Os valores foram calculados apenas com as 2 primeiras PCs do modelo, já

que foram as únicas PCs utilizadas para construção dos gráficos de escores. As amostras 3652-14-SP-5, 1378-15-AM-1 e 1182-14-AM-1 apresentaram valores de Q residual e de T^2 acima do intervalo de confiança.

3.3. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)

A abordagem de HCA apresenta como principal vantagem o fato de não requerer um conhecimento prévio acerca da existência de grupos no conjunto de amostras ou variáveis. A distância euclidiana foi calculada (função *dist*), e o agrupamento foi realizado utilizando o método de Ward (função *hclust*, com parâmetro *ward,D2*). Com estes valores foi gerado um dendrograma (*ggplot*) para permitir uma melhor visualização de agrupamentos não tão evidentes nos gráficos de escores das PCs.

Dendrogram: centered, euclidean distances, Ward method

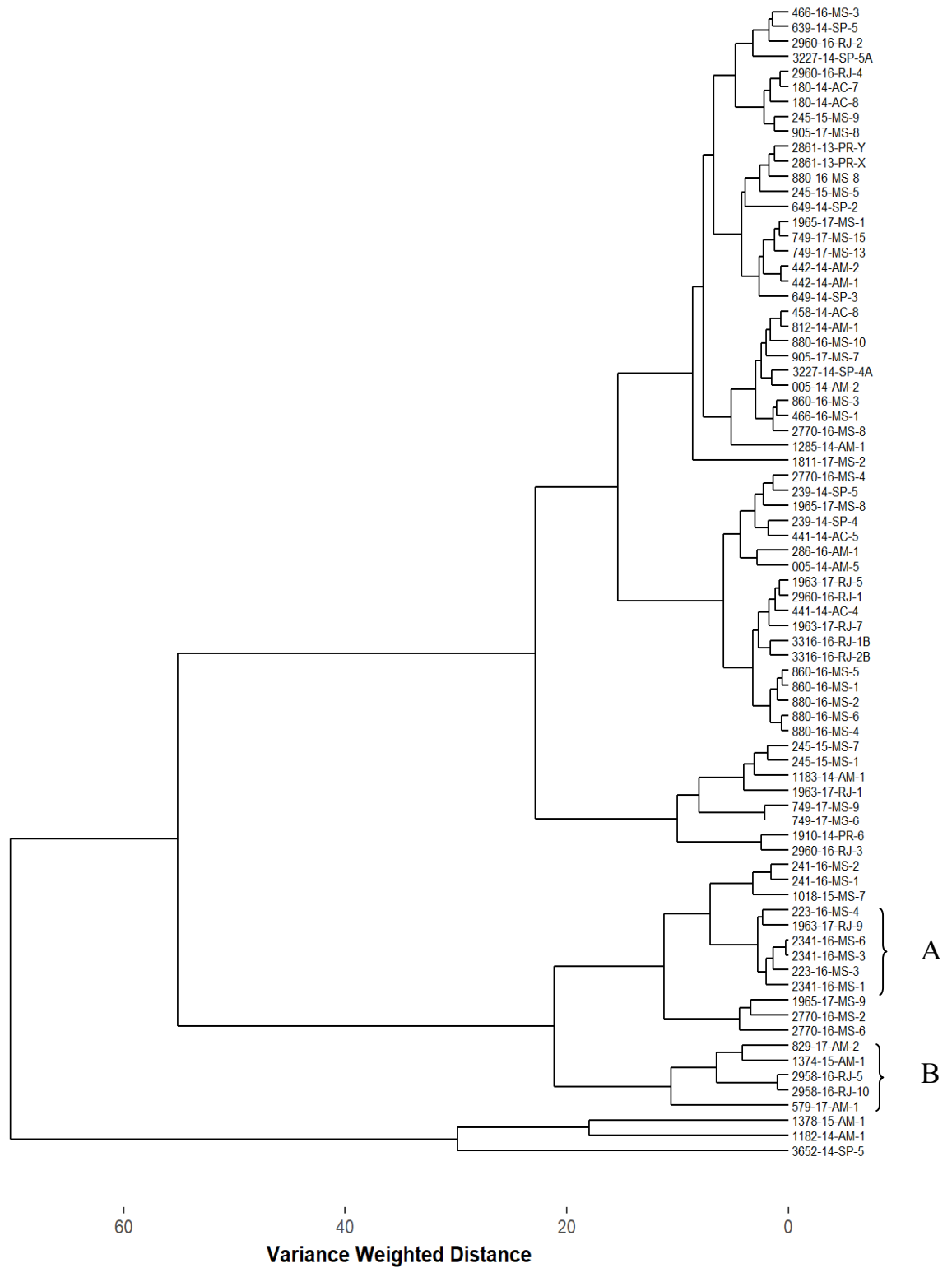


Figura 29. Dendrograma construído com base em distâncias Euclidianas e método de ligação Ward.

Foi possível observar um grande grupo (A) com presença predominante de amostras do MS relativamente longe dos demais grupos e um grupo (B) que apresentou 2 amostras distintas do Estado do Amazonas bem próximas a 2 amostras de uma mesma apreensão realizada no RJ. O fato destas amostras se apresentarem extremamente próximas ao mesmo tempo que guardam certa distância de outros grupos pode ser um indicativo de possível correlação entre estas amostras.

Apesar da obtenção de um dendrograma bem estruturado, não foi possível verificar um padrão bem definido na classificação das amostras no que diz respeito ao Estado onde foi realizada a apreensão. A utilização de um conjunto de amostras de um período extenso (2013-2017) pode estar introduzindo e/ou ressaltando sazonalidades temporais que dificultam a interpretação das características de determinada região ou rota de tráfico. Idealmente, imaginou-se que a utilização de um conjunto de amostras apreendidas em um intervalo de tempo mais curto poderia atenuar este efeito, porém, há certa dificuldade em se conseguir um número de amostras representativo com características adequadas.

3.4. Análise dos coeficientes das PCs

Para determinar quais variáveis estão efetivamente contribuindo para os valores de escores e separação das amostras, é necessário analisar os coeficientes das PCs. A contribuição de cada variável para cada uma das componentes principais pode ser visualizada através de um gráfico que expresse os valores dos pesos calculados versus o centro da região da integral (figura 30).

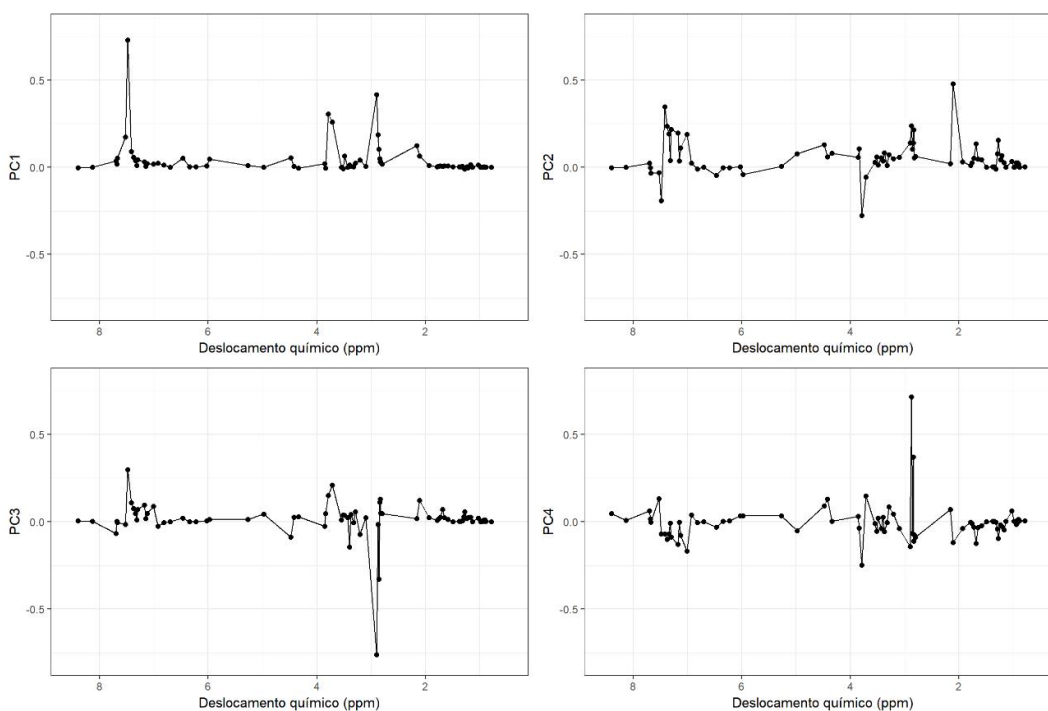


Figura 30. Valores dos coeficientes calculados versus centro da integral (ppm) para as quatro primeiras componentes principais (PCs) do conjunto de dados utilizando dados centrados na média e autoescalados.

Os coeficientes para a primeira componente principal variaram de -0,01 a 0,73, As maiores contribuições foram de 0,73; 0,42; 0,30; 0,26 e 0,19; correspondentes aos sinais centrados em 7,41 ppm; 2,90 ppm; 3,79 ppm; 3,71 ppm e 2,88 ppm, respectivamente. Para a segunda componente principal (Figura 29, PC2), a variação dos coeficientes se deu de -0,28 a 0,47. As maiores contribuições em termos absolutos foram 0,48; 0,35; -0,27; 0,24 e 0,23; correspondentes aos sinais em 2,11 ppm; 7,41 ppm; 3,79 ppm; 2,88 ppm; 7,38 ppm.

Os sinais singletos em 3,79 ppm e 3,71 ppm foram identificados como os sinais da metila do éster do grupo metilecgonina referentes às moléculas de *trans*-cinamoilcocaína e *cis*-cinamoilcocaína, respectivamente. Os sinais das cinamoilcocaínas utilizados para quantificação no capítulo 1 deste trabalho por se apresentarem em uma região menos congestionada do espectro, não apresentaram valores significativos de coeficiente nas PCs. A seleção dos sinais de metila do éster em detrimento dos sinais da dupla ligação do grupo do ácido cinâmico nas cinamoilcocaínas pode ser explicado pelo fato deles apresentarem uma área 3 vezes maior (3 prótons da metila contra 1 próton presente no sinal da dupla ligação), apresentando assim uma variação mais significativa e favorecida ao trabalhar com dados que não foram autoescalados. Vale ressaltar que estes sinais também servem

como indicativo do grau de degradação das amostras, dada a ausência da metila nas cinamoilecgoninas.

O sinal em 2,90 ppm foi atribuído à metila da amina na molécula de *cis*-cinamoilcocaína. Além de figurar entre os maiores coeficientes para a PC1, este sinal apresentou o maior coeficiente na PC3. O sinal em 2,88 ppm foi atribuído à metila da amina para a molécula de benzoilecgonina e apresentou-se nos espectros cerca de 10 vezes inferior aos sinais dessas metilas nas cinamoilcocaínas.

Os sinais na região dos aromáticos, em 7,41 ppm e 7,38 ppm apresentam aspecto de multipletto e não foram identificados, porém, é possível afirmar que não pertencem às cinamoilcocaínas ou a benzoilecgonina. Eles não estão presentes na maioria das amostras e, portanto, podem não pertencer a algum alcaloide minoritário, mas serem provenientes de alguma contaminação durante o processo de extração/refino ou da presença de algum adulterante em baixíssima concentração.

O sinal em 2,11 ppm apresenta-se como um simpleto presente em diferentes intensidades em várias amostras. Consultando uma lista de impurezas comumente encontradas⁵¹ em espectros de RMN de ¹H, verificou-se que é possível que este sinal pertença a molécula de acetato de etila, provavelmente remanescente do processo de extração/refino. Essa possibilidade encontra suporte no fato das amostras que possuem este sinal também apresentarem um triplete na região entre 1,22-1,27ppm ($J \sim 7$ Hz), que, apesar de incluindo no cálculo da PCA, apresentou valores negligenciáveis de coeficientes para as 4 PCs. Não foi possível confirmar a presença do quarteto característico dessa molécula em 4,14 ppm devido a presença de sinal bastante intenso da molécula de cocaína nesta região.

De modo geral, dentre os sinais identificados, os sinais das cinamoilcocaínas e da benzoilecgonina foram predominantes em termos de contribuição para as PCs utilizadas. A contribuição destes alcaloides em detrimento de sinais de outros alcaloides se deve ao fato destes estarem em concentração que são várias ordens de grandeza maiores do que a trimetoxicocaína (0,01% a 0,5%) e a tropacocaína (0,01% a 0,25%), por exemplo. Uma das tentativas de contornar este comportamento ao construir o modelo PCA consistiu em autoescalar os dados na etapa de pré-processamento (apêndice D). Esta abordagem permite, em tese, atribuir um mesmo “peso” aos sinais/variáveis ligados a alcaloides minoritários e até mesmo a sinais de possíveis solventes residuais presentes nas amostras. No entanto, seria necessário um conhecimento prévio acerca dos

sinais a serem utilizados, a fim de se evitar sinais repetidos de uma mesma molécula ou a introdução de sinais não identificados.

A identificação dos sinais de alcaloides minoritários não é uma tarefa trivial. A similaridade estrutural destes alcaloides aliada ao baixíssimo teor em que são encontrados constituem a principal barreira para a utilização de experimentos bidimensionais ou até mesmo de difusão. A melhor alternativa consistiria em experimentos de fortificação (*spiking*) destes alcaloides, na tentativa de encontrar sinais seletivos destas moléculas no espectro de ^1H que possam ser utilizados. Vale ressaltar que, para realizar experimentos de fortificação, seria necessário dispor de uma quantidade razoável de materiais de referência que contenham estes alcaloides em suas formas isoladas, um fator limitante considerável levando em conta a dificuldade em se obter este tipo de material. Uma alternativa possível envolve o desenvolvimento de uma estratégia de isolamento e caracterização destes alcaloides a partir de material de alta pureza apreendidos, tanto por RMN quanto por outras técnicas, permitindo a continuidade e aprimoramento deste trabalho e também gerando materiais de referência disponíveis para utilização em conjunto com outras técnicas, como CG-DIC, CG-EM, CLAE-UVIS, etc.

4. Conclusões

O modelo de análise de componentes principais foi aplicado a 77 amostras apreendidas entre os anos de 2013-2017, mostrando certa limitação em agrupar conjuntos de amostras, porém apontando algumas possíveis correlações entre amostras de apreensões distintas. Estas amostras podem ser investigadas por outras técnicas, envolvendo tanto a análise de alcaloides minoritários quanto o perfil de solventes residuais, a fim de verificar se estas correlações são realmente significativas.

A análise dos coeficientes das PCs demonstrou a necessidade de identificar mais sinais presentes nos espectros, o que pode possibilitar a seleção de sinais que representem moléculas de interesse antes da construção dos modelos de análise multivariada.

Apesar da técnica de RMN apresentar limites de detecção relativamente elevados, este fator não parece ser um impeditivo para aplicação do método proposto aos sinais de alcaloides minoritários e solventes residuais. Experimentos de fortificação (*spiking*) com alcaloides minoritários, como a trimetoxicocaína e a tropacocaína, seriam uma excelente maneira de identificar os sinais destas moléculas de interesse, permitindo verificar se há sinais seletivos nos espectros de RMN de ^1H , tanto para desenvolvimento de técnicas de quantificação destes alcaloides quanto para

análises quimiométricas de classificação/agrupamento de conjuntos de amostras. Esta mesma abordagem pode ser aplicada aos solventes residuais, na tentativa de obter uma técnica mais versátil que a cromatografia gasosa, e capaz de obter informações a respeito de duas classes bastante distintas de moléculas com uma só análise envolvendo um processo de preparo de amostra extremamente simplificado.

Referências

1. Wider, G.; Dreier, L., Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (8), 2571-2576.
2. Bharti, S. K.; Sinha, N.; Joshi, B. S.; Mandal, S. K.; Roy, R.; Khetrpal, C. L., Improved quantification from H-1-NMR spectra using reduced repetition times. *Metabolomics* **2008**, *4* (4), 367-376.
3. Kim, J.; Jung, Y.; Bong, Y. S.; Lee, K. S.; Hwang, G. S., Determination of the Geographical Origin of Kimchi by H-1 NMR-Based Metabolite Profiling. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2012**, *76* (9), 1752-1757.
4. Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S., Liquid state H-1 high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2012**, *66*, 1-39.
5. Nerantzaki, A. A.; Tsiafoulis, C. C.; Charisiadis, P.; Kontogianni, V. G.; Gerothanassis, I. P., Novel determination of the total phenolic content in crude plant extracts by the use of H-1 NMR of the -OH spectral region. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *688* (1), 54-60.
6. Napolitano, J. G.; Goedecke, T.; Lankin, D. C.; Jaki, B. U.; McAlpine, J. B.; Chen, S.-N.; Pauli, G. F., Orthogonal analytical methods for botanical standardization: Determination of green tea catechins by qNMR and LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *93*, 59-67.
7. Simpson, A. J.; McNally, D. J.; Simpson, M. J., NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2011**, *58* (3-4), 97-175.
8. Kizewski, F.; Liu, Y.-T.; Morris, A.; Hesterberg, D., Spectroscopic Approaches for Phosphorus Speciation in Soils and Other Environmental Systems. *Journal of Environmental Quality* **2011**, *40* (3), 751-766.
9. Hays, P. A., Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods for determining the purity of reference drug standards and illicit forensic drug seizures. *Journal of Forensic Sciences* **2005**, *50* (6), 1342-1360.
10. Hohmann, M.; Christoph, N.; Wachter, H.; Holzgrabe, U., 1H NMR Profiling as an Approach To Differentiate Conventionally and Organically Grown Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62* (33), 8530-8540.
11. Sutour, S.; Esselin, H.; Bighelli, A.; Casanova, J.; Le Gall, L.; Tomi, F., Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the Laurencia Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach. *Chemistry & Biodiversity* **2017**, *14* (11), n/a-n/a.
12. Botelho, É. 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). Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2011.
13. UNODC *World Drug Report 2016*; United Nations: New York, USA, 2016; p 174.
14. UNODC *World Drug Report 2015*; United Nations: New York, USA, 2015; p 162.
15. UNODC *World Drug Report 2014*; United Nations: New York, USA, 2014; p 128.
16. Casale, J. F.; Hays, P. A.; Toske, S. G.; Berrier, A. L., Four new illicit cocaine impurities from the oxidation of crude cocaine base: Formation and characterization of the diastereomeric 2,3-dihydroxy-3-phenylpropionylecgonine methyl esters from cis- and trans-cinnamoylcocaine. *Journal of Forensic Sciences* **2007**, *52* (4), 860-866.
17. Mallette, J. R.; Casale, J. F., Rapid determination of the isomeric truxillines in illicit cocaine via capillary gas chromatography/flame ionization detection and their use and implication in the determination of cocaine origin and trafficking routes. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1364*, 234-240.
18. Maldaner, A. O.; Botelho, E. D.; Zacca, J. J.; Melo, R. C. A.; Costa, J. L.; Zancanaro, I.; Oliveira, C. S. L.; Kasakoff, L. B.; Paixao, T., Chemical Profiling of Street Cocaine from Different Brazilian Regions. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2016**, *27* (4), 719-726.
19. Evrard, I.; Legleye, S.; Cadet-Tairou, A., Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy* **2010**, *21* (5), 399-406.

20. Floriani, G.; Gasparetto, J. C.; Pontarolo, R.; Goncalves, A. G., Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. *Forensic Science International* **2014**, *235*, 32-39.
21. Mallette, J. R.; Casale, J. F.; Jordan, J.; Morello, D. R.; Beyer, P. M., Geographically Sourcing Cocaine's Origin - Delineation of the Nineteen Major Coca Growing Regions in South America. *Scientific Reports* **2016**, *6*.
22. Botelho, E. D.; Cunha, R. B.; Campos, A. F. C.; Maldaner, A. O., Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2014**, *25* (4), 611-618.
23. Giraudeau, P., Challenges and perspectives in quantitative NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2017**, *55* (1), 61-69.
24. Claridge, T. D. W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. 2nd ed.; Oxford, UK, 2009; Vol. 27, p 383.
25. Malz, F.; Jancke, H., Validation of quantitative NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, *38* (5), 813-823.
26. Kelman, D.; Wright, A. D., The Importance of H-1-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Reference Standard Validation in Analytical Sciences. *Plos One* **2012**, *7* (7).
27. Burton, I. W.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A., Quantitative H-1 NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (10), 3123-3131.
28. Akoka, S.; Barantin, L.; Trierweiler, M., Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry* **1999**, *71* (13), 2554-2557.
29. Bharti, S. K.; Roy, R., Quantitative H-1 NMR spectroscopy. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *35*, 5-26.
30. Holzgrave, U., Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2010**, *57* (2), 229-240.
31. Holzgrave, U.; Malet-Martino, M., NMR spectroscopy in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *93*, 1-2.
32. Monakhova, Y. B.; Kohl-Himmelseher, M.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W., Determination of the purity of pharmaceutical reference materials by H-1 NMR using the standardless PULCON methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *100*, 381-386.
33. Frank, O.; Kreissl, J. K.; Daschner, A.; Hofmann, T., Accurate Determination of Reference Materials and Natural Isolates by Means of Quantitative H-1 NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62* (12), 2506-2515.
34. Almeida, N. S. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy por Cromatografia Gasosa e Ressonância Magnética Nuclear. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2016.
35. Weber, M.; Hellriegel, C.; Rueck, A.; Sauermoser, R.; Wuethrich, J., Using high-performance quantitative NMR (HP-qNMR(A (R))) for certifying traceable and highly accurate purity values of organic reference materials with uncertainties < 0.1 %. *Accreditation and Quality Assurance* **2013**, *18* (2), 91-98.
36. Abastecimento, M. d. A. P. e., Manual de Garantia da Qualidade Analítica. 1th ed.; MAPA: Brasília, DF, 2011; p 227.
37. Almeida, N. S.; Benedito, L. E. C.; Maldaner, A. O.; de Oliveira, A. L., A Validated NMR Approach for MDMA Quantification in Ecstasy Tablets. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2018; Vol. 29, pp 1944-1950.
38. ANVISA, Farmacopeia Brasileira. Sanitária, A. N. d. V., Ed. Brasília, Brasil., 2010; p 546.
39. Miller, J. N.; Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6th ed.; 2010.
40. Neto, B. d. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E., *Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2nd ed.; Campinas, SP, 2001; p 401.
41. Thomas, F.; Randet, C.; Gilbert, A.; Silvestre, V.; Jamin, E.; Akoka, S.; Remaud, G.; Segebarth, N.; Guillou, C., Improved Characterization of the Botanical Origin of Sugar by Carbon-13 SNIF-NMR Applied to Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (22), 11580-11585.

42. Matsumoto, T.; Urano, Y.; Makino, Y.; Kikura-Hanajiri, R.; Kawahara, N.; Goda, Y.; Nagano, T., Evaluation of characteristic deuterium distributions of ephedrine and methamphetamines by NMR spectroscopy for drug profiling. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (4), 1176-1181.
43. Da Silva Neto, H. G.; Da Silva, J. B. P.; Pereira, G. E.; Hallwass, F., Determination of metabolite profiles in tropical wines by ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2009**, *47* (S1), S127-S129.
44. Locicero, S.; Hayoz, P.; Esseiva, P.; Dujourdy, L.; Besacier, F.; Margot, P., Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland: Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method. *Forensic Science International* **2007**, *167* (2), 220-228.
45. Cartier, J.; Gueniat, O.; Cole, M. D., Headspace analysis of solvents in cocaine and heroin samples. *Science & Justice* **1997**, *37* (3), 175-181.
46. Zacca, J. J.; Groberio, T. S.; Maldaner, A. O.; Vieira, M. L.; Braga, J. W. B., Correlation of Cocaine Hydrochloride Samples Seized in Brazil Based on Determination of Residual Solvents: An Innovative Chemometric Method for Determination of Linkage Thresholds. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (4), 2457-2464.
47. Hays, P. A.; Remaud, G. S.; Jamin, E.; Martin, Y. L., Geographic origin determination of heroin and cocaine using site-specific isotopic ratio deuterium NMR. *Journal of Forensic Sciences* **2000**, *45* (3), 552-562.
48. Locicero, S.; Esseiva, P.; Hayoz, P.; Dujourdy, L.; Besacier, F.; Margot, P., Cocaine profiling for strategic intelligence, a cross-border project between France and Switzerland: Part II. Validation of the statistical methodology for the profiling of cocaine. *Forensic Science International* **2008**, *177* (2), 199-206.
49. de Oliveira, F. H. Consolidação de Análise Cromatográfica e Aplicação de Ferramentas Quimiométricas à Análise de Alcaloides Minoritários em Amostras Reais de Cocaína. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2018.
50. Pagano, B.; Lauri, I.; De Tito, S.; Persico, G.; Chini, M. G.; Malmendal, A.; Novellino, E.; Randazzo, A., Use of NMR in profiling of cocaine seizures. *Forensic Science International* **2013**, *231* (1-3), 120-124.
51. Gregory, R. F., NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176-2180.

Apêndice A - Espectros de ^{13}C , DEPT135, HSQC, HMBC e COSY para amostra de cloridrato de cocaína

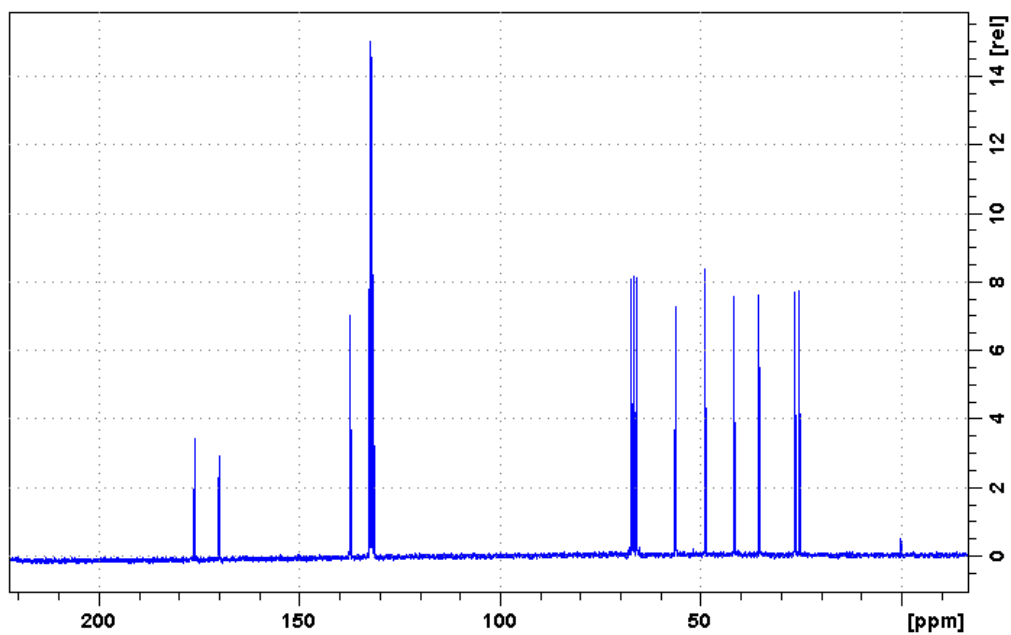


Figura A1. Espectro de RMN de ^{13}C para amostra controle de cloridrato de cocaína em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$.

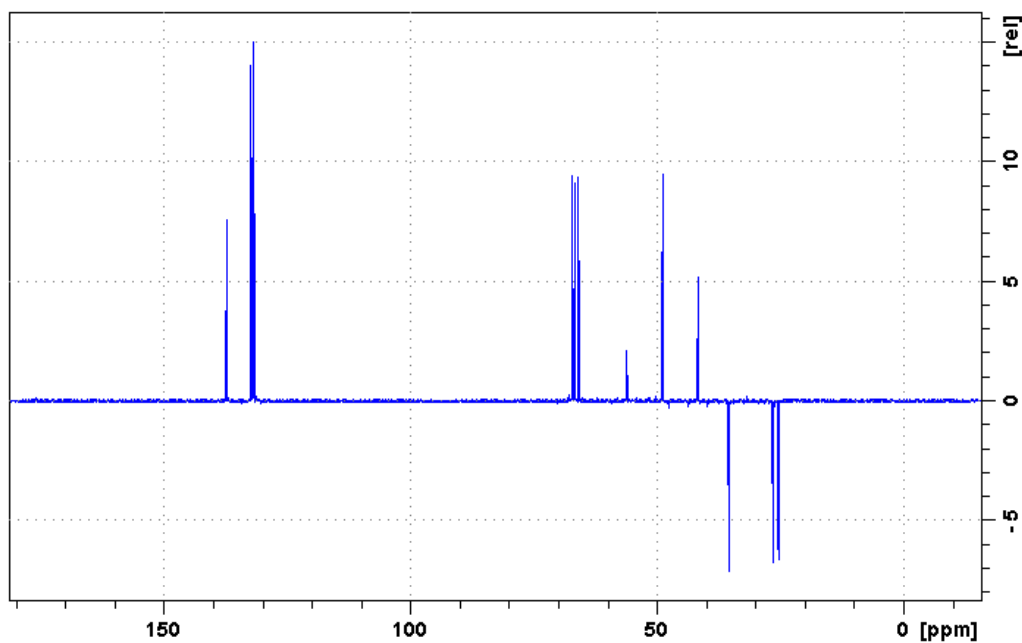


Figura A2. Espectro de RMN DEPT135 para amostra controle de cloridrato de cocaína em solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$.

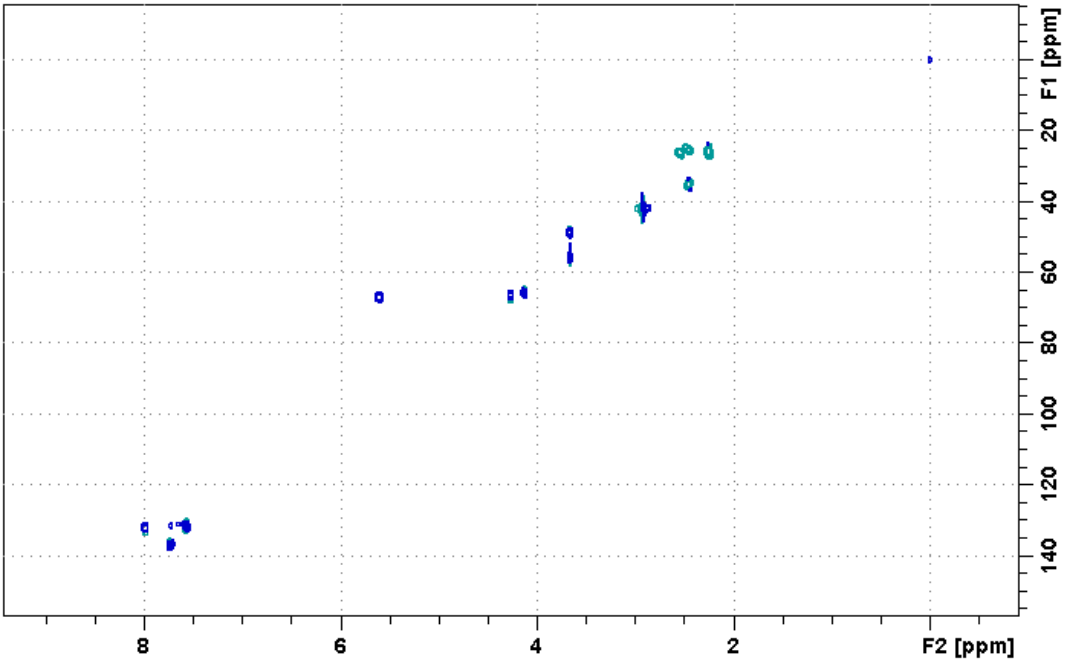


Figura A3. Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC para amostra controle de cloridrato de cocaína em solução de D_2O /TSP.

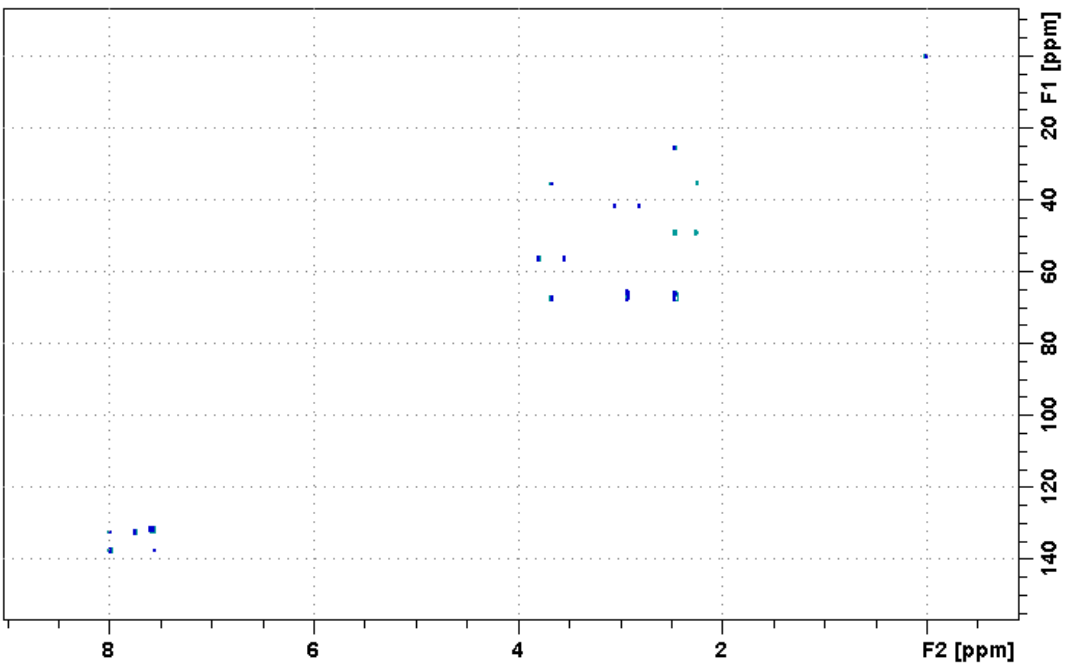


Figura A4. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC para amostra controle de cloridrato de cocaína em solução de D_2O /TSP.

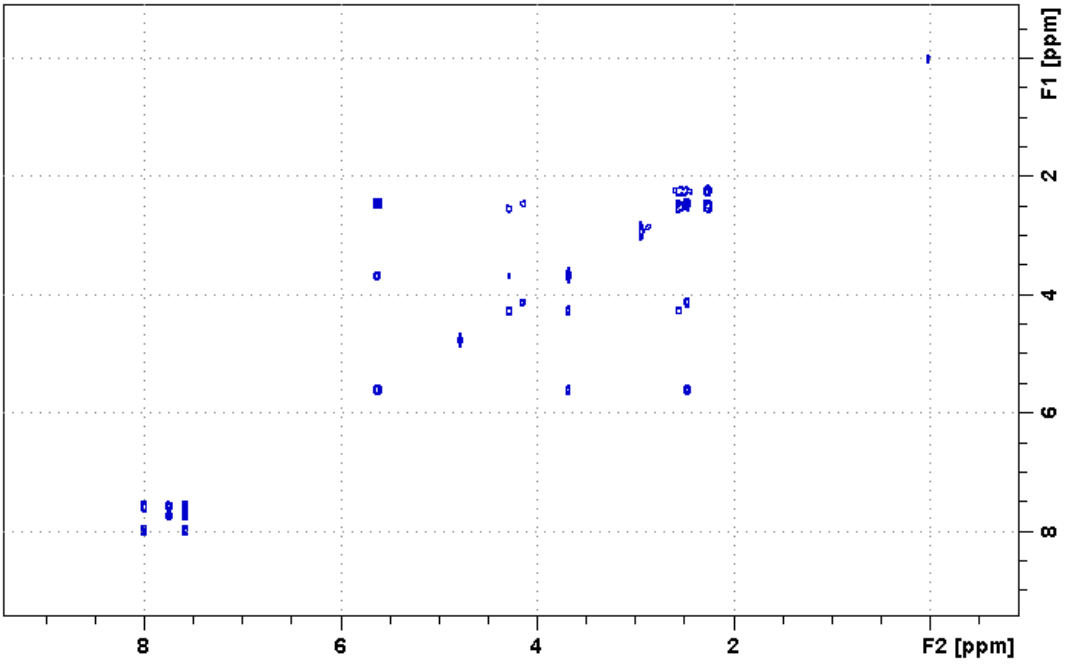


Figura A5. Espectro de RMN ¹H-¹H COSY para amostra controle de cloridrato de cocaína em solução de D₂O/TSP.

Apêndice B – Dados brutos para amostras de cocaína analisadas

Tabela B1. Média, desvio-padrão e coeficiente de variação para determinações de cocaína por RMNq (PULCON) e CG-DIC.

AMOSTRA	Cocaína					
	RMNq			CG-DIC		
	méd	dpad	CV	méd	dpad	CV
COC146_15-AM	91,08	0,67	0,74	91,66	1,09	1,19
COC215_15-AM	91,75	0,51	0,55	93,36	0,25	0,27
COC308_15-AM	93,03	0,53	0,56	94,94	0,54	0,57
COC490_15-AM	92,55	0,75	0,81	94,88	0,66	0,70
COC005_14-AM	93,83	0,19	0,20	96,59	0,63	0,65
COC442_14-AM	92,15	1,08	1,17	94,15	0,46	0,49
COC812_14-AM	92,82	0,56	0,60	95,61	1,02	1,06
COC1460_13-PR	93,08	0,60	0,65	94,68	0,08	0,08
COC1910_14-PR	92,26	0,53	0,57	94,55	0,44	0,47
COC2861_13-PR	92,66	0,80	0,86	95,42	0,58	0,61
COC3738_11-PR	92,31	0,61	0,66	93,40	0,18	0,20
COC036_13-AC	91,14	1,50	1,65	92,91	0,19	0,20
COC152_14-SR-MS	66,74	1,37	2,05	69,90	2,77	3,97
COC685_11-SR-MS	83,22	0,90	1,08	84,30	0,73	0,86
COC693_13-AC	87,21	0,79	0,91	89,49	0,17	0,19
COC107_12-AC	65,03	0,08	0,13	65,46	0,59	0,90
COC1214_13-PR	76,81	1,11	1,44	80,88	0,31	0,39
COC1254_14-AM	76,11	0,52	0,68	78,79	0,04	0,05
COC223_12-AC	70,87	2,13	3,01	73,32	0,38	0,52
COC567_13-AC	59,21	0,20	0,34	57,36	1,01	1,76
COC1459_13-PR	75,98	1,67	2,20	78,21	0,19	0,24
COC1889_12-SR-MS	73,83	0,25	0,33	75,93	0,16	0,21
COC259_11-CRA-MS	73,69	1,08	1,47	80,64	0,95	1,18
COC442_14-AM	68,17	4,19	6,15	71,30	0,66	0,93
COC223_15-AM	74,06	0,67	0,90	77,53	0,65	0,84

COC299_15-AM	68,78	0,80	1,17	72,22	0,16	0,22
--------------	-------	------	------	-------	------	------

Tabela B2. Média, desvio-padrão e coeficiente de variação para determinações de cis-cinamoilcocaína por RMNq (PULCON) e GC-DIC.

AMOSTRA	Cis-cinamoilcocaína					
	RMNq			GC-DIC		
	méd	dpad	CV	méd	dpad	CV
COC146_15-AM	1,42	0,01	0,94	1,49	0,01	0,89
COC215_15-AM	0,91	0,00	0,25	1,00	0,00	0,19
COC308_15-AM	1,03	0,00	0,48	1,11	0,01	0,73
COC490_15-AM	1,05	0,01	0,94	1,15	0,01	0,69
COC005_14-AM	1,37	0,00	0,17	1,46	0,02	1,14
COC442_14-AM	1,68	0,02	1,48	1,76	0,01	0,54
COC812_14-AM	1,28	0,01	0,61	1,39	0,02	1,12
COC1460_13-PR	1,27	0,01	0,54	1,37	0,00	0,36
COC1910_14-PR	1,79	0,00	0,20	1,84	0,01	0,67
COC2861_13-PR	1,15	0,01	1,10	1,29	0,00	0,19
COC3738_11-PR	1,12	0,01	0,80	1,19	0,01	0,62
COC036_13-AC	2,52	0,05	1,84	2,57	0,01	0,35
COC152_14-SR-MS	1,54	0,04	2,68	1,63	0,08	4,76
COC685_11-SR-MS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
COC693_13-AC	0,92	0,01	0,72	1,05	0,01	1,22
COC107_12-AC	0,76	0,01	1,86	0,78	0,04	4,55
COC1214_13-PR	5,47	0,10	1,86	5,93	0,05	0,90
COC1254_14-AM	4,22	0,04	0,93	4,75	0,08	1,75
COC223_12-AC	0,87	0,04	4,30	0,83	0,00	0,37
COC567_13-AC	0,60	0,03	5,71	0,47	0,02	4,44
COC1459_13-PR	4,92	0,08	1,61	5,07	0,02	0,34
COC1889_12-SR-MS	2,61	0,03	0,97	2,30	0,05	2,32
COC259_11-CRA-MS	4,98	0,03	0,59	5,28	0,05	0,97
COC442_14-AM	2,62	0,14	5,49	2,44	0,03	1,30
COC223_15-AM	3,99	0,03	0,64	4,42	0,21	4,76
COC299_15-AM	5,82	0,05	0,90	6,27	0,04	0,62

Tabela B3. Média, desvio-padrão e coeficiente de variação para determinações de trans-cinamoilcoína por RMNq (PULCON) e GC-DIC.

AMOSTRA	Trans-cinamoilcoína					
	RMNq			GC-DIC		
	méd	dpad	CV	méd	dpad	CV
COC146_15-AM	2,16	0,02	0,95	2,18	0,02	1,11
COC215_15-AM	2,23	0,01	0,65	2,26	0,01	0,35
COC308_15-AM	1,43	0,01	0,80	1,52	0,01	0,47
COC490_15-AM	1,50	0,01	0,79	1,62	0,01	0,41
COC005_14-AM	1,01	0,01	1,09	1,14	0,00	0,12
COC442_14-AM	1,28	0,01	1,04	1,38	0,00	0,27
COC812_14-AM	1,49	0,01	0,54	1,60	0,01	0,83
COC1460_13-PR	1,04	0,01	0,76	1,09	0,00	0,44
COC1910_14-PR	0,93	0,01	1,09	1,04	0,00	0,31
COC2861_13-PR	1,13	0,01	1,13	1,10	0,01	0,84
COC3738_11-PR	1,11	0,01	0,68	1,20	0,00	0,36
COC036_13-AC	1,16	0,02	1,68	1,28	0,01	0,45
COC152_14-SR-MS	0,65	0,02	2,73	0,79	0,03	3,74
COC685_11-SR-MS	0,70	0,01	1,06	0,80	0,00	0,48
COC693_13-AC	1,99	0,02	0,94	2,04	0,03	1,26
COC107_12-AC	0,33	0,01	3,27	0,35	0,01	1,83
COC1214_13-PR	4,31	0,12	2,86	5,06	0,08	1,62
COC1254_14-AM	4,30	0,01	0,12	4,89	0,05	0,98
COC223_12-AC	0,52	0,01	1,40	0,48	0,00	0,31
COC567_13-AC	0,36	0,02	6,65	0,25	0,01	3,78
COC1459_13-PR	3,42	0,06	1,65	3,64	0,62	16,92
COC1889_12-SR-MS	3,89	0,02	0,59	3,78	0,05	1,25
COC259_11-CRA-MS	3,67	0,00	0,11	4,07	0,05	1,20
COC442_14-AM	1,89	0,11	5,96	2,04	0,03	1,35
COC223_15-AM	4,03	0,04	0,93	4,49	0,21	4,78
COC299_15-AM	3,99	0,09	2,23	4,64	0,02	0,48

Apêndice C – Script em R utilizado para processamento dos dados

Criar o df clean: importar do sheet relcoc e excluir sinal cocaína (5.58ppm), TSP (0ppm) e tags:

```
relcoc <- transpR_csv[-c(1, 2, 3, 4, 5, 6, 63)]
```

Importar do sheet coef e excluir linhas da cocaína (5.58ppm), TSP (0ppm):

```
coef <- transpR_csv[-c(1,58),]
```

Criar os vetores:

```
vetoramostra <- transpR_csv[1]
```

```
vetorapreens <- transpR_csv[2]
```

```
vetorestado <- transpR_csv[3]
```

```
vetorano <- transpR_csv[4]
```

Library:

```
library(devtools); library(ggfortify); library(ggplot2); library(cluster);library(ggdendro);
```

```
library(graphics); library(gridExtra); library(pca3d)
```

PCA das 4 primeiras PCs:

```
pca.relcoc <- prcomp(relcoc, center=T, scale=F, rank=4)
```

Proporção da variância explicada:

```
summary(pca.relcoc)
```

PCA e gráfico de resíduos com mdatools

```
pcamdatools <- pca(relcoc2, 2, scale = F)
```

```
mdaplot(pcamdatools$scalres$scores, type = 'p', show.labels = T, show.lines = c(0, 0))
```

```
residuals <- plotResiduals(pcamdatools, ncomp = NULL, main = NULL, xlab= "T2", ylab =  
"Squared residual distance (Q)", show.labels = T, show.legend = T, show.limits = T, cgroup =  
NULL)
```



```
tiff(filename="C:/Users/Luiz Eduardo/Desktop/R/residuals.tiff", width=15, height=20, units="cm",
res=150)
```

```
plotResiduals(pcmdatools, ncomp = NULL, main = NULL, xlab= "T2", ylab = "Squared residual
distance (Q)", show.labels = T, show.legend = T, show.limits = T, cgroup = NULL)
```

```
dev.off()
```

```
# plot dos coeficientes das PCs
```

```
#PC1
```

```
pc1 <- qplot(coef$`V [ppm]`, pca.relcoc$rotation[,1], xlim=c(8.5,0.5), ylim=c(-0.8,0.8),
geom=c("point","line"), xlab="Deslocamento químico (ppm)", ylab="PC1") + geom_point(size=1) +
theme_bw()
```

```
ggsave("CoefPC1.tiff", plot = pc1, dpi = 200, width = 10, height = 8, units ="cm")
```

```
#PC2
```

```
pc2 <- qplot(coef$`V [ppm]`, pca.relcoc$rotation[,2], xlim=c(8.5,0.5), ylim=c(-0.8,0.8),
geom=c("point","line"), xlab="Deslocamento químico (ppm)", ylab="PC2") + geom_point(size=1) +
theme_bw()
```

```
ggsave("CoefPC2.tiff", plot = pc2, dpi = 200, width = 10, height = 8, units ="cm")
```

```
#PC3
```

```
pc3 <- qplot(coef$`V [ppm]`, pca.relcoc$rotation[,3], xlim=c(8.5,0.5), ylim=c(-0.8,0.8),
geom=c("point","line"), xlab="Deslocamento químico (ppm)", ylab="PC3") + geom_point(size=1) +
theme_bw()
```

```
ggsave("CoefPC3.tiff", plot = pc3, dpi = 200, width = 10, height = 8, units ="cm")
```

```
#PC4
```

```

pc4 <- qplot(coef$`V [ppm]`, pca.relcoc$rotation[,4], xlim=c(8.5,0.5), ylim=c(-0.8,0.8),
geom=c("point", "line"), xlab="Deslocamento químico (ppm)", ylab="PC4") + geom_point(size=1) +
theme_bw()

ggsave("CoefPC4.tiff", plot = pc4, dpi = 200, width = 10, height = 8, units ="cm")

# Combinados:

pcgrid <- grid.arrange(pc1,pc2,pc3,pc4, nrow = 2)

ggsave("coefpcgrid.tiff", plot = pcgrid, dpi = 200, width = 30, height = 17, units ="cm")

# Tabela coeficientes:

write.csv(pca.relcoc$rotation, file = "coefpca.csv")

# PCA 3D

gr <- vetorestado$Estado

pca3d(pca.relcoc, group=gr, show.centroids=F, show.ellipses = F)

# Plot preliminar:

autoplot(prcomp(relcoc, center=T, scale=F, rank.=4), shape=3)

# Plot com tags dos vetores Estado

## ggplot

estadogg <- cbind(pca.relcoc$x, vetorestado[,1])

ggplot(estadogg, aes(PC1, PC2)) +

  geom_point(aes(colour = Estado, shape = Estado), size = 1.5, stroke=0.9) + theme_bw()

  ## autoplot

biplotestados <- autoplot(prcomp(relcoc, center=T, scale=F, rank.=4),

data=vetorestado, shape='Estado', colour='Estado', size=2, scale=0) + theme_bw()

ggsave("biplotestadosTF1.tiff", plot = biplotestados, dpi = 200, width = 23.5, height = 17, units
="cm")

```

```

# proporção: width=23.5 height=17

# Plot com tags dos vetores Ano

vetorano2 <- vetorano

vetorano2$Ano <- as.character(vetorano2$Ano)

biplotano <- autoplot(prcomp(relcoc, center=T, scale=F, rank.=4), data=vetorano2, shape="Ano",
colour='Ano', size=2) + theme_bw()

ggsave("biplotano.tiff", plot = biplotano, dpi = 200, width = 18, height = 22, units ="cm")

### Plot com tags dos vetores apreensão ###

vetorapreens2 <- vetorapreens

# shape

apreensshape <- rep(0:6, 7)[1:38]

# colour

apreenscol <- rep(rainbow(6), 7)[1:38]

# Plot autoplot

biplotapreens <- autoplot(prcomp(relcoc, center=T, scale=F, rank=4), data=vetorapreens, shape =
"Apreens", colour = "Apreens", size = 3, label=F) +

scale_colour_manual(name = "Apreensao", values = apreenscol) +

scale_shape_manual(name = "Apreensao", values = apreensshape) +

theme_bw()

ggsave("biplotapreens.tiff", plot = biplotapreens, dpi = 200, width = 18, height = 22, units ="cm")

# Plot ggplot

apreensgg <- cbind(pca.relcoc$x, vetorapreens2[,1])

biplotapreens <- ggplot(apreensgg, aes(PC1, PC2)) +

```

```

geom_point(aes(colour = Apreens, shape = Apreens), size = 1.5, stroke=0.9) +
scale_colour_manual(name = "Apreensao", values = apreenscol) +
scale_shape_manual(name = "Apreensao", values = apreensshape) + theme_bw()

ggsave("biplotapreensTF2.tiff", plot = biplotapreens, dpi = 200, width = 30, height = 13, units
="cm")

# proporção: width=40 height=13

### Dendrograma ###

# Compute distances and hierarchical clustering:

relcoc2 <- relcoc #copy df

labs = paste(vetoramostra$Amostra) #new labels

rownames(relcoc2) <- labs #set new row names

distclust <- dist(scale(relcoc2, center=T, scale=F), method="euclidean")

hc <- hclust(distclust, method = "ward.D2")

dendr <- dendro_data(hc, type="rectangle")

# Plot (vertical)

plot(hc, hang=-1, cex=0.7, lwd=1.5, labels = vetoramostra$Amostra, main="Dendrograma", sub="",
xlab="", ylab="")

# ggplot2 (horizontal)

#converter cluster p/ object para usar com ggplot:

dendr <- dendro_data(hc, type="rectangle")

# Exemplo:

#labels (now rownames) are supplied in geom_text() and label=label

ggplot() +

```

```

geom_segment(data=segment(dendr), aes(x=x, y=y, xend=xend, yend=yend)) +
geom_text(data=label(dendr), aes(x=x, y=y, label=label, hjust=0), size=2.5) +
coord_flip() + scale_y_reverse(expand=c(0.2, 0)) +
theme(axis.line.y=element_blank(),
      axis.ticks.y=element_blank(),
      axis.text.y=element_blank(),
      axis.title.y=element_blank(),
      panel.background=element_rect(fill="white"),
      panel.grid=element_blank())
# DENDROGRAMA FINAL#
DendrCentEucWard <- ggplot() +
geom_segment(data=segment(dendr), aes(x=x, y=y, xend=xend, yend=yend)) +
geom_text(data=label(dendr), aes(x=x, y=y, label=label, hjust=-0.05), size=2.2) +
coord_flip() + scale_y_reverse(expand=c(0.12, 0)) +
labs(title="Dendrogram: centered, Manhattan distances, Ward method", x="", y="Variance
Weighted Distance") +
theme(axis.line.y=element_blank(),
      axis.ticks.y=element_blank(),
      axis.text.y=element_blank(),
      axis.title.y=element_blank(),
      panel.background=element_rect(fill="white"),
      panel.grid=element_blank(),
      title=element_text(size=10, face="bold"),

```

```

plot.title=element_text(hjust=0.5))

ggsave("DendrCentEucWard.tiff", plot = DendrCentEucWard, dpi = 200, width = 17, height = 30,
units ="cm")

#### Rascunhos/Testes ####

## Teste dendrograma com mahalanobis

Sx <- cov(relcoc2)

mahalanobis(relcoc2, center=T, Sx, inverted=T, tol=1e-22)

hc <- hclust(distclust, method = "ward.D2")

row_dist = mahalanobis(relcoc2, center =FALSE, cov = cov(relcoc2), tol=1e-22)

hc = hclust(row_dist)

Heatmap(..., cluster_rows = row_hclust)

## Cluster

clust <- kmeans(pca.relcoc$x, 7)

autoplot(kmeans(pca.relcoc$x, 7), data = pca.relcoc$x, label=F, label.size=3, frame=T,
frame.type='norm')

## Plot dos coeficientes das PCs com loop.

lapply(1:4, function(x) {

  qplot(coef$`V [ppm]`, pca.relcoc$rotation[,x], xlim=c(9,0), ylim=c(-1,1), geom=c("point","line"),

  main=paste0("Coef. PC",x, " vs deslocamento químico do sinal (ppm)"),

  xlab="Desloc quím. (ppm)", ylab=paste0("PC", x)) + theme_bw() })

coef <- cbind(coef, pca.relcoc$rotation) # não precisa já que puxei direto da list do PCA...

## Teste da pca com benecg e cinamoilcocainas: 3,79(col. 49) + 3,71(col. 41)+ 2,88(col.36)

relcoc3 <- relcoc[c(36,49,41)]

```

```
pcarelcoc3 <-prcomp(relcoc3, center=T, scale=F, rank=4)
```

```
autoplot(pcarelcoc3)
```

Apêndice D – Gráfico de escores, pesos das PCs e dendrograma para dados centrados na média e autoescalados

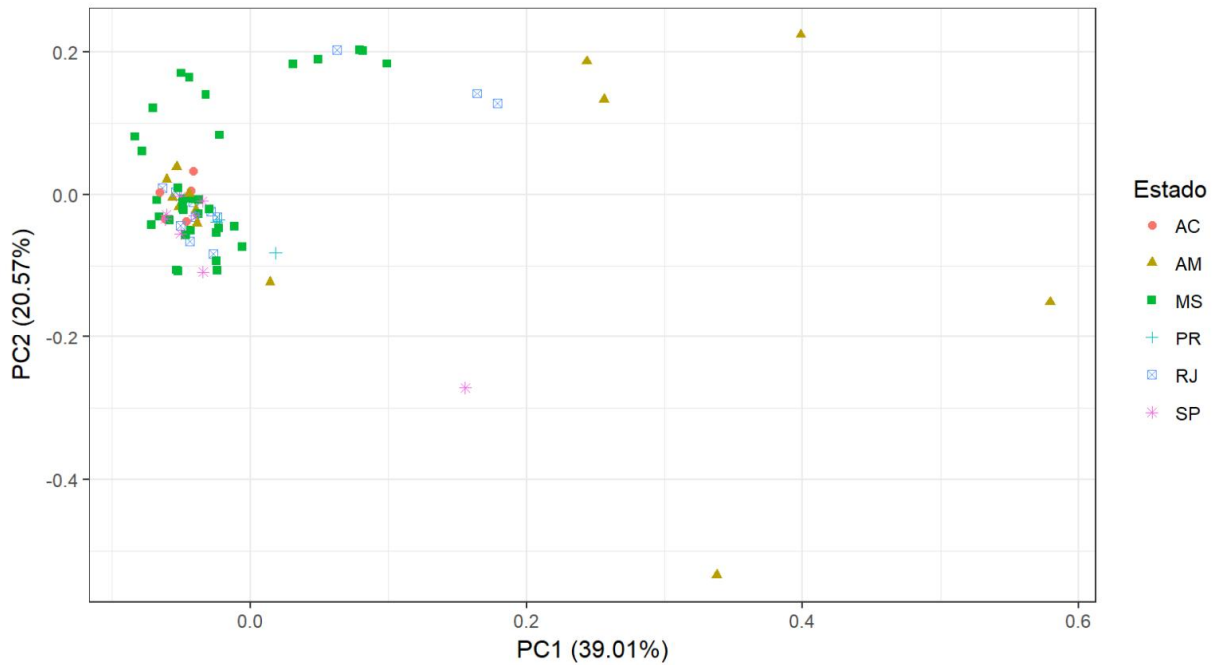


Figura D1. Gráfico de escores para a primeira e segunda PCs do modelo PCA com rótulos dos Estados da apreensão.

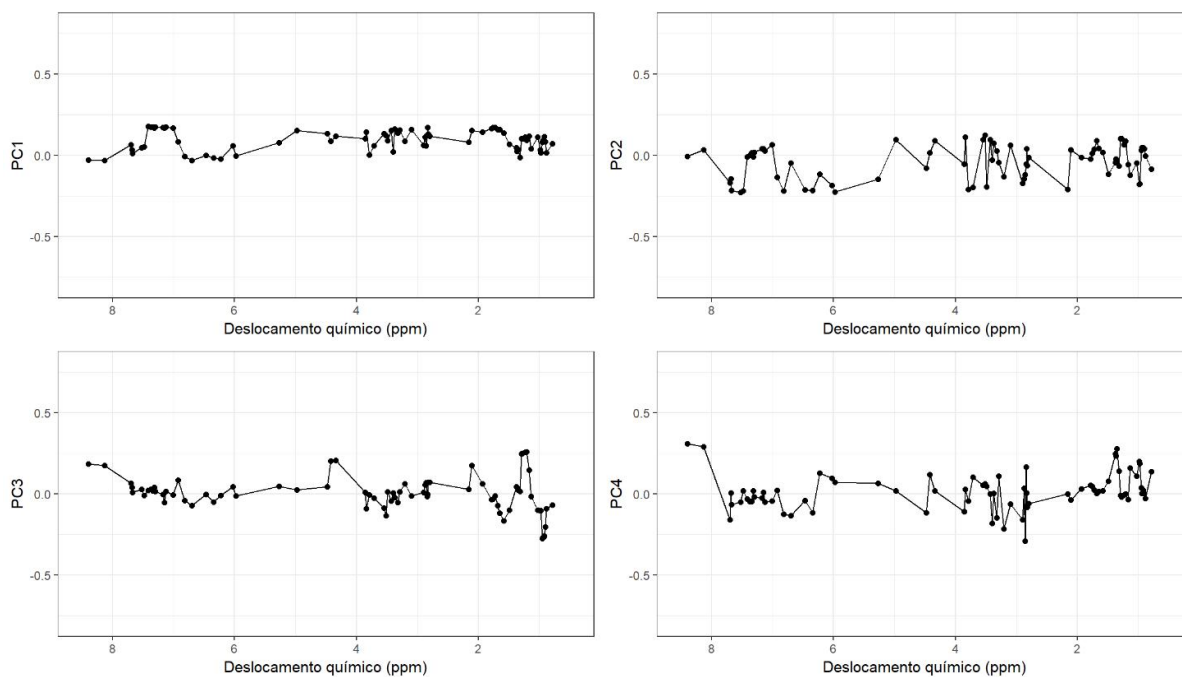


Figura D2. Valores dos coeficientes calculados *versus* centro da integral (ppm) para as quatro primeiras componentes principais (PCs) do conjunto de dados utilizando dados centrados na média e autoescalados.

Dendrogram: centered, Manhattan distances, Ward method

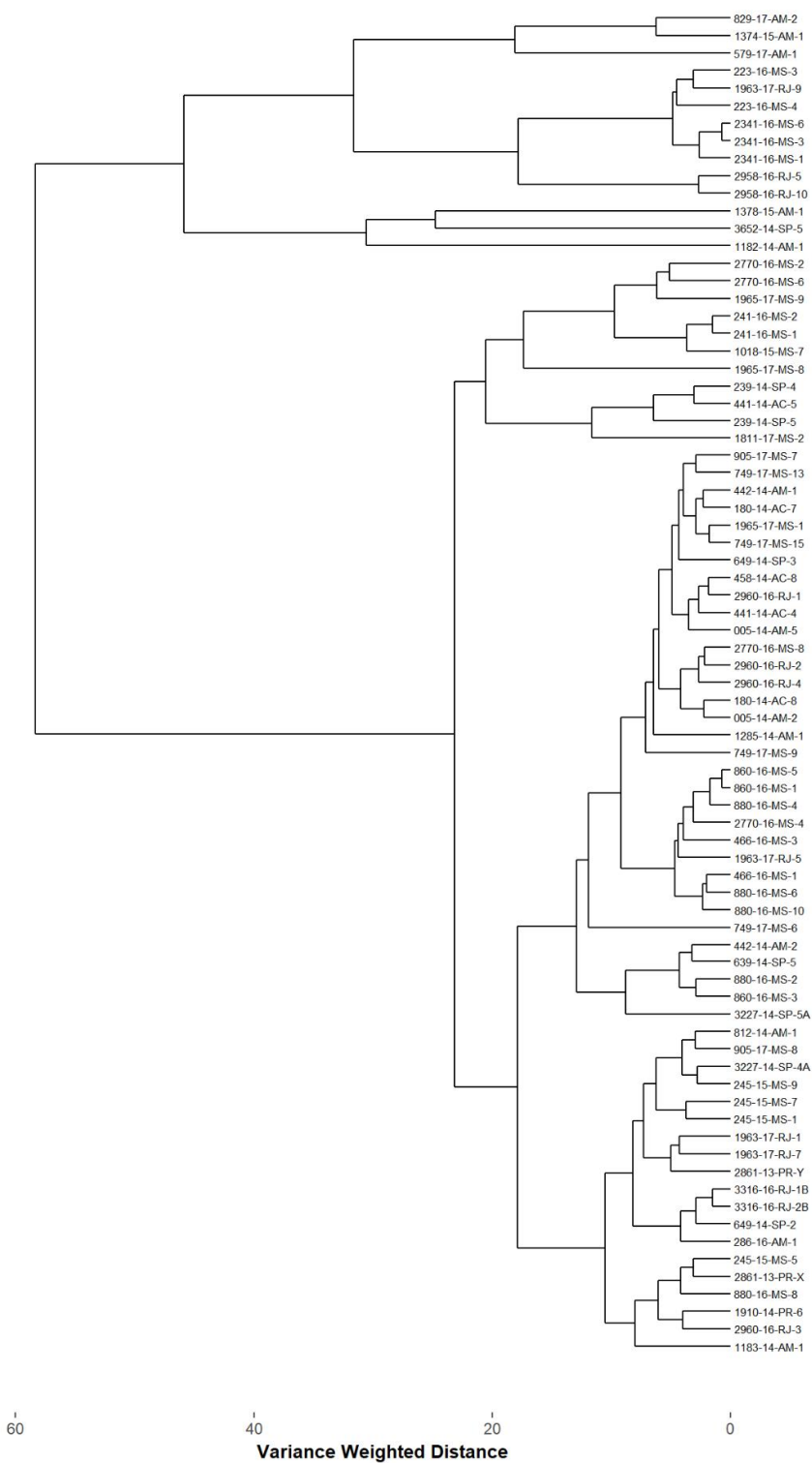


Figura D3. Dendrograma utilizando dados centrados na média e autoescalados, Distâncias: Manhattan, Método de ligação: Ward.