



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Vanessa Filipa Maçana Martins

PROFILING DE ESTUPEFACIENTES
PROFILING DE COCAÍNA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense,
orientada pela Doutora Ana Isabel Ayres de Mendonça Cardoso Matias Marques Teixeira
e co-orientada pela Professora Doutora Teresa Margarida Vasconcelos Dias de Pinho e Melo
e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia

Profiling de Estupefacientes

Profiling de Cocaína

Vanessa Filipa Maçana Martins



Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense orientada pela Doutora Ana Isabel Ayres de Mendonça Cardoso Matias Marques Teixeira e co-orientada pela Professora Doutora Teresa Margarida Vasconcelos Dias de Pinho e Melo e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

setembro de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Com esta tese chega o fim de mais uma etapa e 5 anos no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, onde pude contar com experiências fantásticas e pessoas incríveis nesta cidade que é considerada a cidade dos estudantes. É com uma pequena tristeza e um sentimento de saudade que me despeço assim dela, porque uma vez Coimbra, para sempre saudade. Contudo, é com uma enorme alegria que acabo este percurso e, por isso, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a sua finalização.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária pela oportunidade de realizar este estágio e a todos os funcionários do Setor de Toxicologia pelo apoio prestado e pela incrível experiência. Deixo um especial agradecimento à Doutora Ana Isabel Matias por toda a orientação, apoio e ensinamentos transmitidos ao longo deste trabalhoso percurso, e também por proporcionar momentos de descontração e boa disposição.

Não poderia deixar de agradecer ao Professor Doutor Alberto Canelas Pais, pela sua disponibilidade e ajuda com a quimiometria, e à Professora Doutora Teresa Pinho e Melo, pela sua orientação e apoio.

À Professora Doutora Ermelinda Eusébio, por proporcionar aos seus alunos do Mestrado de Química Forense estágios laboratoriais incríveis, e pela disponibilidade, atenção e dedicação aos seus alunos.

A todos os meus amigos, desde os mais recentes até aos mais antigos, deixo um obrigado pelo apoio, bons momentos, distrações, incentivo e, principalmente, pela paciência deles em certas ocasiões e por me fazerem sair de casa, quando não me apetecia.

Durante este ano pude contar com o apoio de duas pessoas especiais, os meus tios Rui e Elsa Vicente e mais duas de quatro patinhas, a Flor e o Leão, que me deram muito carinho, proporcionaram-me muitos momentos de diversão e entretenimento e bastantes momentos de gulodice.

Por fim, aos mais importantes, a minha família, os meus pais, o meu irmão e os meus avós. A quem deixo o agradecimento mais importante é aos meus pais, pelo carinho, incentivo, orgulho, por terem sempre acreditado em mim, todos os sacrifícios e esforço feitos e também porque sem eles nada disto seria possível.

A todos, um muito obrigada!

**“Education is the most powerful weapon
which you can use to change the world”**

Nelson Mandela

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ABREVIATURAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Problemática das Drogas e Combate Contra o Tráfico	3
1.1.1 Tráfico	4
1.2 <i>Profiling</i> de Estupefacientes	5
1.3 Implicações Analíticas da Produção e Fornecimento de Drogas	7
1.4 Tratamento e Interpretação de Dados	10
1.5 Bases de Dados e Análise Estatística	13
1.6 Cocaína	15
1.6.1 Origem e Produção	16
1.6.2 Propriedades Físico-Químicas	19
1.6.3 Uso e Efeitos	20
1.6.4 Técnicas de Detecção de Cocaína	20
1.6.5 <i>Profiling</i>	23
1.7 Objetivos do Trabalho	27
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Amostras e Reagentes	31
2.2 Estudos de Concentração	31
2.3 Preparação das Amostras	31
2.4 Instrumentação	31
2.5 Estudos de Estabilidade em Solução	32
2.6 Estudos de Estabilidade em Diferentes Condições de Armazenamento	32
2.7 Análise de Agrupamentos Hierárquica	32
2.8 Análise de Componentes Principais	34
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

3.1	Identificação e Escolha dos Alcaloides	39
3.2	Estudos de Concentração	40
3.3	Estudo de Estabilidade em Solução	44
3.4	Estudo de Estabilidade em Diferentes Condições de Armazenamento	47
3.5	Visão Geral das Amostras	52
3.6	Análise de Agrupamentos Hierárquica	54
3.7	Análise de Componentes Principais	57
3.8	Comparação de Amostras	66
	CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXOS	83

Resumo

O *profiling* de estupefacientes é uma ferramenta que permite retirar várias conclusões, não só sobre as conexões que existem entre amostras de drogas ilícitas, mas também referentes à identificação da origem geográfica ou métodos e percursores químicos utilizados na síntese de drogas. Permite assim obter informações valiosas e incontestáveis que complementam o trabalho investigativo, para combater o problema crescente que é o tráfico de drogas.

Uma das drogas mais consumidas em todo o mundo é a cocaína, tendo sido consumida por 0,4% da população mundial, em 2016.

As amostras de cocaína apresentam outros componentes e, por isso, nunca têm 100% da substância ativa. Em *profiling*, pela caracterização química destes componentes obtemos os dados necessários para retirar as conclusões necessárias.

Com este trabalho, realizado no LPC-PJ, pretende-se estabelecer um processo de comparação de amostras de cocaína baseado na especificidade da casuística do laboratório. Neste estudo foram analisadas 298 amostras de cocaína, por GC-FID, onde foram identificados e escolhidos quais os alcaloides a utilizar para o processo de comparação destas.

Realizaram-se estudos de estabilidade em solução e em diferentes condições de armazenamento para os alcaloides, pois o estabelecimento de ligações entre amostras pode ser limitado pela degradação das amostras e exposição a diferentes ambientes. Executou-se também o agrupamento das amostras por HCA e utilizou-se a PCA para se observarem as tendências no conjunto de dados. Finalmente, ainda foi efetuado um *heatmap* que representa visualmente os valores da correlação de Pearson para cada par de amostras.

Todas as técnicas empregadas permitem assim uma análise comparativa rápida entre as amostras e apresentam grande potencial forense.

Abstract

Drug profiling is a tool that allows to withdraw several conclusions, not only about the links that exist between illicit drug samples, but also on geographical origin identification or chemical methods and precursors used in drug synthesis. This allows to obtain valuable and undeniable information that complement the investigative work, to tackle the growing problem of drug trafficking.

One of the most widely used drugs in the entire world is cocaine, which was used by 0,4% of the world population in 2016.

Cocaine samples have others components therefore they never have 100% of the active substance. In drug profiling, we obtain the essential data to withdraw the necessary conclusions by the chemical characterization of these components.

With this work, carried out in LPC-PJ, we intend to establish a comparison process of cocaine samples based in the specificity of the laboratory casuistic. In this study 298 cocaine samples were analyzed by GC-FID, where the alkaloids to be used in the comparison process were identified and chosen.

Stability studies in solution and in different storage conditions were performed for the alkaloids, because the establishment of links between samples could be limited by sample degradation and exposure to different environments. It was also used the HCA for samples clustering and PCA to observe trends in the data set. Finally, a heatmap was also used to visually represent the Pearson correlation values for each pair of samples.

Every technique used allows a quick comparative analysis between samples and presents great forensic potential.

Abreviaturas

As expressões usualmente empregues em inglês são apresentadas a itálico.

ANN	<i>Artificial Neural Network</i>
Cis	<i>Cis-cinamoilcocaína</i>
CLARA	<i>Clustering for LARge Applications</i>
Coca	<i>Cocaína</i>
CPL	<i>Cofre em Plástico</i>
CPP	<i>Cofre em Papel</i>
EdME	<i>Ecgonidina Metil Éster</i>
EME	<i>Ecgonina Metil Éster</i>
ENFSI	<i>European Network of Forensic Science Institutes</i>
ESS	<i>Error Sum of Square</i>
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i>
LPC/PJ	Laboratório de Polícia Científica – Polícia Judiciária
LPL	Laboratório em Plástico
LPP	Laboratório em Papel
MDMA	<i>Metilendioximetanfetamina</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Nor	<i>Norcocaína</i>
PAM	<i>Partitioning Around Medoids</i>
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PI	Padrão Interno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

SNC	Sistema Nervoso Central
TLC	<i>Thin-layer Chromatography</i>
Trans	<i>Trans</i> -cinamoilcocaína
Tropa	Tropacocaína
TR	Tempo de Retenção
TRR	Tempo de Retenção Relativo
TSS	<i>Total Sum of Squares</i>
UNODC	<i>United Nations Office of Drugs and Crime</i>

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Processo de obtenção de inteligência forense. Adaptado de [11].	9
Figura 1.2 - Rede de distribuição e seu impacto nos perfis de impurezas. Adaptado de [5].	11
Figura 1.3 - Representação de ligações entre amostras de apreensões distintas. Adaptado de [2]	15
Figura 1.4 - Produção da cocaína e purezas associadas. Adaptado de [25].	17
Figura 1.5 - Estrutura e equilíbrio da cocaína, como base livre (1) e como cloridrato de cocaína (2). Adaptado de [27].	19
Figura 1.6 - Estrutura da cocaína com o núcleo tropano destacado. Adaptado de [27].	19
Figura 1.7 - Estrutura da benzocaína (1), da lidocaína (2), da procaína (3), da fenacetina (4), da cafeína (5), do levamisole (6) e paracetamol (7). Adaptado de [20,26].	24
Figura 1.8 - Origem e decomposição de alguns alcaloides. Adaptado de [16,34].	25
Figura 3.1 - Alcaloides mais frequentes nas amostras de cocaína do LPC-PJ.	39
Figura 3.2 - Cromatograma de uma amostra de cocaína em GC-MS e identificação dos picos dos alcaloides escolhidos, EdME (1), EME (2), Tropa (3), Nor (4), Cis (7) e Trans (8), da Coca (5) e do PI (6).	40
Figura 3.3 - Cromatograma da amostra A36, obtido por GC-FID.	41
Figura 3.4 - Cromatograma da amostra A80, obtido por GC-FID.	42
Figura 3.5 - Cromatograma da amostra A78, obtido por GC-FID.	43
Figura 3.6 - Estabilidade em solução da Ecgonidina Metil Éster.	45
Figura 3.7 - Estabilidade em solução da Ecgonina Metil Éster.	45
Figura 3.8 - Estabilidade em solução da Tropicocaína.	45
Figura 3.9 - Estabilidade em solução da Norcocaína.	46
Figura 3.10 - Estabilidade em solução da Cis-Cinamoilcocaína.	46
Figura 3.11 - Estabilidade em solução da Trans-Cinamoilcocaína.	46
Figura 3.12 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Ecgonidina Metil Éster.	48
Figura 3.13 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Ecgonina Metil Éster.	48
Figura 3.14 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Tropicocaína.	49
Figura 3.15 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Norcocaína.	49
Figura 3.16 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Cis-Cinamoilcocaína.	50
Figura 3.17 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Trans-Cinamoilcocaína.	50
Figura 3.18 - Médias das áreas normalizadas dos picos dos alcaloides.	52
Figura 3.19 - Histograma das áreas de cocaína.	53
Figura 3.20 - Dendrograma (método de ligação de Ward) construído por agrupamento hierárquico sobre o conjunto de dados de 298 amostras, que foi sujeito à primeira normalização.	55

Figura 3.21 – Dendrograma (método de ligação de Ward) construído por agrupamento hierárquico sobre o conjunto de dados de 298 amostras, que foi sujeito à segunda normalização.	56
Figura 3.22 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de covariância.	57
Figura 3.23 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de correlação.	59
Figura 3.24 - Representação de grupos de amostras no novo sistema de eixos, utilizando a matriz de correlação.	61
Figura 3.25 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de covariância.	62
Figura 3.26 - Representação de grupos de amostras no novo sistema de eixos, utilizando a matriz de covariância.	63
Figura 3.27 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de correlação.	64
Figura 3. 28 - Representação de grupos de amostras no novo sistema de eixos, utilizando a matriz de correlação.	65
Figura 3.29 – Heatmap que representa visualmente os valores da correlação de Pearson para cada conjunto de amostras.	67

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Efeitos dos adulterantes sobre o SNC. Adaptado de [33].	24
Tabela 2.1 - Solventes e padrão interno utilizados nas análises.	31
Tabela 2.2 - Condições de armazenamento das amostras.	32
Tabela 3.1 - TR e TRR, relativamente ao PI, dos alcaloides escolhidos, em GC-MS e GC-FID.	40
Tabela 3.2 - Valores de ρ relativos à comparação entre o mês 0 e 6.	51
Tabela 3.3 - Mediana, média e valores mínimo e máximo dos picos dos alcaloides, após normalização.	52
Tabela 3.4 - Evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de covariância).	58
Tabela 3.5 - Impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais (para a matriz de covariância).	58
Tabela 3.6 - Valores próprios e evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de correlação).	59
Tabela 3.7 - Impacto das variáveis originais nas três primeiras componentes principais (para a matriz de correlação).	60
Tabela 3.8 - Evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de covariância).	61
Tabela 3.9 - Impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais (para a matriz de covariância).	62
Tabela 3.10 - Valores próprios e evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de correlação).	64
Tabela 3.11 - Impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais (para a matriz de correlação).	65
Tabela A1 - Estabilidade em solução da amostra A50.	85
Tabela A2 - Estabilidade em solução da amostra A91.	85
Tabela A3 - Estabilidade em solução da amostra A98.	85
Tabela A4 - Estabilidade em solução da amostra A99.	85
Tabela A5 - Estabilidade em solução da amostra A127.	86
Tabela A6 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento LPL.	86
Tabela A7 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento LPP.	86
Tabela A8 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento CPL.	86
Tabela A9 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento CPP.	87
Tabela A10 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento LPL.	87
Tabela A11 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento LPP.	87
Tabela A12 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento CPL.	87
Tabela A13 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento CPP.	88
Tabela A14 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento LPL.	88
Tabela A15 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento LPP.	88
Tabela A16 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento CPL.	88

Tabela A17 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento CPP.	89
Tabela A18 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento LPL.	89
Tabela A19 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento LPP.	89
Tabela A20 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento CPL.	89
Tabela A21 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento CPP.	90
Tabela A22 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento LPL.	90
Tabela A23 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento LPP.	90
Tabela A24 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento CPL.	90
Tabela A25 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento CPP.	91
Tabela A26 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento LPL.	91
Tabela A27 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento LPP.	91
Tabela A28 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento CPL.	91
Tabela A29 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento CPP.	92
Tabela A30 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento LPL.	92
Tabela A31 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento LPP.	92
Tabela A32 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento CPL.	92
Tabela A33 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento CPP.	93



Capítulo 1

Introdução

1.1 Problemática das Drogas e Combate Contra o Tráfico

Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas, cerca de 275 milhões de pessoas em todo o mundo, com idades entre 15 e 64 anos, consumiram drogas pelo menos uma vez no ano de 2016. Este valor representa um aumento de 0,6% relativamente ao ano anterior, onde 5% da população mundial consumiu drogas em pelo menos uma ocasião.^[1]

O facto de o tráfico de drogas consistir numa cadeia complexa, que visa produzir, transportar, distribuir e vender substâncias ilícitas no mercado ilegal e estimular o aumento do seu consumo, medidas para o seu controlo e a repressão são essenciais, sendo necessário o envolvimento das diversas entidades policiais e mesmo de diferentes equipas especializadas.^[2]

De modo, a combater o tráfico de drogas podem ser usadas várias estratégias, como ações preventivas ou de aplicação da lei contra as redes de tráfico em todas as fases do processo, desde a produção de drogas até à sua venda e consumo. Para que isto possa ocorrer, as ações policiais devem ser estruturadas e direcionadas de modo eficaz, tendo os investigadores conhecimento do panorama geral ou de parte dele, possuindo dados e informações fidedignas. Assim sendo, é necessário seleccionar os métodos e as estratégias operacionais mais eficazes tendo em conta os recursos disponíveis.^[2,3]

Considerando o problema crescente do tráfico de droga, existe uma grande necessidade de identificar rotas de tráfico, recolher informações sobre as fontes de droga, como por exemplo, se estas estão sediadas apenas num país ou espalhadas internacionalmente, pontos e redes de distribuição, entre outros aspetos.^[4,5]

No entanto, estas informações por vezes podem ser obtidas com base em apenas conhecimentos subjetivos, podendo mostrar-se incompletas, sendo necessário complementar o trabalho investigativo. Deste modo, é necessário obter meios alternativos científicos que nos permitam obter as mesmas informações, mas de forma incontestável e precisa, complementando assim os dados já existentes. Uma ferramenta científica que permite complementar o trabalho investigativo é a caracterização e *profiling* de impurezas das drogas apreendidas.^[2,4]

1.1.1 Tráfico

A produção de cocaína continua centrada nos países da América Latina (Colômbia, Peru e Bolívia) e a área de cultivo desta foi de 213000 hectares, em todo o mundo no ano de 2016, tendo resultado num aumento de 36%, relativamente ao ano anterior. Este aumento, relacionado com as necessidades criadas pela alteração da dinâmica do mercado e com as estratégias das organizações de tráfico, observou-se nos principais países produtores.^[1]

De forma semelhante, o fabrico de cocaína aumentou 25% relativamente a 2015, tendo sido produzidas 1410 toneladas e mais de 1100 toneladas foram apreendidas em todo o mundo, levando a um aumento de 23% das apreensões em comparação com 2015. No ano de 2017, foram apreendidos 2734,1 kg em Portugal, quantidade que aumentou mais de 50% relativamente ao ano anterior, onde tinham sido apreendidos 1046,5 kg. Este aumento no fabrico e apreensões a nível mundial está interligado com o crescimento da área de cultivo da folha de coca e um melhor conhecimento do processo de fabricação nas principais áreas de produção. Além disso, a apreensão de pasta de coca, tanto na Espanha como na Itália, sugere a presença de laboratórios ilícitos que produzem cloridrato de cocaína na Europa, indicando assim uma alteração nas estratégias de produção de algumas organizações criminosas.^[1,6-8]

A maior parte da cocaína é traficada dos países andinos para os principais mercados consumidores, segundo dados obtidos a partir de apreensões. No entanto, esta é traficada para outras sub-regiões e, apesar de ser em menor quantidade, pode estar a aumentar rapidamente, contribuindo assim para que haja uma proliferação das rotas de tráfico em todo o mundo.^[1]

Relativamente ao mercado europeu, que é o segundo maior no que diz respeito ao tráfico de cocaína, a Colômbia é responsável por 20% da cocaína que chega à Europa, seguida pelo Brasil (16%), Equador (9%) e República Dominicana (9%).^[1]

Na Europa, a maioria da cocaína entra através da Península Ibérica. Apesar desta rota ter a sua importância diminuída, Portugal continua a ser um ponto de passagem a nível de tráfico internacional, particularmente nos fluxos procedentes da América do Sul, destacando-se o Brasil, o Paraguai e o Chile como principais países de origem. Tendo em conta as rotas de tráfico existentes, 70% da cocaína é intercetada no mar ou junto a este, 15% em aeroportos e 15% em rotas terrestres.^[1,6,7]

Em alguns países da Europa Ocidental, Central e no Sudeste da Europa, a análise da benzoilecgonina, um metabolito da cocaína, em águas residuais permitiu lançar um alerta relativamente ao aumento da disponibilidade e consumo da cocaína. Esta análise aponta também para um crescimento do consumo desta no período 2011-2017, principalmente nos últimos 2 anos.^[1,6]

Apesar do preço da cocaína ter permanecido estável, o seu grau de pureza está nos níveis mais elevados de há mais de 10 anos na Europa. Relativamente ao grau de pureza, em Portugal, e em conformidade com as análises realizadas no LPC/PJ as “amostras de rua” apreendidas, a pureza média do cloridrato de cocaína e da cocaína base, em 2017, foi de 43,9% e 54,6%, respetivamente.^[6,8]

O crescente mercado de cocaína representa um desafio e está destinado a aumentar o poder e a riqueza dos grupos de tráfico na América, na África e na Europa, necessitando-se assim a implementação de abordagens amplas que sejam verdadeiramente globais e compreendam todas as facetas da ameaça atual.^[1]

Em Portugal, as folhas de coca e os alcaloides que podem ser extraídos a partir destas, estão regulamentados pelo regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, Decreto-Lei nº 15/93 de 22 de Janeiro, na tabela I-B.^[9]

1.2 Profiling de Estupefacientes

O *profiling* de estupefacientes é uma ferramenta que permite retirar várias conclusões, não só no que concerne a relacionar amostras de drogas ilícitas, mas também respeitantes à identificação da origem geográfica ou métodos e precursores químicos utilizados na síntese de drogas. Quando este é usado para comparações de amostras (ligações de amostras), deverão ser considerados todos os recursos possíveis para a obtenção de informações.^[2,4]

Este conceito não é novo, tendo em 1976 surgido as primeiras tentativas, de relacionar comprimidos produzidos ilicitamente, baseadas em descrições físicas. O *profiling* de drogas, hoje em dia, é um exercício onde há recolha de características físicas e químicas, onde geralmente, existe o envolvimento de várias análises que permitem a construção detalhada do perfil de uma amostra de droga ilícita. O objetivo final do analista é obter uma “assinatura” química da droga através da obtenção de informações sobre os componentes, principais e secundários, da amostra de droga.^[3,4,10,11]

O modo de apresentação das amostras de drogas (comprimidos, cápsulas, pós, entre outros) influencia o tipo de abordagem analítica a utilizar, tendo esta de ser adequada a cada tipo de amostra. A abordagem mais simples é a inspeção visual das características físicas, como a cor, a textura, a presença de punções ou a aparência geral. Estas características permitem indicar diferenças e semelhanças entre as amostras e, quando combinadas com outro tipo de informação, permitem perceber se duas ou mais amostras estão relacionadas. Todavia, através de uma inspeção complementar, e de forma a obter mais informações, podem ser usadas as características das embalagens, como o tipo de material, o modo de acondicionamento ou até mesmo presença de impressões digitais nas mesmas, e ao serem comparadas podem reforçar a relação entre duas amostras.^[4,5]

No entanto, as características físicas têm significância limitada e existe a necessidade de as drogas serem caracterizadas quimicamente. Visto que, as amostras de droga em causa raramente contêm apenas a substância ativa, sendo regularmente misturas complexas, a sua composição química apresenta uma grande variação, como resultado das condições dos laboratórios clandestinos onde estas são produzidas. As amostras relativas às drogas podem então incluir um ou mais tipos diferentes de componentes principais, para além da droga em si.^[4]

O conjunto resultante das características físicas e químicas, e posterior comparação, pode ser usado para fins probatórios ou como fonte de inteligência, ajudando na descodificação de organizações de tráfico e padrões de distribuição, permitindo identificar novos laboratórios ilícitos e monitorizar os métodos mais comuns usados na produção de drogas.^[4,11,12]

O *profiling* tem vindo a ser implementado em algumas instituições para que se possa fornecer dados úteis às autoridades envolvidas no combate ao tráfico de drogas, sendo bastante estudado pelos departamentos de investigação científica na área forense e unidades policiais na Europa e nos Estados Unidos. As principais substâncias para as quais têm vindo a ser desenvolvidas metodologias de *profiling*, são a canábis, a heroína, a cocaína e as anfetaminas e derivados (anfetaminas, metanfetamina, MDMA, entre outras), visto que estas são as principais drogas traficadas e consumidas a nível mundial.^[11,13,14]

1.3 Implicações Analíticas da Produção e Fornecimento de Drogas

O *profiling* permite que as autoridades obtenham assim informação relativa às drogas, como a sua origem geográfica, a via sintética utilizada, o lote de produção, permitindo uma monitorização do tráfico internacional e a coleta de informações para a criação bases de dados nacionais e internacionais.^[10,15,16]

Todas estas informações podem ser obtidas através do estudo do perfil químico das amostras. Principalmente baseado nos restantes componentes que constituem as amostras de droga, para além da substância ativa.^[5]

As amostras de droga podem conter componentes naturais, subprodutos e/ou agentes de corte.^[5]

Os componentes naturais estão presentes em drogas que são obtidas a partir de plantas, como a cocaína e a heroína, sendo estes co-extraídos durante a produção das mesmas e, não se conseguindo remover totalmente do produto final. De maneira idêntica, os subprodutos são originados também durante o processo de produção das drogas, estando relacionados com o método de produção e não com o material de origem. Em contraste, os agentes de corte podem ser adicionados a qualquer momento da cadeia de distribuição, não estando relacionados com o processo de fabrico das drogas. Os agentes de corte podem ser adulterantes, que permitem potenciar ou mimetizar os efeitos da droga, ou diluentes, que não têm quaisquer efeitos no organismo. No entanto, quer os adulterantes, quer os diluentes usados têm como objetivo aumentar o volume, levando a um aparente aumento das doses e, conseqüentemente, ao aumento do lucro.^[3-5,17]

Todos os componentes intrínsecos à amostra vão apresentar variações nas suas concentrações relativas. Os agentes de corte, sendo substâncias adicionadas posteriormente, não são fontes de informação tão relevante no que diz respeito ao *profiling*. Apesar de várias amostras de drogas terem sido preparadas da mesma forma, o tipo de impurezas e a sua quantidade depende do material de partida e/ou do método segundo o qual foi processada, produzida, distribuída e/ou armazenada. Devido a estas circunstâncias, uma análise química apropriada das drogas torna-se importante, pois permite determinar as concentrações relativas dos componentes principais, minoritários e vestigiais. Com esta informação, obtemos assim um perfil químico, também conhecido

como “assinatura” ou “perfil de impurezas”, permitindo perceber qual a sua história e determinar uma origem comum entre 2 amostras apreendidas em diferentes circunstâncias.^[3-5,17]

Drogas naturais e semissintéticas, como a canábida, a cocaína e a heroína, ao serem derivadas de plantas adquirem características do solo onde estas crescem. Como consequência, a composição deste tipo de drogas vai depender também da área geográfica e das condições em que a planta cresce, como por exemplo, a altitude acima do nível do mar, as condições climáticas, as diferenças na composição dos solos e a distância à costa, visto que todas elas afetam a química interna da planta.^[11,12]

No caso das drogas sintéticas não se obtém o mesmo tipo de informação, mas também a sua composição química nos conta a sua história. Neste tipo de drogas é impossível determinar a região geográfica onde são produzidas, visto que os precursores e os métodos de síntese utilizados não são normalmente específicos de uma determinada região. No entanto, podemos obter informações sobre a via sintética e os precursores que foram utilizados, já que a qualidade e a natureza dos precursores e o tipo de via sintética utilizada vão afetar a composição final da droga. Neste caso, podemos relacioná-las a um determinado laboratório caso as amostras possuam um perfil químico idêntico.^[11,12]

A origem da matéria natural e a natureza dos precursores, não são os únicos fatores que afetam a composição do produto final sendo que, os processos de manufatura, como os de extração e síntese, também a influenciam. Estas alterações estão relacionadas com o facto de serem usadas diferentes vias sintéticas, reagentes, escalas da reação, passos de purificação, entre outras, causando uma repercussão na obtenção e proporção dos componentes naturais e subprodutos, que podem ser encontrados nas drogas, dando origem a produtos finais com características diferentes. Para além disto, a adição de agentes de corte ao longo da rede de distribuição, os solventes residuais presentes e as características da embalagem, nas etapas de acondicionamento e divisão em lotes, permite a obtenção de informações complementares acerca da rede de distribuição e da diluição da droga.^[11]

Cada fase no processo de produção contribui com diferentes informações para a construção do perfil da droga, fornecendo assim inteligência forense, conforme demonstrado na **Figura 1.1**.

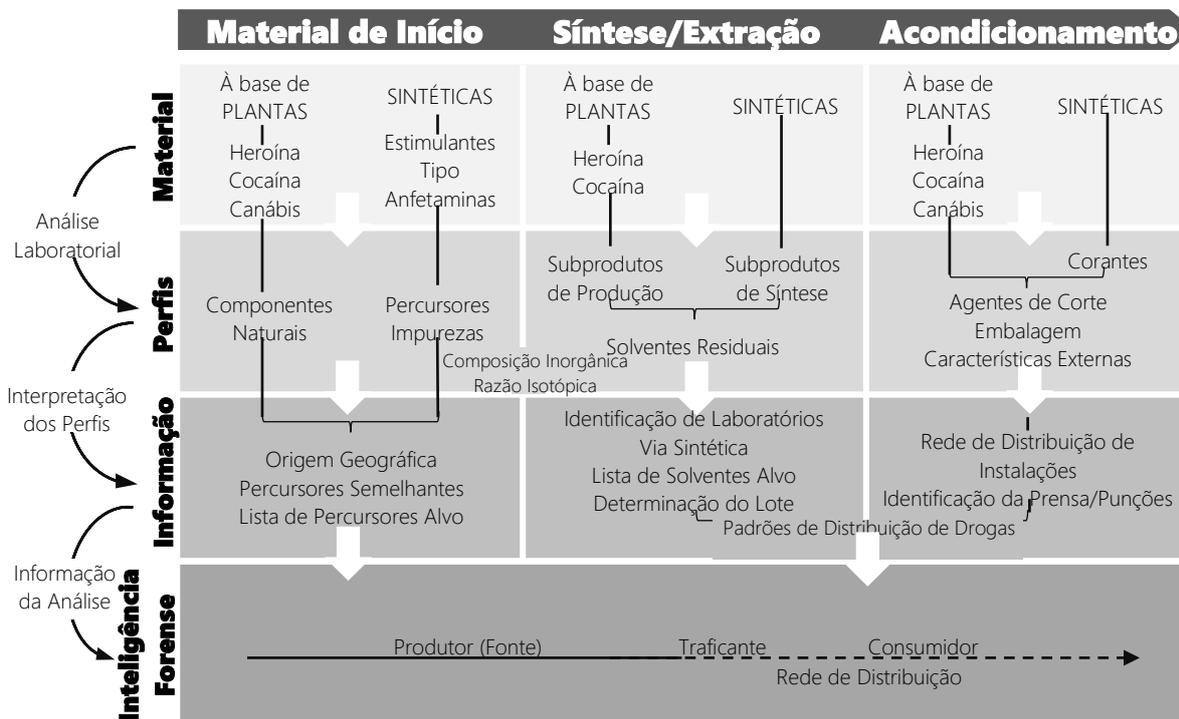


Figura 1.1 - Processo de obtenção de inteligência forense. Adaptado de [11].

Após a obtenção do produto final, este é processado e separado em lotes e considerando que ocorrem variações no teor de impurezas nos processos de produção, lotes diferentes do mesmo laboratório ilícito podem possuir características diferentes. Este tipo de variações são as chamadas variações inter-lotes. No entanto, estes produtos nunca são homogêneos e podemos também observar variações no teor de impurezas dentro do mesmo lote de droga, que são as chamadas variações intra-lote. Contudo, é difícil saber o quanto as amostras devem ser diferentes na sua natureza de impurezas antes de se assumir que estas são provenientes de diferentes lotes ou origens.^[5,17]

A variação intra-lote das drogas naturais e semissintéticas é particularmente alta, tendo em conta as condições relacionadas com a sua extração. Esta variabilidade não se verifica nas drogas sintéticas em que estas variações são comparativamente pequenas, de tal modo que na maior parte dos casos existe pouca diferença no teor de impurezas num único lote.^[5,17]

Porém, sabe-se muito pouco acerca do tamanho de um único lote ou da dimensão das variações intra- e inter-lotes de um país ou de uma fonte regional. Quando existem grandes apreensões de

drogas naturais e semissintéticas, regularmente são encontradas amostras com perfis de impurezas desiguais, o que significa que existe uma grande variação intra-lote ou então que a apreensão é constituída por lotes menores que foram fabricados em momentos ou locais distintos. Assim sendo, pode ser difícil conectar as diferentes amostras, devido à apresentação de perfis de impureza diferentes aquando a apreensão em diferentes situações. No entanto, para que haja informações suficientes para conectar as amostras, podem ser recolhidas características físicas ou dos materiais usados para acondicionar as amostras. Como os processos de produção das drogas sintéticas são usualmente mais controladas, as amostras provenientes do mesmo lote podem ser ligadas de maneira relativamente fácil.^[5,17]

O correto agrupamento das amostras só é possível se existirem informações suficientes obtidas através do método analítico e se a variação inter-lotes for maior do que a variação intra-lote, tendo em conta que grandes variações intra-lote podem proporcionar uma falha na ligação de amostras que estão relacionadas.^[5,17]

1.4 Tratamento e Interpretação de Dados

O processo de *profiling* consiste em 2 passos fundamentais, que estão conectados entre si. O primeiro passo baseia-se no desenvolvimento de metodologias analíticas, que permitem a obtenção do perfil da droga, e o segundo é dedicado à interpretação dos resultados, de modo a que estes tenham um grau de certeza suficiente que possam ter uso probatório.^[16]

Para que seja possível compreender se amostras de drogas estão relacionadas entre si é necessário haver uma comparação entre elas, de forma a se chegar a uma conclusão. Esta tarefa é complexa, devido à existência de variações intra- e inter-lotes ou devido à adição de agentes de corte. Com o objetivo de explorar o potencial da análise química comparativa e avaliar as dificuldades no momento de retirar conclusões, é essencial ter em conta as fontes de informação disponíveis para estudos de *profiling*, assim como as implicações das diferentes etapas de produção de drogas e da rede de distribuição para os perfis das amostras.^[3,5,18]

Para uma melhor compreensão da relação entre amostras de droga, é necessário compreender também a rede de distribuição destas. A rede de distribuição de drogas é extensa e complexa, sendo constituída pelo produtor, traficante, distribuidor, fornecedor e consumidor. Uma vez que, quando a droga é produzida, um produtor pode fornecer drogas a mais do que um traficante, este por sua

vez, fornecer a um ou a mais do que um distribuidor e assim sucessivamente, as amostras de drogas têm grande probabilidade de terem perfis diferentes ao longo da rede, apesar de terem tido a mesma origem, como demonstrado na **Figura 1.2**. Tendo isto em conta, os perfis de impurezas vão-se tornando cada vez mais complexos ao longo da rede de distribuição, visto que vão sendo adicionados agentes de corte ao longo desta e, portanto, quanto mais longe da origem da amostra, maior é a probabilidade de que tenham sido adicionados adulterantes e diluentes.^[3,5]

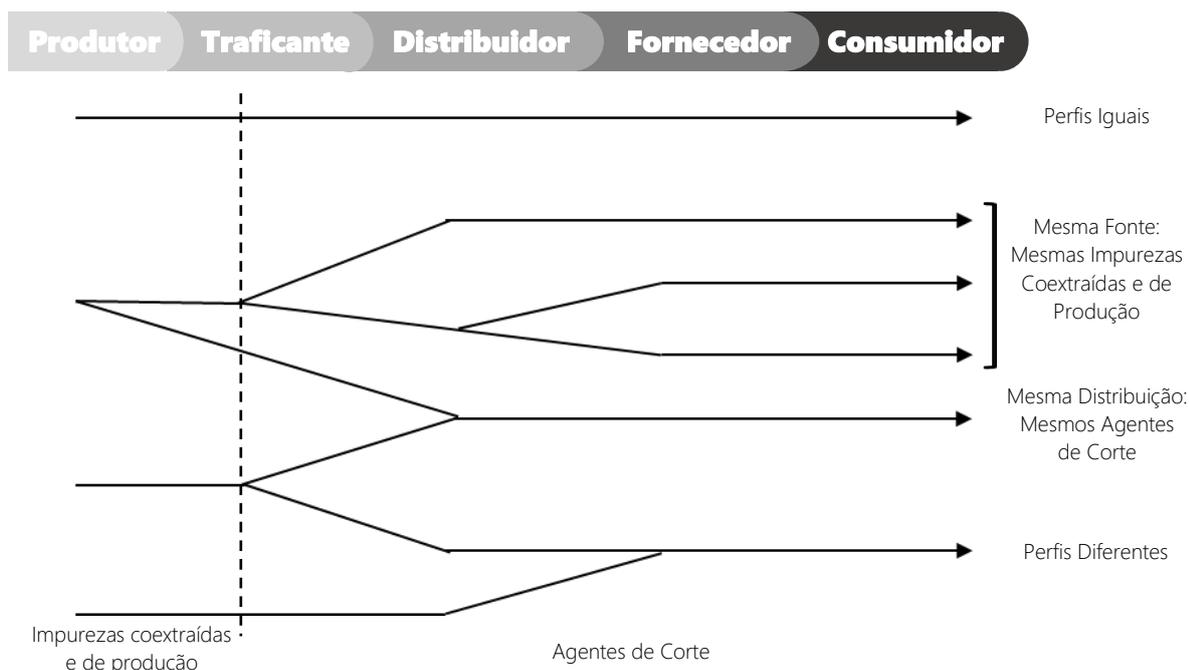


Figura 1.2 - Rede de distribuição e seu impacto nos perfis de impurezas. Adaptado de [5].

Considerando a rede de distribuição, surgem vários cenários possíveis no que diz respeito à ligação entre amostras. Assim, as amostras podem estar relacionadas por possuírem uma história comum, por terem a mesma origem, mas seguirem caminhos de distribuição diferentes ou então seguirem o mesmo percurso de distribuição, mas possuírem origens diferentes.^[3,5]

Se as amostras possuírem a mesma história, estas vão conter as mesmas porções de impurezas e os mesmos agentes de corte. Para drogas em pó, visto que é possível a adição de agentes de corte em qualquer ponto da rede de distribuição, significa que estas provavelmente têm a mesma origem e a mesma rede de distribuição, considerando que é pouco provável terem sido adicionados os mesmos agentes de corte, nas mesmas quantidades, caso tivessem seguido diferentes redes de distribuição.^[3,5]

Os perfis químicos de amostras com a mesma origem podem ser diferentes caso as amostras sejam apreendidas em diferentes fases da rede de distribuição, ou se forem provenientes de diferentes redes de distribuição. Nesta situação, as amostras terão as mesmas proporções relativas de impurezas, mas possivelmente os agentes de corte serão diferentes, visto que dificilmente todos os distribuidores possuam o mesmo agente de corte. Então é necessário nestas situações ter-se o devido cuidado a interpretar os resultados, visto que os perfis químicos podem induzir ao erro de que as amostras não estão relacionadas.^[2,5]

Também é possível que as amostras apresentem proporções relativas de impurezas diferentes, mas proporções semelhantes dos mesmos agentes de corte. Neste caso, não é possível concluir se estas possuem a mesma origem. Ainda assim, pode dizer-se que seguiram uma rede de distribuição semelhante. Conclui-se, tal como no caso anterior, que os perfis podem sugerir que as amostras não estão relacionadas.^[2,5]

Quando os perfis são significativamente diferentes, tanto em termos de impurezas como em agentes de corte, não há ligação entre as amostras. No entanto, existe sempre a possibilidade das amostras estarem relacionadas de alguma forma, seja pelo facto de um traficante ter obtido drogas de produtores diferentes ou cada lote ser cortado com agentes de corte distintos.^[2,5]

No caso dos comprimidos, quando estes são prensados não podem ser alterados posteriormente, terminando o processo de adição de agentes de corte na fase de produção. Assim sendo, quando um comprimido contém um perfil químico diferente, é possível traçar uma linha até ao laboratório clandestino onde estes são produzidos. No entanto, a presença de diferentes perfis não indica que a produção de comprimidos tenha acontecido em laboratórios diferentes, podendo apenas significar que o produtor obteve o material de partida num outro lugar.^[3]

Neste ponto é importante ter em consideração que, apesar dos perfis das amostras serem semelhantes, não significa que exista uma ligação direta entre os indivíduos a elas associados, visto que estes podem ter adquirido substâncias provenientes do mesmo lote, embora os indivíduos não tenham quaisquer conexões entre si.^[2]

Para além de permitirem estabelecer ligações entre amostras, os estudos de *profiling* de estupefacientes também possibilitam a classificação de amostras de diferentes apreensões em grupos de amostras relacionadas.^[5]

No entanto, vários fatores podem limitar o estabelecimento de ligações entre amostras, como a degradação das amostras, exposição a diferentes ambientes durante a rede de distribuição, agentes de corte não inertes ou variações nos processos de produção. E por isso, de modo a maximizar a probabilidade de se estabelecer uma ligação, devem ser coletados o maior número possível de dados comparáveis (agentes de corte, métodos e materiais de embalagem, punções e impressões digitais) de todas as fontes disponíveis.^[4,5]

1.5 Bases de Dados e Análise Estatística

Com o objetivo de se criar uma base de dados internacional e, tendo em conta que não seria exequível centralizar tudo num único laboratório, é necessário que todas as entidades envolvidas usem métodos harmonizados, tornando os resultados comparáveis. Os dados são então organizados numa memória estruturada que permite a sua comparação.^[3,19]

Quando a memória está estabelecida, esta pode ser usada de modo a produzir inteligência. Com este objetivo, recorre-se a métodos computacionais para reconhecer padrões em quantidades enormes de dados que podem facultar informações sobre as tendências do tráfico. Estes métodos ajudam a melhorar as classificações visuais das apreensões e são um passo importante para a criação de uma base de dados internacional.^[3,10]

No que diz respeito à comparação e ligação entre amostras, quando se lida com grandes bases de dados, estes devem ser sujeitos a um pré-tratamento, seguido pelo uso de várias medidas de similaridade, como distâncias (distância euclidiana) ou métodos de correlação (correlação de Pearson ou correlação cosseno), permitindo assim estabelecer uma combinação estatística relevante. O pré-tratamento de dados permite reduzir a influência instrumental relativamente às análises quimiométricas para comparação de dados. A compreensão e interpretação dos valores das medidas de similaridade envolvem um valor mínimo, que permite tomar uma decisão para estabelecer uma ligação entre amostras.^[3,19,20]

As medidas de similaridade permitem determinar a qual das classes já existentes uma amostra pertence, ou seja, permite determinar o grau de similaridade entre duas apreensões, sendo possível saber se as amostras pertencem assim ao mesmo lote ou à mesma rede de distribuição. Assim sendo, a maneira mais eficaz de agrupar as amostras é de acordo com a sua classe química. É

também possível utilizar as mesmas bases estatísticas para determinar a origem geográfica ou identificar a via sintética de uma determinada amostra.^[3,11]

As técnicas estatísticas e quimiométricas habitualmente empregues em *profiling* de drogas são a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*), Análise Discriminante Linear (LDA, do inglês *Linear Discriminant Analysis*) e Redes Neurais Artificiais (ANN, do inglês *Artificial Neural Network*) que permitem fazer as devidas distinções, classificações e reagrupamento das amostras em classes. Devem ser utilizadas técnicas quimiométricas avançadas na interpretação dos resultados em áreas onde há o envolvimento do reconhecimento de padrões, como é o caso do *profiling* de drogas.^[2,10]

Quando é inserido um certo perfil no sistema, podem surgir três resultados possíveis, podendo este não ter um vínculo com outro já presente na memória, estar ligado a amostras na memória que já pertencem a uma classe ou estar numa situação entre estas duas, em que há ligações com amostras que estão na memória, mas não pertencem a uma classe química. No primeiro e último casos é feita a criação de uma nova classe. Quando se estabelece uma ligação entre amostras, todas as amostras constituintes dessa classe são comparadas detalhadamente entre si, de modo a que seja possível estabelecer um grau de similaridade entre elas.^[2,3,18]

Assim sendo, através de bases de dados e de análises estatísticas, é possível agrupar amostras de várias apreensões em classes, como está explícito na **Figura 1.3**. Nesta figura estão representadas várias ligações que foram estabelecidas após a determinação do perfil das amostras correspondentes às apreensões A, B, C e D. Tendo em conta, que as amostras que pertencem a uma classe têm perfis semelhantes, as amostras da Classe 1 vão ter perfis semelhantes entre si, mas estes vão ser diferentes dos das amostras que constituem a Classe 2, e vice-versa.^[2]

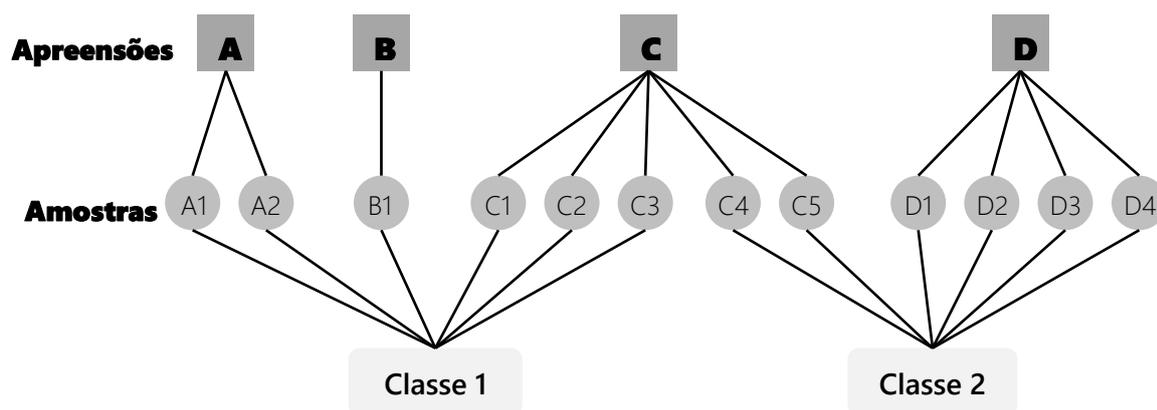


Figura 1.3 - Representação de ligações entre amostras de apreensões distintas. Adaptado de [2]

1.6 Cocaína

A cocaína é uma das drogas de abuso mais consumidas nos dias de hoje, estimando-se que tenha sido usada por 0,4% da população mundial, em 2016. Esta droga é um potente analgésico e é um alcaloide extraído a partir das folhas de *Erythroxylum coca*. As folhas de coca são desde há muito usadas pelos nativos da América do Sul para inibir a fome, reduzir o cansaço e como parte dos seus rituais sociais e religiosos. Porém, só em 1859 é que a cocaína (benzoilmetilecgonina ou éster do ácido benzóico) foi isolada, pelo químico Alemán Niemann, a partir das folhas de coca.^[14,21-23]

Antes da década de 1880, as propriedades fisiológicas da cocaína e das folhas de coca não eram distinguíveis, tendo Rusby e Mortimer feito essa distinção nesse ano. Posteriormente, Freud publicou o primeiro artigo sobre as propriedades medicinais da cocaína e poucos meses depois, foi descoberto o uso desta como anestésico local, por Karl Köller.^[14,21-23]

A partir do séc. XIX, a cocaína começou a ser vendida nas farmácias, podendo também ser encontrada em bares, na constituição de vinhos e refrigerantes, como a Coca-Cola. Em 1923, Richard Willstatter conseguiu sintetizar uma mistura de *D*-cocaína, *L*-cocaína, *D*-pseudococaína e *L*-pseudococaína. No entanto, esta síntese resulta em rendimentos baixos exigindo um alto grau de conhecimento técnico, tornando a extração da cocaína a partir da folha de coca o método pelo qual a maioria da cocaína é obtida para distribuição nos mercados.^[14,21-23]

Com a descoberta dos seus efeitos estimulantes e aditivos sobre o sistema nervoso e o alto risco que representa o seu uso prolongado, a cocaína começou a ser regulada e posteriormente proibida.

No entanto, esta ficou famosa como droga recreativa durante as décadas de 80 e 90, principalmente nos Estados Unidos.^[14,21-23]

1.6.1 Origem e Produção

Existem cerca de 200 espécies de *Erythroxylum*, planta que cresce principalmente na América do Sul, mas apenas aproximadamente 17 é que contêm cocaína. As espécies *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novogranatense* são as que contêm uma maior quantidade de cocaína na sua composição.^[12,24] Existem quatro variedades destas espécies, *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*, a *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense*, a *Erythroxylum coca* var. *ipadu* e a *Erythroxylum coca* var. *coca*, sendo a última variedade a mais utilizada na produção ilícita de cocaína.^[14,21]

As folhas destas plantas contêm cerca de 20 alcaloides diferentes, que podem ser classificados em derivados da tropina, derivados da higrina e derivados da ecgonina. As quantidades destes alcaloides nas folhas diferem e dependem de vários fatores, como a espécie, a altitude em que as plantas crescem e a idade destas. As folhas podem conter teores de alcaloides totais entre 0,5 e 1,5%, cujo aproximadamente 75% correspondem à cocaína.^[14,25]

A produção de cocaína para distribuição ilícita envolve três passos, onde primeiro se faz a extração da pasta de coca bruta a partir da folha de coca, seguida pela purificação da mesma para base livre e, por fim, temos a conversão da base livre em cloridrato de cocaína, como podemos observar na **Figura 1.4**.^[21,26]



* "amostras de rua" podem ter purezas mais baixas

Figura 1.4 - Produção da cocaína e purezas associadas. Adaptado de [25].

A pasta coca pode ser obtida através de duas técnicas, sendo elas a extração por solventes e a extração ácida.

- **Extração por Solventes**

Depois das folhas estarem secas, este processo utiliza uma base inorgânica, como o sal carbonato (de sódio ou de potássio) ou a cal, que é misturada com água para humedecer as folhas. Em seguida é adicionado um solvente orgânico, como o querosene ou a gasolina, durante a maceração das folhas, permitindo a extração dos alcaloides. É então adicionada uma solução de ácido sulfúrico, para que haja a separação da camada aquosa que contém cocaína do solvente orgânico. Procedese assim à neutralização da camada aquosa adicionando um material alcalino, que causa a precipitação de uma pasta de coca, que contém cerca de 30 a 80% de cocaína e o restante são outros alcaloides e produtos de hidrólise.^[21,24,26]

- **Extração Ácida**

Neste processo as folhas secas são misturadas com ácido sulfúrico diluído numa cova revestida por plástico. Os trabalhadores entram na cova e maceram as folhas, permitindo a lixiviação da base

de cocaína das folhas e formando uma solução aquosa de sulfato de cocaína. Após várias extrações e filtrações, que permitem remover os materiais vegetais insolúveis, é adicionado carbonato (de sódio ou de potássio) ou cal à solução para a neutralizar, levando à formação de uma pasta de coca muito primitiva. Esta então é extraída com querosene, onde posteriormente se adiciona ácido sulfúrico diluído, para que se possa recolher a fase aquosa. Para haver a precipitação da pasta de coca é adicionada uma base inorgânica.^[21,24,26]

A pasta de coca produzida através das duas técnicas é quimicamente semelhante e contém uma panóplia de compostos, para além da cocaína, incluindo higrinina, cinamoilcocaínas, tropina, cuscohigrina, ecgonina, benzoilecgonina, ceras vegetais e compostos de truxilina. A cocaína é purificada adicionando ácido sulfúrico diluído para dissolver a pasta, e uma solução diluída de permanganato de potássio para que haja oxidação das impurezas. Procede-se então à filtração da solução e adiciona-se hidróxido de amónia para que haja a precipitação da base de cocaína, que é posteriormente convertida em cloridrato de cocaína. Para obtenção deste é adicionada acetona, éter ou uma mistura deles, à base de cocaína. Posteriormente, é adicionada uma solução diluída de ácido clorídrico e é formado um precipitado de cloridrato de cocaína que é filtrado e seco em fornos micro-ondas, sob a luz do sol ou lâmpadas de calor.^[21,26]

A cocaína pode também ser obtida sinteticamente a partir dos alcaloides tropânicos extraídos das folhas de coca. Uma das vias sintéticas possível é a transformação dos alcaloides, através da sua hidrólise, em ecgonina. Esta é transformada então em ecgonina metil éster, que ao reagir com o cloreto de benzoílo, dá origem à cocaína.^[24]

O cloridrato de cocaína pode ser convertido em base livre, comumente designada como "crack", através de dois processos. O primeiro envolve a dissolução do cloridrato em água e a adição de bicarbonato de sódio ou amónia doméstica. Ao aquecer-se a água a cocaína transforma-se num óleo e é então adicionado gelo para que a água arrefeça e o óleo solidifique. Esta então é cortada e seca sob uma lâmpada de calor ou num forno micro-ondas. O segundo método tem também como base a dissolução do cloridrato de cocaína em água e bicarbonato de sódio ou amónia doméstica. É então adicionado éter dietílico e a mistura separa-se em duas camadas. O éter é decantado e é deixado a evaporar, permanecendo assim a base livre de cocaína.^[21,26]

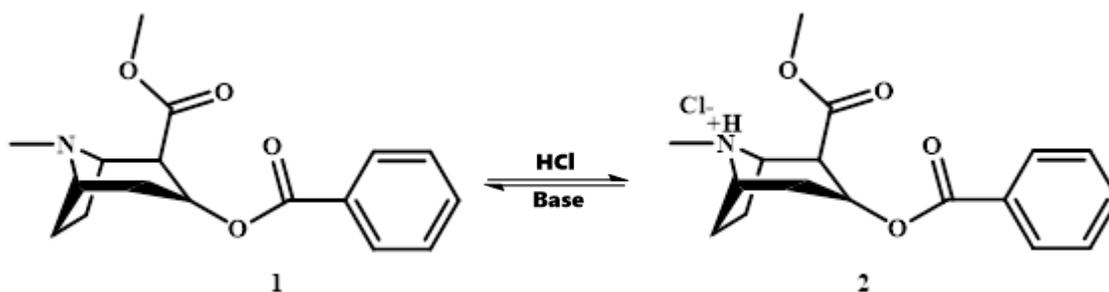


Figura 1.5 - Estrutura e equilíbrio da cocaína, como base livre (1) e como cloridrato de cocaína (2).

Adaptado de [27].

1.6.2 Propriedades Físico-Químicas

A cocaína é uma amina terciária, com um pK_b de 5,4 e está relacionada estruturalmente com a família tropano de alcaloides naturais, possuindo assim uma estrutura bicíclica, formada pela junção da pirrolidina e da N-metilpiperidina, **Figura 1.6**. Em meios alcalinos a cocaína apresenta-se predominantemente na forma da sua base livre, enquanto em meios ácidos a cocaína apresenta-se em forma de sal, usualmente cloridrato de cocaína.^[26]

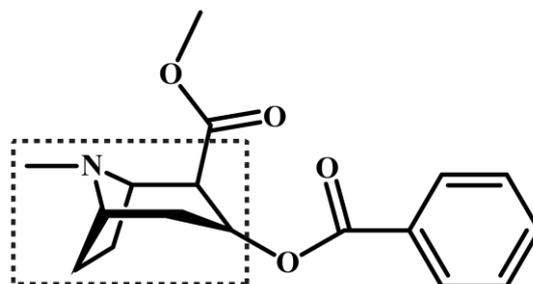


Figura 1.6 - Estrutura da cocaína com o núcleo tropano destacado. Adaptado de [27].

A base pura de cocaína apresenta-se como um pó cristalino, com uma cor branca ou esbranquiçada, um odor característico e um ponto de fusão de 98 °C. O “crack” possui a mesma temperatura de vaporização, é exibido como um material duro, amorfo e quebradiço e tem uma cor esbranquiçada. A cocaína na forma de base é pouco solúvel em água (0,00167 g/ml) e devido à sua temperatura de fusão volatiliza facilmente quando aquecida. A forma mais comum de cocaína ilícita, o cloridrato de cocaína, contrariamente à forma anterior é muito solúvel em água (2,5 g/ml) e tem uma volatilidade limitada (pressão de vapor muito baixa), visto que apresenta um ponto de fusão próximo de 195 °C, apresentando-se como um pó cristalino branco ou esbranquiçado.^[26]

1.6.3 Uso e Efeitos

O cloridrato de cocaína, devido á sua alta solubilidade em água, pode ser "snifado", sendo absorvido pelas mucosas do nariz, ou através de injeção intravenosa. A inalação de "crack", é a forma mais comum de consumo para esta forma de cocaína, visto que este volatiliza facilmente quando aquecido, fornecendo uma dose superior de forma mais rápida.^[22,24-26]

A cocaína tem um efeito estimulante que resulta da ação desta no Sistema Nervoso Central (SNC), em sistemas de neurotransmissores de dopamina, noradrenalina e serotonina, possuindo efeitos semelhantes aos da anfetamina e metanfetamina.^[22,24-26]

Esta droga é consumida com o objetivo de alcançar efeitos, de bem-estar físico e mental, alegria, euforia, maior atenção e energia e supressão da fome. No entanto, tem efeitos agudos associados que são indesejados, como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial, vasoconstrição, respiração mais rápida, aumento da temperatura corporal, sudorese, anestesia local, hiperexcitabilidade, insónia, inquietação, pânico, comportamento errático, às vezes violento, disforia, cansaço, irritabilidade, depressão, síndrome serotoninérgica, dilatação das pupilas, podendo levar a convulsões, alucinações, acidente vascular cerebral, hemorragia ou insuficiência cardíaca. O uso crónico de cocaína ou o consumo em doses muito altas pode provocar efeitos negativos, que podem causar forte dependência psicológica, desenvolvimento de tolerância, destruição de tecidos no nariz se "snifada", bronquite crónica se for fumada, desnutrição, perda de peso, desorientação, apatia, confusão, exaustão devido à falta de sono, psicose paranoica e, em períodos de abstinência, pode haver um longo período de sono e depressão.^[22,24-26]

1.6.4 Técnicas de Detecção de Cocaína

De modo a possibilitar a determinação da composição das amostras provenientes de apreensões de cocaína é necessária uma combinação de vários métodos analíticos, visto que estas contêm muitas mais substâncias para além da substância ativa. A combinação de mais do que um método, na identificação de drogas para fins forenses, tendo em conta o seu grau discriminatório, faz parte das normas internacionais para laboratórios forenses, que são determinadas por entidades como o ENFSI (do inglês, *European Network of Forensic Science Institutes*) e a UNODC (do inglês, *United Nations Office of Drugs and Crime*).^[28]

Para análise forense deste tipo de amostras são comumente utilizados testes colorimétricos, como o Teste de Scott, TLC (do inglês, *Thin-Layer Chromatography*), FTIR (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), GC (do inglês, *Gas Chromatography*) acoplado com FID (do inglês, *Flame Ionization Detector*) ou MS (do inglês, *Mass Spectrometry*) e HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), que são consideradas como adequadas para identificação inequívoca de cocaína. Para análises em que esta está impregnada em matrizes como roupa, resinas sintéticas ou líquidos, deve ser extraída antes de qualquer análise qualitativa ou quantitativa.^[28]

• Testes Colorimétricos

Os testes colorimétricos indicam a presença ou ausência de uma certa classe de drogas, são testes rápidos, têm baixo custo e são de fácil execução. No entanto, devido à existência de elevado número de substâncias que induzem a resultados falsos positivos e falsos negativos, estes não são considerados suficientes para identificação de drogas, sendo que os resultados têm de ser confirmados por exames adicionais.^[29]

No caso da cocaína o teste aplicado é o teste de Scott. Este teste baseia-se na formação de um complexo entre a cocaína e o cobalto que pode ser visualizado devido ao desenvolvimento de uma coloração azul-turquesa. No entanto, esta coloração também pode ser observada na presença de lidocaína ou outras moléculas que formem complexo com o cobalto.^[29]

• Cromatografia em Camada Fina

A cromatografia em camada fina é usada para separação e identificação de drogas ilícitas. É uma técnica barata, rápida, sensível, flexível na seleção das fases estacionária e móvel, permitindo a identificação de uma grande variedade de substâncias. De modo a aumentar a sua capacidade de separação, são comumente utilizadas técnicas de alta resolução.^[29]

A cocaína pode ser analisada, tanto em forma de sal como de base, e podem ser usados diferentes sistemas de solventes como eluentes. Após a placa de TLC estar seca pode ser visualizada em luz UV (254 nm) ou podem ser utilizados reveladores como o reagente de Dragendorff ou Iodo Platinado Acidificado. Posteriormente é necessário calcular-se o R_f para comparação com materiais de referência.^[29]

• Técnicas Cromatográficas

A análise de estupefacientes usando técnicas cromatográficas é bastante explorada, visto que estas técnicas são apropriadas tanto para uma determinação qualitativa quanto quantitativa.^[17,30]

- Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa permite a separação e análise dos diferentes componentes de uma amostra. Nesta técnica a fase móvel é um gás, geralmente inerte, e a fase estacionária é uma camada líquida ou sólida.^[17,30]

Na literatura têm sido descritas algumas técnicas analíticas usadas para *profiling*, sendo a cromatografia gasosa a mais mencionada, visto que esta possui alta resolução na separação de impurezas, acompanhada por uma boa sensibilidade e reprodutibilidade. A cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS), uma das técnicas mais utilizadas para identificação de drogas, é uma técnica sensível e de alta resolução, que permite a obtenção de dados espectrais relativamente aos vários compostos de uma amostra, sem que seja preciso haver um isolamento prévio destes.^[17,30]

A cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização em chama (GC-FID), outra técnica muito usada em trabalhos de rotina, normalmente é usada para análises quantitativas, não requerendo qualquer tipo de derivatização. Esta não fornece tanta informação como a GC-MS, no entanto é mais robusta, estável e tem baixo custo.^[17,30]

- Cromatografia Líquida de Alta Performance

Na cromatografia líquida de alta performance, contrariamente à GC, a fase móvel é líquida. Esta usa bombas para passar o solvente (eluente), o que permite aumentar a eficiência da separação. Apesar da cromatografia gasosa, ter elevada seletividade, alta sensibilidade e reprodutibilidade, a HPLC é também importante, tendo em conta amostras de cocaína onde o uso de uma fase reversa é aconselhável a nível de reprodutibilidade e detetabilidade.^[29,30]

• Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A utilização do FTIR não é muita a nível laboratorial, mas a existência de equipamentos portáteis, permite que haja uma identificação rápida, com quase nenhuma preparação de amostra recorrendo a uma técnica não destrutiva.^[29,30]

Esta técnica baseia-se no facto das ligações químicas das substâncias possuírem frequências de vibração específicas, que correspondem a níveis de energia da molécula. Quando uma molécula recebe radiação com exatamente a mesma energia de uma dessas vibrações ela começa a vibrar e as vibrações só são registadas no espectro se houver variação do momento dipolar da respetiva ligação. Como estes espectros são constituídos por uma variedade de picos, é quase impossível duas substâncias possuírem o mesmo espectro e por isso obtemos uma espécie de “impressão digital” da amostra. A identificação da cocaína é assim inequívoca a partir de cada espectro único.^[29,30]

Como foi referido no ponto anterior, a cocaína que ocorre naturalmente é a *L*-cocaína, e a presença da *D*-cocaína sugere que a droga é sintética. Métodos como HPLC, GC-MS, FTIR e RMN (Ressonância Magnética Nuclear), permitem identificar os isómeros fornecendo informações assim sobre a natureza da amostra.^[26]

1.6.5 Profiling

Métodos de *profiling* de cocaína são utilizados por alguns laboratórios, no entanto a troca de informação não existe ou é escassa, tanto a nível de metodologias como a nível de dados obtidos que possam ser usados para melhorar o combate contra o tráfico.^[16]

O *profiling* de cocaína envolve um processo complexo, sendo necessário considerar os compostos que podem estar nas amostras e como é que estes surgem. A literatura descreve diferentes tipos de compostos que podem ser utilizados em *profiling*, incluindo assim compostos que estão presentes nas folhas de coca, os produtos de degradação que resultam da produção desta, agentes de corte (adulterantes e diluentes) e solventes ocluídos.^[4,16,24]

Os adulterantes, substâncias usadas com o objetivo de simular os efeitos da substância ativa, mascarando a diluição da substância, mais frequentes na cocaína são a benzocaína, a lidocaína, a procaína, a fenacetina, a cafeína e o levamisole. Na **Figura 1.7** e na **Tabela 1.1** estão representadas as estruturas destes adulterantes e os seus efeitos sobre o SNC, respetivamente.^[2,14,26,28,31,32]

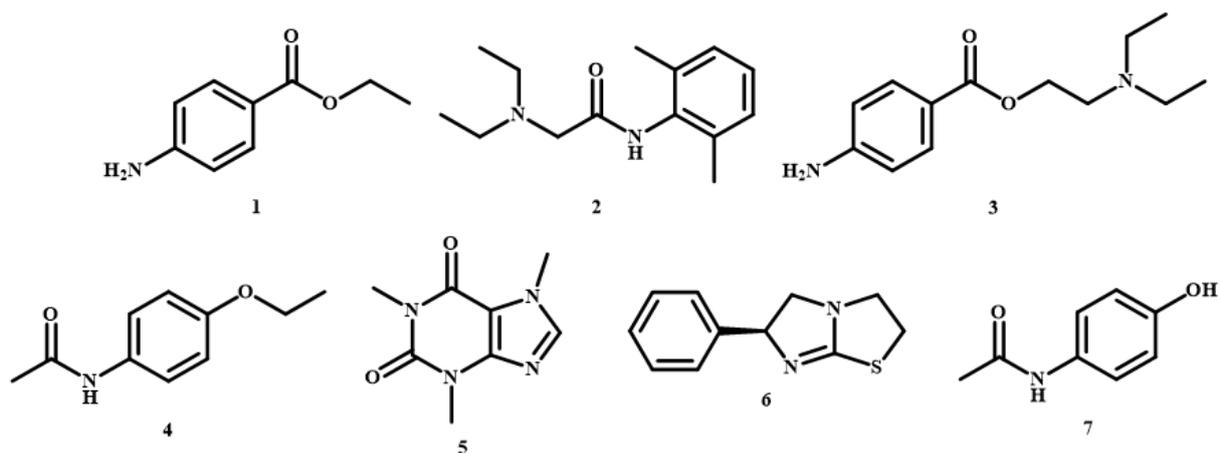


Figura 1.7 - Estrutura da benzocaína (1), da lidocaína (2), da procaína (3), da fenacetina (4), da cafeína (5), do levamisole (6) e paracetamol (7). Adaptado de [20,26].

Tabela 1.1 - Efeitos dos adulterantes sobre o SNC. Adaptado de [33].

Adulterantes	Efeitos sobre o SNC
Benzocaína	Anestésico Local
Lidocaína	Anestésico Local
Procaína	Anestésico Local
Fenacetina	Analgésico e Antipirético
Cafeína	Estimulante
Levamisol	Sinergia estimulante com a cocaína
Paracetamol	Analgésico e Antipirético

Contrariamente aos adulterantes, os diluentes são compostos inertes que possuem características físicas semelhantes à cocaína, como cor e/ou textura. Os diluentes mais comuns são os açúcares, como o manitol, o inositol e a sacarose. No entanto outros são adicionados como sulfato de magnésio, amido, bicarbonato de sódio, entre outros.^[2,14,21,26,28,31]

As substâncias co-extraídas durante a produção de cocaína são outros alcaloides presentes nas folhas de coca e subprodutos que resultam do processo de extração e purificação da cocaína, pela oxidação ou hidrólise dos outros alcaloides, como se pode observar na **Figura 1.8**.^[16,26] Durante a análise das amostras pode também ocorrer a termodegradação de alguns componentes levando ao aparecimento de novos alcaloides. Tendo em conta, que a variedade destes compostos e a sua

concentração relativa depende das condições em que a planta cresce, da área geográfica, do tipo de processo para obtenção da cocaína, entre outros, esta representa assim uma fonte importante de dados para *profiling*.^[11,12]

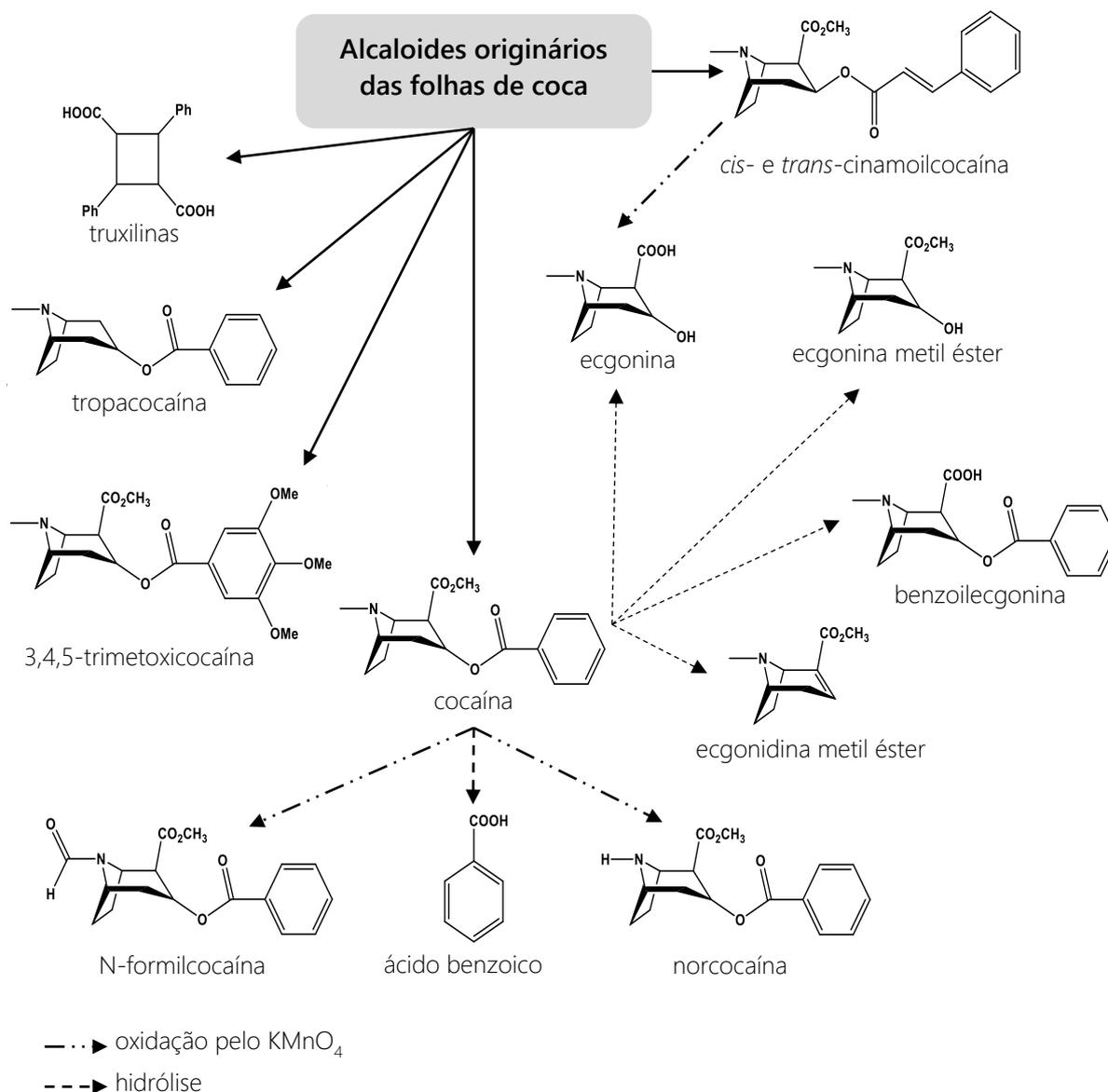


Figura 1.8 - Origem e decomposição de alguns alcaloides. Adaptado de [16,34].

A presença de truxilinas, 3,4,5-trimetoxicocaína, *cis-* (Cis) e *trans-cinamoilcocaína* (Trans) e tropacocaína (Tropa), podem ser usados como indicadores que a amostra é de origem natural. A hidrólise da cocaína durante o processo de fabrico origina ecgonina, ecgonina metil éster (EME), ácido benzoico e benzoilecgonina. A ecgonidina metil éster (EdME) é também um produto de

hidrólise, mas também pode resultar da termodegradação da cocaína ou das truxilinas, durante a análise em GC.^[21,26,28,34]

Apesar de haver etapas de purificação da cocaína que têm como objetivo a eliminação dos componentes naturais, o uso de permanganato de potássio durante estas leva à oxidação da cocaína, originando N-formilcocaína e norcocaína (Nor) e das *cis*- e *trans*-cinamoilcocaína, que produz ecgonina.^[2,26,34]

Como a *Erythroxylum* só produz o isómero levogiro da cocaína (*L*-cocaína), a existência do isómero dextrogiro da mesma (*D*-cocaína) é um indicador de que esta terá origem sintética.^[26]

Tendo em conta, que a *Erythroxylum* cresce, principalmente, em diferentes regiões da América do Sul e, devido às diferentes características destas regiões, os alcaloides vão apresentar proporções relativas diferentes, o que permite inferir acerca da sua origem geográfica. A presença ou ausência de produtos de degradação encontrados em amostras e as suas quantidades estão interligados com o tipo de métodos de produção que foram utilizados pelos laboratórios clandestinos, uma vez que o uso de determinados compostos dá origem a certos produtos de degradação. Os solventes utilizados para a dissolução e a precipitação da cocaína podem ficar ocluídos nas amostras, podendo ser detetados e fornecer dados adicionais para comparação de amostras em *profiling*. No entanto, o uso de dados dos solventes ocluídos não permite retirar conclusões acerca da origem geográfica, mas permite que haja uma distinção sobre a região onde a pasta de coca foi transformada em cloridrato de cocaína.^[2,4,35]

Para o *profiling* de cocaína podem ser utilizadas variadas técnicas analíticas, sendo a cromatografia gasosa a principal, tanto acoplada com espetrometria de massa ou com detetor de ionização em chama. Ao empregar técnicas cromatográficas, é essencial perceber que existe uma relação direta e inversa entre a pureza da amostra e a capacidade de a associar a uma área geográfica ou estabelecer ligações definitivas entre amostras. Isto deve-se ao facto da etapa de purificação e da adição de agentes de corte que, por vezes, torna mais difícil a deteção de componentes que não sejam os alcaloides principais, sendo o número de pontos de comparação reduzido. Além disso, é importante salientar uma assinatura química nas amostras de cocaína que seja confiável e discriminatória quando estamos a lidar com *profiling*.^[4,16]

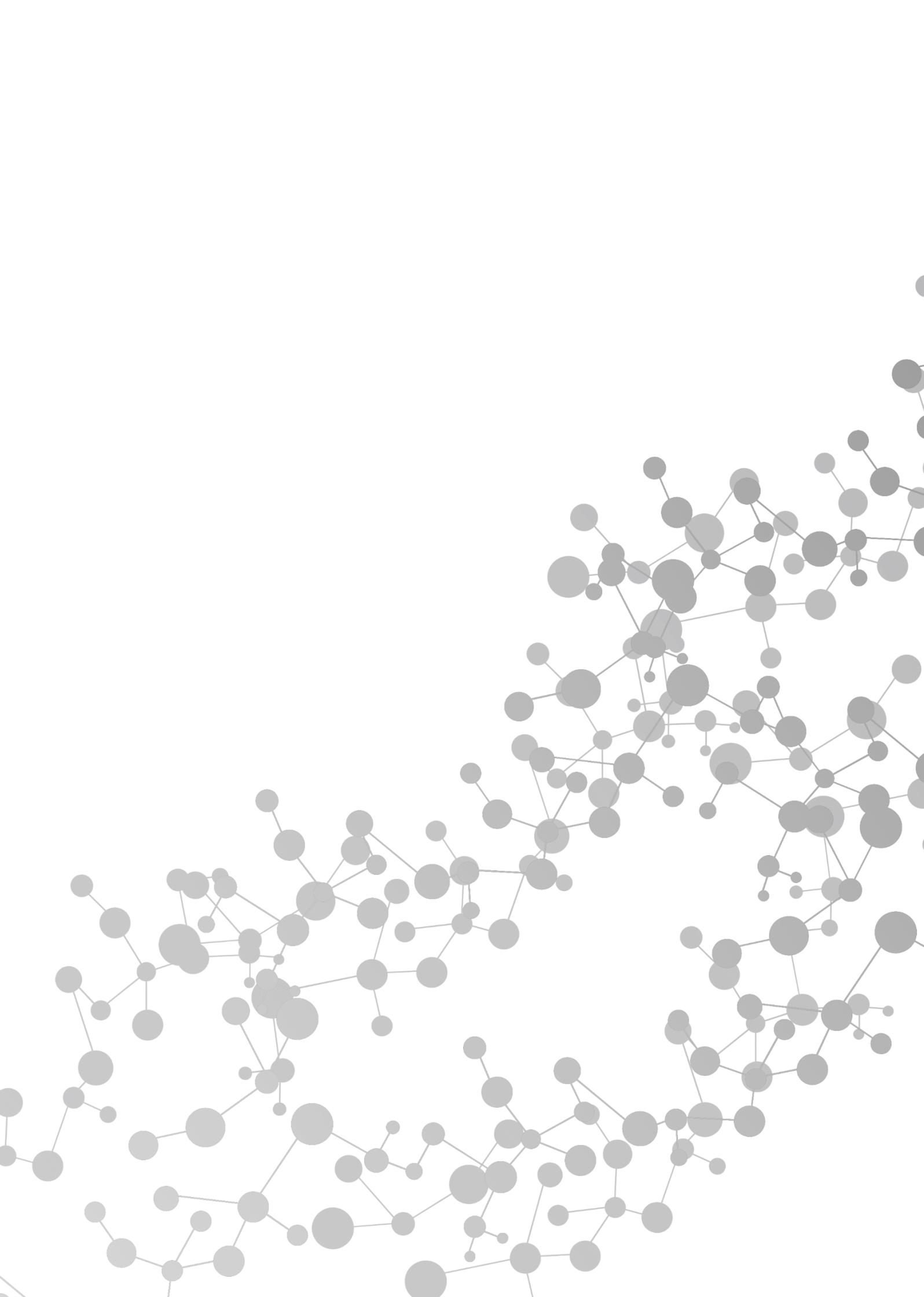
A quantificação das substâncias permite uma comparação mais rigorosa, no entanto os dados qualitativos são os usados mais frequentemente. Segundo a UNODC, a abordagem qualitativa recomendada é a normalização dos dados determinando as proporções das áreas das várias impurezas detetadas em relação à cocaína. Isto permite a obtenção de dados mais confiáveis para fins de comparação de amostras, visto que tanto os erros de quantificação como a tendência da introdução de agentes de corte são reduzidos. No entanto, vários laboratórios utilizam outro tipo de abordagem de tratamento de dados, mas também dependem do uso de proporções para a normalização de dados. Sendo assim, quando duas amostras têm proporções muito semelhantes considera-se uma possível conexão entre elas.^[4]

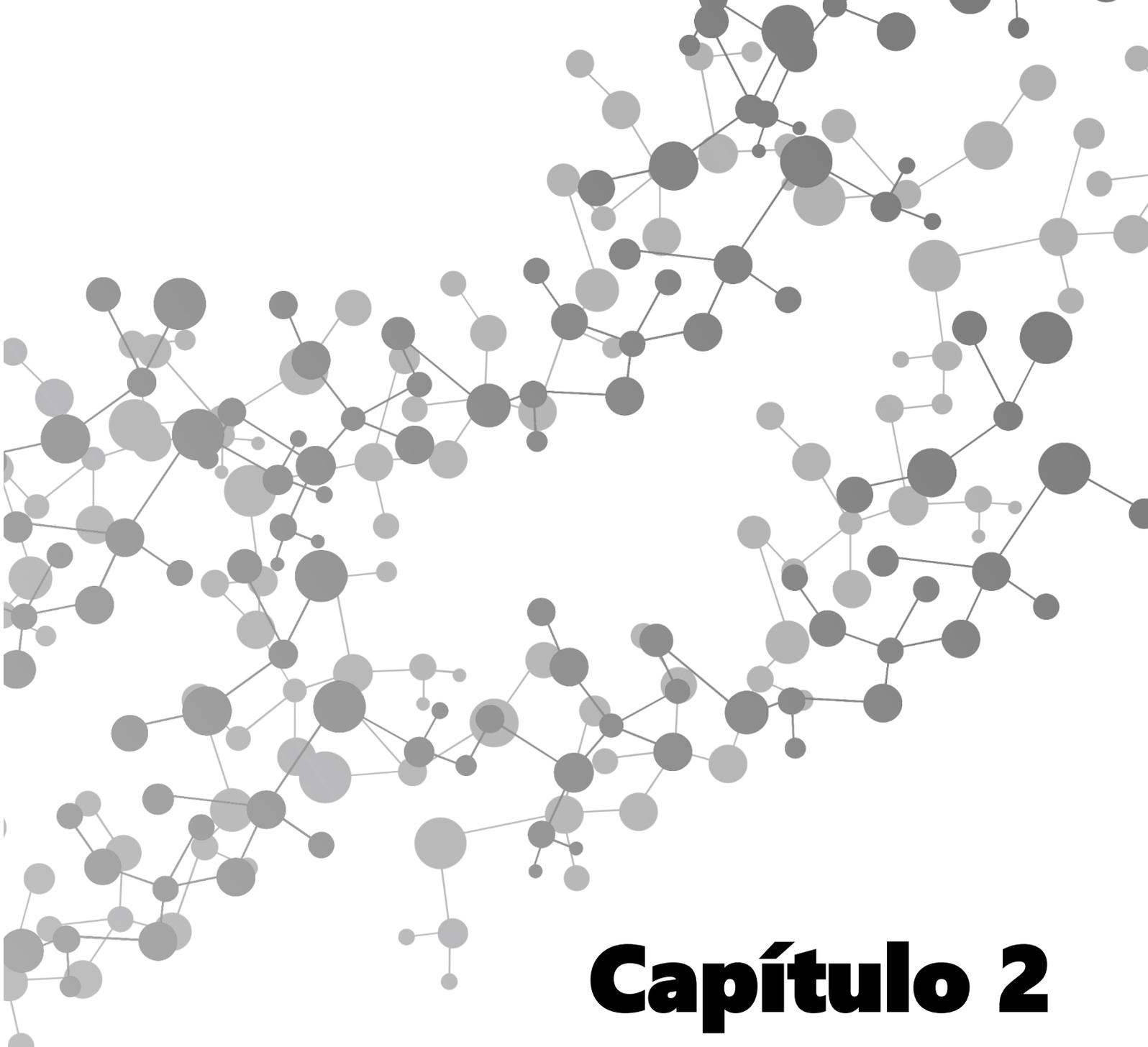
A disponibilidade de uma base de dados apropriada é muito importante, tanto a nível de comparação caso a caso, para fins probatórios, como para comparações retrospectivas, para fins de inteligência. Esta deverá ser reavaliada periodicamente de modo a que se possam identificar valores atípicos e assegurar que é adequada para os objetivos pretendidos.^[4]

1.7 Objetivos do Trabalho

Em Portugal, o LPC-PJ é a entidade responsável pela análise de todas as apreensões de droga em território nacional. Neste laboratório, em certos casos, já são realizadas análises comparativas, não existindo, porém, uma base de dados de perfis químicos que permita fazer agrupamentos de amostras baseados nas suas composições químicas. Este trabalho tem então como objetivo estabelecer um processo de comparação de amostras de cocaína baseado na especificidade da casuística do LPC-PJ.

Para a realização deste projeto a técnica utilizada para fazer o *profiling* das amostras é a GC-FID. A caracterização química das amostras por esta técnica permite a comparação e posterior agrupamento destas. Para além da realização do *profiling* e de tudo aquilo que acarreta, foram também realizados estudos de estabilidade em solução e em diferentes condições de armazenamento, de maneira a que se possam retirar conclusões acerca de como são afetados os diferentes componentes das amostras em determinadas condições e estudos de concentração.





Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Amostras e Reagentes

Todas as 298 amostras de cocaína, tanto em forma de base, como em forma de sal, foram obtidas de apreensões em território português entre 2018 e 2019. As amostras apresentam purezas entre 9,1% e 98,8%.

Na **Tabela 2.1** estão presentes os solventes e o padrão interno (PI) utilizados para a realização das análises.

Tabela 2.1 - Solventes e padrão interno utilizados nas análises.

Composto	Descrição	Fabricante	Pureza
Metanol	Solvente	Merck	-
Clorofórmio	Solvente	Merck	-
Tetracosano	Padrão Interno (PI)	Sigma-Aldrich	99%

2.2 Estudos de Concentração

De forma a perceber qual a melhor concentração a utilizar para análise das amostras, foram escolhidas 3 amostras, com purezas de 28 % (pureza baixa), 57,6 % (pureza intermédia) e 90,9 % (pureza alta). As concentrações escolhidas para este estudo foram de 1 mg/ml, 3 mg/ml e 6 mg/ml.

2.3 Preparação das Amostras

Foram pesadas cerca de 15 mg de cada uma das amostras, e posteriormente foram dissolvidas em 4 ml de uma mistura de clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Por fim foi adicionado 1 ml de tetracosano, como padrão interno (0,5 mg/ml em clorofórmio).

2.4 Instrumentação

Todas as amostras foram analisadas num instrumento de cromatografia gasosa Agilent Technologies 7890B com FID e equipado com um sistema split/splitless. O Hélio foi o gás de arraste usado, a uma pressão de 15 psi, e foi utilizada uma coluna HP-5 (30 m x 320 μ m x 0,25 μ m). A temperatura do injetor e do detetor foram de 280 °C e 300 °C, respetivamente, o volume de injeção foi 1 μ l e com uma razão de split 40:1. O forno teve o seguinte programa de temperatura: 150 °C durante 1 min, seguido por uma rampa de aquecimento de 12 °C/min até atingir 270 °C, mantendo esta temperatura durante 8 min.

2.5 Estudos de Estabilidade em Solução

Com o objetivo de estudar a estabilidade dos compostos em solução foram escolhidas 6 amostras. Estas foram analisadas durante 4 dias seguidos e 15 dias após a primeira análise.

2.6 Estudos de Estabilidade em Diferentes Condições de Armazenamento

De modo a perceber a estabilidade das amostras em diferentes condições de armazenamento e a forma como estas afetam a capacidade de comparação entre elas, foram selecionadas 8 amostras que foram acondicionadas no laboratório e no cofre, em papel e plástico, mimetizando as condições a que as amostras estão normalmente expostas na rotina do laboratório. Os locais de armazenamento foram escolhidos devido às suas diferenças de humidade e de temperatura. As amostras foram analisadas antes de serem armazenadas e mensalmente, durante 6 meses.

Na **Tabela 2.2** está presente um resumo das condições de armazenamento das amostras.

Tabela 2.2 - Condições de armazenamento das amostras.

Local de Acondicionamento	Forma de Acondicionamento
Cofre (C)	Papel (PP)
	Plástico (PL)
Laboratório (L)	Papel (PP)
	Plástico (PL)

2.7 Análise de Agrupamentos Hierárquica

A análise de agrupamentos hierárquica é um método que permite agrupar as amostras através de um processo iterativo que dissocia (métodos divisivos) ou associa (métodos aglomerativos) amostra por amostra, sendo interrompido após o processamento de todas as amostras. Os métodos aglomerativos começam com as amostras separadas, uma em cada grupo, sendo posteriormente feita uma combinação sequencial que promove a redução do número de grupos até todas as amostras se encontrarem num só agrupamento. Em contraste, nos métodos divisivos todas as amostras pertencem inicialmente ao mesmo grupo e, progressivamente, procede-se a uma divisão em grupos menores até que exista apenas uma amostra por grupo. O objetivo principal da HCA é a atribuição de um conjunto de amostras a diferentes grupos, em que amostras pertencentes ao

mesmo grupo possuam uma melhor semelhança entre si do que amostras que pertençam a grupos diferentes, ou seja, exista homogeneidade dentro dos grupos, mas heterogeneidade entre grupos. Tal facilita o entendimento das relações entre amostras em grandes coleções de dados.^[36-39]

Na HCA é necessário escolher o tipo de medida de similaridade entre amostras a ser utilizada, assim como, o tipo de ligação. Primeiramente, é necessário construir a matriz de similaridade, sendo a distância euclidiana e o coeficiente de correlação as medidas de similaridade mais vulgares, porém outras medidas podem ser utilizadas. De seguida, é necessário fazer o agrupamento dos elementos e as definições de ligação mais utilizadas são a ligação completa (*complete linkage*), a ligação simples (*single linkage*), a ligação média (*average linkage*), o método do centróide (*centroid*) e a ligação de Ward.^[38]

Após o estabelecimento da medida de similaridade e do método de ligação, o agrupamento das amostras e agrupamentos menores segue a ordem de maior semelhança. Este método conduz a um dendrograma, em que cada nível de associação representa um desdobramento do conjunto de dados num número específico de grupos e é útil na visualização de similaridades entre amostras. Para um número inicial de N amostras, existem, naturalmente, N-1 passos de associação.^[38,40]

Neste trabalho, a medida de similaridade utilizada para a construção dos dendrogramas foi a distância euclidiana e o método de ligação foi o método de Ward, sendo os diferentes alcaloides o conjunto de variáveis utilizado. Para a construção do dendrograma foi utilizado o software RStudio.

A distância euclidiana define matematicamente de forma mais fácil e intuitiva a similaridade entre duas amostras. Considerando, duas amostras A e B, a distância euclidiana é dada por:

$$d(A, B) = \sqrt{|x_{A1} - x_{B1}|^2 + |x_{A2} - x_{B2}|^2 + \dots + |x_{An} - x_{Bn}|^2} \quad (2.1)$$

O método de Ward, contrariamente aos outros algoritmos de ligação mencionados anteriormente, não utiliza diretamente distâncias ou medidas de associação, em alternativa considera a análise de grupos como um problema de análise de variância. Este método é utilizado nos métodos aglomerativos e, portanto, começa com N grupos de tamanho 1 continuando até que todas as amostras pertençam a apenas um grupo.

A primeira etapa desta associação, consiste na formação de (N-1) grupos, um de tamanho 2 e os restantes de tamanho 1, sendo então a soma dos quadrados e os valores de R² calculados

computacionalmente. O primeiro grupo formado será aquele em que o par de amostras corresponde ao menor erro da soma dos quadrados e ao maior valor de R^2 . Em todas as etapas subsequentes é executado o mesmo procedimento e o algoritmo para quando todas as amostras são combinadas num grupo só. Em suma, em cada etapa as amostras são agrupadas de forma a minimizar o erro da soma dos quadrados e a maximizar o valor de R^2 .^[39,41]

O erro da soma dos quadrados (ESS, do inglês *Error Sum of Square*), o total da soma dos quadrados (TSS, do inglês *Total Sum of Squares*) e o R^2 , são dados por:

$$ESS = \sum_i \sum_j \sum_k (x_{ijk} - \bar{x}_{i,k})^2 \quad (2.2)$$

$$TSS = \sum_i \sum_j \sum_k (x_{ijk} - \bar{x}_{.,k})^2 \quad (2.3)$$

$$R^2 = \frac{TSS-ESS}{TSS} \quad (2.4)$$

2.8 Análise de Componentes Principais

Quando estamos perante um grande conjunto de dados, a sua representação visual permite uma abordagem mais intuitiva para examinar as respetivas tendências. Tal implica uma redução de dimensionalidade, útil sob variados aspetos. Esta redução é frequentemente aplicada sobre dados obtidos a partir de técnicas analíticas.^[40]

A PCA, a abordagem mais popular para levar a cabo a mencionada redução, é um método que expõe melhor as tendências de agrupamentos de dados, e que evita a perda de informações úteis, ou seja, preserva o máximo de variação possível. Neste método as variáveis existentes, os alcaloides presentes nas amostras, são convertidas num menor número de novas variáveis, que resultam de uma combinação linear das medidas originais. As novas variáveis são chamadas de componentes principais (PC, do inglês *Principal Component*), estas resumem as semelhanças entre amostras de dados e entre variáveis, e respondem pela maior parte da variabilidade dos dados. Por isso, permitem a descrição das amostras com um menor número de variáveis do que as que originalmente presentes, de modo a que as primeiras PC's retenham a maioria da variação presente em todas as variáveis originais. Assim sendo, a transformação nas novas variáveis é definida de maneira a que a primeira componente principal seja responsável pela maior variabilidade dos dados e cada componente subsequente é ortogonal à anterior e responsável pela maior variabilidade remanescente.^[40,42-44]

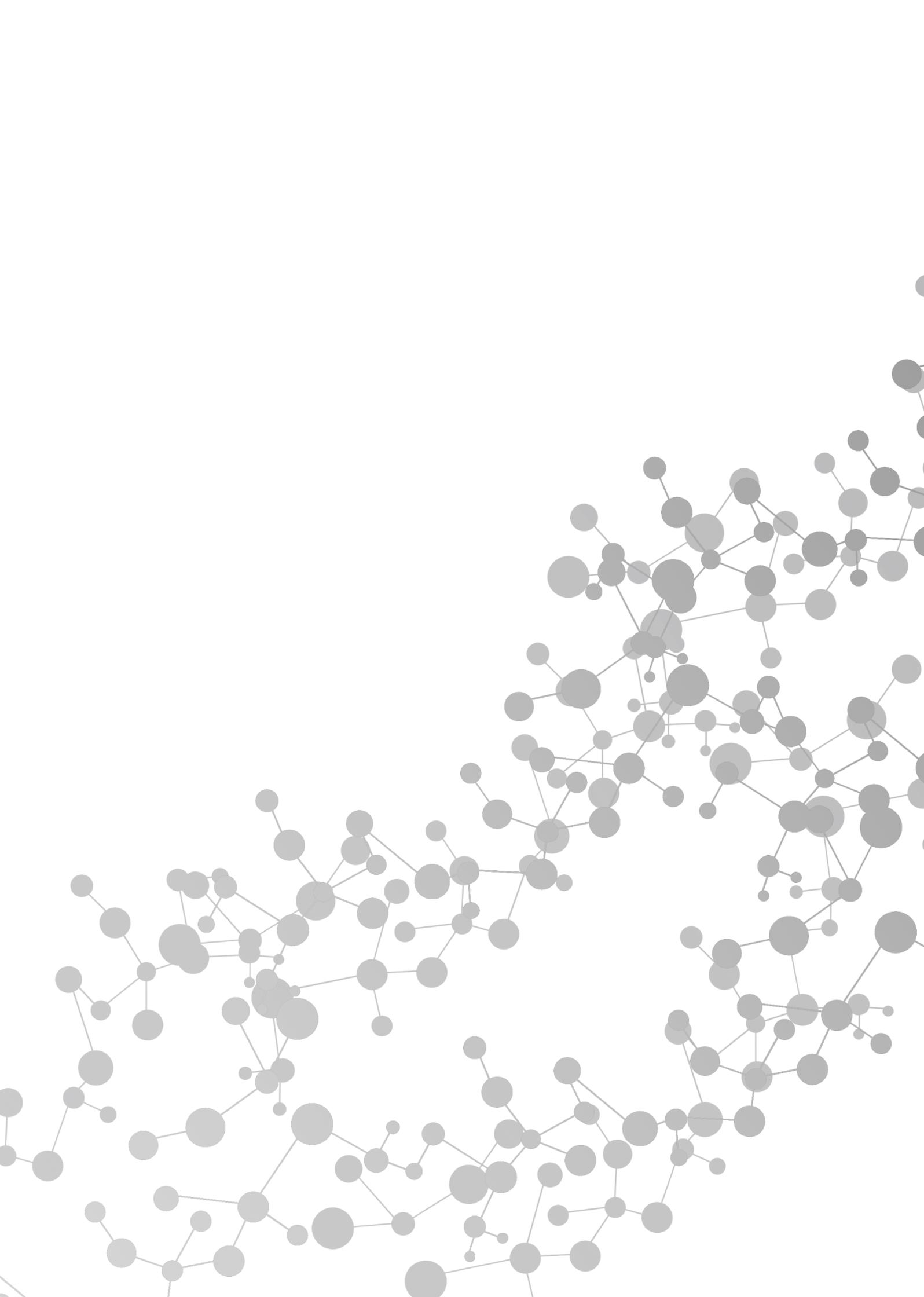
Na representação do PCA, os eixos escolhidos são as duas primeiras componentes principais, visto que são as que contêm a maior variação do conjunto de dados e, por consequência, as que explicam melhor o sistema. Assim, o primeiro eixo corresponde à primeira PC e o segundo eixo à segunda PC. No novo sistema de referências as coordenadas das amostras são denominadas *scores*, permitindo a detecção de possíveis grupos, e a correlação entre as variáveis e as componentes principais, ou seja o peso das variáveis originais em cada PC, são denominados de *loadings*.^[42,44]

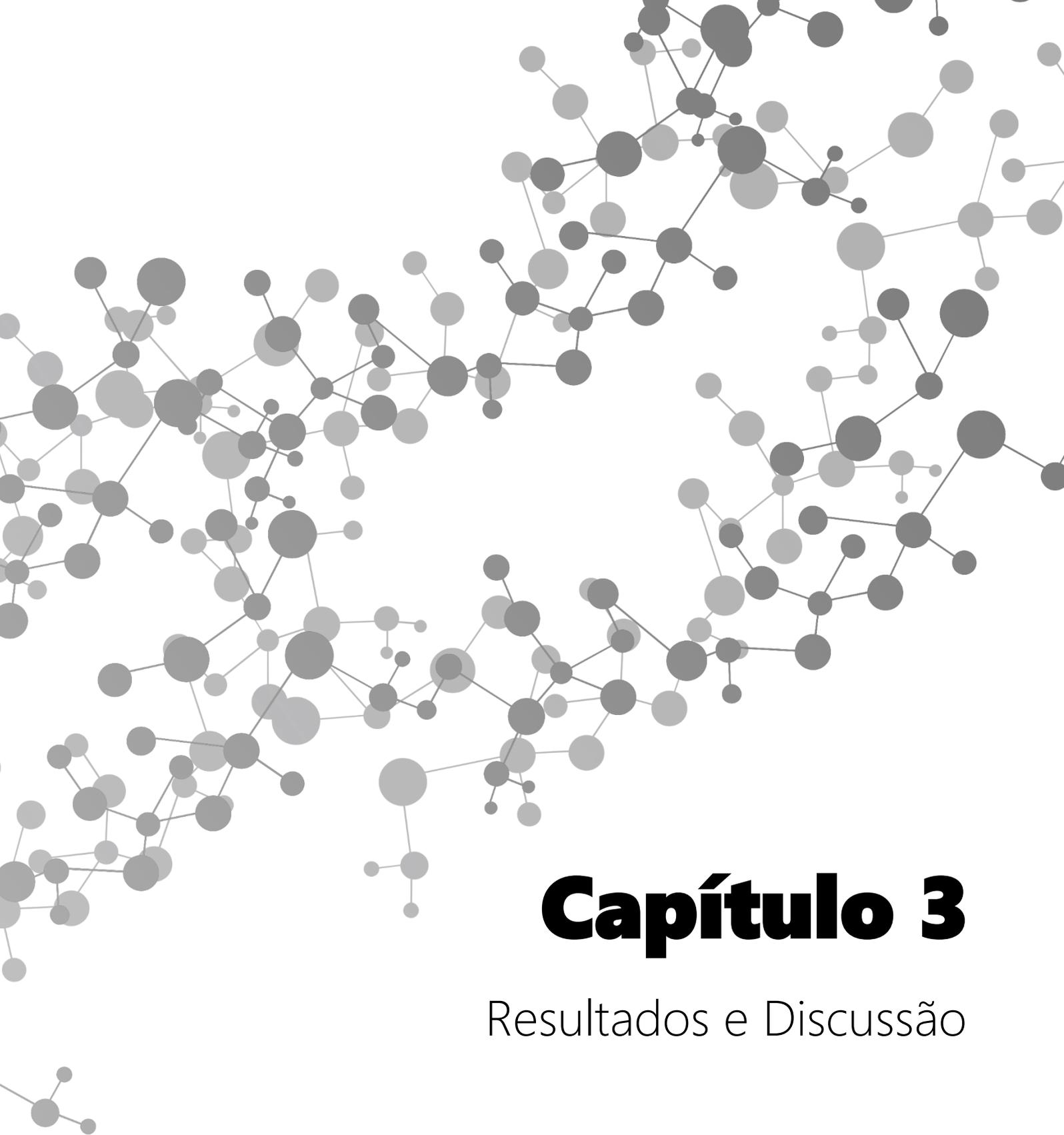
Para o cálculo da PCA podem ser usadas a matriz de correlação ou a matriz de covariâncias, e no decorrer deste trabalho ambas foram utilizadas. Para a representação visual de grupos, e por simplicidade, foi usado o algoritmo CLARA (do inglês, *Clustering for LARge Applications*).^[44]

O CLARA é baseado no algoritmo dos *K-medoids* ou PAM (do inglês, *Partitioning Around Medoids*). Este foi desenvolvido com especial intuito de ser aplicado a grandes conjuntos de dados, pois o PAM não é prático para grandes aplicações.

A formação de grupos de um conjunto de objetos com o CLARA é feita em duas etapas. Em primeiro lugar, uma pequena amostra dos dados é escolhida, aleatoriamente, como representante de todos os dados e agrupada em K subconjuntos usando o PAM para encontrar os K objetos representativos, ou seja, os *K-medoids*. De seguida, cada objeto que não pertence à amostra é atribuído ao *medoid* representativo mais próximo. Se a amostra for representativa do conjunto de dados original, os *medoids* representativos encontrados estarão próximos dos de todo o conjunto. De modo, a melhorar a qualidade do agrupamento, o CLARA faz várias amostragens aleatórias, aplicando o PAM, com o objetivo de gerar o melhor agrupamento.^[45,46]

O software escolhido para a realização das PCA foi o RStudio.





Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Identificação e Escolha dos Alcaloides

O principal foco, relativamente ao *profiling* de amostras de cocaína, está na escolha dos compostos para a realização dos perfis químicos para posterior comparação das amostras. No entanto, como já referido no Capítulo 1, as amostras de cocaína contêm muitos compostos, maioritariamente alcaloides que são coextraídos juntamente com a cocaína e também outros resultantes da produção desta, formados pela hidrólise e oxidação dos alcaloides. Podem também ser detetados compostos formados pela termodegradação dos alcaloides durante o processo de análise das amostras.

Com o objetivo de se perceber quais os melhores alcaloides para a realização do *profiling* de amostras de cocaína, foi feita uma análise dos cromatogramas de GC-MS provenientes de análises efetuadas anteriormente pelo LPC-PJ, com o objetivo de se perceber quais os alcaloides com maior frequência nas amostras analisadas. Tendo em conta a casuística do LPC-PJ, os alcaloides escolhidos foram a EdME, a EME, a Tropa, a Nor, a Cis e a Trans.

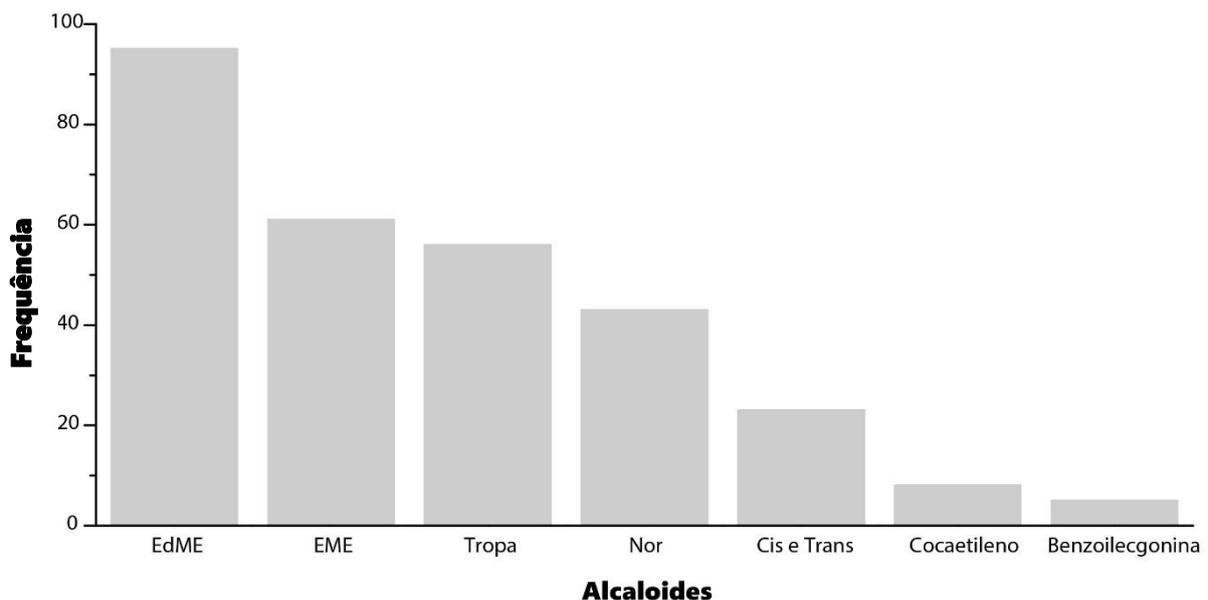


Figura 3.1 - Alcaloides mais frequentes nas amostras de cocaína do LPC-PJ.

Devido à falta de padrões dos alcaloides escolhidos, a identificação destes foi feita por GC-MS, usando tempos de retenção relativos (TRR), relativamente ao PI. Para a obtenção dos TRR foi preparada e analisada uma amostra, tendo sido analisada por GC-MS e GC-FID. Na **Tabela 3.1**, estão presentes os tempos de retenção (TR) e os TRR dos alcaloides escolhidos.

Tabela 3.1 - TR e TRR, relativamente ao PI, dos alcaloides escolhidos, em GC-MS e GC-FID.

	EdME	EME	Tropa	Nor	Coca	PI	Cis	Trans
TR (GC-MS)	2,886	3,504	7,490	9,315	9,594	10,562	11,005	12,007
TRR (GC-MS)	0,27	0,33	0,71	0,88	0,91	1	1,04	1,14
TR (GC-FID)	2,921	3,484	7,151	8,784	9,074	10,008	10,383	11,255
TRR (GC-FID)	0,29	0,35	0,71	0,88	0,91	1	1,04	1,12

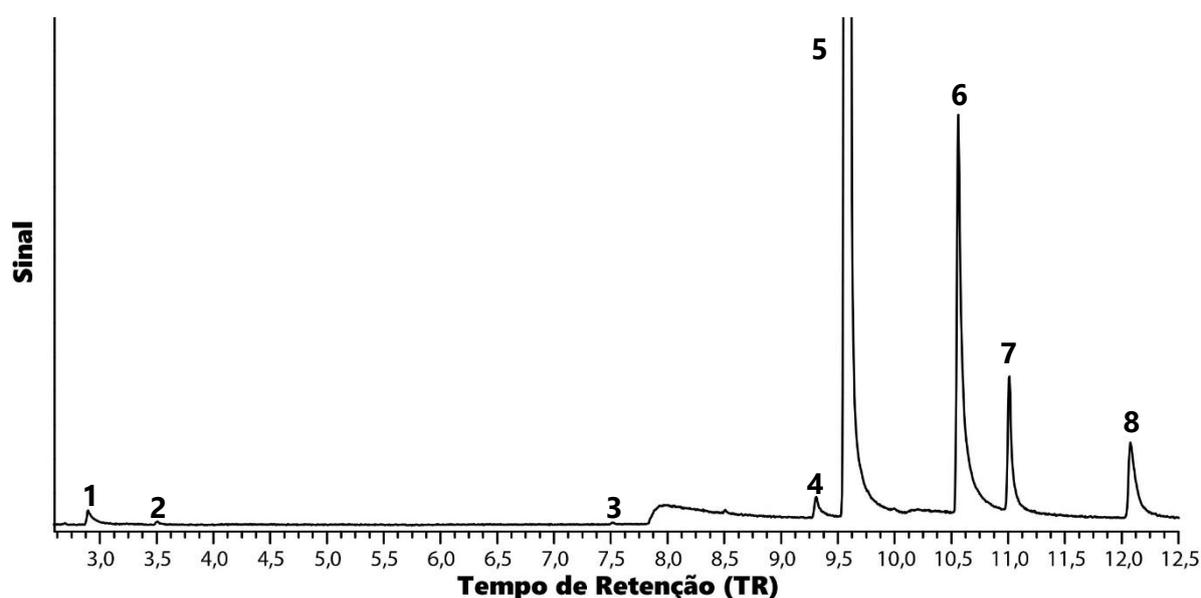


Figura 3.2 - Cromatograma de uma amostra de cocaína em GC-MS e identificação dos picos dos alcaloides escolhidos, EdME (1), EME (2), Tropa (3), Nor (4), Cis (7) e Trans (8), da Coca (5) e do PI (6).

3.2 Estudos de Concentração

Neste trabalho, primeiramente, foram realizados estudos de concentração, para que fosse possível perceber qual a melhor concentração a usar nas restantes análises feitas. Deste modo, as amostras A36, A78 e A80, com purezas de 90,9%, 28% e 57,6%, respetivamente, foram escolhidas para serem analisadas. Esta escolha foi efetuada de acordo com a pureza das mesmas, visto que esta influencia a visualização e tamanho dos picos cromatográficos relativos aos alcaloides presentes nas amostras. Foram escolhidas as concentrações de 1 mg/ml, 3 mg/ml e 6 mg/ml para análise das amostras. A concentração usada juntamente com a pureza das amostras vai permitir perceber qual a melhor concentração a utilizar nas análises de *profiling*, sem que seja necessária uma determinação prévia do grau de pureza.

Para que a escolha seja a mais adequada é necessário ter em consideração por um lado a possibilidade de saturação do detetor, por parte da cocaína e dos adulterantes utilizados, e por outro se a concentração é suficiente para a visualização de todos os picos relevantes, mesmo nas amostras com purezas mais baixas.

Nas Figuras 3.3-3.5, podemos observar os diferentes picos dos alcaloides considerando as diferentes concentrações.

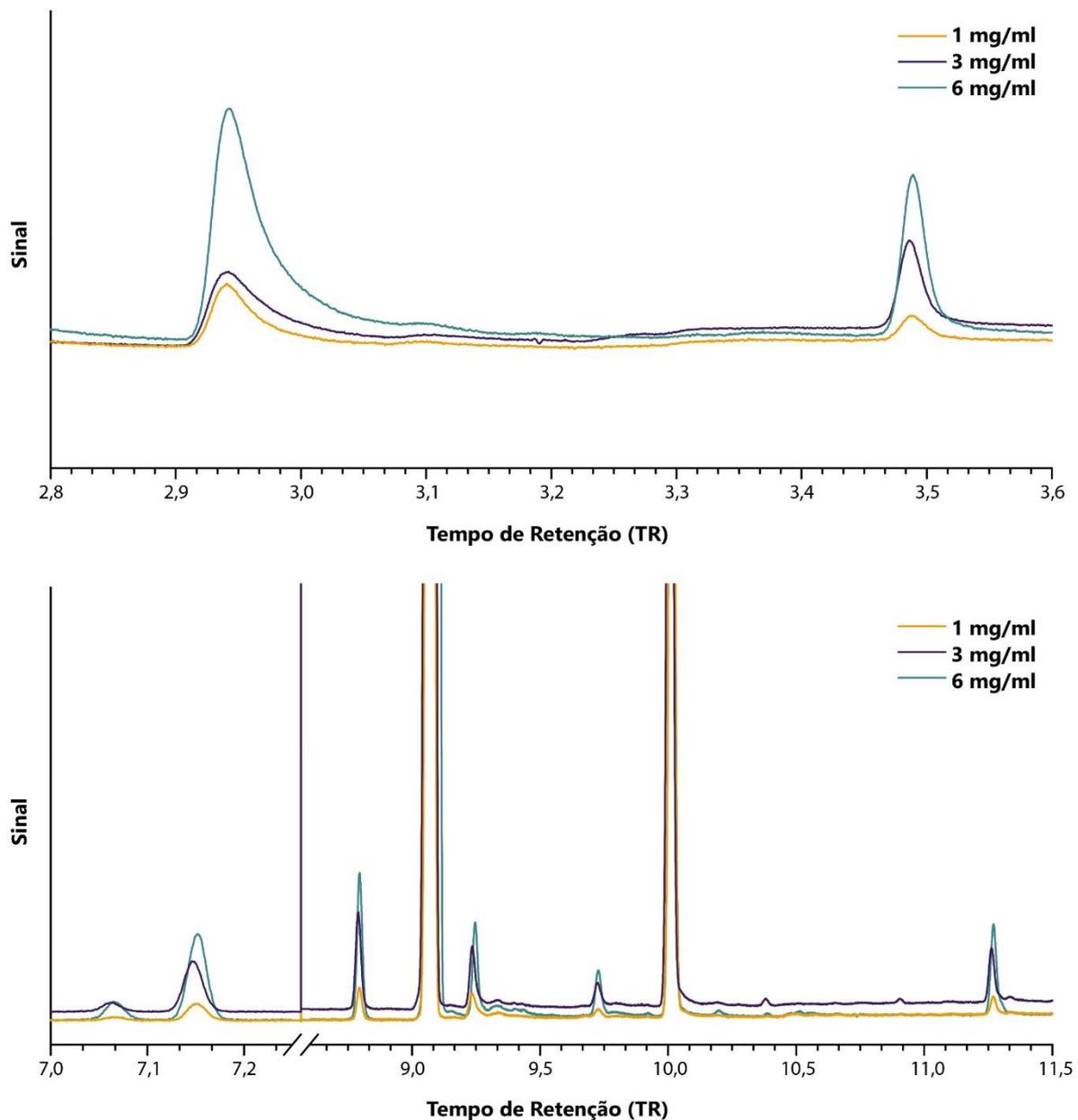


Figura 3.3 - Cromatograma da amostra A36, obtido por GC-FID.

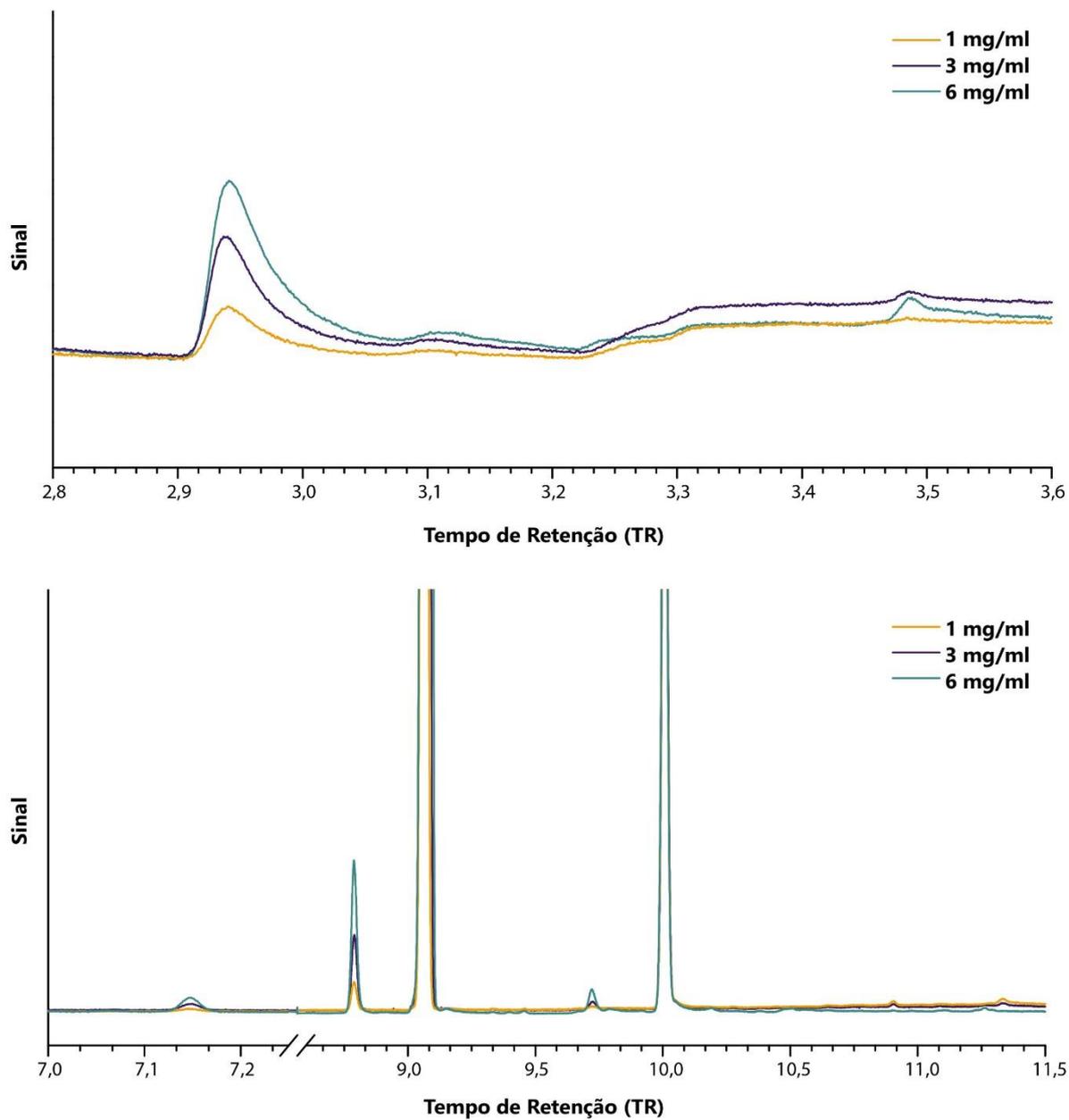


Figura 3.4 - Cromatograma da amostra A80, obtido por GC-FID.

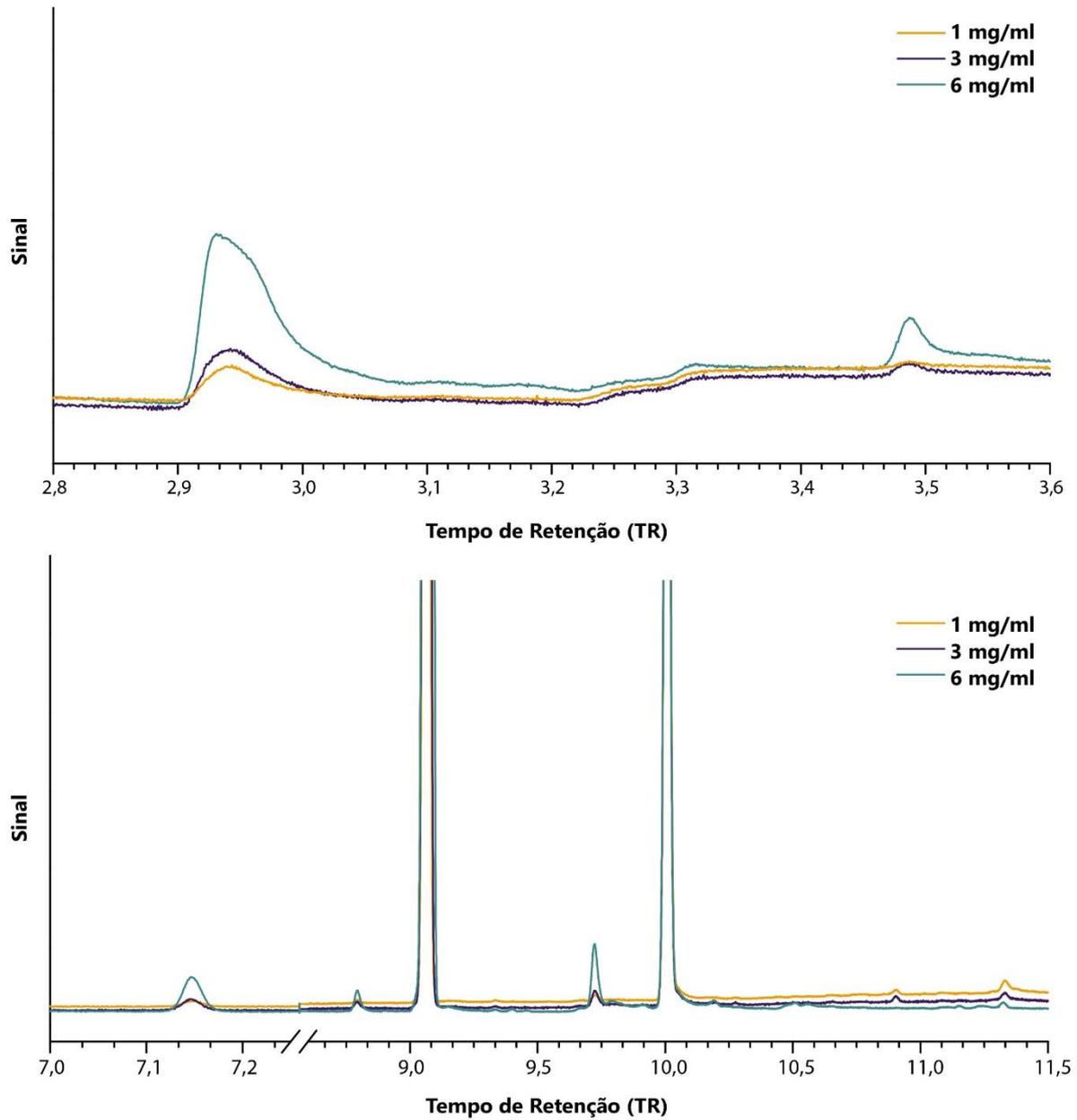


Figura 3.5 - Cromatograma da amostra A78, obtido por GC-FID.

No caso da amostra A36, todos os picos correspondentes aos alcaloides escolhidos para a realização deste trabalho são visíveis em todas as concentrações. No entanto, nas amostras com menor pureza, A80 e A78, existem picos que começam a deixar de ser visíveis, quando as amostras apresentam uma concentração de 1 mg/ml.

Assim sendo, a análise de amostras a uma concentração de 1 mg/ml não é a ideal. Desta forma, as concentrações de trabalho a considerar deverão ser as de 3 mg/ml e 6 mg/ml. Tendo em conta que em amostras mais puras poderá ocorrer a saturação do detetor, levando a uma alteração dos picos cromatográficos, concentrações mais altas não são desejadas. Por isso, a concentração ideal para realização de análises será de 3 mg/ml, pois não há risco de saturação do detetor. Como existe também a possibilidade da quantidade de material apreendido a analisar ser muito pequena, concentrações mais baixas serão ideias, visto que não é necessária tanta quantidade de material para a preparação de amostras para análise. Esta concentração encontra-se também no intervalo utilizado nas análises de rotina do LPC-PJ.

3.3 Estudo de Estabilidade em Solução

A análise das amostras é feita por GC-FID e este está equipado com um *autosampler*, o que permite o fornecimento automático das amostras para análise. Dependendo do número de amostras a analisar, estas podem ficar durante horas em solução até serem finalmente analisadas. Por este motivo, foi testada a estabilidade dos alcaloides em solução. A estabilidade destes foi testada durante 4 dias seguidos e passado 11 dias após a última análise.

Para testes de estabilidade, considera-se que o sistema é estável quando os resultados obtidos em diferentes intervalos de tempo, não excedam uma diferença entre $\pm 20\%$ do valor inicial.^[47] Então, os critérios de aceitação de estabilidade deste estudo foram instituídos tendo por base a diferença de $\pm 20\%$, relativamente ao dia 0.

Os resultados relativos aos diversos alcaloides estão apresentados nas **Figuras 3.6-3.11**. As figuras apresentam os valores da amostra A137, estando os restantes em anexo (**Tabelas A1-A5**).

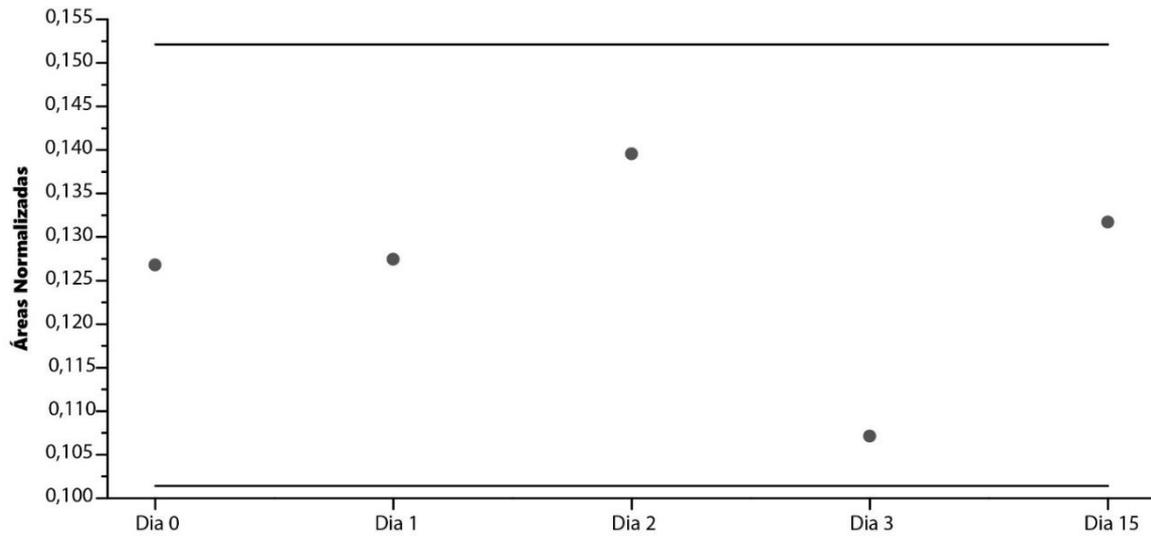


Figura 3.6 - Estabilidade em solução da Ecgonidina Metil Éster.

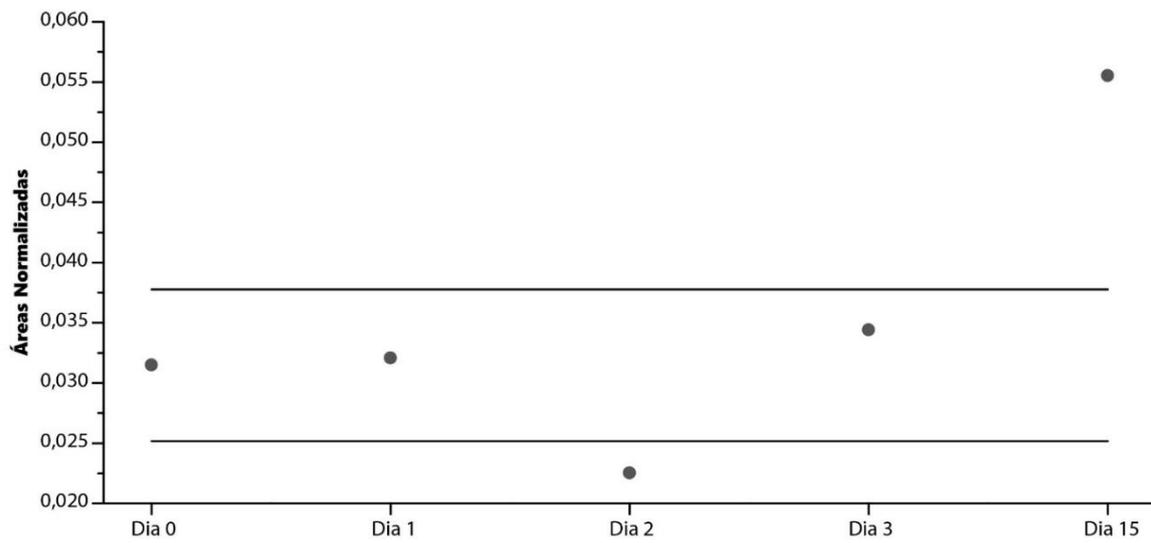


Figura 3.7 - Estabilidade em solução da Ecgonina Metil Éster.

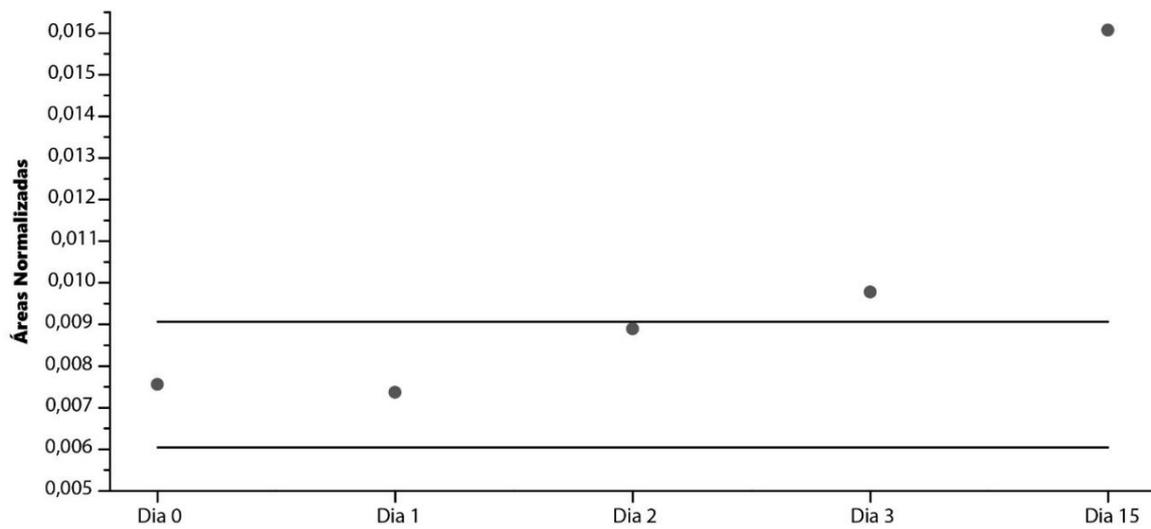


Figura 3.8 - Estabilidade em solução da Tropicocaína.

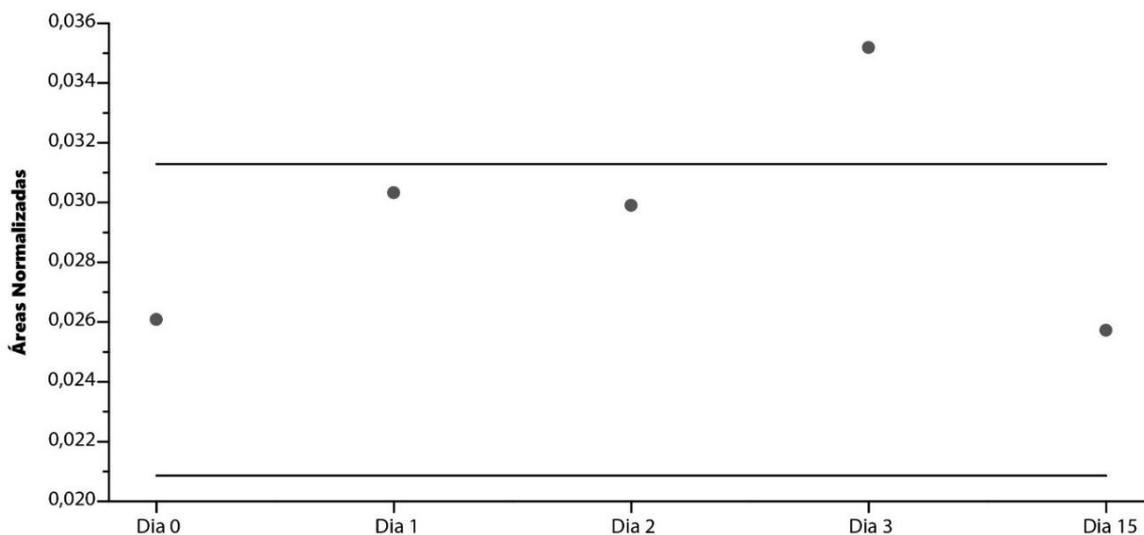


Figura 3.9 - Estabilidade em solução da Norcoocaína.

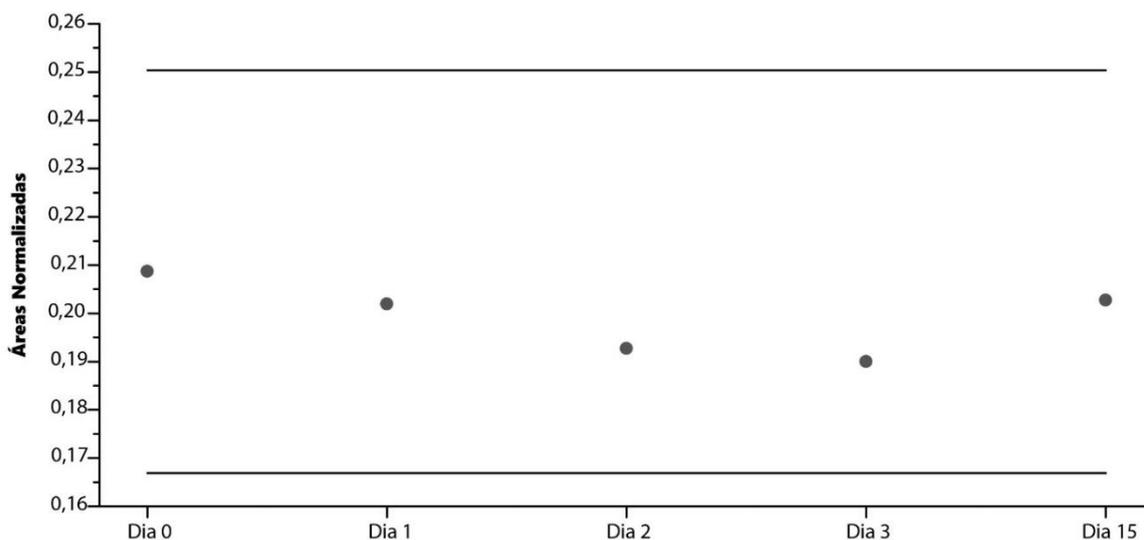


Figura 3.10 - Estabilidade em solução da Cis-Cinamoilcoocaína.

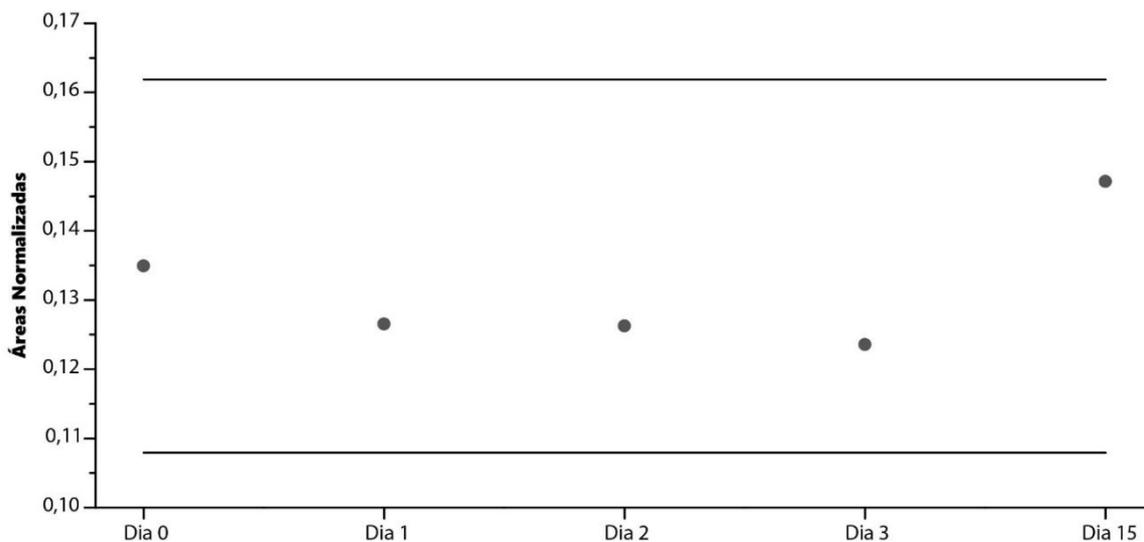


Figura 3.11 - Estabilidade em solução da Trans-Cinamoilcoocaína.

Verificamos, através das **Figuras 3.6-3.11**, que os alcaloides EdME, Nor, Cis e Trans são estáveis até ao dia 15. Enquanto, a EME é só estável até ao dia 3 e a Tropa até ao dia 2. Apesar, de no dia 2, para a EME, e no dia 3, para a Nor, os valores saírem do intervalo de $\pm 20\%$, relativamente ao dia 0, estas consideram-se estáveis para os dias subsequentes, visto que os valores correspondentes a esses dias voltam a cair no intervalo.

Considerando que o intervalo de tempo até a análise das amostras raramente supera as 24h, e os alcaloides são todos estáveis neste intervalo de tempo não existe nenhum inconveniente para o *profiling* de amostras de cocaína.

3.4 Estudo de Estabilidade em Diferentes Condições de Armazenamento

As amostras de drogas apreendidas podem ser acondicionadas em diferentes locais e de formas diferentes, fazendo com que o ambiente não seja controlado e, por isso, as amostras estão expostas a diferentes variações de humidade e temperatura. Tais variações podem levar à alteração dos teores de alcaloides presentes nas amostras e, por conseguinte, é necessário fazerem-se estudos de estabilidade em diferentes condições de armazenamento. Por isso, a estabilidade dos alcaloides foi testada durante 6 meses.

Os critérios de aceitação de estabilidade instituídos neste estudo foram os mesmos utilizados para o estudo de estabilidade em solução. Então, caso os alcaloides não excedam uma diferença entre $\pm 20\%$, relativamente ao mês 0, estes são considerados estáveis.

Os resultados relativos aos diversos alcaloides estão apresentados nas **Figuras 3.12-3.17**. As figuras apresentadas, tal como no ponto 3.4, apresentam os valores da amostra A137, estando os restantes em anexo (**Tabelas A6-A33**).

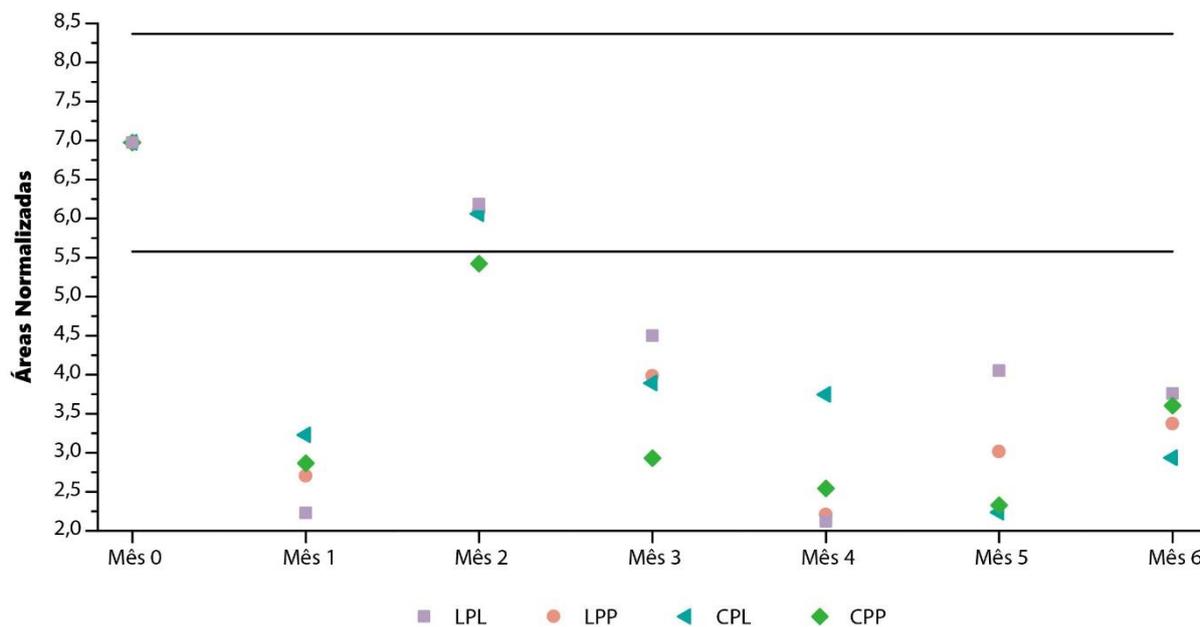


Figura 3.12 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Ecgonidina Metil Éster.

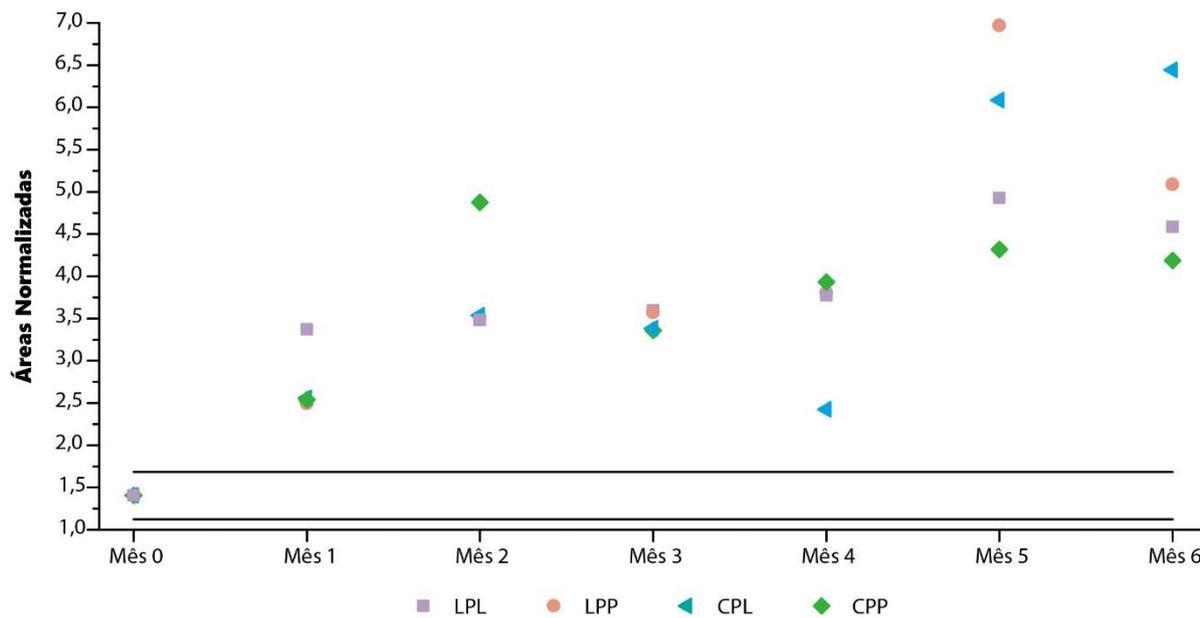


Figura 3.13 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Ecgonina Metil Éster.

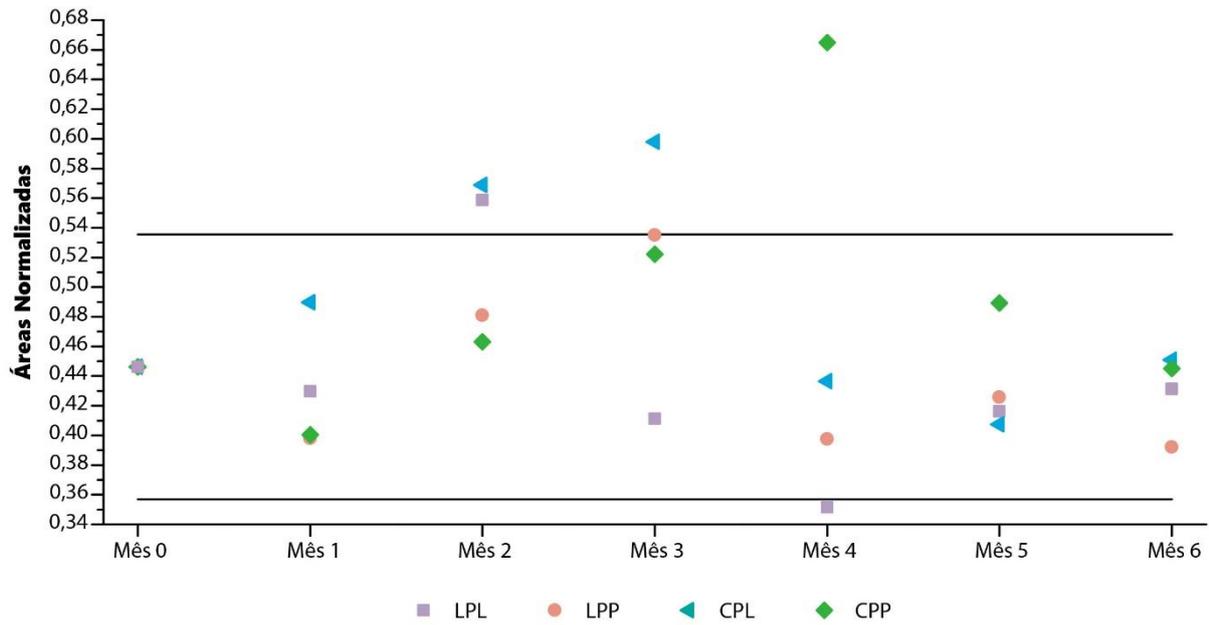


Figura 3.14 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Tropacocaina.

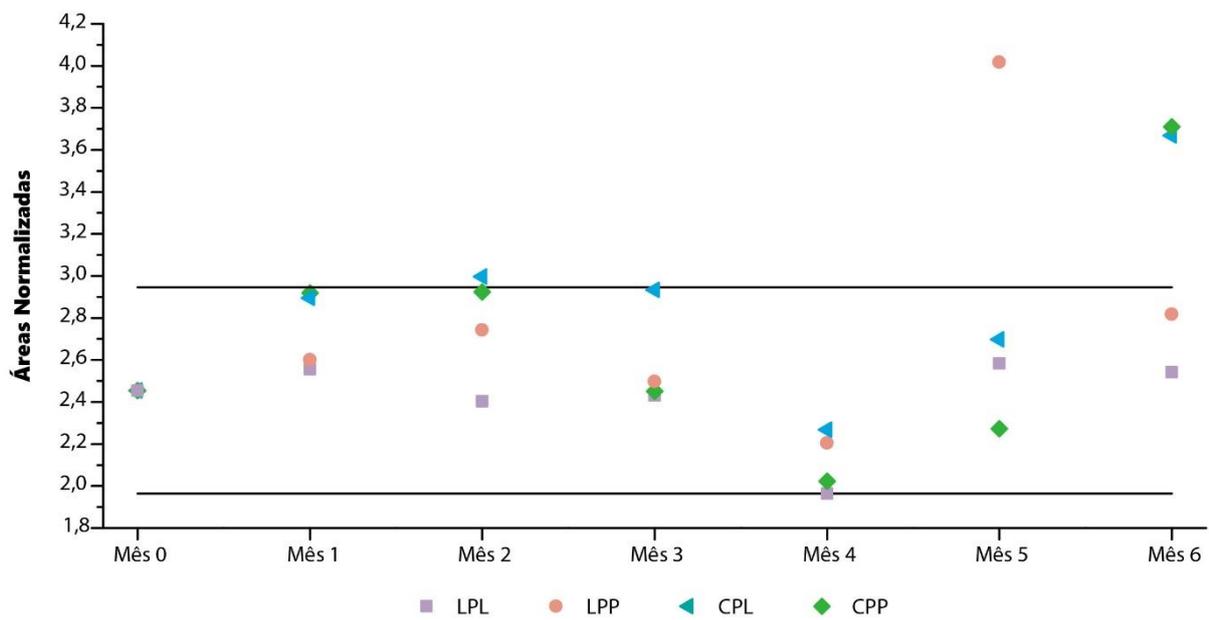


Figura 3.15 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Norcocaina.

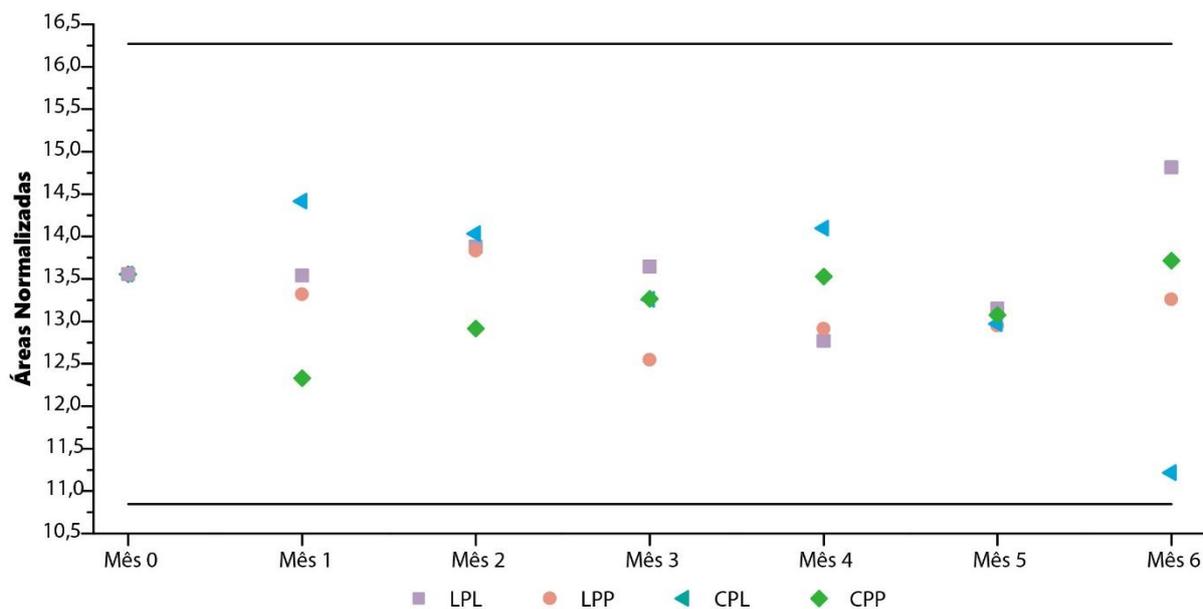


Figura 3.16 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Cis-Cinamoilcofaina.

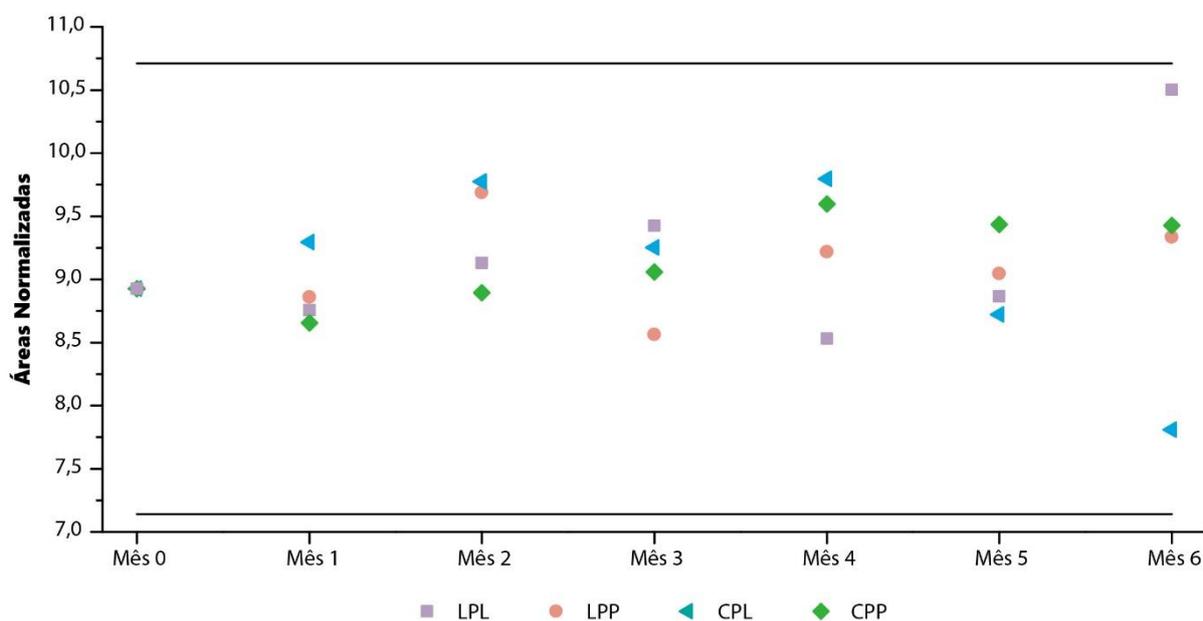


Figura 3.17 - Estabilidade em diferentes condições de armazenamento da Trans-Cinamoilcofaina.

Pela análise das Figuras 3.12-3.17, podemos retirar conclusões acerca da estabilidade dos alcaloides em diferentes condições de armazenamento. Os alcaloides Cis, Trans e Tropa são estáveis durante 6 meses em todas as condições, contrariamente à EME que não é estável em nenhuma. A EdME e a Nor possuem diferentes estabilidades em diferentes condições. Enquanto a EdME é estável durante 2 meses nas condições CPL, LPL e LPP e durante 1 mês na condição CPP, a Nor é estável durante 6 meses em LPL e LPP e 5 meses em CPL e CPP.

Apesar de existirem alcaloides que são estáveis durante os 6 meses, há alguns que não chegam a ser estáveis no primeiro mês, existindo assim muitas variações de estabilidade. Estas variações podem ser explicadas pelos erros de propagação associados ao processo de preparação das amostras que não estão a ser considerados, como erros de pesagem ou erros na medição de solventes. No entanto, uma questão pode-se colocar, mesmo não existindo estabilidade dos alcaloides se as amostras continuam a ser viáveis para comparação num prazo de 6 meses. Para se responder a esta questão fez-se uma comparação, calculando-se o coeficiente de correlação, entre os valores obtidos no mês 0 e no mês 6, para cada condição diferente.

Os valores do coeficiente de correlação de Pearson (ρ) relativos às diferentes comparações estão presentes na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores de ρ relativos à comparação entre o mês 0 e 6.

	LPL	LPP	CPL	CPP
ρ	0,963	0,957	0,919	0,964

Para a compreensão da relevância dos valores obtidos é necessário compará-los com um valor crítico, retirado a partir da tabela de correlação de Pearson para 4 graus de liberdade e $\alpha=0,5$. Este valor é usado como critério para se perceber se duas amostras estão ou não relacionadas. Se os valores de correlação de Pearson apresentarem valores superiores ao valor crítico, as amostras consideram-se relacionadas com 95% de certeza. Neste caso, o valor crítico é 0,811, e como todos os valores obtidos para as diferentes condições de armazenamento são maiores, as amostras do mês 6 estão relacionadas com a do mês 0. Assim, concluímos que apesar de não haver estabilidade de alguns alcaloides, é possível estabelecer uma conexão entre as amostras.

3.5 Visão Geral das Amostras

Para se perceber a variação das áreas dos picos dos alcaloides, foram registados os valores máximo e mínimo, a média e a mediana de cada pico, após normalização. Na **Tabela 3.3**, estão apresentados todos os valores registados e na **Figura 3.18**, está representada a média de todos os alcaloides.

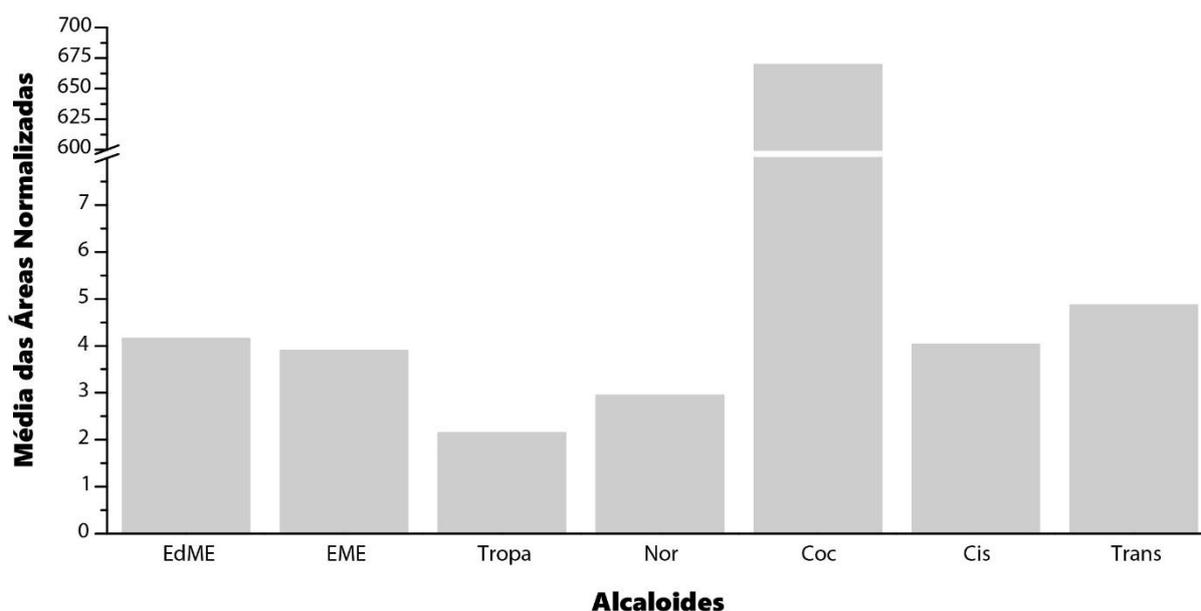


Figura 3.18 - Médias das áreas normalizadas dos picos dos alcaloides.

Tabela 3.3 - Mediana, média e valores mínimo e máximo dos picos dos alcaloides, após normalização.

	EdME	EME	Tropa	Nor	Coca	Cis	Trans
Mínimo	0,67	0	0	0,29	83,17	0	0
Máximo	12,63	15,30	19,43	23,82	1181,92	22,31	32,17
Média	4,17	3,94	2,00	2,93	670,53	4,05	4,87
Mediana	3,69	3,72	0,82	1,88	705,32	0,21	0,82

Através da **Figura 3.18** e da **Tabela 3.3**, pode observar-se que o componente maioritário nas amostras é a cocaína, como seria de esperar, sendo o valor máximo desta entre 40 a 90 vezes superior aos outros alcaloides. Adicionalmente, podemos observar que alcaloides como a EME, a Tropa, a Cis e a Trans, não estão presentes ou não são detetados, em pelo menos uma amostra.

As amostras de cocaína apreendidas, normalmente, não apresentam só cocaína, ou seja não são 100% puras. Para além da cocaína estas contêm outras substâncias, como já foi referido no capítulo

1, e por esta razão para compreender as variações do grau de pureza das amostras, foi feito o histograma apresentado na **Figura 3.19**.

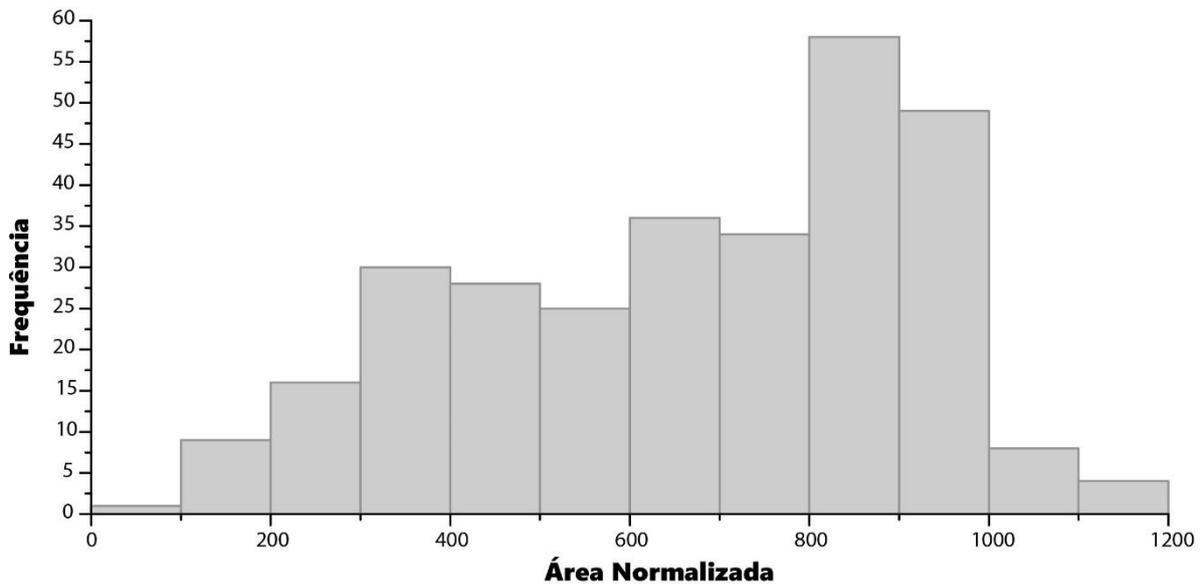


Figura 3.19 - Histograma das áreas de cocaína.

O grau de pureza das amostras analisadas varia entre os 9,1% e 98,8% e, através do histograma apresentado na **Figura 3.19**, podemos observar essa grande variação a nível da área do pico. Apesar das áreas variarem numa grande gama, amostras com áreas acima de 1000 e abaixo de 200 não são muito comuns, o que significa que amostras com graus de pureza muito elevados e muito baixos não são apreendidas com grande frequência. Contudo, a maioria das amostras apreendidas apresenta graus de pureza altos.

Tendo em conta, que agentes de corte podem ser adicionados a qualquer ponto da rede de distribuição, a adição destes vai fazer com que o grau de pureza da droga diminua e, conseqüentemente, a área do pico relativo à cocaína também diminui. Tal como os agentes de corte podem ser adicionados a qualquer momento da rede de distribuição, a apreensão de droga também poderá ocorrer em qualquer ponto. Esta, ao ocorrer em diferentes momentos, as drogas apreendidas podem ter uma grande variação do grau de pureza e, por esta razão, as amostras apresentam uma grande variação das áreas do pico da cocaína, não havendo quebras em regiões específicas.

3.6 Análise de Agrupamentos Hierárquica

A HCA permite visualmente entender a relação entre objetos, pois são atribuídos a diversos grupos, de forma a existir homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre grupos. A utilização deste método quimiométrico permite a observação de grupos mesmo em conjuntos extensos de dados, como é o caso.

Para a realização desta análise as áreas foram normalizadas de formas diferentes, dando origem a dois conjuntos de dados. A primeira normalização das áreas foi feita relativamente ao PI e à massa pesada para análise, sendo a área de cada alcaloide dividida pela área do PI e pela massa de amostra utilizada para análise. Tendo em conta que o componente maioritário é a cocaína, a segunda normalização foi feita relativamente ao pico desta, permitindo assim reduzir a influência da diluição das amostras.

Na **Figura 3.20**, está apresentado o dendrograma construído por agrupamento hierárquico usando os dados que foram sujeitos à primeira normalização e na **Figura 3.21**, o do conjunto de dados submetidos à segunda normalização, usando o método de Ward para a formação de grupos.

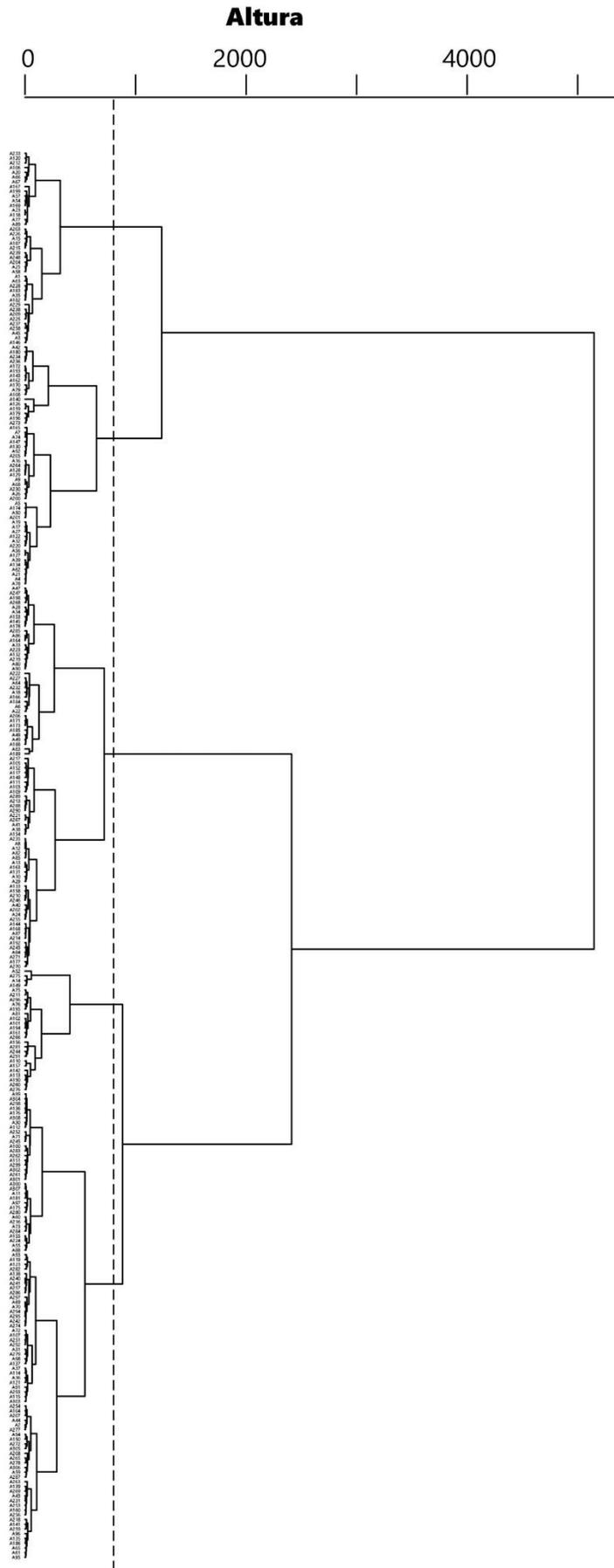


Figura 3.20 – Dendrograma (método de ligação de Ward) construído por agrupamento hierárquico sobre o conjunto de dados de 298 amostras, que foi sujeito à primeira normalização.

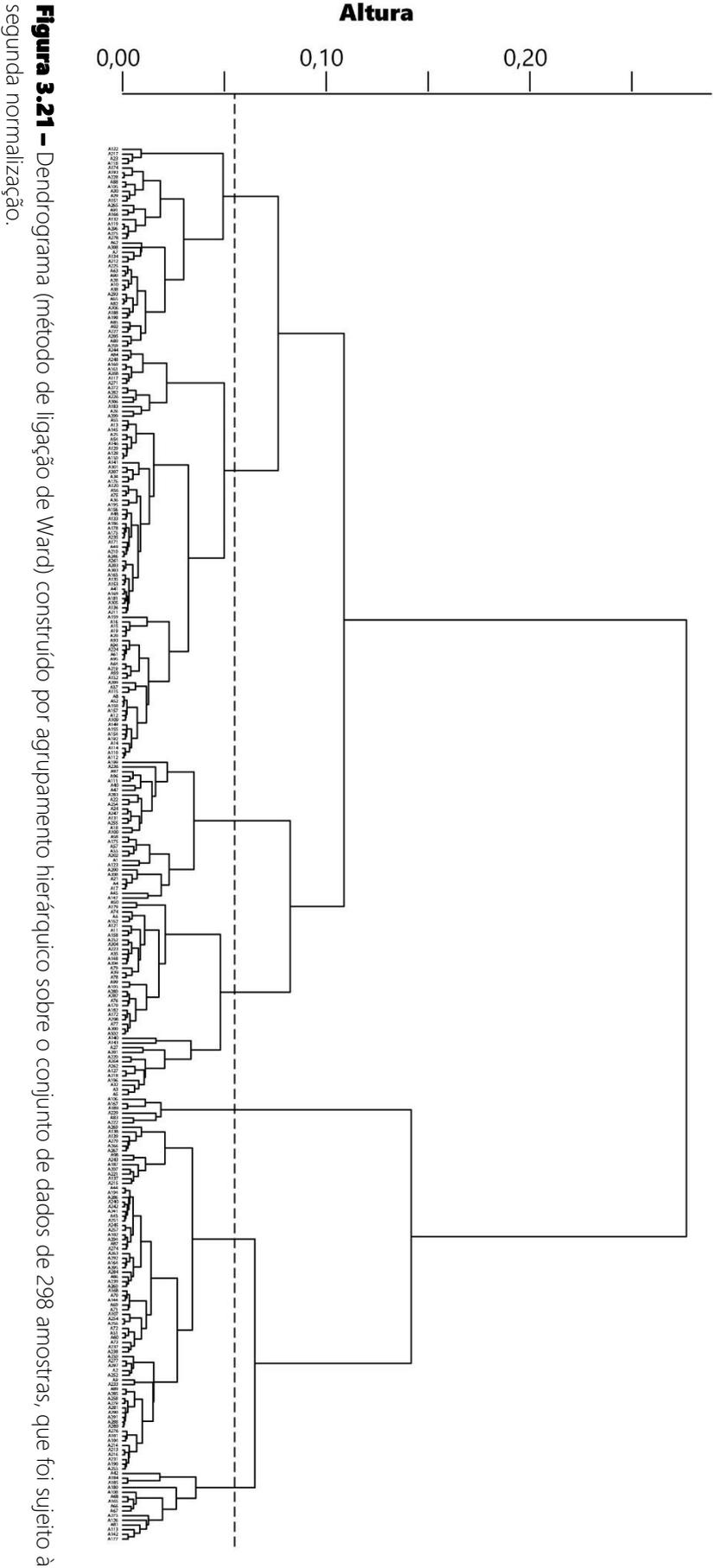


Figura 3.21 – Dendrograma (método de ligação de Ward) construído por agrupamento hierárquico sobre o conjunto de dados de 298 amostras, que foi sujeito à segunda normalização.

Pela análise da **Figura 3.20**, é possível a observação de cinco grupos distintos. Este conjunto de dados é constituído por sete variáveis, os alcaloides escolhidos para a realização deste trabalho e a cocaína. Como a cocaína é o componente maioritário das amostras, os grupos formados são distinguíveis, principalmente, pela quantidade de cocaína que as amostras contêm, ou seja, pelo seu grau de pureza.

Através da análise da **Figura 3.21**, podemos observar a presença de sete grupos. Como o conjunto de dados foi normalizado à área da cocaína, temos apenas seis variáveis presentes neste conjunto. Então, os grupos formados a partir da HCA não são distinguíveis por uma só variável.

3.7 Análise de Componentes Principais

Depois de se terem estabelecido os grupos, foi aplicada a análise de componentes principais para se examinarem as tendências nos dados. Para a realização da PCA, os dados sofreram as mesmas normalizações que na HCA, apresentada no ponto anterior. Nas **Figuras 3.22-3.24**, os dados utilizados para a realização da PCA, foram normalizados pela área do PI e pela massa pesada para análise.

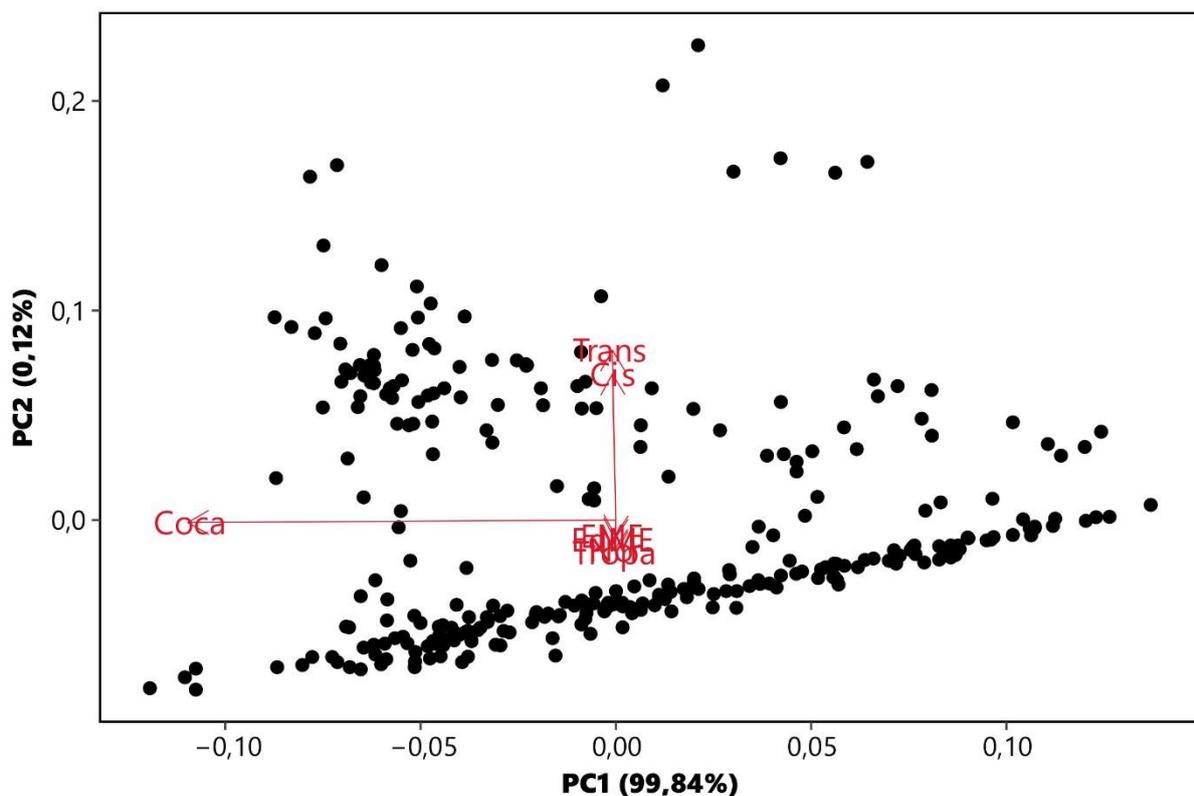


Figura 3.22 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de covariância.

Tabela 3.4 - Evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de covariância).

	Variância Explicada (%)	Variância Explicada Cumulativa (%)
PC1	99,84	99,84
PC2	0,12	99,96
PC3	0,02	99,97
PC4	0,01	99,98
PC5	0,01	99,99
PC6	0,01	100
PC7	0	100

Pela análise da **Tabela 3.4**, podemos observar que através das duas primeiras componentes principais recuperamos, aproximadamente, 99,96% da variabilidade total. No entanto, a maioria da variabilidade total é recuperada pela PC1, e apesar de se observar na **Figura 3.22**, uma distribuição vertical das amostras, essa variação não tem grande relevância, visto que apenas 0,12% da variabilidade total é recuperada.

Tabela 3.5 - Impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais (para a matriz de covariância).

	PC1	PC2
EdME	-0,003	-0,084
EME	-0,002	-0,069
Tropa	-0,001	-0,140
Nor	-0,003	-0,129
Coca	-1,000	-0,010
Cis	-0,008	0,636
Trans	-0,008	0,740

Sendo que, a PC1 têm a maior relevância é a partir desta que vamos conseguir distinguir as amostras. Observando a **Tabela 3.5**, verificamos que a *loading* que mais contribui para a PC1 é a da cocaína, enquanto as restantes têm quase uma contribuição nula. Então, o sistema é principalmente descrito pela quantidade de cocaína presente nas amostras, pois as restantes variáveis não dão muito mais informação. Em suma, a nível geral conseguimos obter muita pouca informação acerca das amostras, exceto informações acerca do grau de pureza destas, que é o que as distingue. Assim, amostras situadas mais à esquerda do eixo da PC1 contêm uma maior quantidade de cocaína, que amostras situadas no lado oposto.

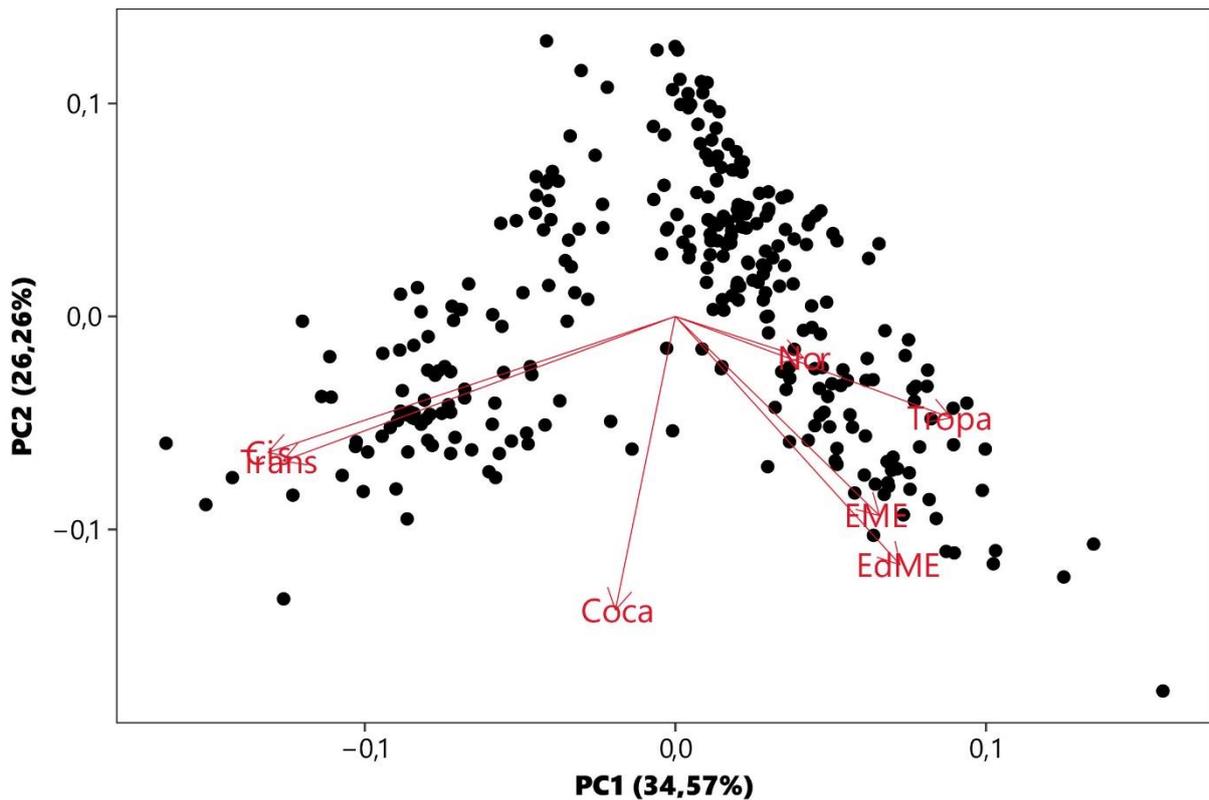


Figura 3.23 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de correlação.

Tabela 3.6 – Valores próprios e evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de correlação).

	Variância Explicada (%)	Variância Explicada Cumulativa (%)	Valor Próprio (λ)
PC1	34,57	34,57	2,42
PC2	26,26	60,83	1,839
PC3	16,85	77,68	1,179
PC4	9,07	86,74	0,635
PC5	7,46	94,2	0,522
PC6	4,83	99,03	0,338
PC7	0,97	100	0,068

No caso de ser utilizada a matriz de correlação (normalização das variáveis), há uma recuperação de 60,83% da variabilidade total. Apesar de termos uma menor recuperação da variabilidade total para o mesmo número de PC's e ser necessário utilizar 3 PC's para termos uma melhor representação dos dados relativamente ao uso da matriz de covariância, a utilização da matriz de correlação permite a recuperação de algumas informações relativamente às variáveis. A **Tabela 3.7**, apresenta o impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais.

Tabela 3.7 - Impacto das variáveis originais nas três primeiras componentes principais (para a matriz de correlação).

	PC1	PC2	PC3
EdME	0,315	-0,508	-0,044
EME	0,286	-0,407	-0,249
Tropa	0,387	-0,208	-0,389
Nor	0,180	-0,085	0,810
Coca	-0,084	-0,601	0,326
Cis	-0,571	-0,278	-0,090
Trans	-0,550	-0,296	-0,120

Pela análise da **Tabela 3.7**, verificamos que as *loadings* que mais contribuem para a PC1 são a Cis e Trans, seguidas pela Tropa, para a PC2 a Coca, seguida pela EdME e EME e para a PC3 a Nor.

Através da observação da **Figura 3.23** e da **Tabela 3.7**, verificamos que as amostras ao longo do eixo da PC1 são distinguíveis pela quantidade de alcaloides presentes nelas, com as que se situam mais à direita com uma maior quantidade de Cis e Trans, enquanto as que estão situadas mais à esquerda apresentam maiores quantidades de EdME, EME e Tropa. A Coca quase não tem nenhuma contribuição para a PC1, logo a PC2 é a que diferencia as amostras no que toca à quantidade de cocaína, aumentando à medida que se desce no eixo da PC2.

Como referido no Capítulo 1, existem alguns alcaloides que são detetados que resultam da hidrólise ou da oxidação por parte da cocaína, no caso deste trabalho os alcaloides são a Nor, a EdME e a EME. A partir da **Figura 3.23**, observamos que as *loadings* correspondentes aos alcaloides que não resultam da decomposição da cocaína (Cis, Tropa e Trans) situam-se ao longo da PC1, quase perpendicularmente ao eixo associado à cocaína, PC2, enquanto as *loadings* correspondentes aos produtos que resultam da decomposição da cocaína, acompanham parcialmente a *loading* desta.

Na **Figura 3.24**, estão apresentados os grupos utilizando o algoritmo CLARA. O número de grupos que foi estabelecido tem por base o número de grupos da HCA. Analisando a figura, os grupos 2 e 5, são distinguíveis dos restantes pela maior quantidade de Trans e Cis. Os três grupos restantes (1, 3 e 4) devido à sua sobreposição acentuada são indistinguíveis.

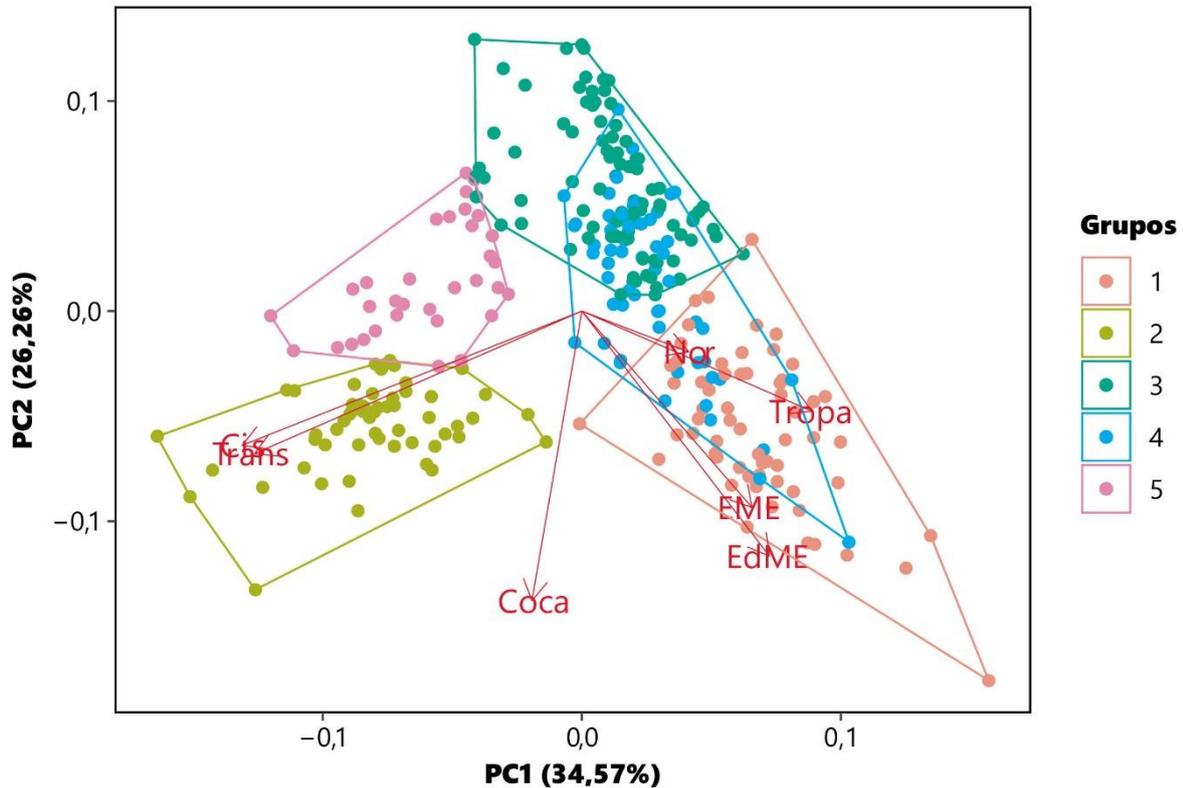


Figura 3.24 - Representação de grupos de amostras no novo sistema de eixos, utilizando a matriz de correlação.

De forma semelhante à HCA e, como já foi referido no início deste ponto, uma segunda normalização é utilizada, em que as áreas dos alcaloides são normalizadas à área da cocaína. Os dados ao sofrerem esta normalização permite observar as diferentes contribuições dos restantes alcaloides no novo sistema de eixos. Nas Figuras 3.25-3.28, as PCA foram realizadas com os dados que sofreram esta normalização.

Tabela 3.8 - Evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de covariância).

	Variância Explicada (%)	Variância Explicada Cumulativa (%)
PC1	66,57	66,57
PC2	13,84	80,41
PC3	8,14	88,55
PC4	6,16	94,71
PC5	3,24	97,95
PC6	2,05	100

Pela análise da Tabela 3.8, podemos observar que existe uma recuperação de 80,41% da variabilidade total pelas duas primeiras PC's, sendo a PC1 dominante.

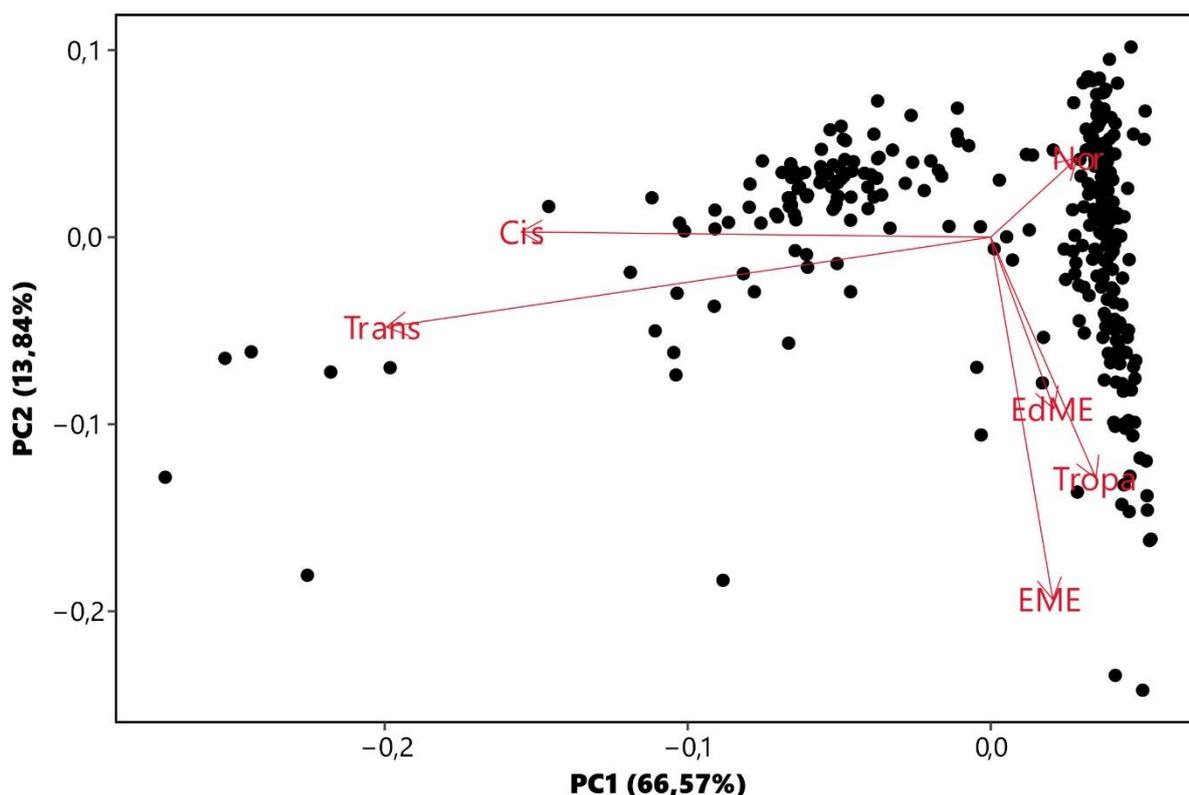


Figura 3.25 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de covariância.

Tabela 3.9 - Impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais (para a matriz de covariância).

	PC1	PC2
EdME	0,081	-0,355
EME	0,079	-0,750
Tropa	0,134	-0,499
Nor	0,111	0,164
Cis	-0,600	0,011
Trans	-0,772	-0,186

Observando a **Tabela 3.9**, a primeira PC retém essencialmente informações acerca das *loadings* da Cis e Trans, enquanto a segunda PC está relacionada com as *loadings* da EME, Tropa e EdME.

A **Figura 3.25** ao ser examinada, verificamos que amostras situadas mais à direita do eixo da PC1 têm uma maior quantidade de Cis e Trans, enquanto amostras situadas no lado oposto são menos concentradas nestes alcaloides. A concentração dos restantes alcaloides é explicada particularmente pelo eixo PC2. Neste caso, as amostras situadas no extremo da zona inferior do eixo PC2 são distinguidas pela maior quantidade de EdME, EME e Tropa e uma menor quantidade de Nor e

amostras no lado oposto do eixo têm menores concentrações de EdME, EME e Tropa e maiores de Nor.

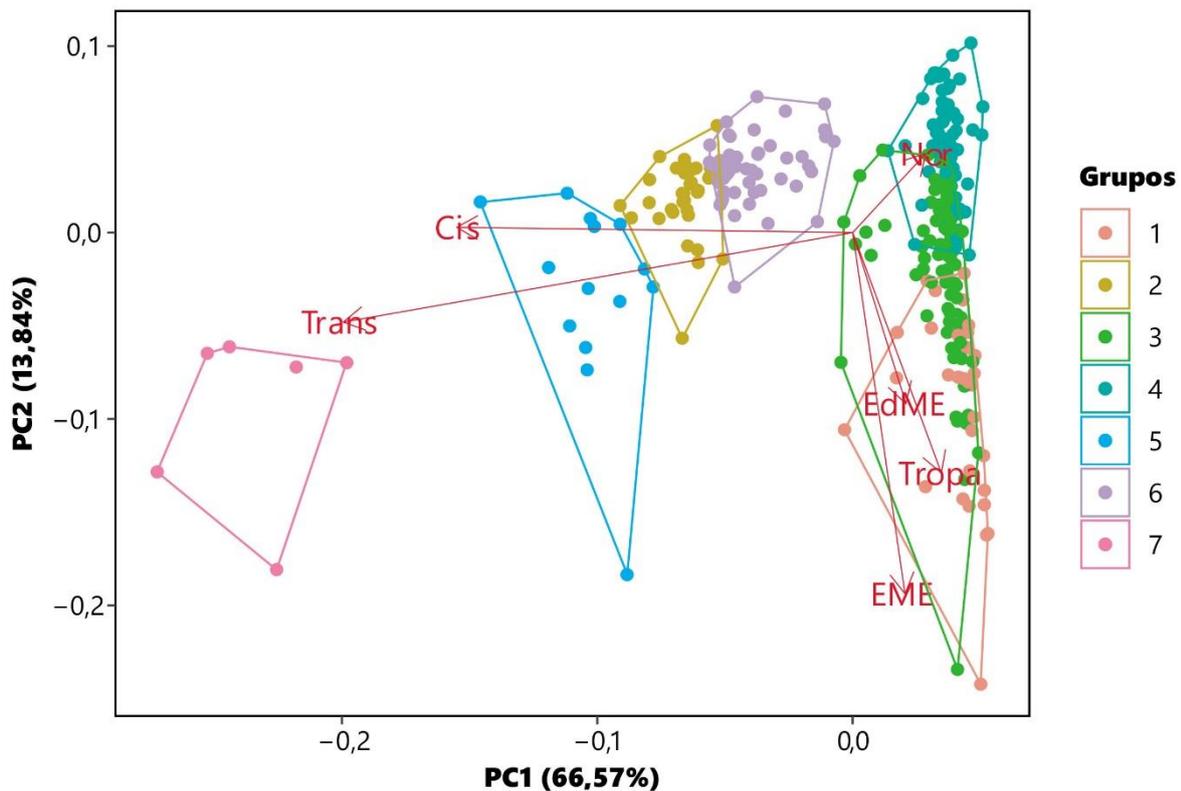


Figura 3.26 - Representação de grupos de amostras no novo sistema de eixos, utilizando a matriz de covariância.

Na **Figura 3.26**, estão representados sete grupos de amostras, que foram formados utilizando o algoritmo CLARA. O número de grupos formados teve por base os grupos da HCA, da **Figura 3.21**. Observando a figura chegamos à conclusão que não se consegue fazer uma distinção entre os grupos 1, 3 e 4, devido à sua sobreposição. Porém, comparando-os aos restantes grupos e, tendo em consideração a análise das *loadings* previamente realizada, estes têm uma menor quantidade de Cis e Trans. Em contraste, o grupo 7 é o que tem uma maior concentração destes alcaloides. Os grupos restantes (2, 5 e 6), no que diz respeito a estes alcaloides tem concentrações intermédias.

No que concerne aos grupos que são distinguíveis (2, 5, 6 e 7) e aos restantes alcaloides (EdME, EME, Nor e Tropa), pode afirmar-se que o grupo 7 tem uma maior quantidade de EdME, EME e Tropa e uma menor quantidade de Nor, enquanto grupos como o 2 e o 6, têm menores concentrações de EdME, EME e Tropa e maiores de Nor. A constituição das amostras que integram o grupo 5 varia entre os valores das amostras que formam os grupos 2, 6 e 7.

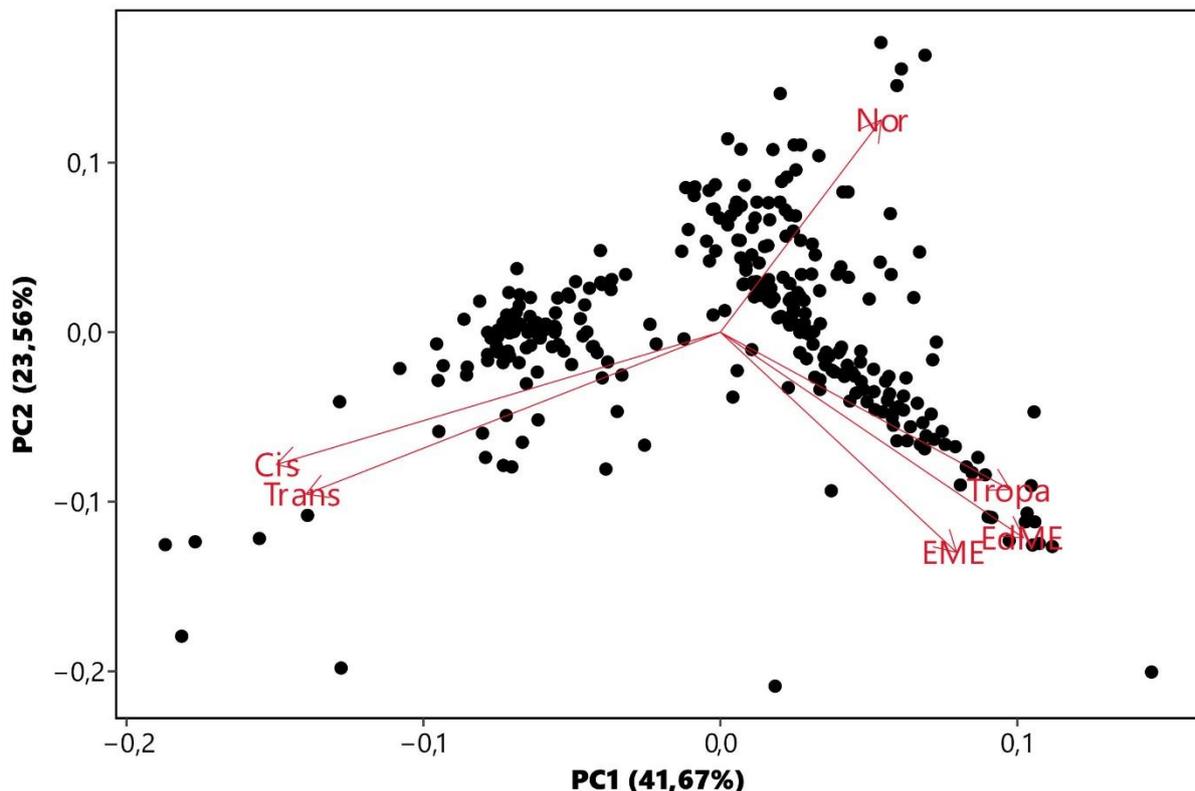


Figura 3.27 - Representação das amostras e contribuição de cada alcaloide no novo sistema de eixos, usando a matriz de correlação.

Tabela 3.10 - Valores próprios e evolução da percentagem de recuperação da informação inicial em relação ao número de componentes principais (para a matriz de correlação).

	Variância Explicada (%)	Variância Explicada Cumulativa (%)	Valor Próprio (λ)
PC1	41,67	41,67	2,5
PC2	23,56	65,23	1,413
PC3	14,61	79,83	0,876
PC4	10,38	90,22	0,623
PC5	8,53	98,75	0,512
PC6	1,25	100	0,075

O uso da matriz da correlação permite tratar todas as variáveis de igual forma, pois existe uma normalização das variáveis. Para termos a mesma recuperação da variabilidade total, relativamente à PCA que usa a matriz de covariância, precisaríamos de usar mais PC's. No entanto, através da análise dos valores próprios, presentes na **Tabela 3.10**, concluímos que 2 PC's são suficientes para descrever o conjunto de dados, havendo uma recuperação de 65,23% da variabilidade total.

A Tabela 3.11, apresenta o impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais.

Tabela 3.11 - Impacto das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais (para a matriz de correlação).

	PC1	PC2
EdME	0,383	-0,455
EME	0,298	-0,487
Tropa	0,366	-0,348
Nor	0,203	0,470
Cis	-0,561	-0,293
Trans	-0,523	-0,358

Através da análise da Tabela 3.11, averiguamos que para a PC1 as loadings que mais contribuem são a Cis e a Trans e para a PC2 são a EdME, a EME e a Nor.

Observando a Figura 3.27, verifica-se que as variações das concentrações dos alcaloides possuem semelhanças com as variações presentes na Figura 3.25. Neste caso, amostras que se situam simultaneamente na zona inferior do eixo da PC2 e do lado direito do eixo da PC1, têm maiores concentrações de EdME, EME e Tropa. No entanto as que se situam na mesma zona do eixo da PC2, mas no lado oposto do eixo da PC1 têm maiores concentrações de Cis e Trans. No que

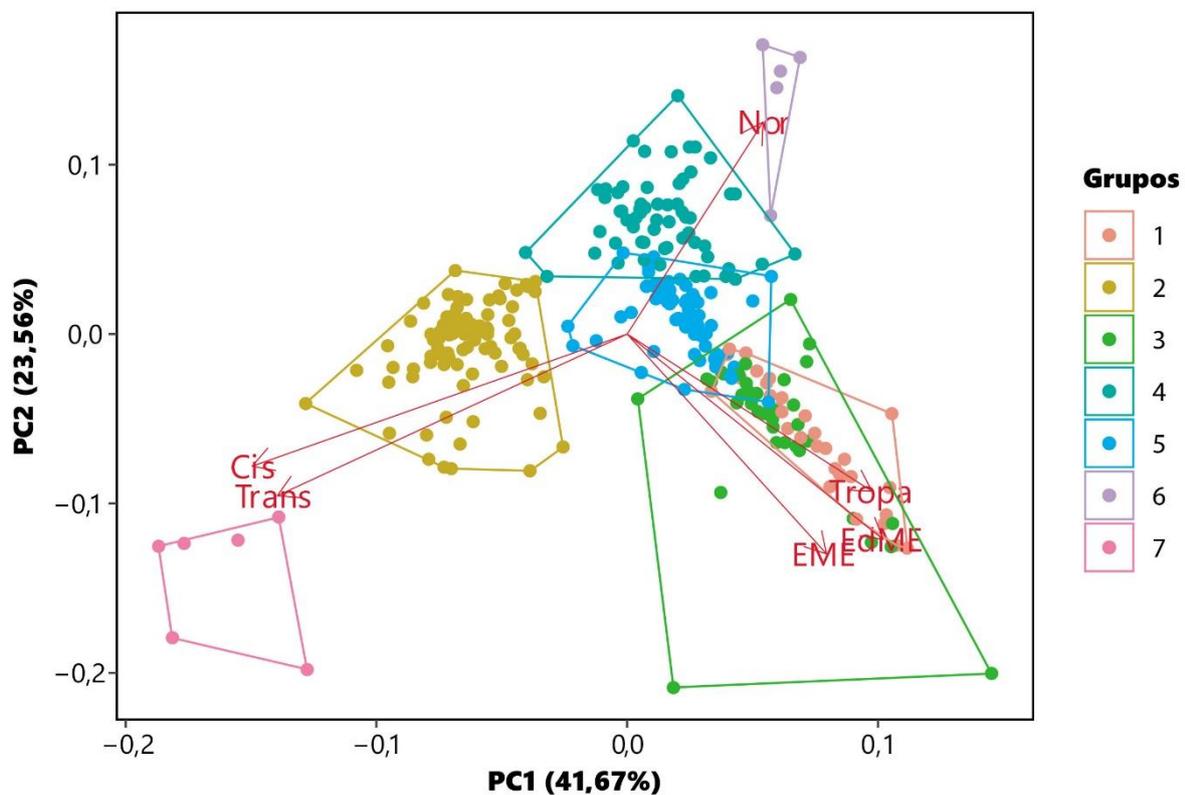


Figura 3. 28 - Representação de grupos de amostras no novo sistema de eixos, utilizando a matriz de correlação.

diz respeito à quantidade de Nor, amostras que se situam na zona superior do eixo da PC2 e, concomitantemente, no lado direito do eixo da PC1 contêm uma maior quantidade deste alcaloide.

Na **Figura 3.28**, estão representados os grupos formados pelo algoritmo CLARA. Tal como, na **Figura 3.26**, o número de grupos teve por base o HCA da **Figura 3.21**.

Da mesma forma, que nas **Figuras 3.24 e 3.26** existem grupos sobrepostos e, por isso, indistinguíveis, aqui estamos perante a mesma situação com os grupos 1, 3 e 5. Apesar do grupo 4 apresentar uma sobreposição com o grupo 5, esta não é muito extensa permitindo assim que estes sejam distinguíveis.

Contrariamente aos grupos 1, 3 e 5, as amostras pertencentes aos grupos 2, 4, 6 e 7 são as que contêm menos quantidade dos alcaloides EdME, EME e Tropa. Estas são passíveis de ser distinguidas pela concentração que apresentam relativamente aos alcaloides Cis, Trans e Nor. Assim, os grupos 6 e 7, que se situam nos extremos, são os que apresentam uma maior quantidade de uns alcaloides e uma menor de outros. O grupo 6 apresenta uma maior concentração de Nor e menores concentrações de Cis e Trans, enquanto o grupo 7 apresenta uma menor concentração de Nor e uma maior concentração de Cis e Trans. Os grupos 2 e 4 contêm concentrações intermédias destes alcaloides, sendo o grupo 2 mais concentrado em alcaloides como a Cis e Trans e o grupo 4 mais concentrado em Nor.

3.8 Comparação de Amostras

No que concerne à comparação e ligação entre amostras, como já referido no Capítulo 1, os dados devem sofrer um pré-tratamento, que é seguido pelo uso de medidas de similaridade. Segundo Lociciro^[15] (2008) a combinação que permite uma melhor discriminação das amostras relacionadas e não relacionadas é a utilização do pré-tratamento, que usa a fórmula (3.1), seguido pelo uso do coeficiente de correlação de Pearson.

$$\frac{A_P}{\frac{A_{COCA}}{\sigma_P}} \quad (3.1)$$

Na **Figura 3.29**, está representado um *heatmap* que permite observar as comparações das amostras analisadas neste projeto. Este foi contruído com os valores do coeficiente de Pearson, para cada conjunto de amostras obtidos, posteriormente ao pré-tratamento do conjunto de dados.

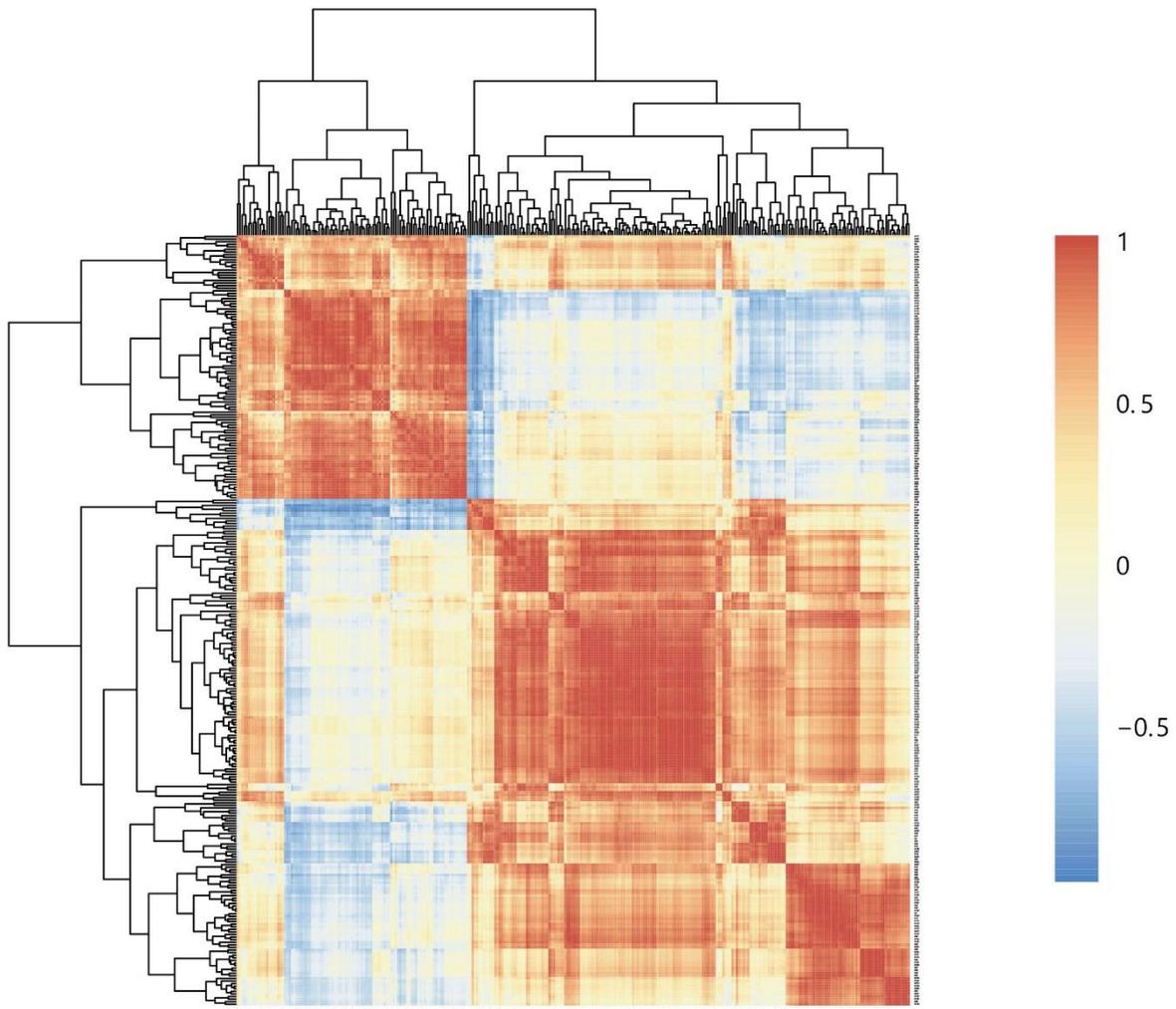
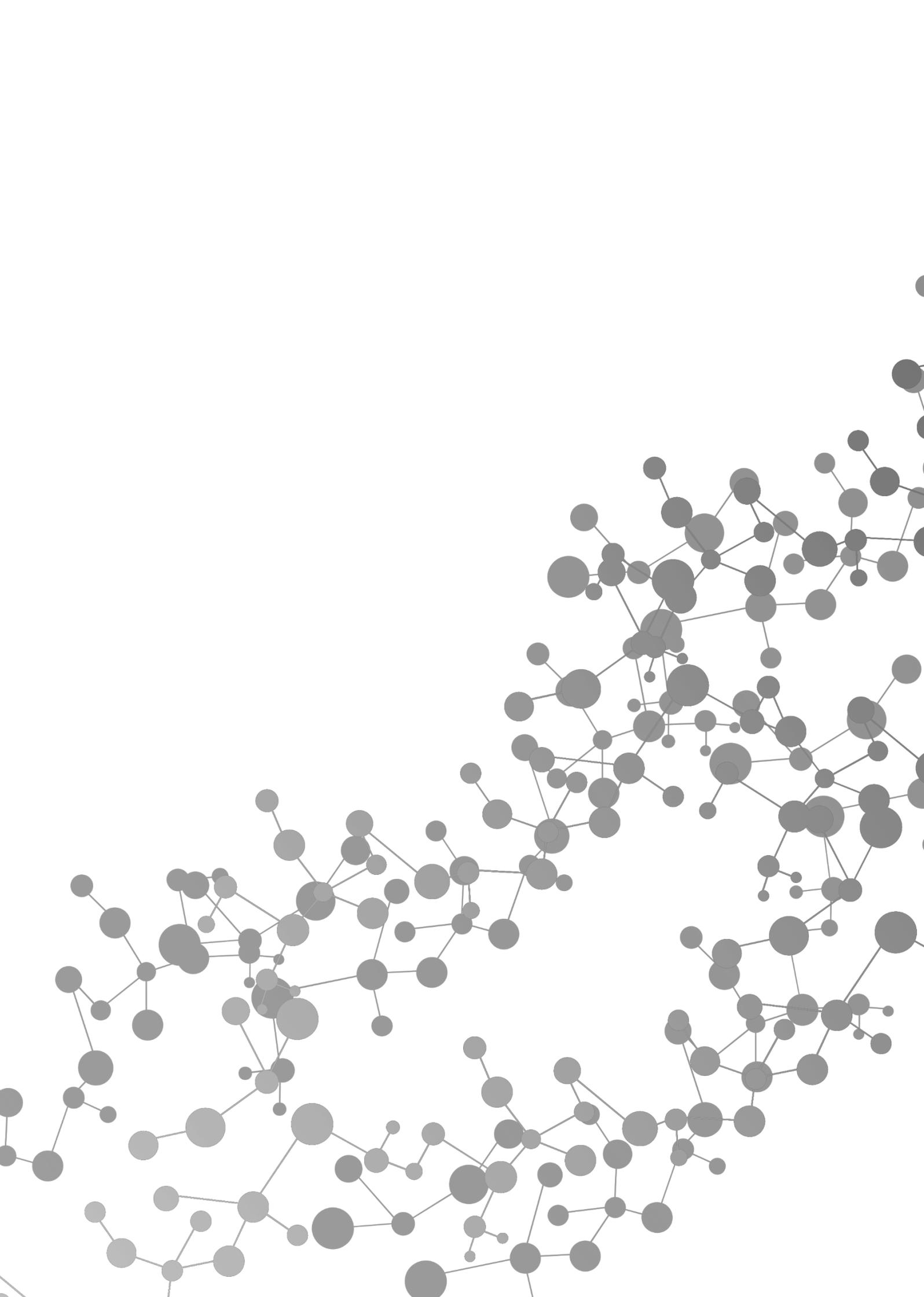


Figura 3.29 – *Heatmap* que representa visualmente os valores da correlação de Pearson para cada conjunto de amostras.

Para se perceber se temos uma comparação estatística relevante é necessário comparar os valores obtidos com um valor crítico, tal como no ponto 3.4, retirado a partir da tabela de correlação de Pearson para 4 graus de liberdade e $\alpha=0,5$. Para se estabelecer uma ligação entre amostras estatisticamente relevante, com 95% de certeza, o valor crítico a considerar, tendo em consideração o conjunto de dados utilizado, é de 0,811. Sendo assim, todos os pares de amostras que apresentem em módulo um valor superior ao valor crítico, consideram-se relacionadas.





Capítulo 4

Conclusão

As apreensões de estupefacientes em território nacional exigem do LPC-PJ, a entidade responsável pela sua análise laboratorial, ferramentas que permitam uma análise rápida e de elevada qualidade científica de um elevado número de amostras. As análises destas são solicitadas como meio probatório e têm particular interesse, no que concerne à obtenção de inteligência forense.

Apesar de já serem realizadas, em casos concretos, análises comparativas, existe a necessidade forense de uma criação de uma base de dados de perfis químicos que permita fazer agrupamentos de amostras baseados nas suas composições químicas e adaptada à sua realidade casuística, como é já feito em laboratórios congéneres de outros países. Assim, com este projeto pretendeu-se estabelecer um processo de comparação de amostras de cocaína, analisadas por GC-FID, baseado na especificidade da casuística do LPC-PJ. Para este fim, foram analisadas cerca de 300 amostras de cocaína, nas suas diversas formas de apresentação, apreendidas em território nacional nos anos de 2018 e 2019.

Inicialmente, foi necessário perceber-se quais são os alcaloides mais comuns, tendo em conta a casuística do laboratório e qual a concentração a utilizar nas análises. A concentração escolhida para a análise das amostras foi 3 mg/ml e os seis alcaloides mais comuns nas amostras resultantes de apreensões em território nacional, foram escolhidos para uso no *profiling* das amostras, sendo eles a ecgonidina metil éster, a ecgonina metil éster, a norcocaína, a tropacocaína e as *cis*- e *trans*-cinamoilcocaína. Estes mostraram-se todos estáveis em solução durante dois dias, mas em diferentes condições de armazenamento existem alcaloides que não chegam a ser estáveis ao primeiro mês de armazenamento. Apesar disso, a instabilidade dos alcaloides não mostrou nenhuma influência significativa na comparação do perfil de uma amostra armazenada em diferentes condições. Este resultado é essencial para que seja possível estabelecer relações entre amostras não contemporâneas.

As amostras estudadas foram então agrupadas, usando dois tipos de normalização, por HCA. O dendrograma final, para o qual é considerado o pico da cocaína, apresenta um total de 5 grupos distintos, enquanto aquele que o conjunto de dados foi normalizado à área da cocaína apresenta 7 grupos distintos.

A PCA permite uma boa visualização dos dados e fornece praticamente toda a informação necessária à interpretação destes. No entanto, o uso do algoritmo CLARA não permite a distinção

de certos grupos e, por isso, não é a ferramenta ideal tendo sido usada por uma questão de facilidade de proceder à representação gráfica. De modo, a melhorar este processo os grupos deverão ser representados, utilizando os dados do HCA. Para a análise de amostras de cocaína, por PCA, o melhor conjunto de dados a ser utilizado, é aquele em que as áreas dos diferentes alcaloides são normalizadas pela da cocaína, pois permite uma melhor observação do comportamento dos restantes alcaloides. O uso de métodos quimiométricos, como a HCA e a PCA, permite fazer o reconhecimento de padrões, separando as amostras em classes e identificando as tendências nos dados.

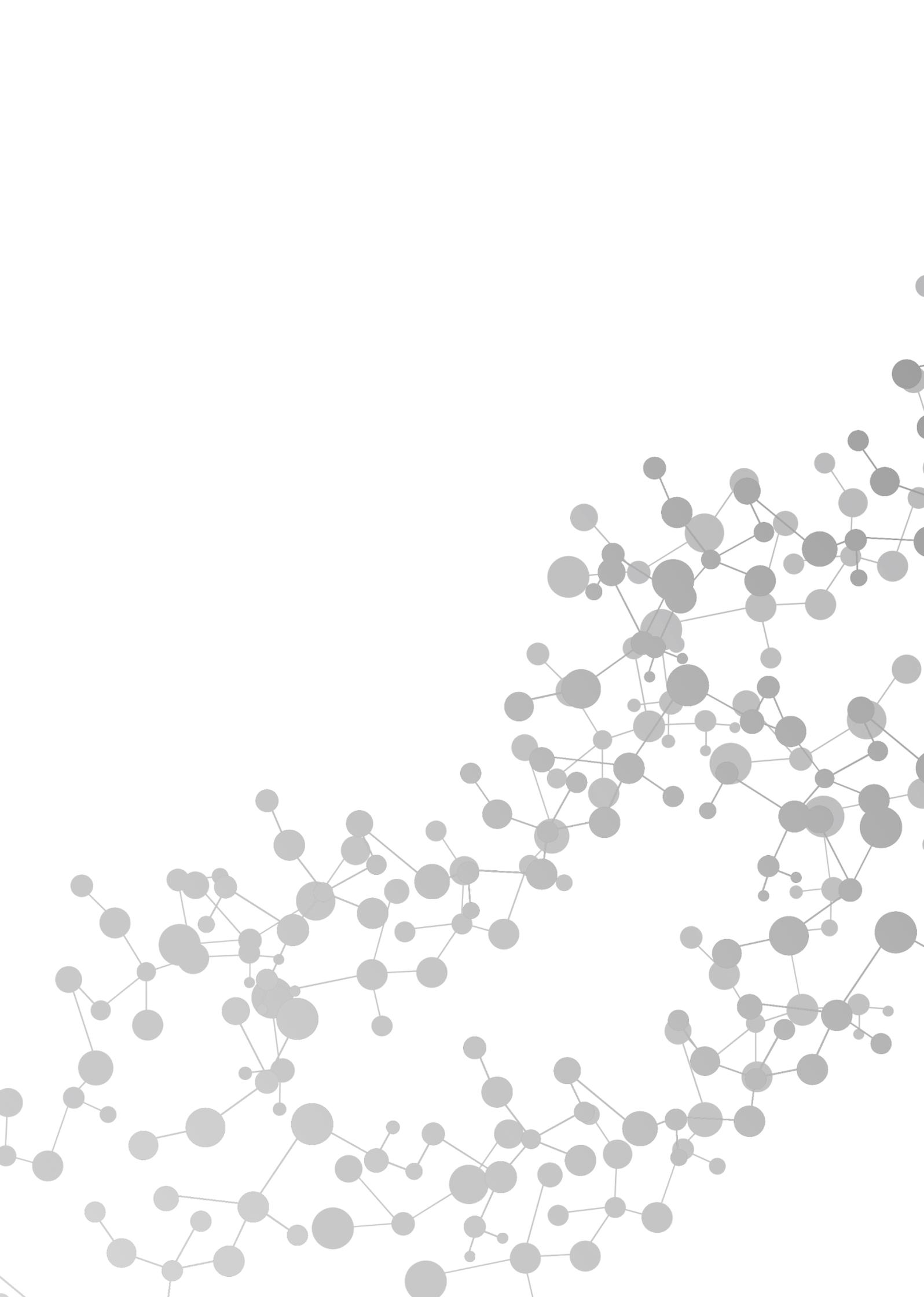
A representação dos valores do coeficiente de correlação de Pearson em forma *heatmap*, para cada par de amostras, mostra-se útil pois permite através de uma inspeção visual perceber a relação entre as amostras comparadas.

Durante este trabalho foi produzido um processo de comparação e análise de tendências dos dados que, apesar de ser preliminar, era necessário para a obtenção de inteligência forense. Este processo permite fazer comparações retrospectivas, separar as amostras em diferentes grupos ou classes químicas e fazer ligações entre amostras com um grau de 95% de confiança. Estamos assim, perante uma estratégia simples e rápida, adequada às rotinas já empregadas por parte do LPC-PJ, e que permite extrair o maior número de informações possíveis de um conjunto de dados. No entanto, é necessário fazer melhorias no processo para este poder ser utilizado como uso probatório, enquadrando-se estas como perspectivas futuras para este trabalho.

De modo, a melhorar o processo devem ser testadas as estabilidades dos alcaloides e quais as melhores formas de acondicionamento para amostras de cocaína dissimuladas. Como a técnica utilizada durante este trabalho, GC-FID, só permite identificar substâncias orgânicas, uma análise das amostras que permita uma identificação de substâncias inorgânicas era ideal (por exemplo utilizando FTIR). Através da análise destas, de solventes ocluídos e do registo de características físicas da droga e das embalagens para uso em *profiling*, permitem o fornecimento de mais características para comparação.

Futuramente, para o estabelecimento deste processo para uso probatório é necessário testá-lo para garantir uma harmonização do mesmo. Isto, porque a análise de drogas em Portugal é realizada pelo LPC-PJ, pelos seus dois polos nas diretorias na sede de Lisboa e na diretoria do Norte.

Uma vez que poderão existir diferenças regionais na casuística e que a análise pode ser feita em aparelhos diferentes a extensão desta análise preliminar à casuística de ambas as diretorias será essencial para o melhoramento deste processo e harmonização dos resultados para o melhoramento deste processo e uma harmonização dos resultados a nível nacional e sua aplicação com fins probatórios.





Referências

Bibliográficas

- [1] UNODC, "World Drug Report," 2018.
- [2] R. M. Vargas, *A Criminalística do Século XXI e Análise de Drogas e Inteligência*, 1 ed., vol. 10, *Academia Nacional de Polícia - Polícia Federal*, 2012.
- [3] S. Ioset, O. Ribaux, C. Weyermann, F. Anglada, S. Locicero, P. Haoyz, I. Baer, L. Gasté, A.-L. Terrettaz-Zufferey, C. Delaporte e P. Margot, "Establishment of an operational system for drug profiling: a Swiss experience," *Bulletin on Narcotics*, vol. 57, nº 1-2, pp. 121-147, 2005.
- [4] UNODC, *Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine*, New York, 2005.
- [5] UNODCCP, *Drug Characterization Impurity Profiling - Background and Concepts*, New York, 2001.
- [6] OEDT, "Relatório Europeu sobre Drogas," 2018. doi:10.2810/287037
- [7] SICAD, "Relatório Anual - 2016 - A Situação do País em Matéria de Drogas e Toxicodependências," 2017.
- [8] SICAD, "Relatório Anual - 2017 - A Situação do País em Matéria de Drogas e Toxicodependências," 2018.
- [9] "Decreto-Lei nº 15/93, de 22 de janeiro," [Online]. Disponível em: http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=181&tabela=leis. [Acedido em 1 dezembro 2018].
- [10] N. N. Daéid e R. J. Waddell, "The analytical and chemometric procedures used to profile illicit drug seizures," *Talanta*, vol. 67, nº 2, p. 280–285, 2005. doi:10.1016/j.talanta.2005.05.018
- [11] P. Esseiva e P. Margot, "Drug Profiling," *Wiley Encyclopedia of Forensic Science*, 2009. doi:10.1002/9780470061589.fsa406
- [12] M. Collins, J. Huttenen, I. Evans e J. Robertson, "Illicit drug profiling: the Australian experience," *Australian Journal of Forensic Sciences*, vol. 39, nº 1, pp. 26-32, 2007. doi:10.1080/00450610701324924

Referências Bibliográficas

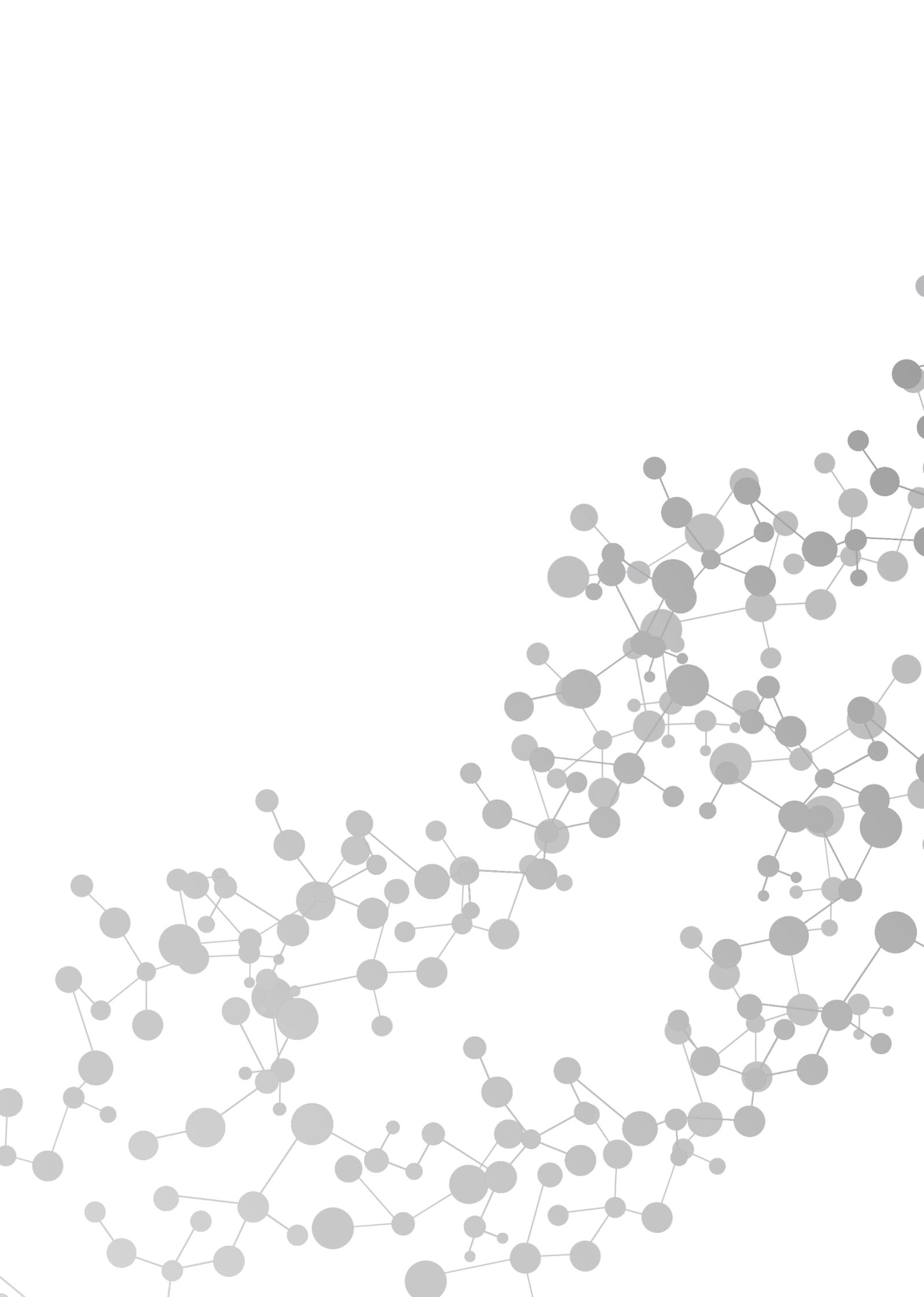
- [13] É. D. Botelho, R. B. Cunha, A. F. C. Campos e A. O. Maldaner, "Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 25, nº 4, pp. 611-618, 2014. doi:10.5935/0103-5053.20140008
- [14] I. Freitas, C. Silva e A. Barbosa, "Abordagens metodológicas que auxiliam na identificação química da cocaína apreendida no Brasil," *Revista Brasileira de Criminalística*, vol. 6, nº 3, pp. 23-29, 2017. doi:10.15260/rbc.v6i3.156
- [15] J. Broséus, S. Huhtala e P. Esseiva, "First systematic chemical profiling of cocaine police seizures in Finland in the framework of an intelligence-led approach," *Forensic Science International*, vol. 251, pp. 87-94, 2015. doi:10.1016/j.forsciint.2015.03.026
- [16] S. Locicero, P. Hayoz, P. Esseiva, L. Dujourdy, F. Besacier e P. Margot, "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*, vol. 167, pp. 220-228, 2007. doi:10.1016/j.forsciint.2006.06.052
- [17] P. Esseiva, L. Dujourdy, F. Anglada, F. Taroni e P. Margot, "A methodology for illicit heroin seizures comparison in a drug intelligence perspective using large databases," *Forensic Science International*, vol. 132, pp. 139-152, 2003. doi:10.1016/S0379-0738(03)00010-0
- [18] H. Huizer, "A contribution to comparison," *Forensic Science International*, vol. 69, pp. 17-22, 1994.
- [19] S. Locicero, P. Esseiva, P. Hayoz, L. Dujourdy, F. Besacier e P. Margot, "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*, vol. 177, pp. 199-206, 2008. doi:10.1016/j.forsciint.2007.12.008
- [20] P. Esseiva, L. Gaste, D. Alvarez e F. Anglada, "Illicit drug profiling, reflection on statistical comparisons," *Forensic Science International*, vol. 207, pp. 27-34, 2011. doi:10.1016/j.forsciint.2010.08.015
- [21] S. B. Karch, *Drug Abuse Handbook*, 2 ed., Taylor & Francis Group, 1998, pp. 9-14.

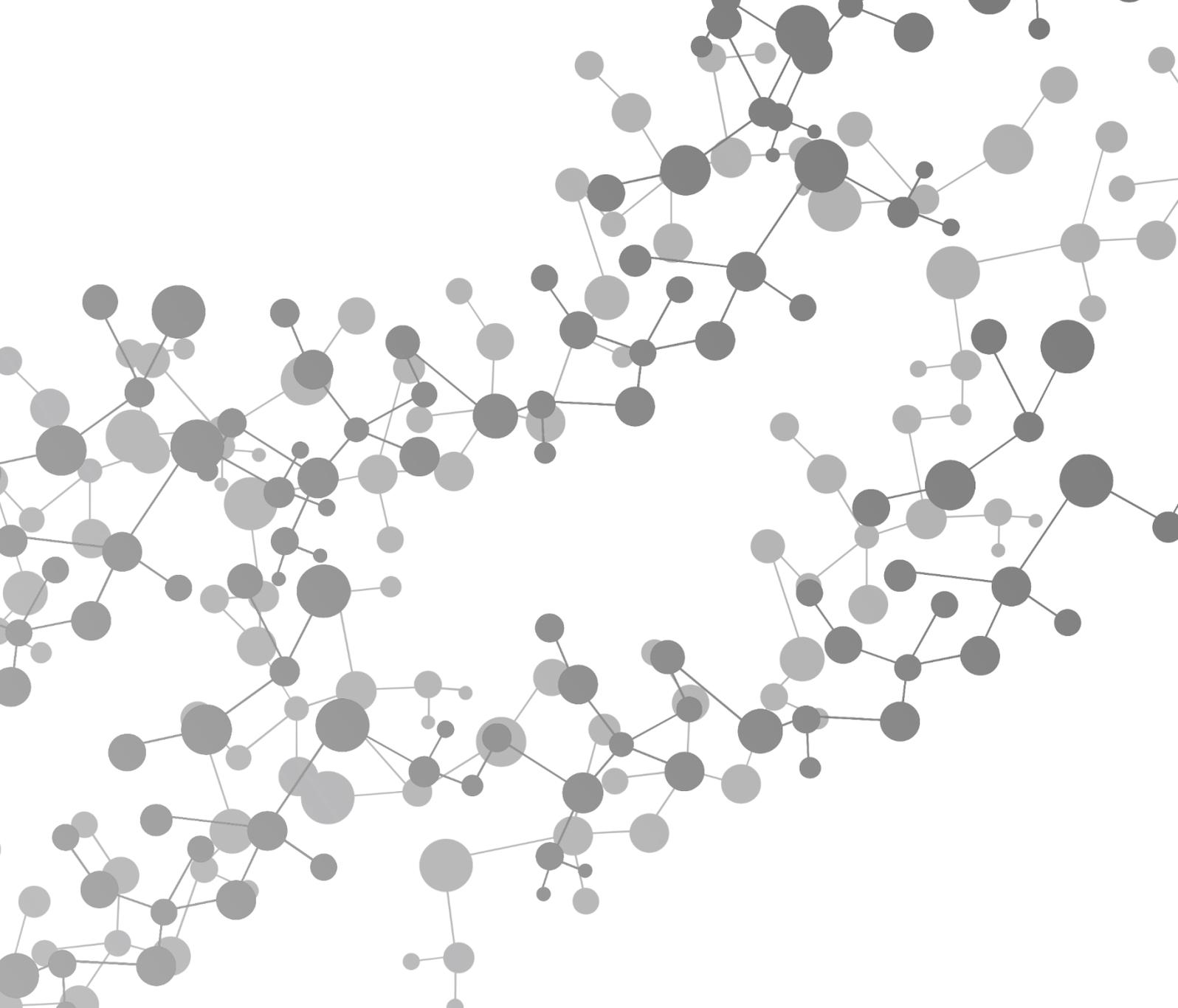
- [22] H. H. Brownstein, *The Handbook of Drugs and Society*, 1 ed., John Wiley & Sons, 2016, pp. 90-108.
- [23] Á. López, W. Garzón, M. Rosero-Moreano e G. Taborda, "Análisis de cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID)," *Revista Colombiana de Química*, vol. 44, nº 1, pp. 19-22, 2015. doi:10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.54010
- [24] M. D. Cole, *The Analysis of Controlled Substances*, John Wiley & Sons, 2003, pp. 97-111.
- [25] UNODC, *Terminology and Information on Drugs*, 3 ed., 2016.
- [26] D. G. Barceloux, *Medical Toxicology of Drug of Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*, John Wiley & Sons, pp. 805-848, 2012.
- [27] K. Smith, "What is the chemical difference between freebase and crack?," 2012. [Online]. Disponível em: <https://www.quora.com/What-is-the-chemical-difference-between-freebase-and-crack>. [Acedido em 14 novembro 2018].
- [28] E. J. Magalhães, C. C. Nascentes, L. S. Pereira, M. L. Guedes, R. A. Lordeiro, L. M. Auler, R. Augusti e M. E. L. Queiroz, "Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil," *Science and Justice*, vol. 53, pp. 425-432, 2013. doi:10.1016/j.scijus.2013.05.003
- [29] UNODC, *Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials*, New York, 2012.
- [30] H. Günzler e A. Williams, *Handbook of Analytical Techniques*, John Wiley & Sons, 2003, pp. 199-260, 465-508.
- [31] D. G. d. Carvalho e A. F. Mídio, "Quality of cocaine seized in 1997 in the street-drug market of São Paulo city, Brazil," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 39, nº 1, pp. 71-75, 2003.

Referências Bibliográficas

- [32] A. O. Maldaner, É. D. Botelho, J. J. Zacca, R. C. Melo, J. L. Costa, I. Zancanaro, C. S. Oliveira, L. B. Kasakoff e T. R. Paixão, "Chemical Profiling of Street Cocaine from Different Brazilian Regions," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 27, nº 4, pp. 719-726, 2016. doi:10.5935/0103-5053.20150321
- [33] I. Evrard, S. Legleye e A. Cadet-Tairou, "Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France," *International Journal of Drug Policy*, vol. 21, pp. 399-406, 2010. doi:10.1016/j.drugpo.2010.03.004
- [34] F. F. Smith, *Handbook of Forensic Drug Analysis*, Elsevier, 2005, pp. 235-270.
- [35] J. Cartier e O. Gueniat, "Headspace analysis of solvents in cocaine and heroin samples," *Science & Justice*, vol. 37, pp. 175-181, 1997.
- [36] R. Suzuki e H. Shimodaira, "Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering," *Bioinformatics*, vol. 22, nº 12, pp. 11540-1542, 2006. doi:10.1093/bioinformatics/btl117
- [37] M. K. d. Santos, K. d. C. Mariotti, A. Kahmann, M. J. Anzanello, M. F. Ferrão, A. d. A. Gomes, R. P. Limberger e P. S. Ortiz, "Comparison between counterfeit and authentic medicines: A novel approach using differential scanning calorimetry and hierarchical cluster analysis," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 166, pp. 304-309, 2019. doi:10.1016/j.jpba.2019.01.029
- [38] J. Almeida, L. Barbosa, A. Pais e S. Formosinho, "Improving hierarchical cluster analysis: A new method with outlier detection and automatic clustering," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 87, pp. 208-217, 2007. doi:10.1016/j.chemolab.2007.01.005
- [39] J. H. Ward Jr., "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function," *Journal of the American Statistical Association*, vol. 58, nº 301, pp. 236-244, 1963. doi:10.1080/01621459.1963.10500845
- [40] K. Drab e M. Daszykowski, "Clustering in Analytical Chemistry," *Journal of AOAC International*, vol. 97, nº 1, pp. 29-38, 2014.

- [41] L. K. Meena, C. Sen e S. Kushwaha, "Cluster Analysis to Form Similarity for Major Selected Crops in Rajasthan, India," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 6, nº 4, pp. 2673-2682, 2017. doi:10.20546/ijcmas.2017.604.311
- [42] L. Campanella, G. d. Angelis e G. Visco, "Chemometric investigation of the efficiency of different TiO₂-based catalysts as principal components of TOC photochemical sensors under development," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 376, pp. 467-475, 2003. doi:10.1007/s00216-003-1928-8
- [43] I. Jolliffe, *Principal Component Analysis*, 2 ed., Springer, 2002, pp. 1-6.
- [44] A. Davies e T. Fearn, "Back to basics: the principles of principal component analysis," *Spectroscopy Europe*, 2004.
- [45] L. Kaufman e P. J. Rousseeuw, *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*, John Wiley & Son, 2005, pp. 126-163.
- [46] C. Sammut e G. I. Webb, *Encyclopedia of Machine Learning and Data Mining*, Springer, 2017, pp. 697-700.
- [47] R. Karinen, E. L. Øiestad, W. Andresen, A. Smith-Kielland e A. Christophersen, "Comparison of the Stability of Stock Solutions of Drugs of Abuse and Other Drugs Stored in a Freezer, Refrigerator, and at Ambient Temperature for Up to One Year," *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 35, pp. 583-590, 2011.





Anexos

Tabela A1 - Estabilidade em solução da amostra A50.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 15	-20%	+20%
EdME	0,067815	0,076188	0,082788	0,079711	0,086465	0,054252	0,081378
EME	0,047365	0,042855	0,045028	0,048588	0,067501	0,037892	0,056838
Tropa	0,009468	0,009365	0,008134	0,008093	0,009552	0,007575	0,011362
Nor	0,00812	0,00992	0,00915	0,009529	0,010842	0,006496	0,009744
Cis	-	-	-	-	0,001394	0	0
Trans	0,006785	0,005001	0,005592	0,004852	0,006551	0,005428	0,008142

Tabela A2 - Estabilidade em solução da amostra A91.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 15	-20%	20%
EdME	0,144634	0,14428	0,156642	0,134008	0,16756	0,115707	0,173561
EME	0,029097	0,037981	0,039716	0,042295	0,013405	0,023277	0,034916
Tropa	0,022928	0,022255	0,02293	0,021868	0,038874	0,018343	0,027514
Nor	0,229265	0,227514	0,220774	0,215117	0,233244	0,183412	0,275118
Cis	-	-	-	-	0,001394	0	0
Trans	0,009977	0,010385	0,010633	0,01058	-	0,007981	0,011972

Tabela A3 - Estabilidade em solução da amostra A98.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 15	-20%	20%
EdME	0,141785	0,157752	0,148797	0,131965	0,138888	0,113428	0,170142
EME	-	0,028143	0,038097	0,00758	-	0	0
Tropa	0,009366	0,013206	0,008834	0,008332	0,010375	0,007493	0,011239
Nor	0,019857	0,020957	0,025102	0,03027	0,023547	0,015886	0,023828
Cis	0,181456	0,163277	0,158959	0,152763	0,16309	0,145165	0,217748
Trans	0,100775	0,051924	0,05615	0,055994	0,157251	0,08062	0,120931

Tabela A4 - Estabilidade em solução da amostra A99.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 15	-20%	20%
EdME	0,210896	0,217207	0,241021	0,199248	0,249155	0,168717	0,253075
EME	0,024259	0,028953	0,04586	0,035562	0,050421	0,019407	0,029111
Tropa	0,093277	0,091148	0,090328	0,088889	0,097741	0,074621	0,111932
Nor	0,018201	0,023859	0,024208	0,028888	0,020853	0,014561	0,021842
Cis	0,004746	0,004685	0,003714	0,003482	0,006123	0,003797	0,005695
Trans	0,013519	0,01099	0,010323	0,010741	0,012784	0,010816	0,016223

Tabela A5 - Estabilidade em solução da amostra A127.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 15	-20%	20%
EdME	0,047135	0,054399	0,059317	0,048188	0,065069	0,037708	0,056562
EME	0,036044	0,037723	0,043441	0,05292	0,060607	0,028835	0,043253
Tropa	0,0122	0,011754	0,012532	0,010189	0,013229	0,00976	0,01464
Nor	0,012107	0,011491	0,012866	0,014377	0,011464	0,009686	0,014529
Cis	-	-	-	-	0,003516	0	0
Trans	0,0061	0,004386	0,00401	0,004741	0,004646	0,00488	0,00732

Tabela A6 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento LPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,792683	3,135335	7,291348	6,147466	3,489995	5,017103	4,913948	6,234146	9,35122
EME	1,345528	2,96607	3,371463	3,219279	3,711582	6,720969	-	1,076423	1,614634
Tropa	0,581978	0,617062	0,572471	0,562196	0,481952	0,536246	0,616064	0,465583	0,698374
Nor	1,868564	1,647462	1,566748	1,971829	1,440316	2,007136	1,417856	1,494851	2,242276
Cis	10,64634	10,25553	11,26848	10,72856	10,63618	10,27034	11,27563	8,517073	12,77561
Trans	3,130081	3,082024	3,19381	3,247718	3,323805	3,665964	3,891946	2,504065	3,756098

Tabela A7 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento LPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,792683	2,865359	7,009022	5,085585	3,106563	2,817177	4,019069	6,234146	9,35122
EME	1,345528	3,128562	4,570645	-	4,197147	4,944107	5,798767	1,076423	1,614634
Tropa	0,581978	0,353899	0,54881	0,4317	0,430652	0,442722	0,500753	0,465583	0,698374
Nor	1,868564	2,078701	2,134016	2,010413	1,798584	1,552057	2,146858	1,494851	2,242276
Cis	10,64634	10,39415	11,09461	9,992831	9,756915	10,52008	10,07622	8,517073	12,77561
Trans	3,130081	3,146631	3,412853	3,133563	3,161295	3,449238	3,138028	2,504065	3,756098

Tabela A8 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento CPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,792683	3,672654	7,039396	4,771765	4,100454	2,787267	4,432119	6,234146	9,35122
EME	1,345528	-	4,551929	3,729276	4,078606	5,187404	9,92411	1,076423	1,614634
Tropa	0,581978	0,415177	0,497602	0,439698	0,468105	0,60918	0,435912	0,465583	0,698374
Nor	1,868564	2,022224	2,306117	1,951326	1,032032	1,589896	4,826248	1,494851	2,242276
Cis	10,64634	10,85802	10,86235	10,35194	11,86525	10,99523	9,516135	8,517073	12,77561
Trans	3,130081	3,140398	3,398112	3,360618	3,706538	3,304538	3,390968	2,504065	3,756098

Tabela A9 - Estabilidade da amostra A98, nas condições de armazenamento CPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,792683	2,558711	6,50515	4,343848	3,884688	2,309372	4,509206	6,234146	9,35122
EME	1,345528	2,352099	0,564328	3,649831	3,067116	4,949306	8,207042	1,076423	1,614634
Tropa	0,581978	0,404297	0,440512	0,423677	0,470291	0,401228	0,361421	0,465583	0,698374
Nor	1,868564	2,046886	2,202478	1,8234	2,146818	1,374952	2,392934	1,494851	2,242276
Cis	10,64634	10,38833	10,60293	9,975248	10,27492	10,55713	8,626023	8,517073	12,77561
Trans	3,130081	3,070454	3,226763	3,217853	3,169516	3,189785	3,00467	2,504065	3,756098

Tabela A10 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento LPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	12,62867	6,037605	11,76805	9,306095	7,032282	6,584362	7,580372	10,10294	15,15441
EME	2,849726	4,616335	5,371708	6,71494	6,681323	9,166277	10,12375	2,279781	3,419671
Tropa	5,923353	6,085169	6,277182	6,162498	5,660266	6,303615	5,673205	4,738682	7,108023
Nor	1,844139	2,150535	2,172871	2,054166	2,1591	1,811659	1,449841	1,475311	2,212966
Cis	0,223489	0,209833	0,235383	0,265833	0,237997	0,349854	0,289377	0,178791	0,268187
Trans	0,743211	0,750386	0,796675	0,743286	0,730509	0,704268	0,729602	0,594569	0,891853

Tabela A11 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento LPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	12,62867	6,601442	12,40966	9,466815	7,924171	6,753813	7,166655	10,10294	15,15441
EME	2,849726	5,00977	4,967692	6,573366	6,825634	7,174583	10,4792	2,279781	3,419671
Tropa	5,923353	5,71833	6,357478	6,149932	5,505584	6,036813	5,693842	4,738682	7,108023
Nor	1,844139	2,23064	2,33858	2,230752	1,761142	3,585414	1,878336	1,475311	2,212966
Cis	0,223489	0,201414	0,299979	0,277371	0,23117	0,227283	0,261917	0,178791	0,268187
Trans	0,743211	0,751202	0,707522	0,747703	0,775933	0,800987	0,705784	0,594569	0,891853

Tabela A12 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento CPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	12,62867	6,670442	11,29398	9,034664	8,441384	8,990488	7,942687	10,10294	15,15441
EME	2,849726	4,89104	6,683176	6,55601	8,932837	8,606527	15,36226	2,279781	3,419671
Tropa	5,923353	5,724618	6,394037	5,809466	5,98724	5,940785	5,499756	4,738682	7,108023
Nor	1,844139	2,278786	2,411485	2,128063	2,630643	1,887169	3,335539	1,475311	2,212966
Cis	0,223489	0,205666	0,269817	0,270427	0,245414	0,256106	0,239188	0,178791	0,268187
Trans	0,743211	0,728153	0,751377	0,770694	0,79044	0,727685	0,767481	0,594569	0,891853

Tabela A13 - Estabilidade da amostra A99, nas condições de armazenamento CPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	12,62867	8,957886	10,84378	8,351955	7,854818	7,944732	7,669735	10,10294	15,15441
EME	2,849726	5,035906	6,538672	5,784402	7,344941	8,865861	8,709039	2,279781	3,419671
Tropa	5,923353	5,3545	6,255113	5,676127	5,81315	6,044905	5,224312	4,738682	7,108023
Nor	1,844139	2,173685	2,582269	2,019303	1,828728	1,727116	2,111956	1,475311	2,212966
Cis	0,223489	0,265145	0,223794	0,212828	0,234292	0,218768	0,260771	0,178791	0,268187
Trans	0,743211	0,763447	0,746046	0,742333	0,729333	0,754174	0,717509	0,594569	0,891853

Tabela A14 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento LPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	9,640483	5,027039	8,02969	7,294948	5,521214	6,536439	5,738986	7,712386	11,56858
EME	2,967526	4,321729	7,232486	6,40573	6,928448	4,441847	9,170992	2,374021	3,561032
Tropa	3,249336	3,492005	3,373874	3,315683	2,976755	3,239145	3,47951	2,599469	3,899204
Nor	1,904783	2,405547	2,148234	1,932112	1,786367	1,907246	2,264236	1,523827	2,28574
Cis	0,263252	0,217477	0,325252	0,386645	0,243534	0,300962	0,354129	0,210601	0,315902
Trans	0,677822	0,703661	0,80344	0,845733	0,687354	0,763574	0,855681	0,542258	0,813387

Tabela A15 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento LPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	9,640483	5,646027	8,476564	5,865494	5,842316	4,506362	4,610869	7,712386	11,56858
EME	2,967526	4,661279	7,033622	7,646106	6,886967	8,019134	9,886964	2,374021	3,561032
Tropa	3,249336	3,055117	3,486594	3,496753	3,114763	2,926615	2,944491	2,599469	3,899204
Nor	1,904783	2,330471	2,28432	2,133739	2,076691	2,165903	2,500394	1,523827	2,28574
Cis	0,263252	0,227751	0,306548	0,237041	0,224091	0,292786	0,272207	0,210601	0,315902
Trans	0,677822	0,719821	0,81161	0,758788	0,786628	0,795748	0,783379	0,542258	0,813387

Tabela A16 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento CPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	9,640483	6,450208	9,553208	6,859889	7,339304	5,263058	4,580252	7,712386	11,56858
EME	2,967526	5,08437	7,315956	8,083129	8,686027	9,318833	8,764117	2,374021	3,561032
Tropa	3,249336	3,280925	3,990581	3,552878	3,54892	3,281442	2,770565	2,599469	3,899204
Nor	1,904783	2,516235	2,660387	2,694957	3,24922	2,032921	3,109881	1,523827	2,28574
Cis	0,263252	0,240795	0,272118	0,251099	0,266199	0,297794	0,367644	0,210601	0,315902
Trans	0,677822	0,776415	0,749745	0,783944	0,78058	0,763065	0,853584	0,542258	0,813387

Tabela A17 - Estabilidade da amostra A103, nas condições de armazenamento CPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	9,640483	5,744481	8,177051	5,349993	6,63529	4,50126	4,542532	7,712386	11,56858
EME	2,967526	4,720261	5,048774	6,125875	6,001624	8,184798	7,654539	2,374021	3,561032
Tropa	3,249336	3,091015	3,367107	3,117758	3,057924	3,154073	3,381339	2,599469	3,899204
Nor	1,904783	2,38633	2,465256	2,293044	2,424258	1,866051	2,930126	1,523827	2,28574
Cis	0,263252	0,233026	0,246536	0,270806	0,271026	0,269438	0,260439	0,210601	0,315902
Trans	0,677822	0,726673	0,769677	0,652625	0,79634	0,823488	0,775678	0,542258	0,813387

Tabela A18 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento LPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,161517	2,82661	7,349717	4,825755	2,999329	5,354383	3,738672	5,729213	8,59382
EME	2,773202	3,424077	3,704306	4,035347	3,789575	4,924882	6,683765	2,218562	3,327842
Tropa	0,36609	0,298926	0,321991	0,211089	0,496291	0,498946	0,322842	0,292872	0,439308
Nor	1,831607	2,55471	2,490181	1,808903	1,978675	2,863409	1,586011	1,465286	2,197929
Cis	12,6006	13,96848	13,48401	10,49264	13,2965	18,78775	12,74286	10,08048	15,12072
Trans	13,37774	14,56622	14,88089	11,75938	14,84622	20,36802	13,98886	10,70219	16,05329

Tabela A19 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento LPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,161517	2,54387	7,30846	4,889334	3,258914	2,831617	4,055835	5,729213	8,59382
EME	2,773202	2,441796	4,043918	3,81104	4,189655	6,356691	3,241894	2,218562	3,327842
Tropa	0,36609	0,30518	0,380411	0,329558	0,286748	0,283162	0,318191	0,292872	0,439308
Nor	1,831607	2,492914	2,717096	2,443966	1,820066	3,062769	2,412051	1,465286	2,197929
Cis	12,6006	13,53252	14,79503	13,47251	12,62698	12,25108	12,00504	10,08048	15,12072
Trans	13,37774	13,63427	15,94199	15,06486	14,28194	14,04251	13,65439	10,70219	16,05329

Tabela A20 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento CPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,161517	2,68916	6,370653	4,248848	3,115542	2,945006	3,782363	5,729213	8,59382
EME	2,773202	2,797991	4,833248	3,51425	3,6613	5,77729	6,270269	2,218562	3,327842
Tropa	0,36609	0,295907	0,488711	0,288941	0,284175	0,322812	0,442932	0,292872	0,439308
Nor	1,831607	2,474597	2,746247	2,380203	2,18596	2,264897	3,458161	1,465286	2,197929
Cis	12,6006	13,44828	14,16964	13,25457	13,44329	12,52071	11,61735	10,08048	15,12072
Trans	13,37774	13,93275	15,10339	14,55796	15,24652	13,59752	12,9147	10,70219	16,05329

Tabela A21 - Estabilidade da amostra A107, nas condições de armazenamento CPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,161517	2,473118	6,006059	3,586389	2,864122	2,321824	3,623137	5,729213	8,59382
EME	2,773202	3,010753	4,13741	3,378821	3,181799	4,311851	5,764978	2,218562	3,327842
Tropa	0,36609	0,301075	0,519215	0,228754	0,540792	0,287495	0,247113	0,292872	0,439308
Nor	1,831607	2,849462	2,973646	2,234792	1,856248	1,990216	2,633303	1,465286	2,197929
Cis	12,6006	13,33333	13,41125	12,47469	13,47065	13,21268	12,29336	10,08048	15,12072
Trans	13,37774	13,87097	14,86884	16,42536	15,06177	14,8712	14,10591	10,70219	16,05329

Tabela A22 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento LPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	8,670247	5,226999	8,79565	5,899131	5,354895	4,893383	5,057065	6,936198	10,4043
EME	8,382495	8,137321	9,886857	12,59939	11,36115	11,62473	14,0278	6,705996	10,05899
Tropa	2,066987	2,047569	2,414435	1,720834	1,769071	1,612812	1,648751	1,65359	2,480385
Nor	1,780027	2,047569	2,069931	1,966667	1,661039	1,835282	1,7604	1,424021	2,136032
Cis	0,22396	0,123901	0,189685	0,173302	0,214323	0,228041	0,187037	0,179168	0,268752
Trans	0,666083	0,706089	0,753136	0,540833	0,73432	0,76197	0,549947	0,532866	0,7993

Tabela A23 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento LPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	8,670247	6,208414	6,554893	5,302157	4,159291	4,83929	4,939425	6,936198	10,4043
EME	8,382495	5,652283	12,74897	10,82543	11,0286	10,96965	14,17915	6,705996	10,05899
Tropa	2,066987	2,659898	1,743962	1,994391	1,553596	2,082545	1,957101	1,65359	2,480385
Nor	1,780027	2,103767	2,285192	1,995372	1,854903	2,631631	2,525641	1,424021	2,136032
Cis	0,22396	0,121912	0,216492	0,211035	0,189905	0,226673	0,218236	0,179168	0,268752
Trans	0,666083	0,676057	0,697585	0,621018	0,611473	0,771941	0,701301	0,532866	0,7993

Tabela A24 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento CPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	8,670247	5,16019	7,793872	4,989582	7,988941	4,980111	4,392944	6,936198	10,4043
EME	8,382495	10,96161	10,99577	11,67836	15,84446	10,46609	15,9394	6,705996	10,05899
Tropa	2,066987	1,624037	2,416605	1,796147	1,98247	1,680391	1,76719	1,65359	2,480385
Nor	1,780027	2,204051	2,597314	1,851427	3,266753	1,625154	3,475093	1,424021	2,136032
Cis	0,22396	0,162275	0,157358	0,185143	0,1987	0,174145	0,176873	0,179168	0,268752
Trans	0,666083	0,713481	0,676692	0,746439	0,670164	0,687999	0,803514	0,532866	0,7993

Tabela A25 - Estabilidade da amostra A148, nas condições de armazenamento CPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	8,670247	5,630693	6,197152	4,488556	4,596929	5,789924	4,651622	6,936198	10,4043
EME	8,382495	8,446415	12,05493	10,93596	10,04421	11,2261	11,92303	6,705996	10,05899
Tropa	2,066987	1,858316	1,819353	1,668966	1,872105	2,176782	1,725284	1,65359	2,480385
Nor	1,780027	2,139663	2,331401	1,898617	1,929552	2,062716	2,039344	1,424021	2,136032
Cis	0,22396	0,146398	0,170523	0,143932	0,192955	0,171901	0,230061	0,179168	0,268752
Trans	0,666083	0,698168	0,739253	0,788612	0,709244	0,773456	0,79983	0,532866	0,7993

Tabela A26 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento LPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,019859	2,593558	7,364811	5,619054	2,750275	4,645079	3,180815	5,615887	8,42383
EME	2,122262	2,483851	4,603635	3,126271	3,465347	4,578759	4,470737	1,69781	2,546715
Tropa	0,353992	0,475952	0,494928	0,393758	0,330033	0,296956	0,646826	0,283193	0,42479
Nor	1,905016	2,263735	1,726128	2,027012	2,090209	2,461069	1,787466	1,524013	2,286019
Cis	11,21063	12,19914	14,03938	8,420001	12,0462	12,48362	12,18126	8,968501	13,45275
Trans	10,55711	11,70265	17,84502	13,08414	12,10121	12,144	12,01265	8,445688	12,66853

Tabela A27 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento LPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,019859	2,637296	6,941356	5,250972	2,289503	2,780244	4,35905	5,615887	8,42383
EME	2,122262	2,812661	5,43863	3,252178	4,063345	5,215976	5,137123	1,69781	2,546715
Tropa	0,353992	0,29901	0,53607	0,47774	0,291546	0,336147	0,320009	0,283193	0,42479
Nor	1,905016	2,519793	2,71871	2,227153	1,831602	2,605724	2,538625	1,524013	2,286019
Cis	11,21063	11,95507	12,98011	11,36024	12,53555	12,28092	11,42006	8,968501	13,45275
Trans	10,55711	11,48624	12,7374	11,3025	12,64898	12,1069	11,30971	8,445688	12,66853

Tabela A28 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento CPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,019859	2,60953	7,246878	4,693551	4,00822	2,954113	3,945693	5,615887	8,42383
EME	2,122262	2,446948	4,277611	3,743614	4,23838	4,876066	5,837333	1,69781	2,546715
Tropa	0,353992	0,266444	0,421422	0,380163	0,316557	0,246613	0,436247	0,283193	0,42479
Nor	1,905016	2,555693	2,494117	2,377196	2,597202	2,080242	3,147733	1,524013	2,286019
Cis	11,21063	12,28786	12,53145	11,64826	12,03493	11,28913	10,66645	8,968501	13,45275
Trans	10,55711	11,527	11,81915	11,64826	11,86602	11,7256	10,40189	8,445688	12,66853

Tabela A29 - Estabilidade da amostra A254, nas condições de armazenamento CPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,019859	3,29665	6,691254	4,043414	3,017017	2,008812	2,669884	5,615887	8,42383
EME	2,122262	2,363107	5,713434	3,822925	3,293964	5,215998	5,456751	1,69781	2,546715
Tropa	0,353992	0,32434	0,354575	0,274507	0,428489	0,271874	0,277078	0,283193	0,42479
Nor	1,905016	2,363107	2,967699	2,31787	2,029132	1,630426	2,406758	1,524013	2,286019
Cis	11,21063	11,92465	13,20045	11,47763	12,73274	12,44217	12,19507	8,968501	13,45275
Trans	10,55711	11,2104	12,88994	11,47763	12,95328	12,22615	12,03852	8,445688	12,66853

Tabela A30 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento LPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,13054	2,43892	6,930421	5,775989	2,616431	4,452249	4,428766	5,704432	8,556648
EME	1,523219	3,250083	1,855612	2,068558	3,841144	7,472289	4,616224	1,218575	1,827863
Tropa	0,481026	0,254733	0,369375	0,309916	0,272777	0,368142	0,300566	0,384821	0,577231
Nor	2,046268	2,547328	1,931715	1,965689	2,004075	4,388045	2,320077	1,637015	2,455522
Cis	11,05559	12,24962	12,72762	12,6321	11,74611	11,10374	11,28096	8,84447	13,2667
Trans	10,66845	11,65364	12,44329	12,15545	11,63477	10,93768	10,96466	8,534756	12,80213

Tabela A31 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento LPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,13054	2,905174	6,91218	4,806371	3,284095	3,717907	3,910755	5,704432	8,556648
EME	1,523219	2,636228	4,749917	3,341878	3,783909	6,028704	3,990509	1,218575	1,827863
Tropa	0,481026	0,274365	0,429132	0,340827	0,283761	0,411104	0,257029	0,384821	0,577231
Nor	2,046268	2,420862	2,561908	2,344571	2,0589	4,729506	2,35668	1,637015	2,455522
Cis	11,05559	12,31976	13,04914	12,309	11,96433	10,92919	10,98359	8,84447	13,2667
Trans	10,66845	11,7817	12,92997	12,43141	12,24266	10,81652	10,77067	8,534756	12,80213

Tabela A32 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento CPL.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,13054	2,903105	6,856056	4,212566	4,162235	2,904902	3,448445	5,704432	8,556648
EME	1,523219	2,35485	4,523398	3,472987	2,662291	5,868351	6,144682	1,218575	1,827863
Tropa	0,481026	0,262898	0,334642	0,326236	0,540111	0,331054	0,31269	0,384821	0,577231
Nor	2,046268	2,519874	2,397446	2,314532	2,86904	2,265973	2,855443	1,637015	2,455522
Cis	11,05559	12,21568	12,27019	11,36917	12,26432	12,83952	11,04791	8,84447	13,2667
Trans	10,66845	11,72289	11,82564	11,26861	11,98308	12,49093	10,4558	8,534756	12,80213

Tabela A33 - Estabilidade da amostra A256, nas condições de armazenamento CPP.

	Mês 0	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	-20%	20%
EdME	7,13054	2,738975	6,44933	3,846276	2,435928	2,956307	3,353189	5,704432	8,556648
EME	1,523219	2,629254	4,952025	3,249004	3,569265	7,094517	8,047088	1,218575	1,827863
Tropa	0,481026	0,339624	0,362718	0,292186	0,339898	0,289384	0,344619	0,384821	0,577231
Nor	2,046268	2,848697	2,879433	2,220234	1,869495	2,601302	2,346478	1,637015	2,455522
Cis	11,05559	11,94004	12,55433	11,96857	12,237	11,98662	10,83094	8,84447	13,2667
Trans	10,66845	11,22791	12,15091	12,07688	12,63361	12,1635	11,02166	8,534756	12,80213