

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES DO  
USO DE COCAÍNA E CRACK**

**ANDREA GARCIA PEREIRA**

**PORTO ALEGRE, 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES DO  
USO DE COCAÍNA E CRACK**

Dissertação apresentada por **Andrea  
Garcia Pereira** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Ana Maria Bergold

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dr. Adriano Otávio Maldaner

Instituto Nacional de Criminalística - INC-DPF/DF

#### CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Andrea Garcia

Obtenção, purificação e caracterização de biomarcadores do uso de cocaína e crack / Andrea Garcia Pereira. -- 2013.

200 f.

Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Cocaína. 2. Toxicologia Analítica. 3. Controle de Qualidade. I. Fröhlich, Pedro Eduardo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de farmácia da UFRGS e no Setor Técnico-Científico da Polícia Federal do Rio Grande do Sul (SETEC/DPF-RS), na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Pedro Eduardo Fröhlich pela orientação, dedicação constante, paciência, incentivo e pela confiança depositada para a realização deste trabalho.

À Profa. Renata Pereira Limberger pelo incentivo, auxílio, dedicação e pelos esclarecimentos.

À Profa. Ana Maria Bergold pela amizade, carinho e colaboração.

Ao Perito Marcelo Gatteli pela oportunidade e valiosas discussões para aprimoramento deste trabalho.

Ao Perito Bruno Todeschini e demais peritos do SETEC da Polícia Federal pelo incentivo, pelas proveitosas discussões e pela disponibilidade do laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Felipe, Pamela, Ana Paula, Cristiane, Fernanda, Graciela, Marcella, Tamara, Dani, Luana, Joyce, Mari, Carol, Esther, Leo pela convivência e amizade.

A Sirlei e ao Marquinho pela amizade e apoio desde que entrei no Laboratório.

Ao Laboratório de Toxicologia e à colega Eloisa pelo auxílio.

Às minhas amigas Amanda Frasson, Amanda Barden, Karine, Maiara e Thatiana pela amizade sincera desde os tempos da graduação.

Ao Diego, meu namorado, por todo o amor, compreensão e apoio durante o tempo do mestrado.

Aos meus pais Elso e Dinora e irmãos Fabiano e Alexandre por estarem sempre presentes e por todo o apoio.



## RESUMO

### **Obtenção, purificação e caracterização de biomarcadores do uso de cocaína e *crack***

As substâncias químicas de referência (SQR) são de extrema importância para a identificação e quantificação de substâncias diversas, tanto em análises de controle de qualidade de medicamentos quanto em análises toxicológicas e forenses. No entanto, existem muitos problemas burocráticos e financeiros que dificultam a obtenção destas SQR no Brasil, especialmente porque a maioria deve ser adquirida do exterior. O objetivo do presente trabalho foi purificar e caracterizar o cloridrato de cocaína (COC), bem como sintetizar, purificar e caracterizar alguns dos principais produtos de degradação e pirólise da cocaína: benzoilecgonina (BZE), ecgonina (ECG), anidroecgonina (AEC) e éster metílico de anidroecgonina (AEME). As sínteses das quatro substâncias foram realizadas por métodos simples a partir do cloridrato de cocaína. As purificações foram realizadas por métodos de cristalização gerando produtos com pureza adequada para serem usados como SQR. A caracterização das SQR foi realizada através de métodos de identificação como faixa de fusão ou ponto de ebulição, espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , calorimetria diferencial exploratória (DSC), rotação óptica específica e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM). A determinação de pureza foi realizada através da determinação das impurezas voláteis, impurezas inorgânicas e orgânicas. A determinação do teor foi calculada por balanço de massas usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta e aerossol carregado (CLAE-UV/CAD) para a quantificação das impurezas orgânicas. Os métodos por CL-EM, CLAE-UV e CLAE-CAD foram validados e demonstraram ser seletivos, lineares, precisos e exatos. Os métodos de CLAE-UV e CLAE-CAD foram comparados na determinação de COC, AEC, BZE e levamisol (LEV), impureza presente na cocaína, e mostraram não ter diferença significativa. ECG não foi detectada por UV e AEME não foi detectada por CAD.

**Palavras-chave:** Cocaína, produtos de degradação, produtos de pirólise, síntese, purificação, caracterização



## ABSTRACT

### **Obtaining, purification and characterization of biomarkers of cocaine and *crack***

Chemical reference substances (CRS) are extremely important for the identification and quantification of several chemicals, not only in quality control analysis of medicines but also in forensic and toxicological analysis. However, there are many bureaucratic and financial problems hindering the obtention of these CRS in Brazil, especially because most of them must come from overseas. Therefore, the objective of this work was to purify and characterize cocaine hydrochloride, and synthesize, purify and characterize some of cocaine major degradation and pyrolysis products: benzoylecgonine, ecgonine, anhydroecgonine and anhydroecgonine methyl ester. The syntheses of these substances were performed by simple methods using cocaine hydrochloride as starting product. Purification was performed by crystallization methods yielding products with adequate purity to be used as CRS. CRS characterizations were carried out by identification methods such as melting range or boiling point, infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance (NMR)  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , differential scanning calorimetry (DSC), specific optical rotation and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Purity determination was performed determining volatile, organic and inorganic impurities. The content of each substance was calculated using the mass balance approach using liquid chromatography coupled with UV detector and charged aerosol detector (LC-UV-CAD) to quantify the organic impurities. LC-MS, -LC-UV and -LC-CAD methods were validated and shown to be selective, linear, precise and accurate. The results from both LC-UV and LC-CAD methods were compared to determine COC, AEC, BZE and levamisole (LEV), a contaminant present in cocaine showing no significant difference. ECG was not detected by UV and AEME was not detected by CAD.

**Keywords:** Cocaine, degradation products, pyrolytic products, synthesis, purification, characterization



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Produtos de biotransformação e pirólise da cocaína.....	28
<b>Figura 3.1</b> - Tablete de cloridrato de cocaína obtido de apreensão e teste de Scott (a); Teste de Scott modificado (b) .....	39
<b>Figura 3.2</b> - Cromatograma referente à amostra de apreensão de cloridrato de cocaína; 1 –ester metílico de anidroecgonina, 2 – levamisol, 3 – impureza, 4 – cloridrato de cocaína .....	40
<b>Figura 3.3</b> - Cromatograma obtido para a amostra de cloridrato de cocaína contaminada antes das etapas de purificação; 1 – levamisol; 2 – cloridrato de cocaína; 3 e 4 – impurezas .....	41
<b>Figura 3.4</b> - Gráfico da solubilidade <i>versus</i> temperatura .....	42
<b>Figura 3.5</b> – Termograma obtido por Calorimetria exploratória diferencial da amostra de cloridrato de cocaína contaminada com levamisol antes da etapa de purificação com taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio contendo 1,53 mg .	46
<b>Figura 3.6</b> - DSC da amostra cristalizada em etanol hidratado com taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio contendo 1,83 mg .....	47
<b>Figura 3.7</b> - DSC da amostra cristalizada em isopropanol com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em panela de alumínio contendo 1,40 mg .....	47
<b>Figura 3.8</b> - Imagem do pó de cloridrato de cocaína (a, b e c) em microscópio óptico; (d) imagem na luz fluorescente .....	50
<b>Figura 3.9</b> - Termograma de calorimetria exploratória diferencial para cloridrato de cocaína purificado com etanol absoluto, candidato à SQR usando taxa de aquecimento de 10°C/min em panela de alumínio contendo 1,36 mg .....	53
<b>Figura 3.10</b> - Espectro de infravermelho da amostra de cloridrato de cocaína obtido usando refletância total atenuada .....	58
<b>Figura 3.11</b> - Espectro de IV de cloridrato de cocaína obtida da literatura usando ATR e pastilhas de KBr .....	59
<b>Figura 3.12</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de cloridrato de cocaína utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	61

<b>Figura 3.13</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C de cloridrato de cocaína utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm.....	62
<b>Figura 3.14</b> - Cromatograma obtido para cloridrato de cocaína por LC-MS usando coluna Luna C18(2) e fase móvel metanol: acetato de amônio 10mM pH6,3 (57:43) e espectros de massas da substância (A) e suas respectiva impureza, cinamoilcocaína (B).....	65
<b>Figura 3.15</b> - Cromatograma obtido para cloridrato de cocaína por CLAE-UV usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila:acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20 uL; 1 – benzoilecgonina; 2 – Cloridrato de cocaína; 3 - cinamoilcocaína .....	67
<b>Figura 4.1</b> - Representação do mecanismo de hidrólise de ésteres carboxílicos catalisada por ácido.....	77
<b>Figura 4.2</b> - Representação da reação de formação dos alcenos.....	77
<b>Figura 4.3</b> - Termograma de calorimetria exploratória diferencial da amostra de cloridrato de anidroecgonina após a síntese, sem purificação, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em panela de alumínio contendo 1,87 mg .....	79
<b>Figura 4.4</b> - Cromatograma obtido para o produto bruto da síntese de cloridrato de anidroecgonina por CL-EM, apresentando os picos de anidroecgonina (5), ecgonina (2) e levamisol (3) .....	81
<b>Figura 4.5</b> - Cromatograma do produto bruto obtido através da síntese do cloridrato de ecgonina por CL-EM em modo SCAN, mostrando os picos de ecgonina (6), anidroecgonina (5) e benzoilecgonina (3).....	86
<b>Figura 4.6</b> - Cromatograma do produto bruto obtido através da síntese da benzoilecgonina por CL-EM em modo <i>scan</i> de m/z 80-600.1-ecgonina; 2 - benzoilecgonina; 3-cocaína; 4 -cinamoilcocaína .....	89
<b>Figura 4.7</b> - Representação da esterificação de Fischer que ocorre na síntese do éster metílico de anidroecgonina .....	92
<b>Figura 4.8</b> - Cromatograma do produto obtido através da síntese do éster metílico de anidroecgonina por CL-EM em modo SCAN .....	94

<b>Figura 4.9</b> - Imagem do pó de cloridrato de anidroecgonina (a) em microscópio óptico; pó do cloridrato de ecgonina (b) em microscópio óptico; benzoilecgonina (c) em microscópio óptico e (d) luz fluorescente .....	95
<b>Figura 4.10</b> - Termograma obtido para cloridrato de anidroecgonina purificado, candidato à SQR usando taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio .....	99
<b>Figura 4.11</b> - Termograma obtido para cloridrato de ecgonina purificado, candidato à SQR usando taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio.....	100
<b>Figura 4.12</b> - Termograma obtido para benzoilecgonina purificada, candidata à SQR usando taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio.....	101
<b>Figura 4.13</b> - Espectro de infravermelho da amostra de cloridrato de anidroecgonina obtido usando ATR.....	109
<b>Figura 4.14</b> - Espectro de infravermelho da amostra cloridrato de ecgonina obtido usando ATR .....	110
<b>Figura 4.15</b> - Espectro de infravermelho da amostra de benzoilecgonina obtido usando ATR .....	111
<b>Figura 4.16</b> - Espectro de infravermelho da amostra de éster metílico de anidroecgonina obtido usando ATR .....	112
<b>Figura 4.17</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de cloridrato de anidroecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	114
<b>Figura 4.18</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C de cloridrato de anidroecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	115
<b>Figura 4.19</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de cloridrato de ecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	116
<b>Figura 4.20</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C de cloridrato de ecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	117
<b>Figura 4.21</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de benzoilecgonina utilizando metanol-d <sup>4</sup> como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm.....	118
<b>Figura 4.22</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C de benzoilecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	119

<b>Figura 4.23</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do éster metílico de anidroecgonina utilizando metanol-d <sup>4</sup> como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	120
<b>Figura 4.24</b> - Espectro de RMN- <sup>13</sup> C do éster metílico de anidroecgonina utilizando metanol-d <sup>4</sup> como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm .....	121
<b>Figura 4.25</b> - Cromatograma obtido para cloridrato de anidroecgonina por CLAE-CAD (1) e CLAE-UV (2) usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20 uL, em 200 nm, mostrando impurezas por UV (a,b) e por CAD (d,e) e o pico do cloridrato de anidroecgonina por UV (c) e CAD (f) .....	124
<b>Figura 4.26</b> - Cromatograma obtido para cloridrato de ecgonina por CLAE-CAD usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20 uL, mostrando as impurezas (1e 3) e o pico de cloridrato de ecgonina (2) .....	125
<b>Figura 4.27</b> - Cromatograma obtido para benzoilecgonina por CLAE-CAD (1) e CLAE-UV (2) usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20 uL, em 200 nm, mostrando o pico de benzoilecgonina por UV (a) e CAD (d) e as impurezas por UV (b) e por CAD (c,e) .....	126
<b>Figura 4.28</b> - Cromatograma obtido para éster metílico de anidroecgonina por CLAE-UV usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20 uL, em 200 nm, mostrando os picos de impurezas (a, b) e o pico do éster metílico de anidroecgonina (c) .....	127

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Índice de polaridade e ponto de ebulição de solventes .....	43
<b>Tabela 3.2</b> - Tabela de solubilidade do cloridrato de cocaína e cloridrato de levamisol .....	44
<b>Tabela 3.3</b> - Valores obtidos para a faixa de fusão do cloridrato de cocaína em equipamento automático Mettler Toledo FP90.....	51
<b>Tabela 3.4</b> - Determinações de rotação óptica específica para cloridrato de cocaína .....	54
<b>Tabela 3.5</b> - Valores obtidos de porcentagem de substâncias voláteis no ensaio de perda por dessecação para amostra de cloridrato de cocaína.....	55
<b>Tabela 3.6</b> - Valores das porcentagens de substâncias inorgânicas presente na amostra de cloridrato de cocaína .....	57
<b>Tabela 3.7</b> - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de cloridrato de cocaína e suas atribuições .....	59
<b>Tabela 3.8</b> - Dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H de cloridrato de cocaína utilizando espectrômetro de 400MHz .....	61
<b>Tabela 3.9</b> - Dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C de cloridrato de cocaína utilizando espectrômetro de 9,4 Tesla.....	63
<b>Tabela 3.10</b> - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra.....	67
<b>Tabela 4.1</b> - Solubilidade do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina e ácido benzoico .....	81
<b>Tabela 4.2</b> - Solubilidade da benzoilecgonina, cocaína, ecgonina e cinamoilcocaína .....	90
<b>Tabela 4.3</b> - Valores médios obtidos para a faixa de fusão do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina e benzoilecgonina e ponto de ebulição para éster metílico de anidroecgonina em equipamento automático Mettler Toledo FP90 .....	96

<b>Tabela 4.4</b> - Determinações de rotação óptica específica média para cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina a 1 g% .....	103
<b>Tabela 4.5</b> - Valores obtidos de porcentagem média de substâncias voláteis no ensaio de perda por dessecação para as amostras de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina.....	105
<b>Tabela 4.6</b> - Valores, em porcentagem, de substâncias inorgânicas presente nas amostras de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina. ....	107
<b>Tabela 4.7</b> - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de cloridrato de anidroecgonina e suas atribuições.....	109
<b>Tabela 4.8</b> - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de cloridrato de ecgonina e suas atribuições.....	110
<b>Tabela 4.9</b> - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de benzoilecgonina e suas atribuições.....	111
<b>Tabela 4.10</b> - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de éster metílico de anidroecgonina e suas atribuições. ....	112
<b>Tabela 4.11</b> - Dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H de cloridrato de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz.....	114
<b>Tabela 4.12</b> - Dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C de cloridrato de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 9,4 Tesla .....	115
<b>Tabela 4.13</b> - Dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H de cloridrato de ecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz.....	116
<b>Tabela 4.14</b> - Dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C de cloridrato de ecgonina utilizando espectrômetro de 9,4Tesla .....	117
<b>Tabela 4.15</b> - Dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H da benzoilecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS em espectrômetro de 400MHz .....	118
<b>Tabela 4.16</b> - Dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C da benzoilecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz.....	119

<b>Tabela 4.17</b> - Dados do espectro de RMN- <sup>1</sup> H de éster metílico de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz .....	120
<b>Tabela 4.18</b> - Dados do espectro de RMN <sup>13</sup> C do éster metílico de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 9,4 Tesla.....	121
<b>Tabela 4.19</b> - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de cloridrato de anidroecgonina.....	124
<b>Tabela 4.20</b> - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de cloridrato de ecgonina.....	125
<b>Tabela 4.21</b> - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de benzoilecgonina tetraidratada .....	126
<b>Tabela 4.22</b> - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de éster metílico de anidroecgonina.....	127



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 <b>Objetivos Gerais</b> .....	<b>33</b>
2.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	<b>33</b>
<b>3 CAPÍTULO 1 – Purificação e Caracterização de Cloridrato de Cocaína</b> .....	<b>35</b>
3.1 <b>Procedência da amostra</b> .....	<b>38</b>
3.2 <b>Identificação e avaliação da pureza da amostra apreendida</b> .....	<b>38</b>
3.2.1 <b>Teste de Scott modificado</b> .....	<b>38</b>
3.2.1.1 <b>Material e métodos</b> .....	<b>38</b>
3.2.1.2 <b>Resultados e discussão</b> .....	<b>38</b>
3.2.2 <b>Cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrômetro de massas (EM)</b> .....	<b>39</b>
3.2.2.1 <b>Material e métodos</b> .....	<b>39</b>
3.2.2.2 <b>Resultados e discussão</b> .....	<b>40</b>
3.2.3 <b>Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)</b> .....	<b>41</b>
3.2.3.1 <b>Material e métodos</b> .....	<b>41</b>
3.2.3.2 <b>Resultados e discussão</b> .....	<b>41</b>
3.3 <b>Desenvolvimento do método de purificação do cloridrato de cocaína</b> .....	<b>42</b>
3.3.1 <b>Escolha do solvente</b> .....	<b>42</b>
3.3.1.1 <b>Material e métodos</b> .....	<b>43</b>
3.3.1.2 <b>Resultados e discussão</b> .....	<b>43</b>
3.4 <b>Análise por Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</b> .....	<b>45</b>
3.4.1 <b>Material e Métodos</b> .....	<b>45</b>
3.4.2 <b>Resultados e discussão</b> .....	<b>45</b>
3.5 <b>Purificação do cloridrato de cocaína</b> .....	<b>48</b>
3.5.1 <b>Material e métodos</b> .....	<b>48</b>
3.5.2 <b>Resultados e discussão</b> .....	<b>48</b>
3.6 <b>Caracterização do Cloridrato de Cocaína candidato à SQR</b> .....	<b>49</b>
3.6.1 <b>Aspectos visuais</b> .....	<b>49</b>
3.6.1.1 <b>Material e métodos</b> .....	<b>49</b>
3.6.1.2 <b>Resultados e discussão</b> .....	<b>50</b>

<b>3.6.2</b>	<b>Determinação do ponto de fusão.....</b>	<b>50</b>
3.6.2.1	Material e métodos.....	50
3.6.2.2	Resultados e discussão .....	51
<b>3.6.3</b>	<b>Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....</b>	<b>51</b>
3.6.3.1	Material e métodos.....	52
3.6.3.2	Resultados e discussão .....	52
<b>3.6.4</b>	<b>Rotação específica.....</b>	<b>53</b>
3.6.4.1	Material e métodos.....	53
3.6.4.2	Resultados e discussão .....	54
<b>3.6.5</b>	<b>Perda por dessecação .....</b>	<b>55</b>
3.6.5.1	Material e métodos.....	55
3.6.5.2	Resultados e discussão .....	55
<b>3.6.6</b>	<b>Determinação de cinzas sulfatadas (Resíduo por incineração).....</b>	<b>56</b>
3.6.6.1	Material e métodos.....	56
<b>3.6.7</b>	<b>Espectroscopia na região de infravermelho (IV) .....</b>	<b>57</b>
3.6.7.1	Material e métodos.....	58
3.6.7.2	Resultados e discussão .....	58
<b>3.6.8</b>	<b>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....</b>	<b>60</b>
3.6.8.1	Material e métodos.....	60
3.6.8.2	Resultados e discussão .....	60
<b>3.6.9</b>	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM).....</b>	<b>63</b>
3.6.9.1	Material e métodos.....	63
3.6.9.2	Resultados e discussão .....	64
<b>3.6.10</b>	<b>Balanço de massas por CLAE-UV .....</b>	<b>65</b>
3.6.10.1	Material e métodos.....	66
3.6.10.2	Resultados e discussão .....	66
<b>3.7</b>	<b>Substância Química de Referência de cloridrato de cocaína.....</b>	<b>67</b>
<b>3.8</b>	<b>Tratamento de resíduos.....</b>	<b>68</b>
<b>3.9</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>69</b>
<b>3.10</b>	<b>Referências .....</b>	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2 – Síntese, purificação e caracterização dos principais produtos de pirólise e produtos de degradação da cocaína.....</b>	<b>73</b>

<b>4.1</b>	<b>Introdução</b>	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Síntese de cloridrato de anidroecgonina</b>	<b>75</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>76</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>76</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Análise do cloridrato de anidroecgonina sintetizado</b>	<b>78</b>
4.2.3.1	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	78
4.2.3.1.1	Material e métodos	78
4.2.3.1.2	Resultados e discussão	79
4.2.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)	80
4.2.3.2.1	Material e métodos	80
4.2.3.2.2	Resultados e discussão	80
<b>4.3</b>	<b>Purificação do cloridrato de anidroecgonina</b>	<b>81</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>82</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>82</b>
<b>4.4</b>	<b>Síntese do Cloridrato de Ecgonina</b>	<b>83</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>84</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>84</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise do produto obtido a partir da síntese do cloridrato de ecgonina</b>	<b>85</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massas (CL-EM)</b>	<b>85</b>
4.5.1.1	Material e métodos	85
4.5.1.2	Resultados e discussão	85
<b>4.6</b>	<b>Purificação do cloridrato de ecgonina</b>	<b>86</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>86</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>86</b>
<b>4.7</b>	<b>Síntese da benzoilecgonina</b>	<b>87</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>87</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>88</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise do produto obtido através da síntese da benzoilecgonina</b>	<b>88</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)</b>	<b>89</b>
4.8.1.1	Material e métodos	89
4.8.1.2	Resultados e discussão	89
<b>4.9</b>	<b>Purificação da benzoilecgonina</b>	<b>89</b>

<b>4.9.1</b>	<b>Material e métodos</b> .....	<b>90</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>90</b>
<b>4.10</b>	<b>Síntese do éster metílico de anidroecgonina</b> .....	<b>91</b>
<b>4.10.1</b>	<b>Material e métodos</b> .....	<b>91</b>
<b>4.10.2</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>92</b>
<b>4.11</b>	<b>Análise do produto obtido a partir da síntese do éster metílico de anidroecgonina</b> .....	<b>93</b>
<b>4.11.1</b>	<b>Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)</b> ...	<b>93</b>
4.11.1.1	Material e métodos.....	93
4.11.1.2	Resultados e discussões .....	93
<b>4.12</b>	<b>Caracterização do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina</b> .....	<b>94</b>
<b>4.12.1</b>	<b>Aspectos Visuais</b> .....	<b>94</b>
4.12.1.1	Material e métodos.....	94
4.12.1.2	Resultados e discussão .....	94
<b>4.12.2</b>	<b>Determinação do ponto de fusão</b> .....	<b>95</b>
4.12.2.1	Material e métodos.....	95
4.12.2.2	Resultados e discussão .....	96
<b>4.12.3</b>	<b>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</b> .....	<b>97</b>
4.12.3.1	Material e métodos.....	98
4.12.3.2	Resultados e discussão .....	98
<b>4.12.4</b>	<b>Rotação específica</b> .....	<b>101</b>
4.12.4.1	Material e métodos.....	102
4.12.4.2	Resultados e discussão .....	102
<b>4.12.5</b>	<b>Perda por dessecação</b> .....	<b>104</b>
4.12.5.1	Material e métodos.....	104
4.12.5.2	Resultados e discussão .....	104
<b>4.12.6</b>	<b>Determinação de água</b> .....	<b>105</b>
4.12.6.1	Material e métodos.....	106
4.12.6.2	Resultados e discussões .....	106
<b>4.12.7</b>	<b>Determinação de cinzas sulfatadas (Resíduo por incineração)</b> .....	<b>106</b>
4.12.7.1	Material e métodos.....	106
4.12.7.2	Resultados e discussão .....	107

<b>4.12.8 Espectroscopia na região de infravermelho (IV)</b> .....	<b>107</b>
4.12.8.1 Material e métodos .....	108
4.12.8.2 Resultados e discussão.....	108
<b>4.12.9 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</b> .....	<b>113</b>
4.12.9.1 Material e métodos .....	113
4.12.9.2 Resultados e discussão.....	113
<b>4.12.10 Balanço de massas por CLAE-UV e CLAE-CAD</b> .....	<b>122</b>
4.12.10.1 Material e métodos .....	122
4.12.10.2 Resultados e discussão .....	123
<b>4.13 Substâncias Químicas de Referência</b> .....	<b>128</b>
<b>4.14 Conclusão</b> .....	<b>129</b>
<b>4.15 Referências</b> .....	<b>130</b>
<b>5 CAPÍTULO 3 – Determinação de cocaína, seus metabólitos, produtos de pirólise por CL-EM usando abordagem quimiométrica</b> .....	<b>133</b>
<b>6 CAPÍTULO 4 – Desenvolvimento e validação de método para determinação de cocaína, seus principais metabólitos e produtos de pirólise por CLAE-UV e CLAE-CAD</b> .....	<b>139</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>185</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>189</b>
<b>9 APÊNDICE</b> .....	<b>193</b>







O estudo da cocaína e dos seus metabólitos é de grande importância, visto que ela é uma das drogas de abuso mais consumidas no mundo. Mais recentemente, nos anos 90, o *crack*, a forma básica da cocaína na forma de “pedras”, passou a ser conhecido no Brasil, com crescente número de usuários, popularizando-se rapidamente entre as classes mais baixas da população (FILHO et al., 2003).

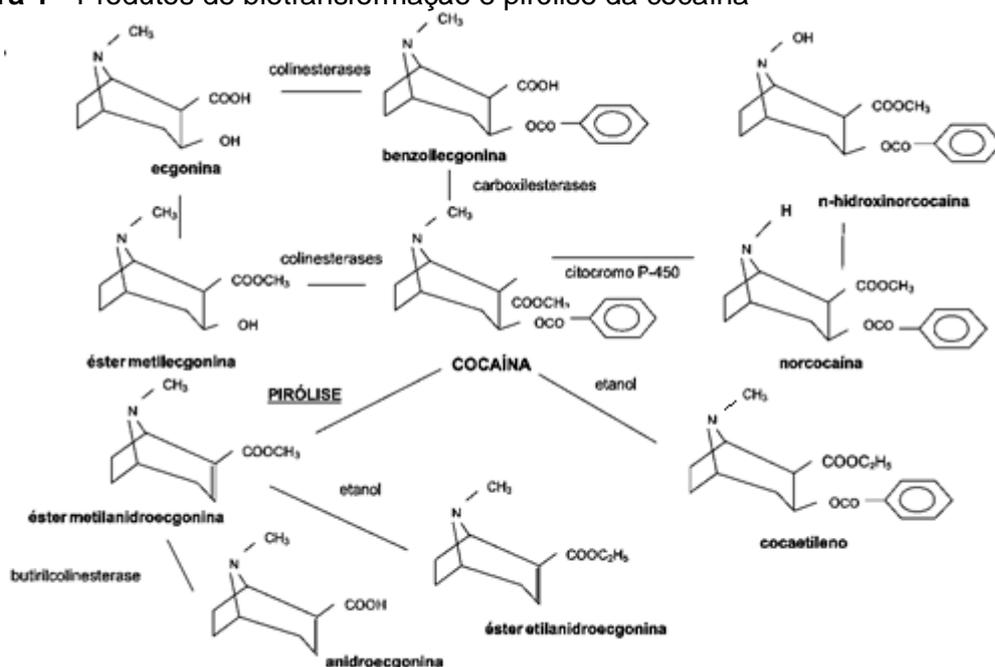
A cocaína é susceptível a uma biotransformação extensa (Figura 1). A hidrólise das ligações ésteres ocorre de forma espontânea ou por efeito enzimático. A transformação produz a benzoilecgonina, o éster metílico da ecgonina e a ecgonina, além da formação de outros metabólitos, embora em menores proporções, como norcocaína e norbenzoilecgonina. Em torno de 86-90% da dose administrada é recuperada na urina como um destes três principais produtos (BILLINGS, 2003), principalmente a benzoilecgonina que é o principal marcador do uso de cocaína, sem diferenciar a via de administração (CHASIN e CARVALHO, 2008). O *crack*, ao ser aquecido, forma o éster metílico da anidroecgonina e, já no organismo, este é convertido principalmente em anidroecgonina (PAUL et al., 2005). Assim, estas duas substâncias são consideradas importantes marcadores do uso de *crack* em análises toxicológicas e forenses, uma vez que se formam unicamente durante o consumo de *crack*.

As análises toxicológicas e forenses desempenham um papel importante ao possibilitar a diferenciação entre as formas de uso da cocaína através da detecção dos seus metabólitos. As principais formas de autoadministração da cocaína são a intranasal e intravenosa, em que a cocaína consumida se apresenta na forma do sal cloridrato, a outra forma muito consumida é a fumada que se apresenta na forma de base livre (CHASIN e CARVALHO, 2008).

Segundo a Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, e as atualizações presentes na RDC nº 39, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 9 de julho de 2012, a cocaína e a ecgonina constam na lista F1 (substâncias entorpecentes de uso proscrito no Brasil), bem como seus sais, isômeros e ésteres, além dos derivados da substância ecgonina que sejam transformáveis em ecgonina ou cocaína.

Para a realização de uma análise satisfatória e confiável, é necessário, muitas vezes, o uso de substâncias químicas (SQR) de referência para comprovar a composição da amostra analisada. Todavia, estas SQR existem em número bastante restrito no país, e este número se restringe ainda mais quando estamos trabalhando com substâncias de uso controlado ou proscrito, como é o caso da cocaína e produtos relacionados.

**Figura 1** - Produtos de biotransformação e pirólise da cocaína



Fonte: Carvalho, 2006.

A necessidade do uso de material de referência obriga os laboratórios a recorrerem ao mercado internacional para sua aquisição. Principalmente quando relacionado a substâncias controladas ou proscritas, este processo é bastante demorado, necessitando da aprovação de diversos órgãos regulatórios, além de possuir custos muito elevados. Sendo assim, as análises se tornam ainda mais caras, principalmente para laboratórios públicos e de pequeno porte. Além disso, a entrada destas substâncias em nosso país ocorre apenas em quatro localizações: os aeroportos de Guarulhos (SP) e Galeão (RJ) e os portos de Santos (SP) e Rio de Janeiro (RJ). As transportadoras, por sua vez, necessitam de autorização especial e outros documentos para realizar a entrega deste tipo de substância, o que dificulta ainda mais a compra (BRASIL, 1998).

Em nosso grupo de pesquisa temos alguns casos de tentativa de compra deste tipo de substância que nunca pôde ser entregue pelos motivos descritos acima, o que atrasou ou impossibilitou a realização de pesquisas científicas importantes que poderiam contribuir em âmbito nacional no combate do uso de drogas no país.

Nesse contexto, a importância de dispor de SQR de cocaína, benzoilecgonina, ecgonina, bem como dos seus produtos de pirólise, éster metílico da anidroecgonina e anidroecgonina, trouxe a necessidade do desenvolvimento destes produtos por síntese, partindo-se do cloridrato de cocaína. A cocaína pode ser considerada, neste âmbito, de mais fácil obtenção em vista do grande número de apreensões realizadas pelas polícias e pela parceria estabelecida entre a Faculdade de Farmácia da UFRGS e a Polícia Federal do Rio Grande do Sul, que permitiu o uso do produto de apreensão para uso científico após devida liberação judicial. A cocaína de apreensão geralmente possui alguns diluentes ou adulterantes misturados, tais como lidocaína, fenacetina, levamisol e açúcares (UNODC, 2012). A presença de levamisol como adulterante da cocaína tem aumentado nos últimos anos, sendo um dos adulterantes mais comuns (CASALE et al., 2012). A cocaína usada neste trabalho possui o adulterante levamisol, necessitando o desenvolvimento de método específico para sua purificação.

As sínteses dos produtos de interesse deste trabalho são relatadas na literatura tanto usando a cocaína como produto de partida como a síntese completa do produto de interesse (MATCHETT e LEVIN, 1941; HENRY, 1949; FINDLAY, 1954; ZIRKLE et al., 1962; LUKASZEWSKI e JEFFERY, 1980). No entanto, não é relatada a purificação destes produtos.

A purificação e a caracterização das substâncias sintetizadas são pontos de extrema importância no estabelecimento de SQR. Para tanto é necessário o uso de métodos adequados que possibilitem a retirada das impurezas, como o método de cristalização, que embora tenha um baixo rendimento possibilita a obtenção de um produto com alta pureza. A caracterização para o estabelecimento das SQR é realizado através de métodos que podem ser divididos em dois grupos: os que se destinam a identificação das substâncias, e os utilizados na determinação da pureza (WHO, 2006).







## 2.1 Objetivos Gerais

Obter substâncias químicas de referência com grau de pureza estabelecido de cloridrato de cocaína, benzoilecgonina, cloridrato de ecgonina, cloridrato de anidroecgonina e éster metílico de anidroecgonina.

## 2.2 Objetivos específicos

- Purificar e caracterizar o cloridrato de cocaína;
- Sintetizar benzoilecgonina, cloridrato de ecgonina, cloridrato de anidroecgonina e éster metílico da anidroecgonina a partir do cloridrato de cocaína
- Purificar as substâncias de interesse através de técnicas adequadas;
- Caracterizar as substâncias purificadas através de métodos adequados e determinar suas purezas;
- Desenvolver e validar método analítico para identificação e quantificação de cocaína e seus principais produtos de degradação e de pirólise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM).
- Desenvolver e validar métodos analíticos para a quantificação das amostras de cocaína e seus principais produtos de degradação e pirólise por cromatografia líquida acoplada a detectores de ultravioleta (UV) e de aerossol carregado (CAD).







Com o intuito de aumentar os lucros, traficantes geralmente acrescentam adulterantes ou diluentes à droga (DEA, 2011). Os principais diluentes são açúcares tais como lactose, sacarose, manitol. Os adulterantes são substâncias que mimetizam ou alteram o efeito da cocaína, como a lidocaína, a benzocaína, a fenacetina e a procaína. Alguns adulterantes podem causar intoxicação aguda como atropina e escopolamina, ou intoxicação crônica como levamisol (EVRARD et al., 2010). A cocaína de importação/exportação geralmente possui pureza entre 80 e 90%. Quando esta chega às ruas, a pureza diminui para 30% com a adulteração e diluição (UNODC, 2012).

A cocaína mesmo sem adulterantes adicionados propositalmente possui impurezas das fases de extração da planta. Estes são alcaloides também encontrados nas folhas de coca, produtos de degradação da cocaína e solventes residuais usados no isolamento da substância (MOORE et al., 1994).

Para a retirada de impurezas, contaminantes e solventes residuais de um produto sólido é necessário o uso de técnicas de purificação. Existem diversas técnicas usadas em laboratórios químicos principalmente cristalização, extração com solventes, destilação fracionada e cromatografia preparativa. A cristalização é uma técnica muito simples de ser realizada e, por este motivo, uma das mais utilizadas para obter um produto puro (PAVIA et al., 2007).

Após a etapa de purificação é importante caracterizar o produto. Para isso, faz-se uso de técnicas de avaliação físico-químicas. Os métodos para o estabelecimento das substâncias são divididos em dois grupos: aqueles com a finalidade de identificar a substância e aqueles usados para estabelecer sua pureza. Para o estabelecimento de uma substância química de referência deve-se determinar a identidade e a pureza da substância baseadas na avaliação dos resultados dos testes analíticos. Toda a preparação e controle das SQR devem ser realizados de acordo com os princípios de boas práticas de fabricação e boas práticas de controle de qualidade (WHO, 2006).

Sendo assim, este estudo teve por objetivo a purificação do cloridrato de cocaína originado de uma apreensão através da técnica de cristalização, bem como

a caracterização da substância utilizando ensaios de identificação e análises de pureza para o estabelecimento da SQR.

### **3.1 Procedência da amostra**

A matéria-prima cloridrato de cocaína utilizada para a realização deste trabalho foi fornecida pelo Setor Técnico-Científico da Polícia Federal (SETEC), proveniente de uma apreensão realizada no estado do Rio Grande do Sul no ano de 2010. Uma quantidade específica de Cocaína lacrada foi devidamente autorizada pela Justiça Federal para o uso restrito na pesquisa, ficando a mesma armazenada no depósito do SETEC sob a guarda do Perito responsável pelo Projeto.

### **3.2 Identificação e avaliação da pureza da amostra apreendida**

#### **3.2.1 Teste de Scott modificado**

Teste de Scott modificado ou teste de tiocianato de cobalto é uma reação colorimétrica usualmente realizada nos laboratórios de polícia na triagem inicial de identificação da droga. O teste foi desenvolvido por Scott em 1973 e modificado por Fasanello e Higgins permitindo sua aplicação à cocaína na forma básica (TSUMURA et al., 2005). Além disso, o teste de Scott modificado utiliza menores concentrações de tiocianato de cobalto, diminuindo a probabilidade de resultados falsos positivos.

O teste foi realizado no laboratório de análises químicas do SETEC.

##### **3.2.1.1 Material e métodos**

O teste consiste na adição de aproximadamente 1 mg de cloridrato de cocaína em um tubo de ensaio e, em seguida, é adicionado 0,5 mL de solução de tiocianato de cobalto na amostra. Após o aparecimento de um precipitado azul, a solução é acidificada com 0,5 mL de ácido clorídrico. Após a reação, é adicionado clorofórmio.

##### **3.2.1.2 Resultados e discussão**

Após adição da solução de tiocianato de cobalto observou-se um precipitado de coloração azul, característico da reação do alcaloide com o cobalto. Ao se adicionar o ácido clorídrico a solução torna-se incolor, devido à quebra do complexo formado. A cor azul torna a aparecer na fase inferior na adição do clorofórmio (Figura 3.1).

**Figura 3.1** - Tablete de cloridrato de cocaína obtido de apreensão e teste de Scott (a); Teste de Scott modificado (b)



### 3.2.2 Cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrômetro de massas (EM)

Com o objetivo de identificar e avaliar os possíveis adulterantes presentes na amostra de apreensão o cloridrato de cocaína foi analisado por CG-EM, seguindo protocolo de rotina de análises para elaboração de laudo pericial do SETEC.

#### 3.2.2.1 Material e métodos

As análises foram realizadas em equipamento Agilent modelo 7890A, coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm ID x 0,25  $\mu$ m) com fluxo de gás de 1,0 mL/min, usando como gás de arraste hélio de alta pureza. As condições do método foram: temperatura do injetor: 180 °C; temperatura inicial do forno: 150 °C aumentando 15 °C/min até 220 °C permanecendo nesta temperatura por 10 min. Após este tempo a temperatura aumentou 15 °C/min até 290 °C permanecendo por 2 min. A temperatura da linha de transferência foi 290 °C.

A solução foi injetada em uma concentração de 2 mg/mL, em duplicata.

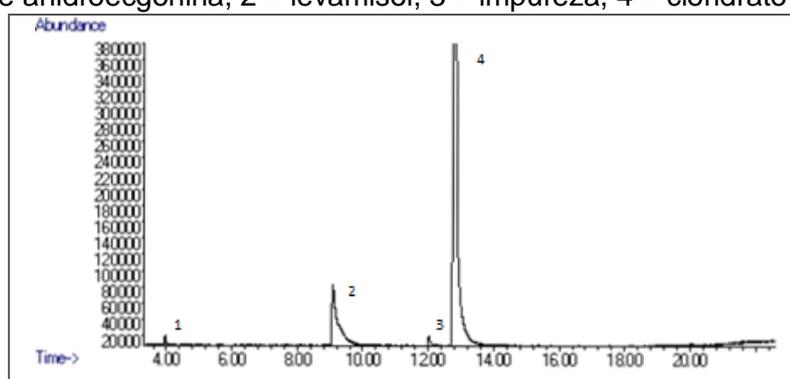
## 3.2.2.2 Resultados e discussão

CG-EM é uma técnica bastante utilizada para confirmação de resultados positivos encontrados nas etapas preliminares. O sistema permite a separação e identificação de substâncias através do espectro de massas, obtido pela fragmentação da molécula. Os softwares dos equipamentos geralmente possuem ótimas bibliotecas de estruturas que são bastante completas na área de toxicologia. Sendo assim, é possível identificar com boa precisão as substâncias presentes na amostra.

A avaliação da amostra foi realizada através da relação de áreas dos picos obtidos nos cromatogramas. A relação das áreas não pode ser considerada exata, devido à diferença no fator resposta de ionização de cada molécula, porém fornece uma boa aproximação das concentrações das substâncias presentes.

No cromatograma apresentado na Figura 3.2, a amostra de cloridrato de cocaína (4) apresentou a substância levamisol (2) como adulterante em uma concentração de aproximadamente 5%. Foram observados outros dois picos no cromatograma, o primeiro pico (1) se refere à substância éster metílico de anidroecgonina. Porém, essa substância não está presente na amostra mas é produzida pelas altas temperaturas do injetor no momento da injeção. Esse evento de pirólise é relatado por diversos autores (GONZÁLEZ et al., 1995; CARDONA et al., 2006). O segundo pico (3) se refere à impureza provavelmente proveniente das etapas de extração da cocaína da planta.

**Figura 3.2** - Cromatograma referente à amostra de apreensão de cloridrato de cocaína; 1 – éster metílico de anidroecgonina, 2 – levamisol, 3 – impureza, 4 – cloridrato de cocaína



### 3.2.3 Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)

A identificação do cloridrato de cocaína e seus contaminantes também foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM). A técnica de CL-EM foi preferida em virtude da praticidade na realização das análises e pela alta seletividade e sensibilidade da técnica para a detecção dos possíveis picos de impurezas (KAZAKEVICH, 2007).

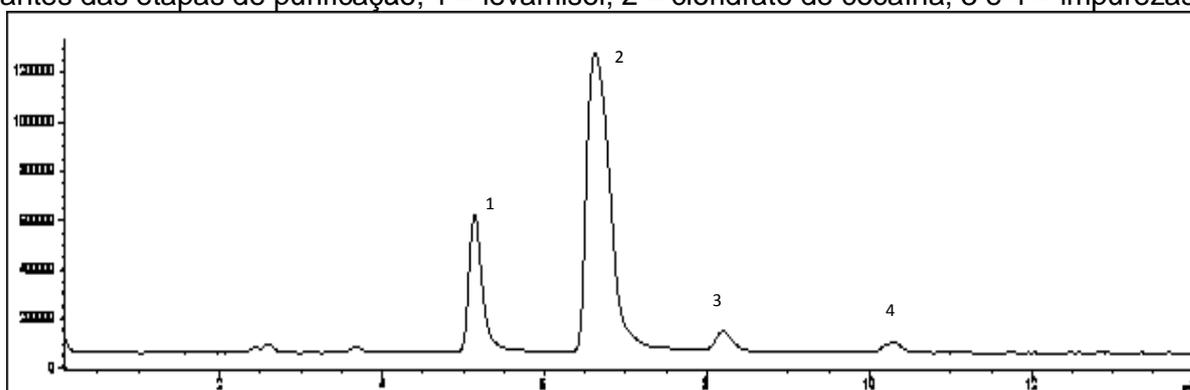
#### 3.2.3.1 Material e métodos

A identificação foi realizada em cromatógrafo a líquido acoplado a espectrômetro de massas, usando coluna Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). O sistema cromatográfico utilizado foi em modo isocrático com proporção de fase móvel de 53% metanol e 47% de acetato de amônio 10 mM, pH 6,3, ajustado com ácido acético. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, com temperatura do forno de 31 °C. Os detalhes do método serão apresentados no capítulo 4 deste trabalho.

#### 3.2.3.2 Resultados e discussão

Pelo cromatograma apresentado na Figura 3.3, pode-se identificar o pico do cloridrato de cocaína (2), levamisol (1) e outras impurezas provenientes das etapas de extração da cocaína (3 e 4).

**Figura 3.3** - Cromatograma obtido para a amostra de cloridrato de cocaína contaminada antes das etapas de purificação; 1 – levamisol; 2 – cloridrato de cocaína; 3 e 4 – impurezas



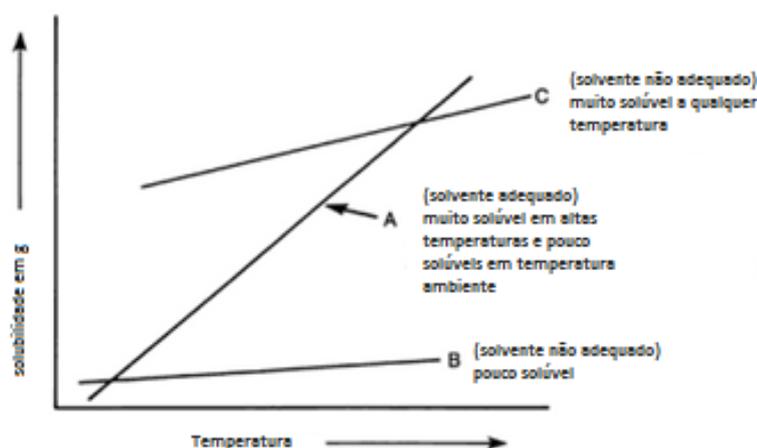
### 3.3 Desenvolvimento do método de purificação do cloridrato de cocaína

A técnica de cristalização foi utilizada para a purificação do cloridrato de cocaína. A cristalização é um processo de equilíbrio para produção de material mais puro, consistindo na dissolução do sólido em um solvente a quente e no resfriamento lento da solução permitindo a cristalização seletiva dos cristais. Como as impurezas estão geralmente em quantidades muito menores, estas ficarão solubilizadas após o resfriamento do solvente. Entretanto, para o sucesso da purificação, a escolha do solvente utilizado é fundamental (PAVIA et al., 2007).

#### 3.3.1 Escolha do solvente

A substância deve ser idealmente pouco solúvel à temperatura ambiente e muito solúvel no ponto de ebulição do solvente. Se a substância for muito solúvel à temperatura ambiente ou pouco solúvel em baixas e altas temperaturas, o solvente não será o ideal para a cristalização. A Figura 3.4 mostra o gráfico do solvente ideal para cristalização (linha A). A solubilidade dos compostos é uma função da polaridade do solvente e da substância. Se a substância for muito polar, é necessário um solvente polar para a sua solubilização. Outro parâmetro que deve ser avaliado é o ponto de ebulição do solvente. O mesmo não deve ser maior que o ponto de fusão do composto e não deve facilitar a degradação da substância. A Tabela 3.1 mostra o índice de polaridade e ponto de ebulição de alguns solventes de interesse. (PAVIA et al., 2007).

**Figura 3.4** - Gráfico da solubilidade *versus* temperatura



Fonte: Pavia et al., 2007

**Tabela 3.1** - Índice de polaridade e ponto de ebulição de solventes

<b>Solvente</b>	<b>Índice de polaridade</b>	<b>Ponto de ebulição (°C)</b>
Água	9,0	100
Acetonitrila	5,8	81
Etanol	5,2	78
Acetona	5,1	57
Acetato de etila	4,4	77
Clorofórmio	4,1	61,2
Isopropanol	3,9	82,5
Éter etílico	2,8	35

Fonte: (Adaptado de Pavia et al., 2007 )

### 3.3.1.1 Material e métodos

A escolha dos solventes a serem testados foi feita com base na polaridade e na solubilidade do cloridrato de cocaína e cloridrato de levamisol. As respectivas solubilidades foram retiradas da literatura e são apresentadas na Tabela 3.2 (MOFFAT, 2004; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2011).

### 3.3.1.2 Resultados e discussão

Com base na polaridade e solubilidade podemos verificar que os cloridratos de cocaína e levamisol são muito pouco solúveis em éter etílico, por ser um solvente apolar, não sendo este um solvente apropriado. Assim como a água, um solvente muito polar, não é favorável para a cristalização, pois as duas substâncias são muito solúveis. O clorofórmio também não foi selecionado, pois o cloridrato de levamisol é muito pouco solúvel neste solvente, assim iria precipitar com o cloridrato de cocaína. Foi realizado o teste de solubilidade em acetato de etila, porém o cloridrato de cocaína foi praticamente insolúvel mesmo após o aquecimento à temperatura de ebulição do solvente.

Sendo assim, os solventes escolhidos para iniciar os testes para a cristalização foram: álcool etílico absoluto, álcool etílico hidratado e isopropanol. A solubilidade do cloridrato de cocaína em acetato de etila e isopropanol não estava descrita em literatura e foi determinada no laboratório.

**Tabela 3.2** - Tabela de solubilidade do cloridrato de cocaína e cloridrato de levamisol

<b>Solventes</b>	<b>Cloridrato de cocaína</b>	<b>Cloridrato de levamisol</b>
Água	Muito solúvel	Solúvel (1:5)
Álcool Etílico	a frio (1: 3,2) e a quente (1:2,0)	Solúvel (1:50)
Éter etílico	Insolúvel	Muito pouco solúvel
Clorofórmio	1:12,5	1:3000
Acetona	Solúvel	Pouco solúvel
Acetato de Etila*	Praticamente insolúvel	Praticamente insolúvel
Isopropanol*	a quente (1: 30)	Pouco solúvel (1: 230)

\*Teste de solubilidade realizado no laboratório de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010)

Fonte: Moffat, 2004

O solvente que mostrou ser mais eficiente na retirada do cloridrato de levamisol e outras impurezas foi o etanol absoluto. O etanol hidratado, por conter maior quantidade de água na sua composição, solubilizou uma maior quantidade de cloridrato de cocaína, diminuindo ainda mais o rendimento. O uso do isopropanol necessitaria um maior número de recristalizações, pois as impurezas não foram totalmente retiradas com duas recristalizações, o que diminuiria o rendimento da purificação.

Boudreau e Casale (2008) relataram o uso de etanol para refinar a cocaína na produção clandestina, a chamada *base lavada*. O refino era feito na cocaína base, a qual também é solúvel em etanol. A técnica substituiu o refino usando permanganato de potássio.

Foi observado que uma cristalização e uma recristalização em etanol absoluto eram suficientes para a retirada do cloridrato de levamisol e dos produtos de degradação da cocaína. Após estas duas etapas, apenas uma pequena quantidade de cis/trans-cinamoilcocaína ainda estava presente como impureza e foi detectada por CL-EM.

Cis e trans-cinamoilcocaína são alcaloides presentes nas folhas de coca que permanecem mesmo após várias extrações. Só é possível a retirada destas substâncias através do processo de oxidação da cocaína com permanganato de potássio. É sabido, no entanto, que a oxidação com permanganato de potássio gera outros produtos como norcocaína e *N*-formilnorcocaína (ENSING e HUMMELEN, 1991).

Sendo assim, optou-se pela cristalização em etanol sem a oxidação do cloridrato de cocaína para a retirada da cis/trans-cinamoilcocaína.

### **3.4 Análise por Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica frequentemente escolhida devido à sua habilidade em prover informações detalhadas das propriedades físicas e energéticas de uma substância. A técnica vem sendo usada para fornecer informações sobre a pureza da amostra através da entalpia de fusão e temperatura de fusão usando a equação de Hoff (CLAS et al., 1999). As amostras foram analisadas e comparadas por DSC para a observação da pureza. A pureza foi confirmada por CG-EM.

#### **3.4.1 Material e Métodos**

Os experimentos de calorimetria exploratória diferencial para as amostras foram realizados no Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS. O equipamento usado foi SHIMADZU DSC-60 acoplado a integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS (Collection monitor versão 2.0, 1997-2003) e controlador de fluxo FC- 60, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min até 300 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min. As amostras foram analisadas em panelas de alumínio e foram pesados exatamente em torno de 1 a 2 mg.

As análises por CG-EM foram realizadas conforme item 3.2.2.1.

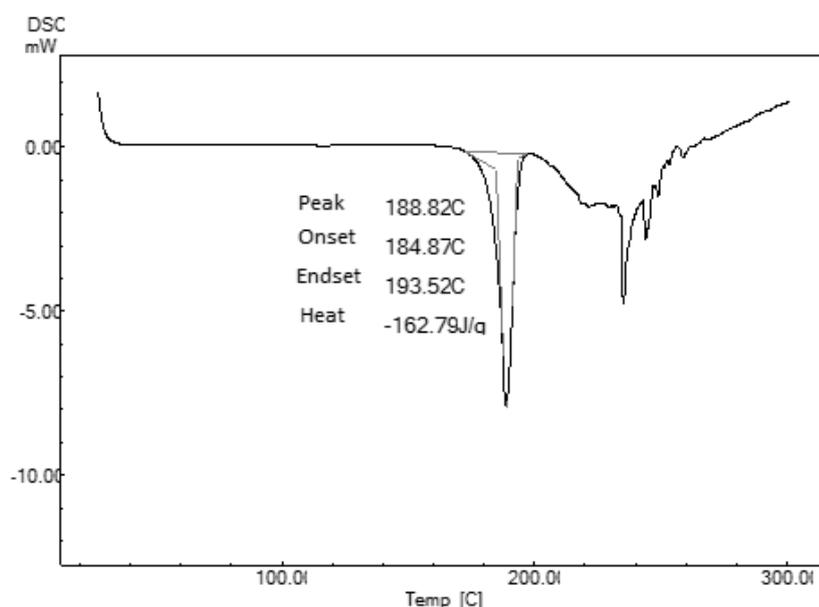
#### **3.4.2 Resultados e discussão**

As Figuras 3.5, 3.6 e 3.7 mostram, respectivamente, os termogramas para a amostra sem sofrer qualquer processo de purificação, cristalizada duas vezes em etanol hidratado e cristalizada em isopropanol. É possível observar eventos endotérmicos característicos de fusão nos três termogramas, porém foi observado um alargamento e diminuição no ponto de fusão no pico da amostra sem purificação. Isso ocorre devido à presença de impurezas que, quanto maior a quantidade de impurezas menor será o ponto de fusão e maior o alargamento do pico (CLAS et al.,

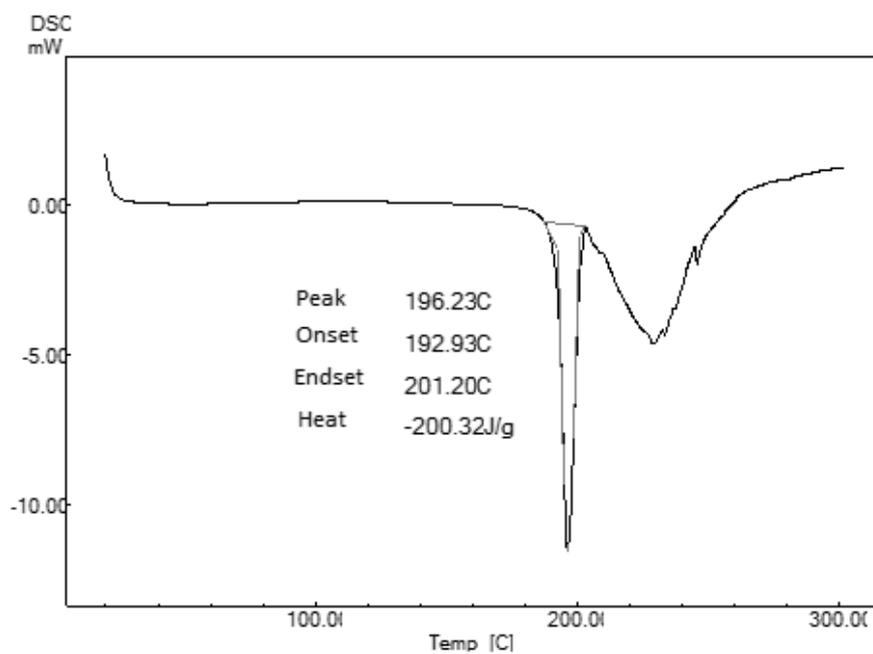
1999). Além disso, é possível observar outros dois eventos endotérmicos após a fusão do cloridrato de cocaína, provavelmente de impurezas que fundem a uma temperatura maior. O ponto de fusão do cloridrato de levamisol é 227 °C, próximo à temperatura do evento endotérmico. Na amostra cristalizada em etanol hidratado é possível observar um aumento na temperatura de fusão e um estreitamento do pico, porém ainda existem impurezas presentes na amostra. A amostra purificada em isopropanol apresentou uma temperatura de fusão muito próxima à relatada na literatura assim como um pico mais fino, o que indica um maior grau de pureza da amostra. O termograma referente à cristalização em etanol absoluto é apresentado na seção 3.6.3 referente à caracterização da substância na Figura 3.9, uma vez que este solvente foi usado nas etapas posteriores.

É possível ainda observar que a altura do pico também é um indicativo de pureza, mas esse parâmetro tem influência da massa pesada para a aquisição do termograma (CLAS et al., 1999).

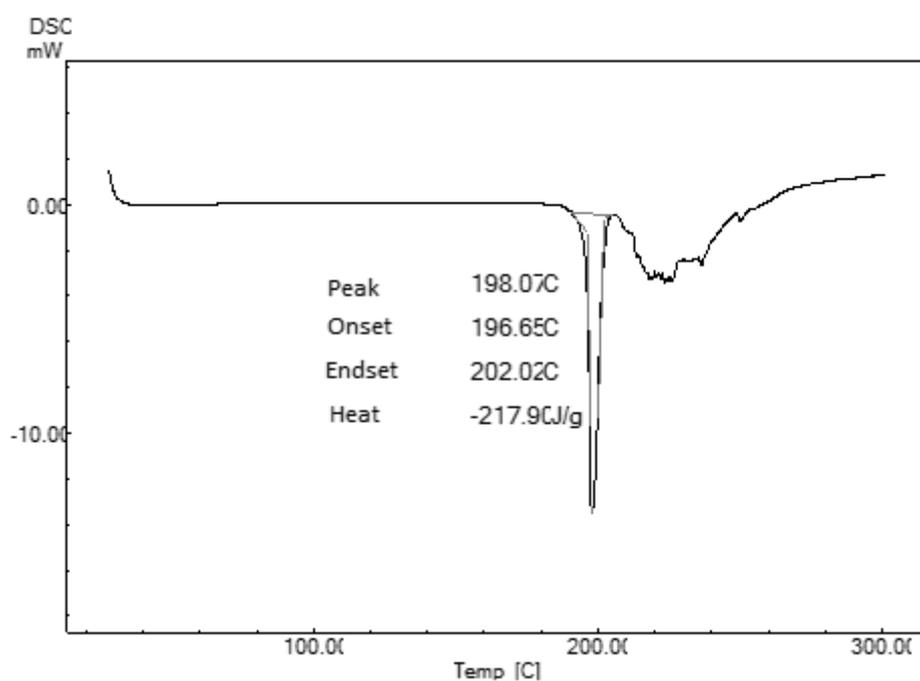
**Figura 3.5** – Termograma obtido por Calorimetria exploratória diferencial da amostra de cloridrato de cocaína contaminada com levamisol antes da etapa de purificação com taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio contendo 1,53 mg



**Figura 3.6** - DSC da amostra cristalizada em etanol hidratado com taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio contendo 1,83 mg



**Figura 3.7** - DSC da amostra cristalizada em isopropanol com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em panela de alumínio contendo 1,40 mg



### 3.5 Purificação do cloridrato de cocaína

#### 3.5.1 Material e métodos

Pesaram-se 200 g da amostra (0,59 mol) e adicionaram-se 300 mL de etanol absoluto misturando com um bastão de vidro até a formação de uma massa amarelada. A mistura foi aquecida em chapa de aquecimento até a completa solubilização. A solução foi filtrada a quente em funil de Büchner aquecido, a vácuo. Após a filtração, a solução foi resfriada lentamente em temperatura ambiente para a formação dos cristais de cloridrato de cocaína. A massa foi filtrada novamente em funil de Büchner e lavada com três porções de etanol absoluto gelado e três porções de éter etílico gelado. O pó foi seco em estufa a 40 °C. O resíduo amarelado foi seco em evaporador rotatório a baixa pressão e armazenado.

#### 3.5.2 Resultados e discussão

Ao misturar o cloridrato de cocaína e etanol absoluto, formou-se uma massa amarelada devido à presença de impurezas coloridas solúveis em etanol. Essas impurezas também são relatadas no estudo de Boudreau e Casale (2008). O aquecimento da mistura permite a completa solubilização da amostra no solvente, como preconiza a técnica de cristalização. A primeira filtração é realizada para a retirada de impurezas insolúveis em etanol como pedaços de plástico, fiapos de pano e lascas de madeira entre outros resíduos não identificados. O resfriamento da solução após a primeira filtração é realizado lentamente para permitir a cristalização apenas da cocaína. Um resfriamento brusco não é seletivo, a rápida precipitação forma uma rede cristalina deixando as impurezas retidas (PAVIA et al., 2007). Os cristais formados foram então filtrados para a retirada do etanol impuro. Finalmente, os cristais foram lavados com etanol absoluto gelado para a retirada de possíveis impurezas que possam ter ficado retidas. O etanol usado estava gelado para evitar a solubilização de uma quantidade maior de cloridrato de cocaína. A última lavagem dos cristais foi realizada com éter etílico por dois motivos: primeiro para retirar os resíduos de etanol para evitar a transesterificação da cocaína com o etanol formando ésteres etílicos de tropano, como cocaetilenos (BOUDREAU e CASALE,

2008) e segundo para acelerar a secagem dos cristais uma vez que a temperatura de evaporação do éter etílico é menor que do etanol.

Foi realizada uma recristalização dos cristais de cloridrato de cocaína da mesma forma que a cristalização. Porém, a mistura de cristalização, após um lento resfriamento em temperatura ambiente, foi resfriada em geladeira para diminuir a solubilidade e aumentar o rendimento.

A técnica de cristalização é bastante eficiente na purificação de sólidos orgânicos, porém o rendimento é baixo. Na primeira etapa usou-se 300 mL de etanol absoluto, e levando em conta que a solubilidade a frio do cloridrato de cocaína é de 1 g para 3,2 mL, o que significa que aproximadamente 94 g de cloridrato de cocaína e as impurezas ficariam no líquido-mãe. Na segunda etapa dos 107 g de cloridrato de cocaína solubilizados em 140 mL de etanol, 49,5 g ficariam solubilizados no líquido-mãe. Sendo assim, o rendimento esperado para esse procedimento seria em torno de 30%.

De fato, ao final da purificação do cloridrato de cocaína foi obtido um rendimento de 28%.

## **3.6 Caracterização do Cloridrato de Cocaína candidato à SQR**

### **3.6.1 Aspectos visuais**

A microscopia óptica é um método clássico para a obtenção de informações a respeito da natureza física da superfície do sólido. As substâncias sólidas se apresentam na forma amorfa ou cristalina, a última pode apresentar estruturas cristalinas diferentes que podem ser observadas usando a microscopia óptica.

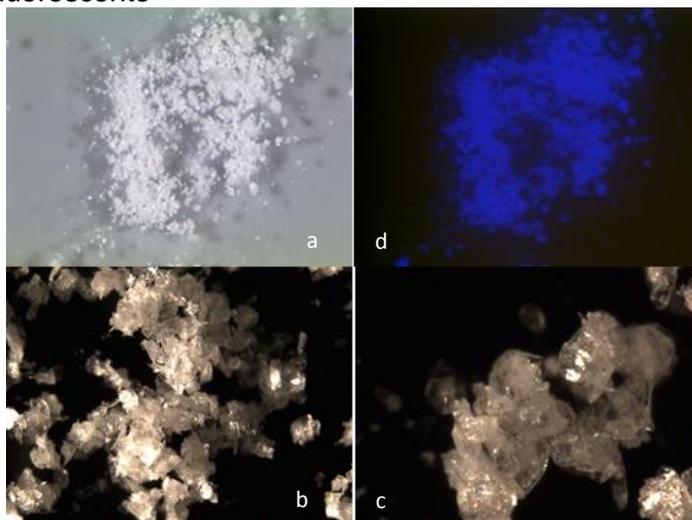
#### **3.6.1.1 Material e métodos**

A caracterização foi realizada visualmente em microscópio óptico Leica S8 através da aplicação da amostra em placa de vidro. A mesma amostra foi submetida à análise por equipamento de vídeo espectral VSC5000 para análise da fluorescência da substância.

### 3.6.1.2 Resultados e discussão

O cloridrato de cocaína obtido foi um pó branco cristalino, com cristais alongados, estando de acordo com a literatura (USP 34, 2011). Apresentou reflexão ao incidir luz fluorescente.

**Figura 3.8** - Imagem dos cristais de cloridrato de cocaína (a, b e c) em microscópio óptico; (d) imagem na luz fluorescente



### 3.6.2 Determinação do ponto de fusão

#### 3.6.2.1 Material e métodos

As determinações da faixa de fusão foram realizadas em equipamento automático METLER TOLEDO FP90. A substância foi compactada em capilares com 1 mm de diâmetro e 6 cm de altura e introduzidos verticalmente no equipamento. Previamente foi realizada a calibração do equipamento com fenolftaleína (WHO, Melting Point Substance Reference n° 13; ponto de fusão 263 °C), ácido benzoico (Mettler ME-18555 A.8.92 Calibration Substance; ponto de fusão 122,4 °C) e cafeína (Mettler ME-18872 A.4.96; ponto de fusão 236,5 °C). A taxa de aquecimento foi de 5 °C/min até 20 °C acima da temperatura de fusão preconizada na literatura.

As determinações foram realizadas em triplicata.

### 3.6.2.2 Resultados e discussão

Os valores obtidos nas três determinações da faixa de fusão do cloridrato de cocaína são apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** - Valores obtidos para a faixa de fusão do cloridrato de cocaína em equipamento automático Mettler Toledo FP90

Determinação	Valor (em °C)
1	193,0 – 194,6
2	192,7 – 193,8
3	193,4 – 194,9
<b>Média</b>	<b>193,0 – 194,4</b>

Os resultados encontrados não estão de acordo com os valores relatados na literatura entre 195 e 197 °C. A amostra apresentou caramelização ao final das análises, o que possivelmente dificultou a determinação correta da faixa de fusão por este tipo de equipamento. Como o ponto de fusão é um parâmetro importante na caracterização da substância foi realizada a determinação por calorimetria exploratória diferencial.

### 3.6.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Calorimetria exploratória diferencial é a técnica de análise térmica mais amplamente utilizada e proporciona de forma rápida e fácil informações detalhadas da amostra. A técnica é usada em diversas áreas, na farmacêutica é usada desde 1960 e possui duas principais aplicações: mudanças físicas, como fusão, mudança de fase cristalina, transição vítrea; e reações químicas, como decomposição e oxidação (GIRON, 2002; GABBOTT, 2008). Na toxicologia forense a técnica é usada para identificar e caracterizar diversos tipos de materiais como plásticos, explosivos, retalhos de tecido, metais, entre outros (RIGA, 1998). Alguns trabalhos utilizam DSC para analisar o comportamento calorimétrico da cocaína e seus principais adulterantes (CURINI et al., 1989; GOSTIC et al., 2009; MEDEIROS et al., 2009).

DSC mede a mudança de energia que ocorre entre a amostra e o material de referência quando aquecidos ou esfriados. A técnica fornece a temperatura de fusão

com a exatidão que os métodos tradicionais muitas vezes não fornecem (CLAS et al., 1999).

### 3.6.3.1 Material e métodos

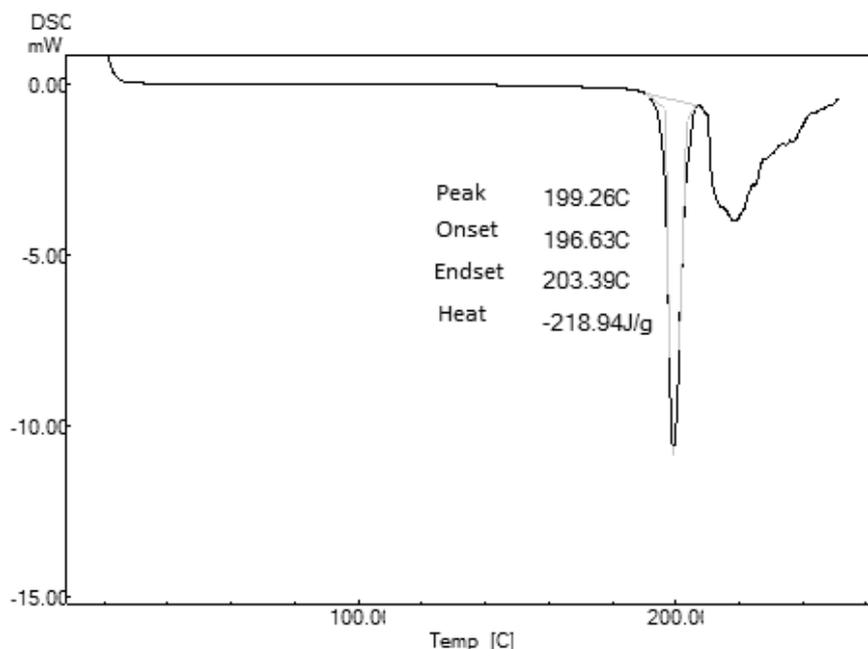
Os ensaios foram realizados no Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS. As análises foram realizadas conforme item 3.5.1 com o objetivo de caracterizar o cloridrato de cocaína candidato a SQR.

### 3.6.3.2 Resultados e discussão

A Figura 3.9 ilustra o termograma obtido para a amostra de cloridrato de cocaína.

Pode-se observar um evento endotérmico característico da fusão da amostra. O ponto de fusão é obtido através da determinação do *Onset* fornecido pelo equipamento. O ponto de fusão determinado para amostra foi de 196,63 °C. O ponto de fusão obtido corresponde ao relatado na literatura entre 195 e 197 °C (MOFFAT et al., 2004; BRITISH PHARMACOPEA, 2011). Além disso, o pico apresenta uma boa simetria e sem alargamento, um indicativo de pureza da substância. Após o ponto de fusão observa-se outro evento endotérmico referente à decomposição da amostra após sua fusão. Esse comportamento é relatado na literatura para o cloridrato de cocaína. Geralmente sais possuem ponto de fusão muito alto e tendem a se decompor após a fusão.

**Figura 3.9** - Termograma de calorimetria exploratória diferencial para cloridrato de cocaína purificado com etanol absoluto, candidato à SQR usando taxa de aquecimento de 10°C/min em panela de alumínio contendo 1,36 mg



### 3.6.4 Rotação específica

A determinação da rotação específica permite estabelecer a identidade e pureza óptica de uma substância. As substâncias que desviam o plano de luz polarizada são ditas opticamente ativas e podem ser classificadas como levógiras (-) ou dextrógiras (+).

#### 3.6.4.1 Material e métodos

A rotação óptica específica foi determinada em polarímetro Perkin Elmer 341, em temperatura ambiente ( $20 \pm 0,5$  °C). As análises foram determinadas em comprimento de onda de 589,3 nm da raia D de sódio. As cubetas utilizadas foram de vidro com janelas de quartzo com 1 dm de percurso óptico e volume de 1 mL.

As determinações foram realizadas em solução a 2% p/v em água, usando como branco o mesmo solvente.

O experimento foi realizado segundo a Farmacopeia Americana (USP 34, 2011), a qual possui monografia específica para cloridrato de cocaína e cocaína base, e os valores comparados.

Os valores obtidos foram aplicados na Equação 3.1.

$$[\alpha]_D^{20} = \alpha/l.c \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde:

$\alpha$  = ângulo de rotação

l = comprimento, em dm, da cubeta

c = concentração da substância em g% p/v

#### 3.6.4.2 Resultados e discussão

A cocaína é uma molécula opticamente ativa, possui dois centros ópticos, sendo quatro isômeros possíveis. A (-) – cocaína é o único enantiômero encontrado naturalmente nas folhas de *Erythroxylum coca*. O processo de síntese geralmente resulta em uma mistura racêmica (KIDWELL E ATHANASELIS, 2005).

Os valores de  $\alpha$  e  $[\alpha]_D^{20}$  são apresentados na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** - Determinações de rotação óptica específica para cloridrato de cocaína

Determinação	$\alpha$	$[\alpha]_D^{20}$
1	- 1,432	- 71,10
2	- 1,440	-71,49
3	- 1,441	- 71,54
<b>Média</b>	<b>-1,437</b>	<b>- 71,37</b>

Os valores encontrados estão de acordo com a faixa especificada na monografia: entre -71 e -73. O resultado satisfatório deste ensaio é mais um indicativo de pureza da amostra.

### 3.6.5 Perda por dessecação

A perda por dessecação é o ensaio que determina a quantidade de substâncias voláteis de qualquer natureza eliminadas nas condições específicas (BRASIL, 2010).

#### 3.6.5.1 Material e métodos

O ensaio foi realizado de acordo com a Farmacopeia Britânica (2009), em triplicata.

Pesou-se aproximadamente 1,0 g de amostra em um pesa-filtro previamente dessecado por 30 min a 100 °C e pesado. O pesa-filtro contendo a amostra foi levado à estufa, com tampa aberta, em temperatura de 105 °C por 2 horas. Após, o pesa-filtro foi retirado da estufa e esfriado a temperatura ambiente em dessecador e pesado. Levou-se novamente à estufa a 105 °C por 1 hora. Retirou-se da estufa, deixou-se esfriar e pesou-se novamente. O peso obtido da amostra foi usado para o cálculo da porcentagem de perda por dessecação pela equação 3.2:

$$\text{Perda} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde:

$P_u$  = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes de dessecação

$P_s$  = peso do pesa-filtro

$P_a$  = peso da amostra dessecada

#### 3.6.5.2 Resultados e discussão

Os resultados do ensaio estão descritos na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5** - Valores obtidos de porcentagem de substâncias voláteis no ensaio de perda por dessecação para amostra de cloridrato de cocaína

	% de substâncias voláteis
1	0,30
2	0,21
3	0,26
<b>Média</b>	<b>0,26</b>

O valor especificado na monografia da Farmacopeia Britânica (2009) é de no máximo 0,5%. Sendo assim, a porcentagem de substâncias voláteis presentes na amostra está dentro do especificado.

### 3.6.6 Determinação de cinzas sulfatadas (Resíduo por incineração)

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico. O ensaio permite determinar o teor de impurezas inorgânicas presentes na amostra.

#### 3.6.6.1 Material e métodos

Pesou-se exatamente cerca de 1 g de amostra de cloridrato de cocaína previamente dessecada em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico e aqueceu-se em bico de Bunsen até completa carbonização. Esfriou-se e adicionou-se ácido sulfúrico para umedecer o resíduo, em seguida, incinerou-se em forno de mufla a 700 °C por 3 horas.

Calculou-se a porcentagem de cinzas sulfatadas pela equação 3.3.

$$\% \text{ Cinzas sulfatadas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100 \qquad \text{Equação 3.3}$$

Onde:

$P_1$  = peso do cadinho calcinado

$P_2$  = peso do cadinho amostra incinerada

$P_3$  = peso da amostra inicial

#### 3.6.6.2 Resultados e discussão

Os resultados do ensaio estão descritos na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6** - Valores das porcentagens de substâncias inorgânicas presente na amostra de cloridrato de cocaína

<b>Amostra</b>	<b>% substâncias inorgânicas</b>
<b>1</b>	0,0038
<b>2</b>	0,0029
<b>Média</b>	<b>0,0034</b>

A porcentagem de substâncias inorgânicas obtida para a amostra de cloridrato de cocaína (0,0034%) está dentro do especificado na monografia da Farmacopeia Britânica (2009), que estipula um máximo de 0,1% em relação à substância dessecada.

### 3.6.7 Espectroscopia na região de infravermelho (IV)

A região do infravermelho do espectro eletromagnético se encontra em comprimentos de onda maiores que os associados à luz visível e menores que as ondas de rádio. As moléculas são excitadas a um estado de energia superior quando absorvem a radiação infravermelha. A absorção da radiação infravermelha é um processo quantizado, apenas frequências selecionadas são absorvidas pelas moléculas. As frequências de radiação que coincidem com as frequências naturais de vibração são absorvidas e a energia envolvida aumenta a amplitude dos movimentos de vibração das ligações da molécula. Como cada tipo de ligação tem uma frequência própria de vibração, as moléculas de estruturas diversas nunca terão espectros idênticos (PAVIA et al., 2007).

A espectrofotometria de IV possui ampla aplicação na área farmacêutica e química como na identificação de compostos, na caracterização de amostras e na detecção de polimorfos. No entanto, a técnica possui algumas limitações. A presença de impurezas, por exemplo, é apenas detectada se estas estiverem em altas concentrações (WATSON, 2005).

Com a análise detalhada do espectro e a consulta a tabelas de correlação é possível extrair informações estruturais da molécula. IV em conjunto com outras técnicas pode auxiliar na determinação estrutural da molécula (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

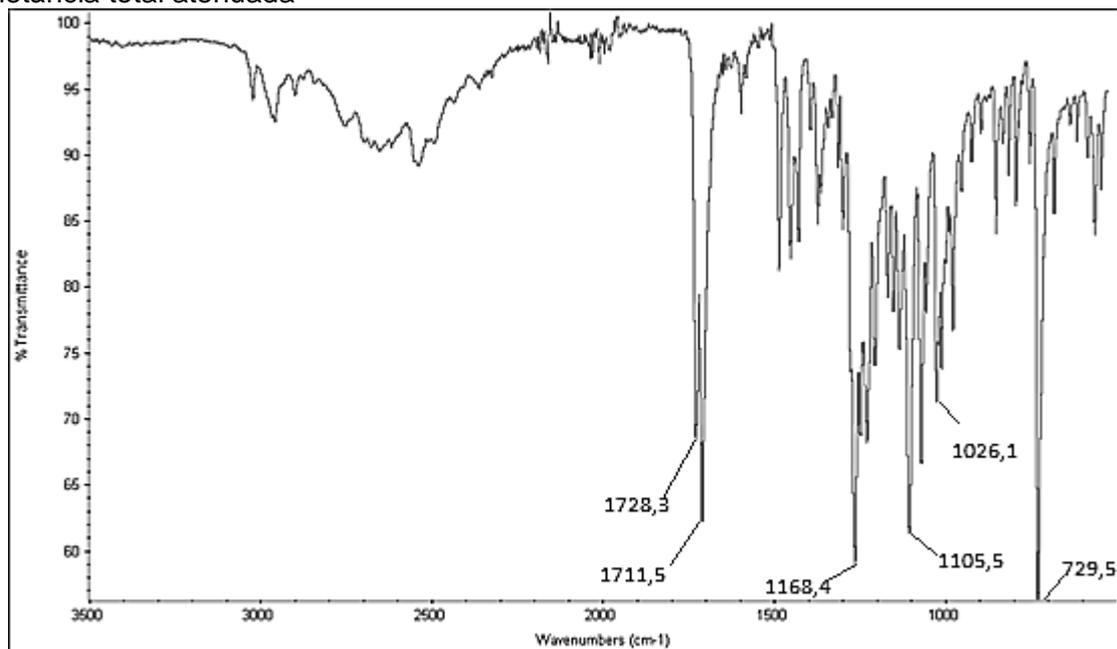
## 3.6.7.1 Material e métodos

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido por análise direta usando refletância total atenuada (ATR) em espectrofotômetro Nicolet 380 FT-IR System. A faixa de varredura foi de 3500 a 500  $\text{cm}^{-1}$  realizando 16 scans.

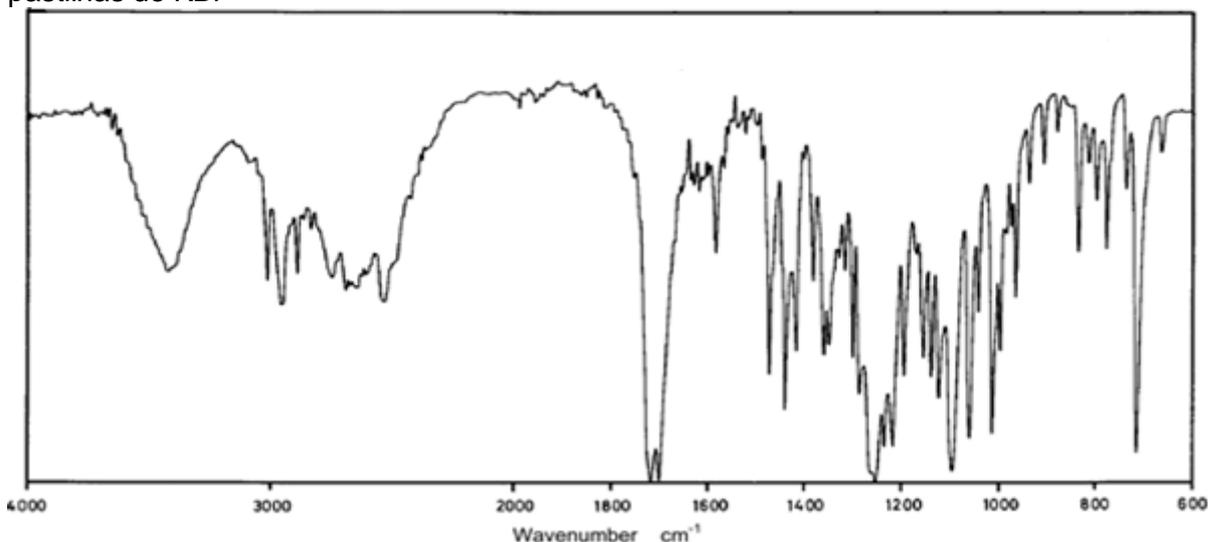
## 3.6.7.2 Resultados e discussão

O espectro de infravermelho obtido para a amostra de cloridrato de cocaína é apresentado na Figura 3.10. Na Figura 3.11 é apresentado o espectro de IV usando ATR e KBr de cloridrato de cocaína retirado da literatura. Na Tabela 3.7 estão descritas as principais bandas e suas respectivas atribuições.

**Figura 3.10** - Espectro de infravermelho da amostra de cloridrato de cocaína obtido usando refletância total atenuada



**Figura 3.11** - Espectro de IV de cloridrato de cocaína obtida da literatura usando ATR e pastilhas de KBr



Fonte: DIBBERN, 2001

**Tabela 3.7** - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de cloridrato de cocaína e suas atribuições

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
1728	Deformação axial de carbonila (C=O) de éster próximo ao anel fenila
1711	Deformação axial de carbonila (C=O) de éster metílico
1168	Deformação axial de C-O
1105	Deformação axial assimétrica de O-C
1026	Deformação axial de C-N
729	Deformação angular – anéis monossustituídos

Fonte: Silverstein & Webster, 2000; Pavia et al., 2007

Pela análise do espectro obtido para a amostra de cloridrato de cocaína e o reportado na literatura (Figura 3.11), além de consulta a tabelas de correlação foi possível caracterizar a substância pela presença de bandas características dos principais grupamentos presentes na molécula sendo eles os dois grupamentos éster, o grupamento fenila e a amina terciária.

As principais bandas descritas acima para a caracterização do cloridrato de cocaína coincidem com as descritas na literatura.

### 3.6.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear é uma forma de espectroscopia de absorção, onde a amostra absorve radiação eletromagnética na região de radiofrequência governada pelas características estruturais da molécula. A técnica de RMN permite a determinação do número, do tipo e das posições relativas de certos átomos da molécula. Este tipo de espectroscopia é aplicável apenas aos átomos que possuem momentos magnéticos nucleares, ou seja, aqueles átomos que a soma de prótons e nêutrons for um número par possuem o número de spins 0, a carga não gira em torno do próprio eixo. Os átomos que a soma for um número ímpar, terão um número de spin fracionário, por exemplo  $\frac{1}{2}$ , que gira em torno do próprio eixo e assim produzirá sinal na RMN em condições adequadas. Esse é o caso dos átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ . O átomo dos isótopos mais abundantes de carbono ( $^{12}\text{C}$ ) e o oxigênio ( $^{16}\text{O}$ ) não possuem momentos magnéticos nucleares. As RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são as mais estudadas e serão usadas na caracterização do cloridrato de cocaína (BREITMAIER, 2002).

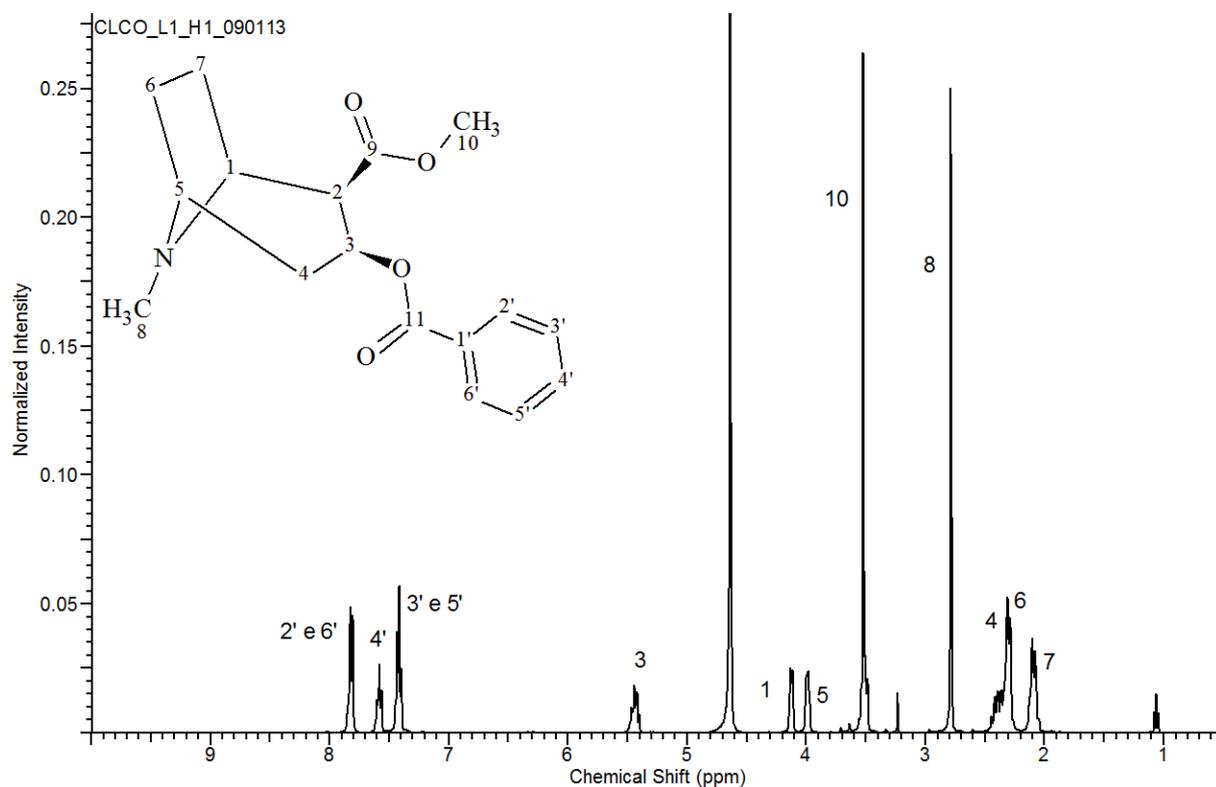
#### 3.6.8.1 Material e métodos

Para a realização do ensaio a amostra, aproximadamente 25 mg, foi diluída em 0,4 mL de água deuterada contendo tetrametilsilano (TMS) como agente de calibração e transferida para tubo de vidro para RMN (0,5 cm x 18 cm). A análise foi realizada em espectrômetro Varian 400MR com campo de 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 9,4 Tesla para  $^{13}\text{C}$ . As análises foram realizadas no Centro de Nanociência e Nanotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CNANO-UFRGS).

#### 3.6.8.2 Resultados e discussão

Na Figura 3.12 é apresentado o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de cocaína. Na Tabela 3.8 são apresentados os deslocamentos químicos bem como as atribuições para cada hidrogênio.

**Figura 3.12** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cloridrato de cocaína utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm



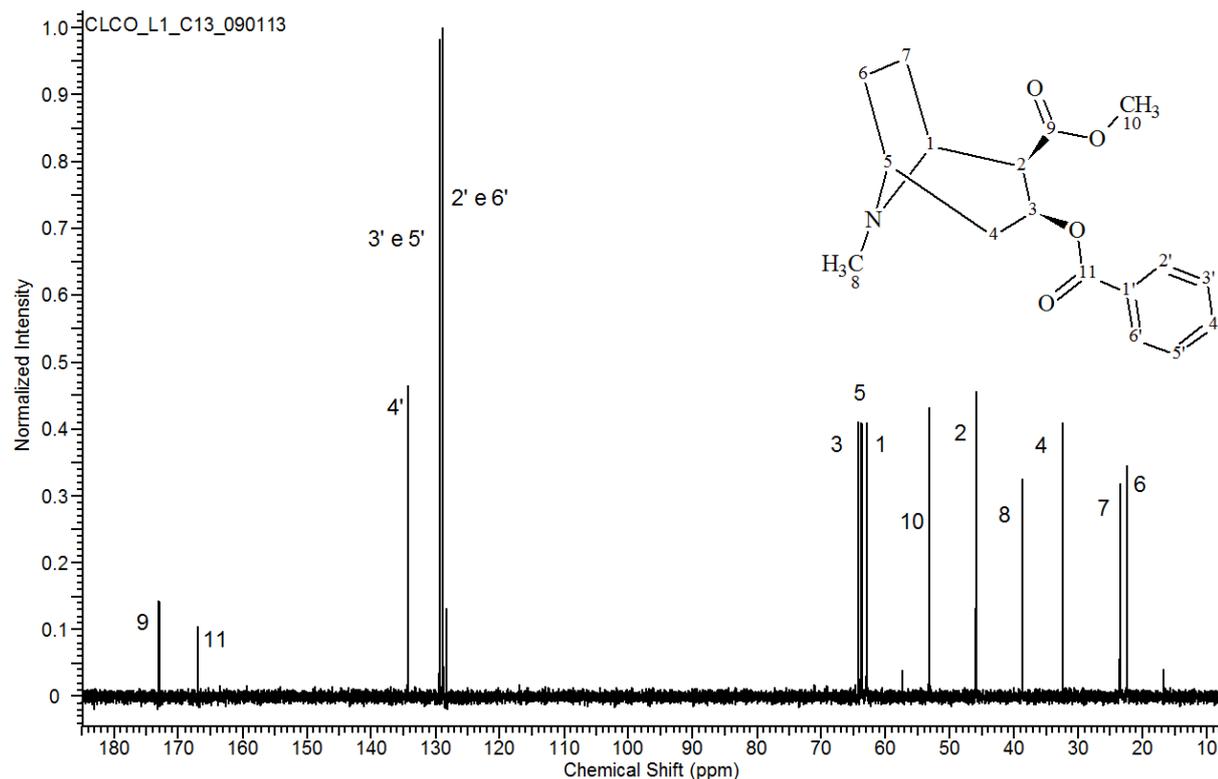
**Tabela 3.8** - Dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cloridrato de cocaína utilizando espectrômetro de 400MHz

Posição	Deslocamento	Nº Hidrogênios	Multiplicidade	Atribuição
2' 6'	7,806	2	d	H na posição orto do anel aromático
4'	7,563	1	t	H na posição para do anel aromático
3' 5'	7,414	2	dd	H na posição meta do anel aromático
3	5,444	1	m	H ligado a C-OCO
1	4,114	1	dd	H ligado a C-N
5	3,988	1	t	H ligado a C-N
10	3,502	3	s	H de metila ligado a éster
2	3,482	1	dd	H ligado a C-COO
8	2,787	3	s	H de metila ligada a N
4	2,326	1	m	H de CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
6	2,29	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
7	2,10	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>

Fonte: Silverstein & Webster, 2000; Pavia et al., 2007; Breitmaier, 2002

Na Figura 3.13 é apresentado o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de cocaína. Na Tabela 3.9 são apresentados os deslocamentos químicos bem como as atribuições para cada carbono. Os resultados foram comparados com a literatura (BREITMAIER, 2002).

**Figura 3.13** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de cloridrato de cocaína utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm



**Tabela 3.9** - Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de cloridrato de cocaína utilizando espectrômetro de 9,4 Tesla

Posição	Deslocamento	Atribuição
1	62,954	CH ligado a N
2	45,944	CH ligado a COO
3	64,245	CH ligado a OCO
4	32,456	CH <sub>2</sub> ligado a COC=O
5	63,728	CH ligado a N
6 e 7	22,436	CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub>
8	38,741	CH <sub>3</sub> ligado ao N
9	173,076	C de COO
10	53,178	CH <sub>3</sub> radical éster
11	166,928	C de C=O
1'	128,323	CH de anel aromático ligado a C=O
2' 6'	128,847	CH de anel aromático em orto
3' 5'	129,378	CH de anel aromático em meta
4'	134,297	CH de anel aromático em para

Fonte: Breitmaier, 2002

Através da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados presentes na literatura é possível afirmar que a substância em questão é o cloridrato de cocaína.

### 3.6.9 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM)

#### 3.6.9.1 Material e métodos

A análise por CL-EM foi realizada para a identificação do cloridrato de cocaína e de possíveis impurezas que poderiam estar presentes. A solução foi preparada em metanol em concentração de 1 mg/mL, apenas uma injeção nesta concentração foi realizada. A análise da solução diluída a 100 µg/mL foi realizada em duplicata.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Agilent 1260 acoplado a um espectrômetro de massas Agilent série 6120B usando coluna Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). O sistema cromatográfico utilizado foi em modo isocrático com proporção de fase móvel de 53% de metanol e 47% de acetato

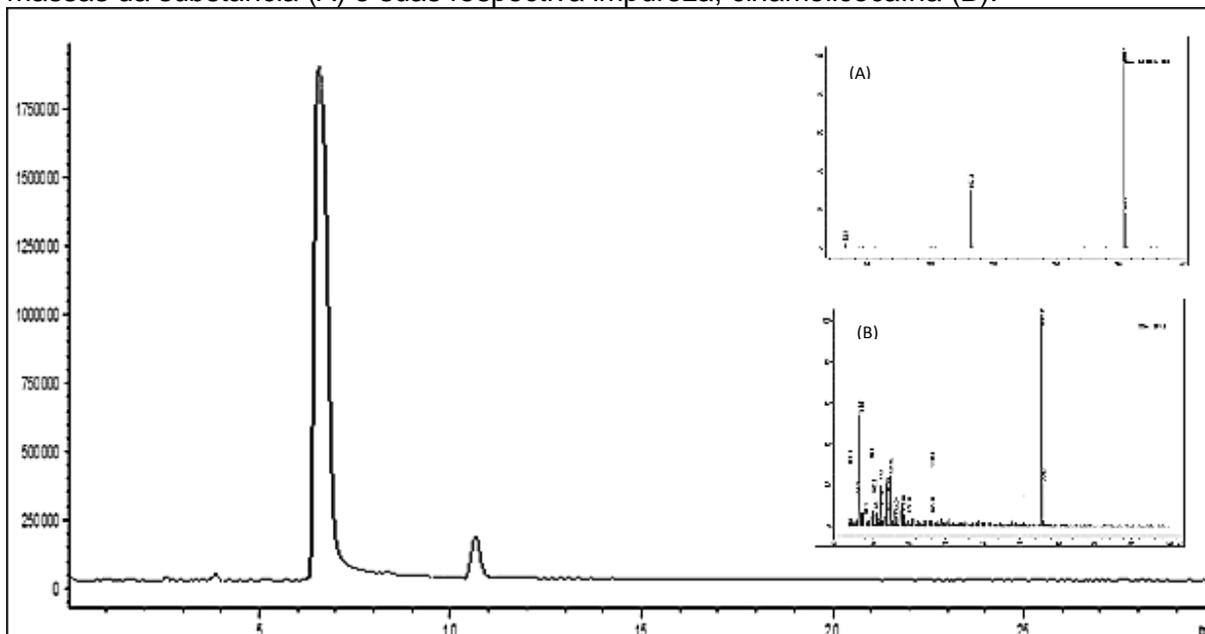
de amônio 10 mM, pH 6,3 ajustado com ácido acético. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, com temperatura do forno de 31 °C. Foram realizadas a injeção de 1 µL na solução concentrada e 10 µL na mais diluída. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização eletrospray positivo. Os parâmetros de análise foram: temperatura do gás 350 °C; fluxo do gás de secagem 13 L/min; pressão do gás nebulizador (nitrogênio) de 40 p.s.i., voltagem do capilar 3000 V e energia de fragmentação 150 V.

### 3.6.9.2 Resultados e discussão

O cromatograma obtido para o cloridrato de cocaína e a impureza presente na amostra é apresentado na Figura 3.14. Como é possível observar no cromatograma, cis/trans-cinamoilcocaína estão presentes como impurezas. A presença de cis/trans-cinamoilcocaína era esperada, uma vez que se optou por não incluir a etapa de oxidação da cocaína para a retirada da impureza. O método por CL-EM foi usado apenas na etapa de identificação da substância de interesse e suas possíveis impurezas, não sendo usado para a quantificação das impurezas. A resposta de ionização é diferente para cada molécula, para realizar a quantificação é necessário o uso de padrões.

Devido à dificuldade de se obter padrões de drogas no Brasil e a burocracia para tal, não foi possível a aquisição de padrões de cinamoilcocaína para realizar a quantificação por CL-EM. Sendo assim, optou-se por fazer a quantificação por balanço de massas usando detector de ultravioleta (UV).

**Figura 3.14** - Cromatograma obtido para cloridrato de cocaína por LC-MS usando coluna Luna C18(2) e fase móvel metanol: acetato de amônio 10mM pH6,3 (57:43) e espectros de massas da substância (A) e suas respectiva impureza, cinamoilcocaína (B).



### 3.6.10 Balanço de massas por CLAE-UV

Balanço de massas é um método bastante exato para a determinação de impurezas e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO), Farmacopeia Internacional e Farmacopeia Europeia para estabelecimento de substâncias de referência (MA et al., 2009). A técnica consiste na subtração a partir de 100 do somatório da porcentagem das impurezas. As impurezas orgânicas são calculadas por métodos analíticos como CLAE-UV usando normalização de áreas. As impurezas voláteis são geralmente solventes residuais e umidade e podem ser quantificados na perda por dessecação, enquanto que as impurezas inorgânicas são calculadas através da determinação de resíduos de ignição. A normalização de áreas na determinação de pureza é utilizada na ausência de SQR dos produtos de degradação e é baseada na hipótese de que o fator de resposta da substância de interesse e das impurezas é igual a 1. A incerteza analítica embutida nesta técnica é menor que no método tradicional de determinação de impurezas, através de doseamento (GÖRÖG, 2005; LIU e HU, 2007; MA et al., 2009).

### 3.6.10.1 Material e métodos

Para a porcentagem de impurezas voláteis foi usado o resultado obtido na perda por dessecação, descrito no item 3.6.5.1. A porcentagem de impurezas inorgânicas foi obtida no ensaio de determinação de cinzas sulfatadas descrito no item 3.6.6.1.

A determinação de impurezas orgânicas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta (CLAE-UV) em cromatógrafo SHIMADZU com coluna Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm, 2,6 µm). O sistema cromatográfico utilizado foi em modo isocrático com proporção de fase móvel de 75% acetonitrila e 25% de acetato de amônio 10 mM, pH 6,3 ajustado com ácido acético. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min, com temperatura do forno de 30 °C. Foram realizadas injeções de 20 µL de uma solução de 1 mg/mL da amostra diluída em acetonitrila. As condições cromatográficas e detalhes do método serão descritas no capítulo 4.

O cálculo da pureza da amostra foi calculado usando a equação 3.4.

$$\% \text{ Teor} = 100 - \sum \% \text{ impurezas}$$

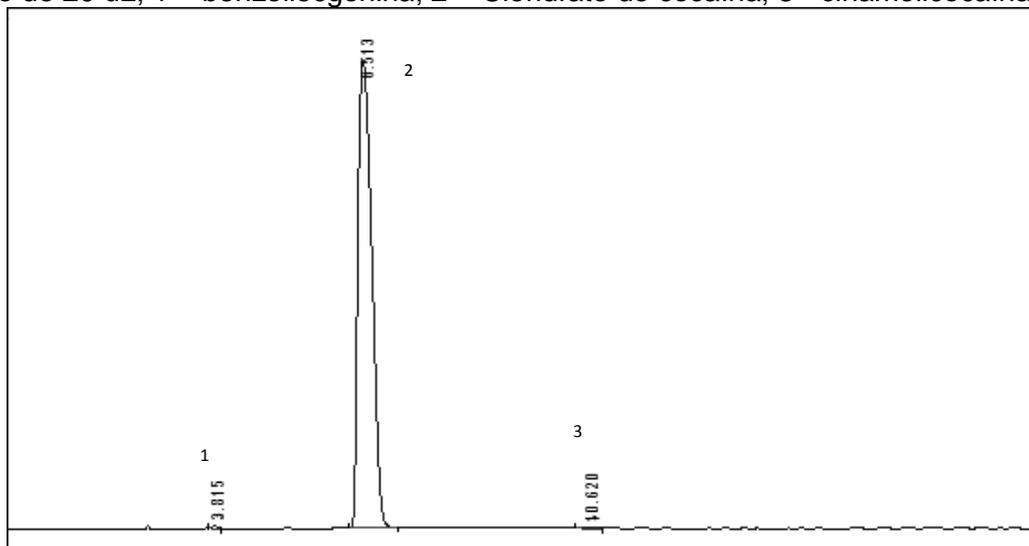
$$= 100 - \% \text{ Impurezas Voláteis} - \% \text{ Impurezas Inorgânicas} - \% \text{ Impurezas Orgânicas}$$

**Equação 3.4**

### 3.6.10.2 Resultados e discussão

A Figura 3.15 mostra o cromatograma obtido para a amostra de cloridrato de cocaína e as impurezas presentes. Na Tabela 3.10 estão descritas as impurezas orgânicas, inorgânicas e voláteis utilizadas para o cálculo da pureza da amostra.

**Figura 3.15** - Cromatograma obtido para cloridrato de cocaína por CLAE-UV usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila:acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20  $\mu$ L; 1 – benzoilecgonina; 2 – Cloridrato de cocaína; 3 - cinamoilcocaína



O cloridrato de cocaína possui duas impurezas detectadas por CLAE-UV, a benzoilecgonina (1) e a cinamoilecgonina (3). As impurezas foram identificadas pelo tempo de retenção e por análise em CL-EM através da identificação dos íons moleculares das impurezas  $m/z$  330 para cinamoilcocaína e  $m/z$  290 para benzoilecgonina.

**Tabela 3.10** - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra

Impurezas		%
Impurezas orgânicas	Benzoilecgonina	0,28
	Cinamoilcocaína	0,28
Impurezas inorgânicas		0,0034
Impurezas voláteis		0,25

Aplicando os resultados na equação 3.4 o valor obtido para a pureza do cloridrato de cocaína foi de 99,2%.

### 3.7 Substância Química de Referência de cloridrato de cocaína

Após a caracterização da substância através de métodos de identificação e análise de pureza do cloridrato de cocaína é possível afirmar que a substância apresenta pureza adequada para uso como SQR em laboratórios forenses e de

pesquisa. Um estudo interlaboratorial, utilizando as mesmas condições e os mesmos ensaios realizados neste trabalho, deve ser realizado para confirmação do teor.

A substância foi envasada em frascos de vidro âmbar contendo cada um 200 mg. Os frascos foram fechados, lacrados e devidamente identificados com rótulo contendo nome químico, teor, cuidados a serem tomados com a substância e código de barras para assegurar a rastreabilidade.

Foram separados vinte frascos para o controle da estabilidade das substâncias em 6, 12, 24 e 36 meses. Cada grupo de cinco frascos foi armazenado em diferentes condições como em dessecador a temperatura ambiente, em geladeira, em freezer e a temperatura ambiente fora do dessecador.

Os testes interlaboratorial e de estabilidade não serão contemplados neste trabalho em virtude dos prazos para a elaboração desta pesquisa.

A etapa de envase, rotulagem e armazenamento dos frascos foi realizada no Setor Técnico-Científico da Polícia Federal (SETEC).

### **3.8 Tratamento de resíduos**

As etapas de purificação do cloridrato de cocaína por cristalização geraram resíduos de cloridrato de cocaína e suas impurezas. Os resíduos foram secos em evaporador rotatório a baixa pressão e armazenados em frascos devidamente identificados. Os frascos foram armazenados no depósito do SETEC sob a guarda do Perito responsável pelo Projeto, aguardando a destruição por incineração. A incineração é realizada juntamente com outros produtos de apreensão da Polícia Federal, e faz parte da rotina da Polícia Federal.

Os materiais descartáveis contaminados usados no estudo foram descartados em lixo especial com coleta especial.

### 3.9 Conclusões

- A técnica usada para a retirada dos contaminantes bem como o solvente selecionado resultou na obtenção de cloridrato de cocaína com alta pureza, porém com um baixo rendimento, característico da técnica selecionada;
- Os ensaios realizados para identificação da substância como os ensaios de análises das constantes físicas, DSC e rotação específica, bem como IV, RMN, CL-EM confirmaram a estrutura da molécula e permitiram a completa identificação do cloridrato de cocaína;
- Os ensaios de pureza de perda por dessecação, cinzas sulfatadas e balanço de massas por CLAE-UV determinaram a quantidade de substâncias voláteis, orgânicas e inorgânicas que estavam presentes na amostra, possibilitando o estabelecimento da pureza do cloridrato de cocaína em 99,2%.

### 3.10 Referências

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5. Ed., Brasília: ANVISA, 2010, 546 p.

BREITMAIER, E. **Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide**. 3.ed., Chichester: Wiley, 2002, 257 p.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London : The Stationery Office BP Commission, 2011. 4 v. : il. 824 p.

CARDONA, P. S.; CHATURVEDI, A. K.; SOPER, J. W.; CANFIELD, D. V. Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products. **Forensic Science International**, v. 157, n. 1, p. 46-56, 10 mar. 2006.

CLAS, S.; DALTON, C.; HANCOCK, B. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 8, p. 311-320, ago. 1999.

CURINI, R.; ZAMPONI, S.; D'ASCENZO, F.; CURTIS, S. A.; MARINO, A.; DEZZI, A. Thermal analytical techniques applied to the narcotic field: cocaine analysis. **Thermochimica Acta**, v. 153, p.11-26, jan. 1989.

D. E. A.- DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION - Department of Justice. **Drugs of Abuse**. McLean, VA, 2011.

DIBBERN, H-W. **UV- und IR-Spectren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe**, 4ed. Aulendorf: Editio Cantor, 2001.

ENSING, J. G.; HUMMELEN, J. C. Isolation, Identification, and Origin of Three Previously Unknown Congeners in Illicit Cocaine, **Journal of Forensic Sciences**, JFSCA, v. 36, n. 6, , p. 1666-1687, nov. 1991.

EVARD, I.; LEGLEYE, S.; CADET-TAÏROU, A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. **The International journal on drug policy**, v. 21, n. 5, p. 399-406, set. 2010.

GABBOTT, P. **Principles and applications of thermal analysis**. 1 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008, 464 p.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 335-357, 2002.

GONZÁLEZ, M. L., CARNICERO, M., TORRE, R., ORTUÑO, J., SEGURA, J. Influence of the injection technique on the thermal degradation of cocaine and its metabolites in gas chromatography. **Journal of chromatography. B, Biomedical applications**, v. 664, n. 2, p. 317-27, 17 mar. 1995.

GÖRÖG, S. The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterising the quality of bulk pharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 5, p. 931-7, 4 jan. 2005.

GOSTIC, T.; KLEMENC, S.; STEFANE, B. A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. **Forensic Science International**, v. 187, n. 1-3, p. 19 – 28, 2009.

JONES, L. M.; BOUDREAU, D. K.; CASALE, J. F. An In-Depth Study of the Peruvian Base Llavada (“Washed Base”) Technique for Purification of Crude Cocaine Base. **Microgram Journal**, v. 6, n. 3-4, p. 72-76, 2008.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. 1104 p.

KIDWELL, D. A.; ATHANASELIS, S. A. **HANDBOOK OF FORENSIC DRUG ANALYSIS**. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, 2005. Capítulo 5: COCAINE: METHODS OF FORENSIC ANALYSIS

LIU, S.; HU, C. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative. **Analytica Chimica ACTA**, v. 2, p. 114-121, 2007.

MA, K.; WANG, H.; ZHAO, M.; XING, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, p. 227-233, 2009.

MEDEIROS, R.I.; FILHO, N.R.A.; LELES, M. I. G. Development of forensic analytical chemistry method for examination of Merla by thermal analysis and high resolution gas chromatography. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** v. 97, n. 1, p. 337 – 342, 2009.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, D. M.; WIDDOP, B. **Clarke’s analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material** 3.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 2v.

MOORE, J. M.; CASALE, J. F.; KLEIN, R. F. X.; COOPER, D. A.; LYDON, J. Determination and in-depth chromatographic analyses of alkaloids in South American and greenhouse-cultivated coca leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 659, p. 163-175, 1994.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; ENGEL, R.G. **Introduction to Organic Laboratory Techniques: A microscale approach**. 4. Ed. Belmont: Thomson 2007, 990 p.

RIGA, A. Thermal analysis as an aid to forensics: Alkane melting and oxidative stability of wool. **Thermochimica Acta**, v. 324, n. 1-2, p. 151-163, dez. 1998.

SILVERSTEIN, R., WEBSTER, F. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6. ed., Rio de Janeiro, LTC Editora, p.67-135, 2000.

TSUMURA Y.; MITOME, T.; KIMOTO S. False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision. **Forensic Science International**, v. 155, p. 158-164, 2005.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials**unodoc. Vienna: 2012.

USP 34. The United States Pharmacopeia. 35<sup>th</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis**: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. London: Churchill Livingstone, 2005. 382 p.

WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. . **Restricted General Guidelines For The Establishment , Maintenance And Distribution Of Chemical Reference Substances**. Geneva: World Health Organization, 2006.

---

## **4 CAPÍTULO 2 –**

**Síntese, purificação e caracterização dos principais produtos de  
pirólise e produtos de degradação da cocaína**

---



## 4.1 Introdução

Para que as análises toxicológicas e forenses tenham resultados satisfatórios, os laboratórios devem utilizar substâncias químicas de referência (SQR). Porém, na área forense e na pesquisa toxicológica, as SQR são substâncias geralmente sujeitas a regime de controle especial e a grande maioria não é comercializada no Brasil, tendo que ser muitas vezes adquiridas no mercado internacional. O processo de importação torna a compra demorada e dispendiosa. Os metabólitos e produtos de pirólise da cocaína, bem como a própria substância são um exemplo de SQR que não são encontradas no Brasil.

Com a dificuldade em obter esse tipo de substância, faz-se necessária a busca por outras alternativas. A síntese dos metabólitos da cocaína é relatada por diversos autores desde o início do século XX (HENRY, 1949; FINDLAY, 1954; ZIRKLE et al., 1961). As técnicas são simples e muito eficientes na obtenção do produto de interesse. A purificação dos produtos obtidos após as sínteses é essencial para garantir a pureza da substância. Substâncias com altos teores de impurezas podem interferir no resultado das análises.

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi obter substâncias químicas de referência para o cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina com pureza adequada.

## 4.2 Síntese de cloridrato de anidroecgonina

A anidroecgonina é o produto de hidrólise do éster metílico de anidroecgonina, que por sua vez é o produto de pirólise da cocaína base quando esta é aquecida a altas temperaturas. A estrutura da molécula de anidroecgonina possui um anel cicloepteno com uma ponte de nitrogênio e um grupamento ácido carboxílico. É uma molécula anfotérica,  $pK_a$  9,8 e  $pK_b$  10,2. A presença do grupamento ácido carboxílico torna a molécula altamente polar e solúvel em água. O caráter pouco lipofílico faz com que a mesma seja pouco ou praticamente insolúvel em solventes orgânicos. A presença da insaturação conjugada com o ácido

carboxílico aumenta o potencial ácido da molécula. (MATCHETT e LEVIN, 1941; PAUL et al., 1999; UNODC, 1965).

A síntese da anidroecgonina é relatada na literatura por vários autores, que apresentam basicamente duas formas de se obter anidroecgonina. Einhorn e colaboradores (1887) propuseram o uso de agentes desidratantes como pentacloreto de fósforo ou oxicloreto de fósforo (MATCHETT e LEVIN, 1941; FINDLAY, 1954). Por sua vez, Zirkle e colaboradores (1961) propuseram um método baseado nas observações de De Jong (1937) de que a cocaína ou a ecgonina quando tratadas com ácido formavam o ácido insaturado.

No entanto, a literatura não relata qualquer tratamento de purificação. O cloridrato de anidroecgonina é usado, pelos autores, na forma bruta em outras etapas de experimentos (LUKASZEWSKI e JEFFERY, 1980; ZHANG et al., 1997).

#### **4.2.1 Material e métodos**

A realização da síntese do cloridrato de anidroecgonina foi baseada no método relatado por Zirkle e colaboradores (1961). Alguns parâmetros, entretanto, foram otimizados no intuito de obter um rendimento da síntese desejável.

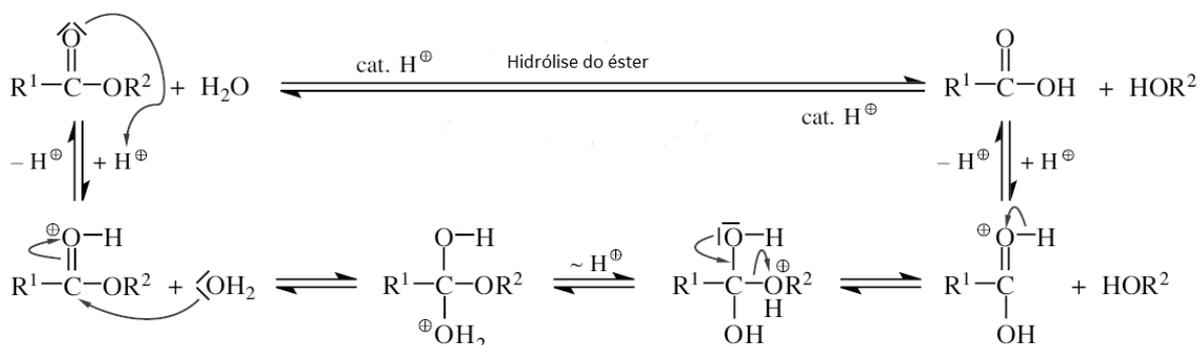
Pesaram-se 34 g de cloridrato de cocaína (0,10 mol) e adicionaram-se 250 mL de ácido clorídrico concentrado (37%). A solução permaneceu em refluxo por 30 horas em manta de aquecimento coberta com alumínio à temperatura de ebulição do ácido clorídrico concentrado (48 °C). Após este tempo, a solução foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com 100 mL de água e fez-se uma extração com várias porções de éter etílico para a retirada de substâncias insolúveis em água. A porção aquosa foi seca em evaporador rotatório com trompa d'água a 80 °C. O precipitado formado foi lavado com porções de éter etílico e seco em estufa a vácuo a 80 °C por 20 horas.

#### **4.2.2 Resultados e discussão**

Ao realizar o refluxo do cloridrato de cocaína com ácido clorídrico concentrado ocorre, simultaneamente, a hidrólise dos ésteres formando assim ácido

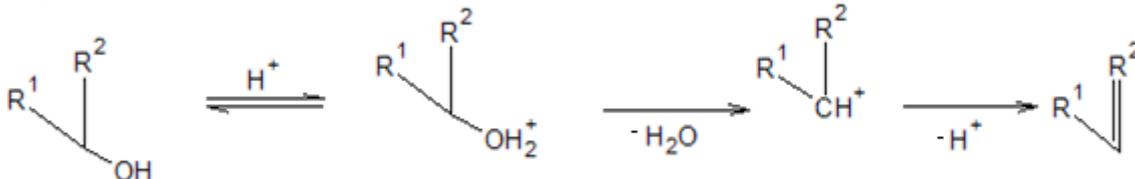
benzoico e metanol. A reação que ocorre é uma reação de substituição nucleofílica (SN) catalisada por ácido, onde a SN ocorre no carbono da carboxila. A representação gráfica é apresentada na Figura 4.1 (BRUCKNER, 2010). Simultaneamente ocorre uma desidratação do álcool pela reação de eliminação (E<sub>1</sub>) sob a influência do ácido forte (HCl<sub>conc</sub>) formando uma liga dupla na posição 2,3 do anel tropânico com a liberação de uma molécula de água (MATCHETT e LEVIN, 1941; ZHANG, 1997; NORMAN e COXON, 2000). A representação da reação de desidratação do álcool está representada na Figura 4.2.

**Figura 4.1** - Representação do mecanismo de hidrólise de ésteres carboxílicos catalisada por ácido



Fonte: Bruckner, 2010

**Figura 4.2** - Representação da reação de formação dos alcenos



Fonte: Norman e Coxon, 2000

Ao final da reação, observou-se uma mudança de cor na solução de transparente (início da reação) para uma cor amarelo claro. Isso provavelmente ocorre pela formação de produtos intermediários corados da degradação da cocaína.

Ao esfriar a reação, ocorreu a precipitação do ácido benzoico na forma de cristais brancos em formato de agulha. O ácido benzoico é insolúvel em meio ácido

à temperatura ambiente, porém a quente ele permanece solubilizado. Sendo o coeficiente de partição mais favorável ao éter, a extração usando este solvente permite a retirada do ácido benzoico, enquanto que a anidroecgonina, insolúvel em éter, permanece na fase aquosa. A solubilidade do cloridrato de anidroecgonina e ácido benzoico são apresentados na Tabela 4.1.

No caso da síntese ocorrer de forma completa ao final da reação espera-se formar 20,3 g de cloridrato de anidroecgonina bruto. Obteve-se uma quantidade de 16,7 g de um pó cristalino com coloração amarelo escuro, rendimento bruto de 82,2%.

### **4.2.3 Análise do cloridrato de anidroecgonina sintetizado**

Após a realização da síntese, o produto foi analisado para a verificação de possíveis impurezas para, em seguida, proceder a uma técnica de purificação adequada.

#### **4.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A técnica, como já explicitado no capítulo 1 deste trabalho, é uma ferramenta importante na análise da presença de impurezas em uma amostra. Através do cálculo do ponto de fusão da amostra é possível identificar a presença de impurezas, uma vez que presentes diminuem o ponto de fusão e acarretam um alargamento no pico (CLAS et al., 1999).

##### **4.2.3.1.1 Material e métodos**

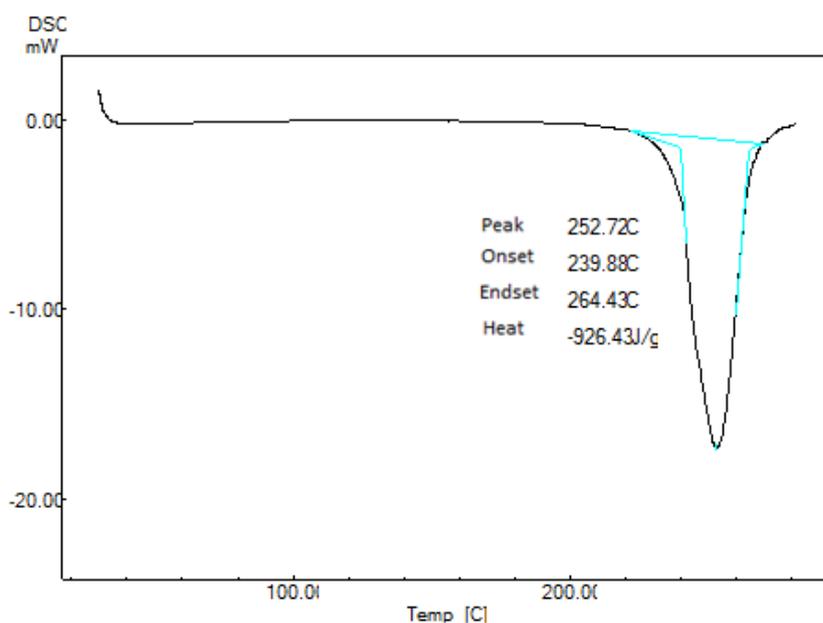
Uma amostra de 1,87 mg exatamente pesada em uma panela de alumínio lacrada foi analisada em equipamento SHIMADZU DSC-60 acoplado a integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS (Collection monitor versão 2.0, 1997-2003) e controlador de fluxo FC- 60, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min até 300 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

## 4.2.3.1.2 Resultados e discussão

Na Figura 4.3 é apresentado o termograma da amostra de cloridrato de anidroecgonina sem purificação. É possível observar um evento endotérmico com  $T_{onset}$  de 239 °C. Os valores relatados na literatura apresentam pequenas diferenças. Essa divergência ocorre provavelmente devido à falta de purificação prévia da substância. Zirkle e colaboradores (1962) relataram ponto de fusão de 233 °C e Kline e colaboradores (1989) relataram um faixa de fusão de 239 - 243 °C, enquanto Einhorn (1887, citado por ZIRKLE et al., 1962) encontrou 241 °C.

Podemos observar, além do  $T_{onset}$  abaixo do valor esperado, que o pico possui um alargamento o que é um indicativo de presença de impurezas.

**Figura 4.3** - Termograma de calorimetria exploratória diferencial da amostra de cloridrato de anidroecgonina após a síntese, sem purificação, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em panela de alumínio contendo 1,87 mg



#### 4.2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)

A cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas permite a detecção e identificação de impurezas presentes na amostra através do monitoramento do íon molecular (BOXLAER et al., 2000; WATSON, 2005).

##### 4.2.3.2.1 Material e métodos

A análise da amostra de cloridrato de anidroecgonina foi realizada usando as condições analíticas descritas no método apresentado no capítulo 3. A identificação foi realizada no modo scan entre  $m/z$  de 80 – 600. A amostra foi preparada em metanol e água (4:2) na concentração de 1 mg/mL. As injeções foram de 1  $\mu$ L e o tempo de corrida de 20 minutos.

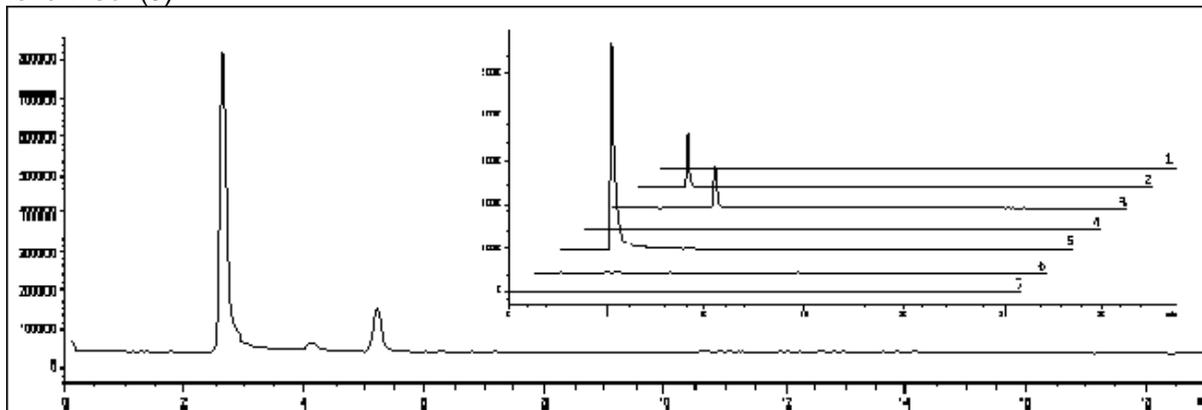
##### 4.2.3.2.2 Resultados e discussão

O cromatograma apresentado na Figura 4.4 mostra duas principais impurezas, cloridrato de ecgonina e levamisol. A presença do levamisol decorre do cloridrato de cocaína usado como material precursor. O cloridrato de cocaína usado tinha passado por apenas uma cristalização para a retirada das impurezas, restando uma fração de levamisol ao final da síntese da anidroecgonina. A ecgonina, outra impureza presente na amostra, é o produto intermediário da síntese da anidroecgonina, indicando que não ocorreu a conversão total em anidroecgonina.

Nos teste preliminares de síntese da anidroecgonina, usando quantidades pequenas de amostra (5 g) com a mesma proporção de ácido clorídrico em refluxo por 20 horas, ocorreu a quase completa conversão da cocaína em anidroecgonina, restando ainda uma quantidade de ecgonina presente. Ao transpor as condições ideais alcançadas na síntese em pequena escala para a síntese em escalas maiores, observou-se uma maior proporção de ecgonina presente no produto final. Sendo assim, aumentou-se o tempo de reação para que uma maior quantidade de anidroecgonina pudesse ser formada. A reação com duração de 30 horas

apresentou uma maior quantidade de anidroecgonina e a presença, ainda que mínima, de ecgonina.

**Figura 4.4** - Cromatograma obtido para o produto bruto da síntese de cloridrato de anidroecgonina por CL-EM, apresentando os picos de anidroecgonina (5), ecgonina (2) e levamisol (3)



### 4.3 Purificação do cloridrato de anidroecgonina

Sabendo as principais impurezas presentes na amostra, partiu-se para a etapa de purificação da amostra. A técnica de cristalização foi novamente preferida devido à praticidade e à eficiência da técnica. A escolha do solvente, importante para o sucesso da purificação, foi realizada usando pequenas quantidades de amostra e baseada na solubilidade das substâncias envolvidas. A solubilidade para cloridrato de anidroecgonina e cloridrato de ecgonina é apresentada na Tabela 4.1

**Tabela 4.1-** Solubilidade do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina e ácido benzoico

Solvente	Cloridrato de anidroecgonina	Cloridrato de ecgonina	Ácido benzoico	
Água	Muito solúvel	Solúvel	a frio	Insolúvel
Etanol	Fracamente solúvel	Fracamente solúvel	a quente	Solúvel
			a frio	Pouco solúvel
			a quente	Solúvel
Clorofórmio	--	--	Solúvel	
Éter	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	
Acetonitrila*	Muito pouco solúvel	Muito pouco solúvel	--	
Metanol*	Pouco solúvel	Pouco solúvel	--	
Acetato de etila*	Pouco solúvel	Pouco solúvel	--	

\*teste de solubilidade realizado no laboratório segundo Farmacopeia Brasileira 5 ed. (2010)  
Fonte: Moffat, 2005; UNODC, 2012

### 4.3.1 Material e métodos

Para a escolha do solvente adequado, utilizou-se uma pequena amostra da substância impura (300 mg) para proceder os testes de purificação. Foram testados três solventes: acetonitrila, acetato de etila e etanol absoluto.

Após os testes, o solvente selecionado para a purificação do produto obtido pela síntese foi o etanol absoluto.

Adicionaram-se 15 mL de etanol absoluto para cada 15 g de produto em um tubo de centrífuga de vidro com capacidade para 60 mL. A mistura foi agitada usando bastão de vidro e centrifugada a 1095 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. O procedimento foi repetido sete vezes. Ao final, a amostra foi lavada com porções de éter etílico, filtrada, transferida para um vidro de relógio e levada à estufa para secagem por 10 horas a 80 °C a vácuo.

### 4.3.2 Resultados e discussão

Os testes realizados para a escolha do solvente adequado foram realizados de forma padronizada, utilizando mesmas quantidades de solvente e tempo de agitação e centrifugação. As amostras foram então secas em estufa e analisadas.

Enquanto o produto inicial possuía uma coloração amarelo escura, o produto ao final dos testes de purificação possuía coloração que variava do branco, para as amostras purificadas com etanol absoluto e acetato de etila, ao amarelo claro para aquela em que foi utilizada acetonitrila. A coloração amarela foi considerada como um indicativo da presença de impurezas e, conseqüentemente, da menor eficiência da acetonitrila neste processo.

Ao analisar as amostras por CL-EM, confirmou-se a menor capacidade de purificação da acetonitrila. A amostra purificada com acetato de etila não apresentava mais impurezas de levamisol, mas ainda apresentava uma quantidade significativa de ecgonina, muito próxima à quantidade presente antes da purificação. Isso se deve ao fato de ambas, anidroecgonina e ecgonina, serem muito pouco

solúveis neste solvente. A purificação utilizando etanol absoluto se mostrou mais eficiente na retirada da ecgonina, por ser esta um pouco mais solúvel neste solvente. No entanto, para a purificação de toda a amostra obtida na síntese, foram realizadas nove etapas de centrifugação para garantir a retirada da ecgonina presente na amostra.

A separação do cloridrato de anidroecgonina e cloridrato de ecgonina é uma etapa complexa na purificação tanto de uma como da outra substância. As propriedades físicas destas moléculas são muito semelhantes devido à semelhança estrutural. A ecgonina possui uma hidroxila ligada ao anel tropânico na posição 3 enquanto que a anidroecgonina possui uma insaturação na posição 2,3 do anel tropânico. As solubilidades de ambas são muito semelhantes, além de serem muito polares, sendo solúveis apenas em água. Sendo assim, baseou-se em que uma mistura de duas substâncias, uma em maior quantidade, o produto, e a outra em menor quantidade, a impureza, dissolvidas em uma pequena quantidade de solvente, uma maior solubilização da impureza iria ocorrer, enquanto que o produto, apenas uma pequena parte solubiliza o restante pode ser coletado por filtração ou centrifugação (MULLIN, 2001; PAVIA et al., 2007).

#### 4.4 Síntese do Cloridrato de Ecgonina

A ecgonina é um ácido hidroxiamino, produto de hidrólise da cocaína (FINDLAY, 1954) e também um alcaloide encontrado na planta *Erythroxylum coca*. É uma molécula levogira e possui uma hidroxila e um grupamento ácido carboxílico o que torna a molécula extremamente polar, facilmente solúvel em água e pouco solúvel na maioria dos solventes orgânicos. A ecgonina é capaz de formar sais com ácidos e bases, principalmente cloridrato, cloreto áurico e bário. É uma molécula anfótera possuindo  $pK_a$  11,1 e  $pK_b$  11,2. Como não possui a dupla ligação conjugada com a carboxila e nem o anel benzênico, assim como outros derivados da cocaína, não absorve na região do ultravioleta. A ecgonina também pode ser usada como precursor na síntese da cocaína com iodeto de metila e anidrido benzoico sob pressão reduzida (MANSKE e HOLMES, 1950; HENRY, 1949).

A síntese do cloridrato de ecgonina pode ser realizada por hidrólise ácida ou básica a partir da cocaína. Willstätter e colaboradores (1923) e Einhorn e colaboradores (1887) realizaram a conversão de cocaína à ecgonina usando solução aquosa de hidróxido de bário à temperatura ambiente ou hidróxido de potássio, respectivamente, no entanto a hidrólise básica gera uma quantidade considerável do isômero dextrógiro da ecgonina que não é encontrado naturalmente na planta (NICHOLLS, 1936; MANSKE e HOLMES, 1950). A hidrólise ácida a partir da cocaína realizada com ácido clorídrico diluído (0,2 M) produz apenas o isômero levógiro da ecgonina. A formação de outros isômeros durante a hidrólise básica é característico dos alcaloides do grupo metilacilecgoninas (HENRY, 1949).

#### **4.4.1 Material e métodos**

Pesaram-se 4 g de cloridrato de cocaína (0,012 mol) e adicionaram-se 80 mL de ácido clorídrico 0,8 M. A solução permaneceu em ebulição sob refluxo durante 20 horas em manta de aquecimento fechada. Ao final da reação a solução foi resfriada à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma extração com éter etílico. A porção aquosa foi seca em evaporador rotatório com trompa d'água e a secagem foi finalizada em estufa a vácuo a 80 °C por 20 horas.

#### **4.4.2 Resultados e discussão**

Da mesma forma que a síntese da anidroecgonina, ocorre a hidrólise dos dois ésteres da molécula de cocaína. Porém, no meio reacional mais brando, usado na síntese da ecgonina, não ocorre a desidratação do grupamento álcool após sua hidrólise. A conversão da cocaína à ecgonina ou anidroecgonina é dependente da concentração do ácido e do tempo de reação. Quanto mais fortemente ácido o meio, maior conversão à anidroecgonina. Quanto mais fracamente ácido o meio, maior será a formação de ecgonina. No entanto, independente da concentração do ácido, sempre ocorrerá a formação das duas substâncias, em maiores ou menores quantidades (UNODC, 1965).

Ao final da reação, a extração com éter etílico permitiu a retirada do ácido benzoico. O produto bruto da síntese da ecgonina possuía uma coloração amarelo claro.

Após a secagem em estufa obteve-se 2,43 g de amostra bruta.

#### **4.5 Análise do produto obtido a partir da síntese do cloridrato de ecgonina**

Após a realização da síntese, o produto bruto foi analisado para a verificação de possíveis impurezas para, em seguida, proceder a uma técnica de purificação adequada.

##### **4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massas (CL-EM)**

###### 4.5.1.1 Material e métodos

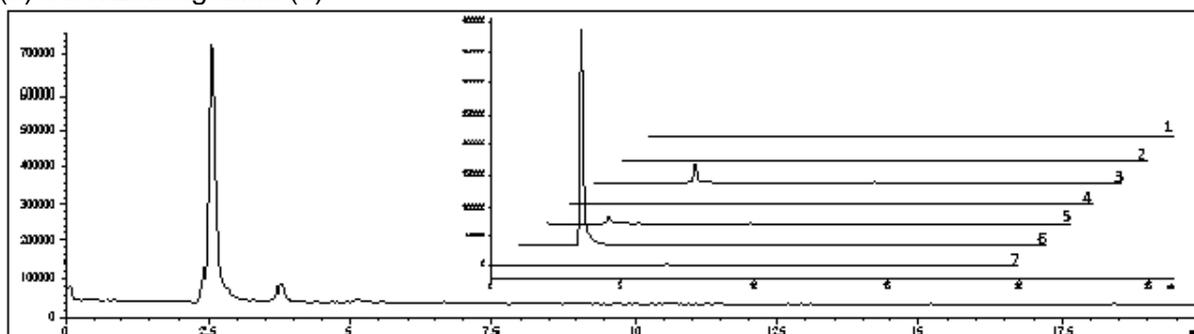
A análise da amostra de cloridrato de ecgonina foi realizada usando as condições analíticas descritas no método apresentado no capítulo 3. A identificação foi realizada no modo *scan* entre  $m/z$  80 – 600. A amostra foi preparada em metanol e água (4:2) na concentração de 1 mg/mL. As injeções foram de 1  $\mu$ L com tempo de corrida de 20 minutos.

###### 4.5.1.2 Resultados e discussão

Através da análise do cromatograma obtido para a amostra de cloridrato de ecgonina, apresentado na Figura 4.5, e dos espectros gerados para os picos presentes no cromatograma, é possível identificar duas impurezas principais: a anidroecgonina, como era esperado, devido à desidratação do álcool formando uma insaturação e a benzoilecgonina, indicando que não ocorreu a hidrólise dos dois ésteres, não ocorrendo a liberação do ácido benzoico. Além destas impurezas, foi possível detectar a presença de éster metílico de ecgonina, ainda que em baixa concentração. A presença do éster metílico de ecgonina indica que ocorreu a esterificação da ecgonina pela presença de moléculas de metanol liberadas durante a hidrólise, ou a hidrólise apenas do éster ligado ao anel benzênico.

Cis/trans-cinamoilcocaína, presentes no produto de partida, não são encontradas após a reação na amostra de cloridrato de ecgonina, uma vez que também hidrolisam formando ecgonina (BOUDREAU e CASALE, 2008).

**Figura 4.5** - Cromatograma do produto bruto obtido através da síntese do cloridrato de ecgonina por CL-EM em modo SCAN, mostrando os picos de ecgonina (6), anidroecgonina (5) e benzoilecgonina (3)



#### 4.6 Purificação do cloridrato de ecgonina

Como relatado anteriormente, as propriedades físicas do cloridrato de ecgonina e do cloridrato de anidroecgonina são muito semelhantes, inclusive a solubilidade de ambas. No entanto, é possível a retirada de impurezas presentes em menores concentrações fazendo sucessivas recristalizações, mesmo que as impurezas tenham o mesmo perfil de solubilidade que o produto majoritário.

##### 4.6.1 Material e métodos

Inicialmente a amostra foi lavada com porções de éter etílico e em seguida filtrada a vácuo. A etapa seguinte consistiu na cristalização usando etanol absoluto. Adicionou-se etanol absoluto e agitou-se com o auxílio de um bastão de vidro. A mistura foi centrifugada a 1095 g durante 10 minutos. O procedimento foi repetido por quatro vezes. A amostra foi novamente lavada com porções de éter etílico, filtrada e, em seguida, levada à estufa a vácuo a 80 °C por 20 horas.

##### 4.6.2 Resultados e discussão

Para a retirada de impurezas solúveis em solvente orgânico, como a benzoilecgonina e o éster metílico de ecgonina procedeu-se a primeira purificação usando éter etílico. Em seguida realizou-se a purificação usando como solvente o

etanol absoluto. Como as duas substâncias, ecgonina e anidroecgonina, são muito semelhantes usou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para a retirada da anidroecgonina da amostra de ecgonina. Por último, realizou-se uma lavagem da amostra com éter etílico para a retirada do resíduo de etanol. A ecgonina, assim como a anidroecgonina, em presença de etanol à quente pode esterificar, formando, por exemplo, éster etílico de ecgonina, o que não é desejável na purificação da ecgonina. Além disso, o ponto de ebulição do éter etílico é menor que a do etanol, ocorrendo assim a evaporação do solvente mais rapidamente.

#### 4.7 Síntese da benzoilecgonina

Benzoilecgonina é o acil éster de ecgonina, possui um grupamento ácido carboxílico e um éster do ácido benzoico. Assim como os outros derivados da cocaína, a molécula encontrada naturalmente é levogira. A benzoilecgonina é uma molécula anfótera, possuindo  $pK_a$  de 2,15 e  $pK_b$  de 11,41, hidrofílica, altamente solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos. Dissolve-se rapidamente em soluções alcalinas formando sais (BILLINGS, 2003).

O alcaloide benzoilecgonina é produto de hidrólise da cocaína. A substância é também encontrada na planta *Erythroxylum coca*, no entanto não é extraído juntamente com a cocaína no processo clandestino devido à sua alta solubilidade em meio alcalino e insolubilidade em éter etílico. A benzoilecgonina, assim como a ecgonina é um produto da degradação da cocaína (HENRY, 1949; UNODC, 2005; CASALE e WAGGONER, 1991).

A benzoilecgonina pode ser sintetizada a partir da ecgonina através da ação do anidrido benzoico ou a partir da cocaína pela hidrólise do éster metílico gerando metanol e benzoilecgonina (HENRY, 1949). Ambas as formas de obtenção da benzoilecgonina originam um produto na forma de base relativamente estável.

##### 4.7.1 Material e métodos

O desenvolvimento da síntese da benzoilecgonina foi baseado nos experimentos relatados por Findlay (1954).

Pesaram-se 32 g de cloridrato de cocaína (0,094 mol) e adicionaram-se 200 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Agitou-se até precipitação, formando uma massa branca. O precipitado foi extraído com cinco porções de éter etílico. As frações etéreas foram misturadas e evaporadas. Ao resíduo adicionaram-se 200 mL de água. A mistura foi levada à ebulição sob refluxo em manta de aquecimento por 2 horas. Após o tempo de reação evaporou-se a água em evaporador rotatório a baixa pressão e o produto foi lavado com éter etílico e seco em estufa a 40 °C a vácuo.

#### **4.7.2 Resultados e discussão**

A primeira etapa da síntese da benzoilecgonina é a transformação da cocaína na forma de sal para a forma de base livre que é alcançado através da alcalinização do meio. A cocaína em meio ácido possui a amina protonada, ao passar para o meio alcalino, entre pH 8,0 e 10,0, a amina fica desprotonada. A cocaína na forma de base livre é insolúvel em água e solúvel em solvente orgânico. A mistura de cocaína base e água à temperatura ambiente forma uma pasta branca. Quando a mistura entra em ebulição (100 °C) a cocaína se funde, pois o ponto de fusão é abaixo do ponto de ebulição da água (96 °C), formando duas fases. Durante a reação, a cocaína, que está na forma líquida, é hidrolisada à benzoilecgonina tornando-se solúvel na água. Após a reação, o produto foi seco em evaporador rotatório a baixa pressão e a finalização da secagem foi realizada em estufa a 50 °C a vácuo. A temperatura de fusão da benzoilecgonina na forma hidratada é 92 °C (MOFFAT et al., 2004), sendo assim não se deve proceder a secagem em estufa com temperaturas muito altas para evitar a fusão e degradação da amostra.

O mecanismo de reação que ocorre na síntese da benzoilecgonina é a hidrólise do grupamento éster metílico formando benzoilecgonina e uma molécula de metanol.

#### **4.8 Análise do produto obtido através da síntese da benzoilecgonina**

Após a realização da síntese, o produto foi analisado para a identificação de possíveis impurezas, em seguida, procedeu-se o ensaio de purificação.

### 4.8.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)

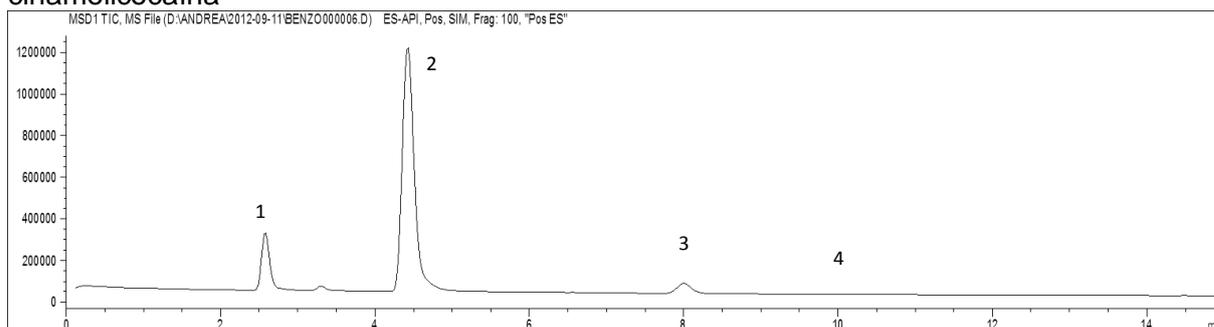
#### 4.8.1.1 Material e métodos

A análise da amostra de benzoilecgonina foi realizada usando as condições analíticas descritas no método descrito no capítulo 3. A identificação foi realizada no modo scan entre  $m/z$  80 – 600. A amostra foi preparada em metanol na concentração de 1 mg/mL. As injeções foram de 1  $\mu$ L com tempo de corrida de 15 minutos.

#### 4.8.1.2 Resultados e discussão

Pela análise do cromatograma obtido para a amostra de benzoilecgonina, apresentado na Figura 4.6, e dos espectros gerados para os picos presentes no cromatograma, é possível identificar como as principais impurezas a cocaína (3), ecgonina (1) e cinamoilcocaína (4). Todas as impurezas estão na forma de base livre uma vez que o produto de partida na síntese da benzoilecgonina era a cocaína base livre.

**Figura 4.6** - Cromatograma do produto bruto obtido através da síntese da benzoilecgonina por CL-EM em modo *scan* de  $m/z$  80-600. 1-ecgonina; 2 -benzoilecgonina; 3-cocaína; 4 - cinamoilcocaína



### 4.9 Purificação da benzoilecgonina

Tendo-se conhecimento das impurezas presentes na amostra de benzoilecgonina procedeu-se a etapa de purificação da amostra. A técnica de cristalização foi realizada para a purificação da benzoilecgonina. A seleção do

solvente adequado foi realizada baseada na solubilidade das substâncias presentes na amostra e na solubilidade da benzoilecgonina (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2** - Solubilidade da benzoilecgonina, cocaína, ecgonina e cinamoilcocaína

<b>Solvente</b>	<b>Benzoilecgonina</b>	<b>Cocaína</b>	<b>Cinamoilcocaína</b>	<b>Ecgonina</b>
<b>Água</b>	a frio a quente	Pouco solúvel Solúvel	Pouco solúvel Praticamente insolúvel	Solúvel
<b>Etanol</b>	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Pouco solúvel
<b>Éter etílico</b>	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Ligeiramente solúvel
<b>Clorofórmio</b>	---	Solúvel	Solúvel	Ligeiramente solúvel

Fonte: UNODC, 2012

#### 4.9.1 Material e métodos

O produto bruto da síntese da benzoilecgonina foi lavado com quatro porções de éter etílico. Em seguida, foi realizada uma cristalização em água. A mistura foi aquecida até completa solubilização do produto e depois resfriada para a precipitação da benzoilecgonina. Os cristais foram filtrados, coletados e secos em dessecador.

#### 4.9.2 Resultados e discussão

De acordo com a tabela de solubilidade das substâncias envolvidas e considerando que é importante a coleta dos cristais puros de benzoilecgonina iniciou-se a purificação lavando o produto obtido com éter etílico. A lavagem permite a retirada de impurezas que são solúveis no solvente, como a cocaína que esta na forma de base livre e outras impurezas como a cis/trans-cinamoilcocaína. Para a cristalização selecionou-se a água como solvente uma vez que nesta a benzoilecgonina não é solúvel a frio, mas é solúvel a quente. A ecgonina presente na amostra é solúvel em água, ficando solubilizada no líquor-mãe. A benzoilecgonina precipitada após o resfriamento foi filtrada e lavada com água gelada para retirada de impurezas que possam ter ficado retidas na rede cristalina da benzoilecgonina.

#### 4.10 Síntese do éster metílico de anidroecgonina

O éster metílico de anidroecgonina é o principal produto de pirólise da cocaína. É formado quando a cocaína base é aquecida a cerca de 260 °C juntamente com o ácido benzoico (NÓVAK, 2011). A molécula possui um grupamento éster e uma insaturação na posição 2,3 do anel tropânico. O éster metílico de anidroecgonina é um óleo higroscópico com odor de aminas, e em meio ácido é rapidamente hidrolisado à anidroecgonina (MATCHET e LEVIN, 1941).

A síntese do éster metílico de anidroecgonina é relatada na literatura usando ácido sulfúrico e metanol para a esterificação (LUKASZEWSKI e JEFFERY, 1980), ou pelo uso de metanol saturado com cloreto de hidrogênio (ZIRKLE et al., 1962), ambas usando como produto de partida a anidroecgonina. O éster metílico de anidroecgonina também pode ser obtido pela síntese completa a partir do hexanoato de ródio II e N-trimetilsilil-etóxi-carbonil pirrol com sucessivas reações até obter o éster com rendimento de 95% (DAVIES et al., 1991).

##### 4.10.1 Material e métodos

A síntese do éster metílico de anidroecgonina foi baseada no estudo realizado por Zirkle e colaboradores (1962).

O produto de partida da síntese do éster metílico de anidroecgonina foi o cloridrato de anidroecgonina. O cloridrato de anidroecgonina foi obtido a partir do processo descrito no item 4.2.1 e purificado de acordo com o item 4.3.1.

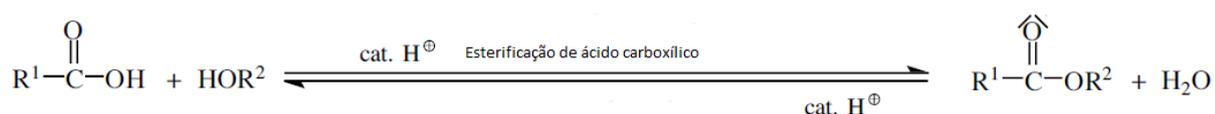
Pesaram-se 10,7 g de cloridrato de anidroecgonina (0,052 mol) adicionaram-se 240 mL de metanol e 120 mL de ácido clorídrico concentrado. A solução permaneceu em refluxo durante 34 horas em manta de aquecimento coberta. Ao fim da reação a solução foi evaporada em evaporador rotatório a baixa pressão. O resíduo foi solubilizado com água e alcalinizado a pH 10 com solução de carbonato de potássio saturada. A solução foi extraída com várias porções de éter etílico. A fase orgânica foi evaporada em evaporador rotatório a baixa pressão.

#### 4.10.2 Resultados e discussão

O uso do produto de partida, cloridrato de anidroecgonina, já purificado evitou a formação de subprodutos que contaminariam a amostra do éster metílico de anidroecgonina. Alguns testes preliminares foram realizados usando o produto bruto da síntese do cloridrato de anidroecgonina, o que gerou diversos subprodutos, entre eles, o éster metílico de ecgonina. Isto indica que a ecgonina presente como impureza do cloridrato de anidroecgonina também reagiu gerando seu éster correspondente.

A anidroecgonina na presença do metanol em meio ácido sofre esterificação. A reação é conhecida como esterificação de Fischer (NORMAN e COXON, 2000). Inicialmente ocorre a protonação da carbonila gerando um intermediário estabilizado por ressonância. Em seguida ocorre a adição do álcool à carbonila protonada, a desprotonação gerando um intermediário tetraédrico que perde uma água, e finalmente, a formação do éster. A representação da esterificação de Fischer é apresentada na Figura 4.7 (REINHARD, 2010).

**Figura 4.7** - Representação da esterificação de Fischer que ocorre na síntese do éster metílico de anidroecgonina



Fonte: Bruckner, 2010

No entanto, quando o álcool não está em excesso, ocorre a protonação do radical OR gerando a saída do álcool, voltando a reação para o início. Na síntese do éster metílico de anidroecgonina pode ter ocorrido a falta de metanol, uma vez que o rendimento da síntese foi muito baixo (aproximadamente 31%), embora gerando um produto puro (NORMAN e COXON, 2000).

Para a separação do éster do produto de partida que não sofreu a reação é necessário basificar o meio. Em meio básico ocorre o fenômeno de *salting out*, que diminui a solubilidade de compostos orgânicos. O éster é insolúvel em meio básico,

---

passando para a fase orgânica na extração com éter etílico. A anidroecgonina mesmo em meio alcalino não é solúvel em éter etílico, ficando retida na fase aquosa (ARMAREGO e CHAI, 2003).

Ao evaporar a fase orgânica obteve-se um óleo amarelo claro translúcido, característico do éster metílico de anidroecgonina na forma de base.

#### **4.11 Análise do produto obtido a partir da síntese do éster metílico de anidroecgonina**

Após a obtenção do óleo, o produto foi analisado para a identificação de possíveis impurezas.

##### **4.11.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM)**

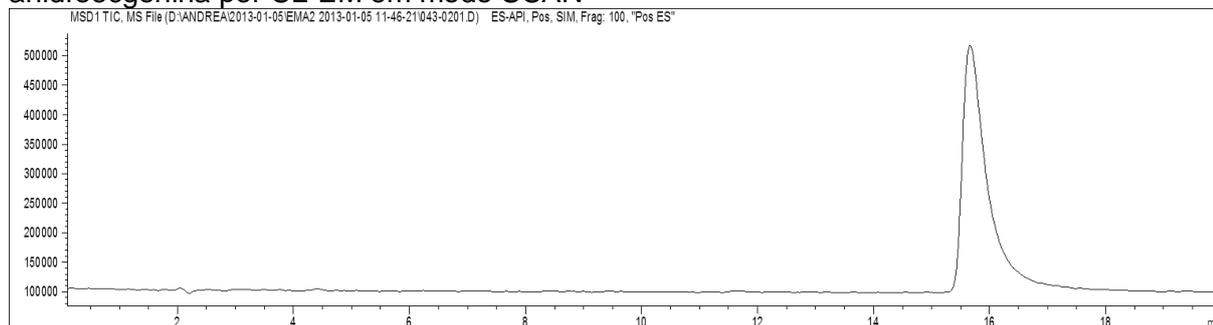
###### **4.11.1.1 Material e métodos**

A análise da amostra de éster metílico de anidroecgonina foi realizada usando as condições analíticas descritas no método apresentado no capítulo 3. A identificação foi realizada no modo scan entre  $m/z$  80 – 600. A amostra foi preparada em metanol na concentração de 1 mg/mL. As injeções foram de 1  $\mu$ L com tempo de corrida de 20 minutos.

###### **4.11.1.2 Resultados e discussões**

Através da análise do produto obtido não se observou presença de impurezas. O produto foi utilizado na realização de outros testes de caracterização sem ser submetido a outros processos de purificação.

**Figura 4.8** - Cromatograma do produto obtido através da síntese do éster metílico de anidroecgonina por CL-EM em modo SCAN



## 4.12 Caracterização do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina

### 4.12.1 Aspectos Visuais

Através da microscopia óptica é possível identificar a forma das substâncias sólidas, amorfa ou cristalina. Sendo a substância cristalina, é possível observar a forma dos cristais. Dependendo do tipo de solvente usado na cristalização obtêm-se diferentes tipos de cristais, e podem ser caracterizados quanto à sua forma.

#### 4.12.1.1 Material e métodos

As caracterizações foram realizadas visualmente em microscópio óptico Leica S8 através da aplicação das amostras, separadamente, em placas de vidro. Cada amostra foi também submetida à análise por equipamento de vídeo espectral VSC5000 para análise da fluorescência da substância.

#### 4.12.1.2 Resultados e discussão

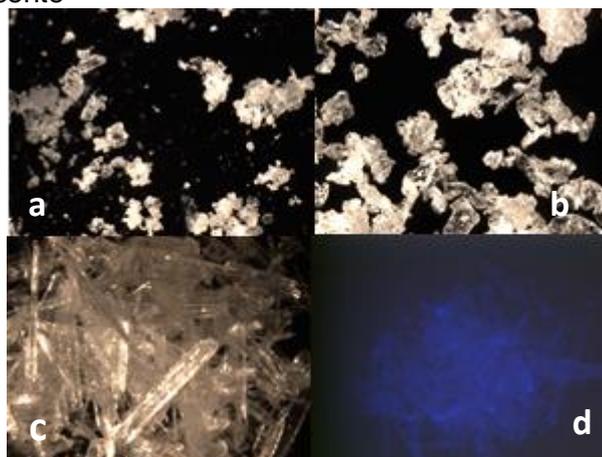
O cloridrato de anidroecgonina obtido foi um pó branco cristalino, com cristais irregulares pequenos dispostos em aglomerados, e não apresentou reflexão ao incidir luz fluorescente. Na literatura existe relato de que os cristais de anidroecgonina base possuem formato de agulha (HENRY, 1949), no entanto nada foi encontrado para os cristais de cloridrato de anidroecgonina.

O cloridrato de ecgonina obtido foi um pó branco cristalino, com cristais irregulares. De acordo com o descrito na literatura, os cristais de ecgonina na forma de cloridrato podem apresentar formato rômboico (HENRY, 1949), porém não foi possível observar o exato formato dos cristais. Não apresentou reflexão ao incidir luz fluorescente.

A benzoilecgonina obtida foi um pó branco cristalino, com cristais em formato de agulhas, como relatado na literatura (HENRY, 1949). Ao incidir luz fluorescente apresentou reflexão.

A Figura 4.9 apresenta as imagens por microscopia óptica para as três substâncias descritas acima, bem como a imagem de reflexão na luz fluorescente.

**Figura 4.9** - Imagem do pó de cloridrato de anidroecgonina (a) em microscópio óptico; pó do cloridrato de ecgonina (b) em microscópio óptico; benzoilecgonina (c) em microscópio óptico e (d) luz fluorescente



## 4.12.2 Determinação do ponto de fusão

### 4.12.2.1 Material e métodos

As determinações da faixa de fusão foram realizadas em equipamento automático METLER TOLEDO FP90. A substância foi compactada em capilares com 1 mm de diâmetro e 6 cm de altura, introduzidos verticalmente no equipamento. Previamente foi realizada a calibração do equipamento com fenolftaleína (WHO, Melting Point Substance Reference n° 13; ponto de fusão 263 °C), ácido benzoico

(Mettler ME-18555 A.8.92 Calibration Substance; ponto de fusão 122,4 °C) e cafeína (Mettler ME-18872 A.4.96; ponto de fusão 236,5 °C). A taxa de aquecimento foi de 5 °C/min até 20 °C acima da temperatura de fusão preconizada na literatura.

As determinações foram realizadas em triplicata para cada uma das substâncias.

A determinação do ponto de ebulição do éster metílico de anidroecgonina foi realizada no mesmo equipamento na função “ponto de ebulição”. A substância foi adicionada em tubo para ponto de ebulição, um capilar com a extremidade aberta foi colocado verticalmente no tubo de ponto de ebulição e o conjunto foi introduzido no equipamento. A taxa de aquecimento foi de 5 °C/min até 10 °C acima do ponto de ebulição da amostra. A pressão atmosférica na qual foi realizado o ensaio foi 756 mmHg. Através de uma equação matemática tendo o valor da temperatura que ocorreu a ebulição e a pressão atmosférica o equipamento calcula automaticamente o ponto de ebulição.

#### 4.12.2.2 Resultados e discussão

Os valores médios obtidos na faixa de fusão do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina e benzoilecgonina, e o valor médio do ponto de ebulição do éster metílico de anidroecgonina são apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** - Valores médios obtidos para a faixa de fusão do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina e benzoilecgonina e ponto de ebulição para éster metílico de anidroecgonina em equipamento automático Mettler Toledo FP90

<b>Substância</b>	<b>Faixa de fusão média (em °C)</b>	<b>PF literatura (em °C)</b>
Cloridrato de anidroecgonina	246 – 248,1	239 - 244
Cloridrato de ecgonina	246,4 – 263,7	246
Benzoilecgonina	84, 7 – 89,1	86 - 92 (tetraidratada)
	<b>Ponto de ebulição médio (em °C, 760 mmHg)</b>	<b>P.E. literatura</b>
Éster metílico de anidroecgonina	104,9	--

A faixa de fusão encontrada para o cloridrato de anidroecgonina está um pouco acima do observado na literatura, entre 239 e 244 °C, porém, os produtos relatados estavam na forma bruta, sem purificação (KLINE et al., 1989; ZIRKLE et al., 1962). Após a fusão ocorreu decomposição da amostra. O ponto de fusão para a anidroecgonina base relatado na literatura é de 235 °C, o que confirma a forma de sal da substância (HENRY, 1949).

A faixa de fusão encontrada para o cloridrato de ecgonina está de acordo com o descrito na literatura que é 246 °C, no entanto os valores observados possuem uma faixa muito ampla o que pode indicar a presença de alguma impureza. O ponto de fusão da ecgonina base é de 205 °C (MOFFAT et al., 2004). Os valores de ponto de fusão encontrados indicam que o produto obtido está na forma de sal cloridrato.

A faixa de fusão da benzoilecgonina está de acordo com a literatura para a forma de cristais tetraidratados, na faixa de 86 – 92 °C. A forma anidra da benzoilecgonina base possui ponto de fusão mais elevado, 195 °C. Sendo assim é possível afirmar que a benzoilecgonina obtida se apresente na forma hidratada. Segundo a literatura, a benzoilecgonina cristaliza com quatro moléculas de água em cristais agulha (MOFFAT et al., 2004; HENRY, 1949).

O ponto de ebulição obtido para o éster metílico de anidroecgonina foi 104,9 °C, a pressão atmosférica de 760 mmHg. Não foram encontrados na literatura valores referentes ao ponto de ebulição para do éster metílico de anidroecgonina.

#### **4.12.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede a mudança de energia que ocorre entre a amostra e o material de referência quando aquecidos ou esfriados. A técnica fornece a temperatura de fusão com exatidão que os métodos tradicionais muitas vezes não fornecem (CLAS et al., 1999). A DSC pode ser usada na confirmação do ponto de fusão através das mudanças de estado que ocorrem na substância submetida a variações da temperatura, além de identificar a presença de solventes ou água de hidratação, ainda que não se possa avaliar com precisão o número de moléculas de água presentes.

Não existe relato na literatura do uso desta técnica para avaliar os eventos ocorridos durante o aquecimento das três substâncias.

#### 4.12.3.1 Material e métodos

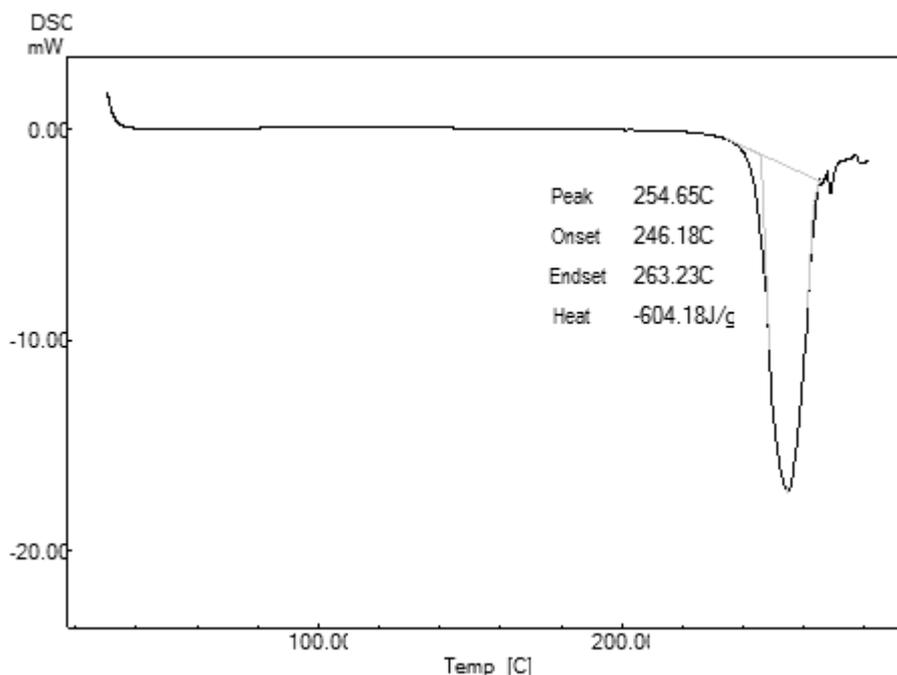
Os experimentos de calorimetria exploratória diferencial para as amostras de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina e benzoilecgonina foram realizados no Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS. O equipamento usado foi um SHIMADZU DSC-60 acoplado a integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS (Collection monitor versão 2.0, 1997-2003) e controlador de fluxo FC- 60, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min até 300 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min. As amostras foram analisadas em painéis de alumínio e foram pesados exatamente em torno de 1 a 2 mg.

#### 4.12.3.2 Resultados e discussão

A Figura 4.10 ilustra o termograma obtido para a amostra de cloridrato de anidroecgonina.

Pode-se observar um evento endotérmico característico da fusão da amostra. O ponto de fusão obtido através da determinação do *Onset* fornecido pelo equipamento foi de 246,2 °C. O ponto de fusão obtido está um pouco acima do valor relatado na literatura (239 – 244 °C). Como já foi discutido no item 4.11.2, os produtos relatados na literatura estavam na forma bruta, sem purificação, o que pode diminuir o ponto de fusão da substância devido a presença de impurezas (KLINE et al., 1989; ZIRKLE et al., 1962).

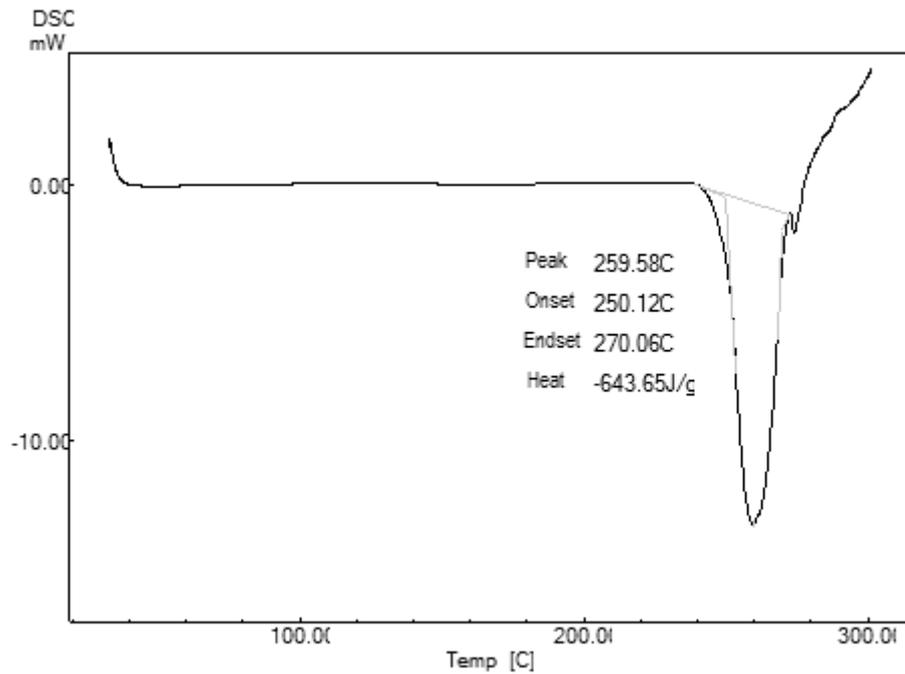
**Figura 4.10** - Termograma obtido para cloridrato de anidroecgonina purificado, candidato à SQR usando taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio



A Figura 4.11 apresenta o termograma obtido para a amostra de cloridrato de ecgonina.

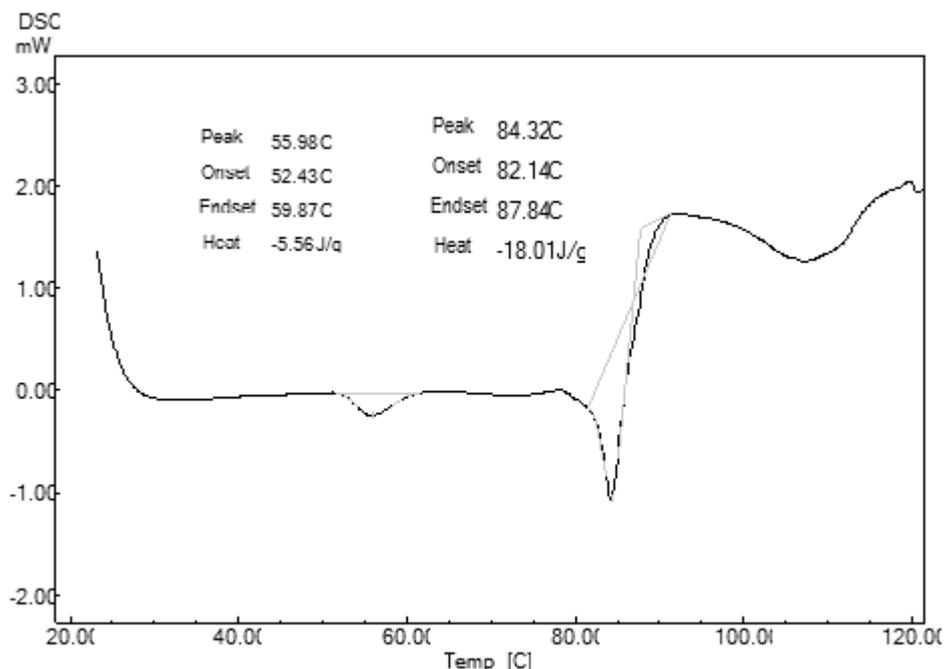
É possível observar um evento endotérmico característico da fusão do cloridrato de ecgonina. O ponto de fusão obtido através da determinação do *Onset* fornecido pelo equipamento foi de 250,1 °C. O ponto de fusão obtido encontra-se um pouco acima do valor relatado na literatura de 246 °C (MOFFAT et al., 2004; HENRY, 1949). No entanto, como não existem relatos de purificação do produto de síntese do cloridrato de ecgonina nos trabalhos que apresentam o ponto de fusão da amostra é possível que exista alguma interferência nas análises. Após o evento de fusão da amostra é possível observar que houve degradação da amostra. A degradação ocorreu em duas partes, inicialmente um evento endotérmico e por fim um evento exotérmico.

**Figura 4.11** - Termograma obtido para cloridrato de ecgonina purificado, candidato à SQR usando taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio



A Figura 4.12 apresenta o termograma obtido para a amostra de benzoilecgonina.

**Figura 4.12** - Termograma obtido para benzoilecgonina purificada, candidata à SQR usando taxa de aquecimento de 10 °C/min em panela de alumínio



Pela análise do termograma obtido para a amostra de benzoilecgonina purificada é possível observar um evento endotérmico característico de fusão. O ponto de fusão obtido através da determinação do *Onset* fornecido pelo equipamento foi de 82,1 °C encontrando-se um pouco abaixo do valor relatado na literatura (MOFFAT et al., 2004). Antes do evento de fusão da amostra é possível observar que houve um evento endotérmico, provavelmente devido à perda da água de hidratação da amostra. Após o evento de fusão da amostra, ocorreu degradação do composto.

#### 4.12.4 Rotação específica

Muitas substâncias são opticamente ativas desviando a luz plano-polarizada de modo que a luz transmitida é desviada em um determinado ângulo em relação à incidente. Um dos enantiômeros desvia a luz plano-polarizada para a direita (+), chamado dextrógiro, ou *d*; o antípoda desvia para a esquerda (-), conhecido como levógiro, ou *l*. O ângulo desse desvio é igual em módulo para os enantiômeros, porém com sinais opostos (FB, 2010).

A avaliação do poder rotatório de uma substância com polarímetro é um dos métodos mais práticos para distinguir os enantiômeros, sendo um importante critério de identificação, caracterização e determinação de pureza enantiomérica dos fármacos.

#### 4.12.4.1 Material e métodos

A rotação óptica específica foi determinada em polarímetro Perkin Elmer 341, em temperatura ambiente ( $20 \pm 0,5$  °C). As análises foram determinadas em comprimento de onda de 589,3 nm da raia D de sódio. As cubetas utilizadas foram de vidro com janelas de quartzo com 1 dm de percurso óptico e volume de 1 mL.

As determinações foram realizadas em solução a 1% p/v em água, usando como branco o mesmo solvente.

Os valores obtidos foram aplicados na Equação 4.1.

$$[\alpha]_D^{20} = \alpha/l.c \qquad \text{Equação 4.1}$$

Onde:

$\alpha$  = ângulo de rotação

l = comprimento, em dm, da cubeta

c = concentração da substância em g% p/v

#### 4.12.4.2 Resultados e discussão

**Tabela 4.4** - Determinações de rotação óptica específica média para cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina a 1 g%

Composto	média de $\alpha$	média de $[\alpha]^{20}_D$	$[\alpha]^{20}_D$ literatura	$[\alpha]^{20}_D$ Especificação comercial
<b>Cloridrato de anidroecgonina</b> (em água)	- 0,722	- 71,6	-61 <sup>a</sup> a -72 <sup>a</sup>	-58 (MeOH) <sup>c</sup>
<b>Cloridrato de ecgonina</b> (em água)	-0,356	- 47,5	-47 <sup>a</sup> a -57 <sup>b</sup>	-45 ± 2 <sup>c,d</sup>
<b>Benzoilecgonina</b> (em metanol)	- 0,474	- 47,2	-63 <sup>b</sup>	-52 <sup>c</sup>
<b>Éster metílico de anidroecgonina</b> (em metanol)	-0, 410	-41,3	-47 <sup>e</sup> (etanol)	-40± 2 <sup>c,d</sup>

Fonte: <sup>a</sup>UNODC, 1965; <sup>b</sup>Henry, 1949; <sup>c</sup>Lipomed; <sup>d</sup>Sigma-Aldrich; <sup>e</sup>Matchett e Levin (1941)

Os valores de rotação óptica específica para as três substâncias estão próximos aos valores relatados na literatura. No entanto, a faixa de valores entre diferentes autores é ampla, o que indica grande variação, que pode ser devido a falta de purificação das substâncias nos trabalhos. Por outro lado, algumas empresas internacionais que possuem estes produtos relatam valores de rotação específica mais próximos aos encontrados para as substâncias candidatas a SQR. A pureza declarada pelos fabricantes para o cloridrato de ecgonina foi acima de 98,5%, para a benzoilecgonina acima de 98,5%, para o cloridrato de anidroecgonina acima de 97% e para éster metílico de anidroecgonina acima de 97,5%. O valor de rotação específica encontrado na literatura para a benzoilecgonina (-63°) não indica se a substância é tetraidratada ou anidra, normalmente substâncias hidratadas possuem o valor de rotação específicas menores que as anidras.

Os valores negativos para todas as substâncias indicam que as moléculas são levogiras, majoritariamente, assim como o produto de partida das sínteses, o cloridrato de cocaína. Esse fato indica que não ocorreu a extensa formação do isômero dextrógiro.

#### 4.12.5 Perda por dessecação

O ensaio de perda por dessecação é realizado para avaliar a quantidade de substâncias voláteis de qualquer natureza eliminadas nas condições específicas (FB, 2010).

##### 4.12.5.1 Material e métodos

O ensaio foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), em triplicata para o cloridrato de anidroecgonina e cloridrato de ecgonina. Para a benzoilecgonina, por possuir um ponto de fusão abaixo de 100 °C e por se saber ser uma substância hidratada, procedeu-se o ensaio de determinação de água por Karl Fischer descrito no item 4.12.6. O éster metílico de anidroecgonina, por ser uma substância oleosa e volátil, o ensaio de perda por dessecação não se aplica.

Pesou-se exatamente cerca de 1,0 g de amostra em um pesa-filtro previamente dessecado por 30 min a 100 °C e tarado. O pesa-filtro contendo a amostra foi levado à estufa, com tampa aberta, em temperatura de 105 °C por 2 horas. Após, o pesa-filtro foi retirado da estufa e esfriado à temperatura ambiente em dessecador e pesado. Levou-se novamente à estufa a 105 °C por 1 hora. Retirou-se da estufa, deixou-se esfriar e pesou-se novamente. O peso obtido da amostra foi usado para o cálculo da porcentagem de perda por dessecação pela equação 4.2:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

**Equação 4.2**

Onde:

$P_u$  = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes de dessecação

$P_s$  = peso do pesa-filtro

$P_a$  = peso da amostra dessecada

##### 4.12.5.2 Resultados e discussão

Os resultados dos ensaios estão descritos na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** - Valores obtidos de porcentagem média de substâncias voláteis no ensaio de perda por dessecação para as amostras de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina

<b>Substância</b>	<b>% média de substâncias voláteis</b>
Cloridrato de anidroecgonina	0,095
Cloridrato de ecgonina	0,082

Os valores encontrados de impurezas voláteis nas amostras de cloridrato de ecgonina e cloridrato de anidroecgonina estão abaixo de 0,1 %, um valor adequado visto que a monografia do cloridrato de cocaína especifica no máximo 0,5% (BRITISH PHARMACOPEA, 2011). A benzoilecgonina encontra-se na forma hidratada, como foi mostrado nos ensaios de ponto de fusão e DSC, provavelmente na forma tetraidratada, relatado na literatura (HENRY, 1949). A porcentagem de água esperada para a benzoilecgonina na forma tetraidratada é de 19,29%. Para a confirmação da quantidade de água na benzoilecgonina foi realizado o ensaio de Karl Fischer, descrito a seguir.

#### **4.12.6 Determinação de água**

Muitas substâncias encontram-se na forma hidratada ou contém água absorvida, o que torna relevante sua determinação por métodos específicos como o método de Karl Fischer.

O método se baseia na reação quantitativa da água com solução anidra de dióxido de enxofre e iodo em presença de uma solução tampão que reage com íons hidrogênio. Como a substância benzoilecgonina encontra-se na forma hidratada o ensaio foi realizado. As demais substâncias que não se apresentam na forma hidratada a determinação de substâncias voláteis foi realizada por perda por dessecação, descrita anteriormente.

#### 4.12.6.1 Material e métodos

Para a determinação da quantidade de água presente na amostra utilizou-se equipamento Scott e reagente de Karl Fischer (Merck).

A análise foi realizada em duplicata e a padronização do reagente titulante foi realizada em triplicata.

#### 4.12.6.2 Resultados e discussões

O valor médio obtido para a porcentagem de água presente na amostra foi de 18,61%, o que reforça a hidratação da molécula de benzoilecgonina com quatro moléculas de água, majoritariamente, podendo ser caracterizada como benzoilecgonina tetraidratada.

#### 4.12.7 Determinação de cinzas sulfatadas (Resíduo por incineração)

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico. O ensaio permite determinar o teor de impurezas inorgânicas presentes na amostra (FB, 2010).

##### 4.12.7.1 Material e métodos

Pesou-se exatamente cerca de 1,0 g de cada amostra previamente dessecada, separadamente, em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico e aqueceu-se em bico de Bunsen até completa carbonização. Esfriou-se e adicionou-se ácido sulfúrico para umedecer os resíduos, em seguida, incinerou-se em forno de mufla a 600 °C por 4 horas.

Os cálculos de porcentagem de cinzas sulfatadas foram realizados pela equação 4.3.

$$\% \text{ Cinzas sulfatadas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100 \qquad \text{Equação 4.3}$$

Onde:

$P_1$  = peso do cadinho calcinado

$P_2$  = peso do cadinho amostra incinerada

$P_3$  = peso da amostra inicial

#### 4.12.7.2 Resultados e discussão

Os valores encontrados para os ensaios de cinzas sulfatadas estão descritos na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6** - Valores, em porcentagem, de substâncias inorgânicas presente nas amostras de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina.

<b>Amostra</b>	<b>% substâncias inorgânicas</b>
<b>Cloridrato de anidroecgonina</b>	0,0023
<b>Cloridrato de ecgonina</b>	0,014
<b>Benzoilecgonina</b>	0,0090
<b>Éster metílico de anidroecgonina</b>	0,0018

A porcentagem de substâncias inorgânicas obtida para as amostras de cloridrato de anidroecgonina (0,0023%), cloridrato de ecgonina (0,014%), benzoilecgonina (0,0090%) e éster metílico de anidroecgonina (0,0018%) estão abaixo de 0,1% em relação à substância dessecada, valor especificado para cinzas sulfatadas na monografia do cloridrato de cocaína, produto de partida das sínteses (BRITISH PHARMACOPEIA, 2011).

#### 4.12.8 Espectroscopia na região de infravermelho (IV)

A análise do espectro de IV, com o auxílio das tabelas de correlação, que mostram informações conhecidas sobre a absorção de diversos grupos funcionais, bem como a consulta de espectros encontrados na literatura, permite extrair informações estruturais da molécula. Em conjunto com outras técnicas como RMN, MS e UV, o IV auxilia na determinação estrutural da molécula (SILVERSTEIN, 2000; PAVIA et al., 2007).

No entanto, o IV possui uma limitação na identificação da presença de impurezas. Só é possível identificar uma impureza, quando esta estiver em concentrações muito elevadas, as bandas da substância majoritária encobrem as bandas das impurezas, não permitindo sua identificação (WATSON, 2005).

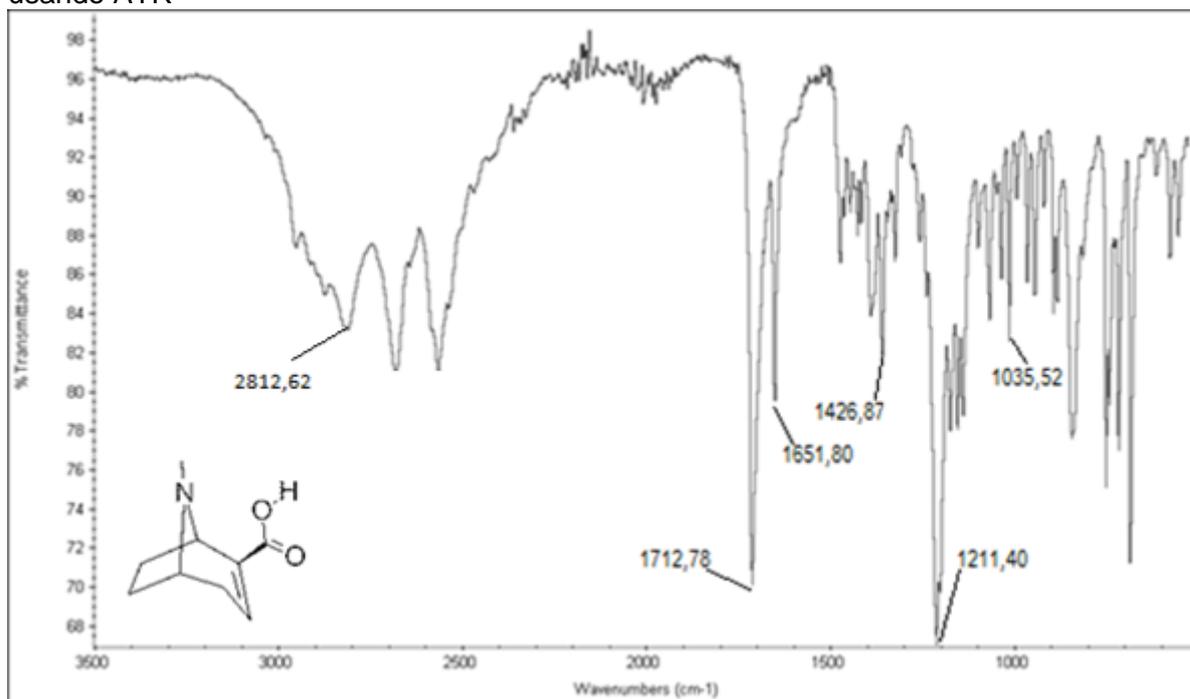
#### 4.12.8.1 Material e métodos

O espectro de absorção na região do IV foi obtido por análise direta usando refletância total atenuada (ATR) em espectrofotômetro Nicolet 380 FT-IR System. A faixa de varredura foi de 3500 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , realizando 16 scans.

#### 4.12.8.2 Resultados e discussão

Os espectros de infravermelho obtidos para a amostra de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina são apresentados nas Figuras 4.13, 4.14, 4.15 e 4.16, respectivamente. As Tabelas 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10 apresentam as principais bandas e suas respectivas atribuições para cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina.

**Figura 4.13** - Espectro de infravermelho da amostra de cloridrato de anidroecgonina obtido usando ATR

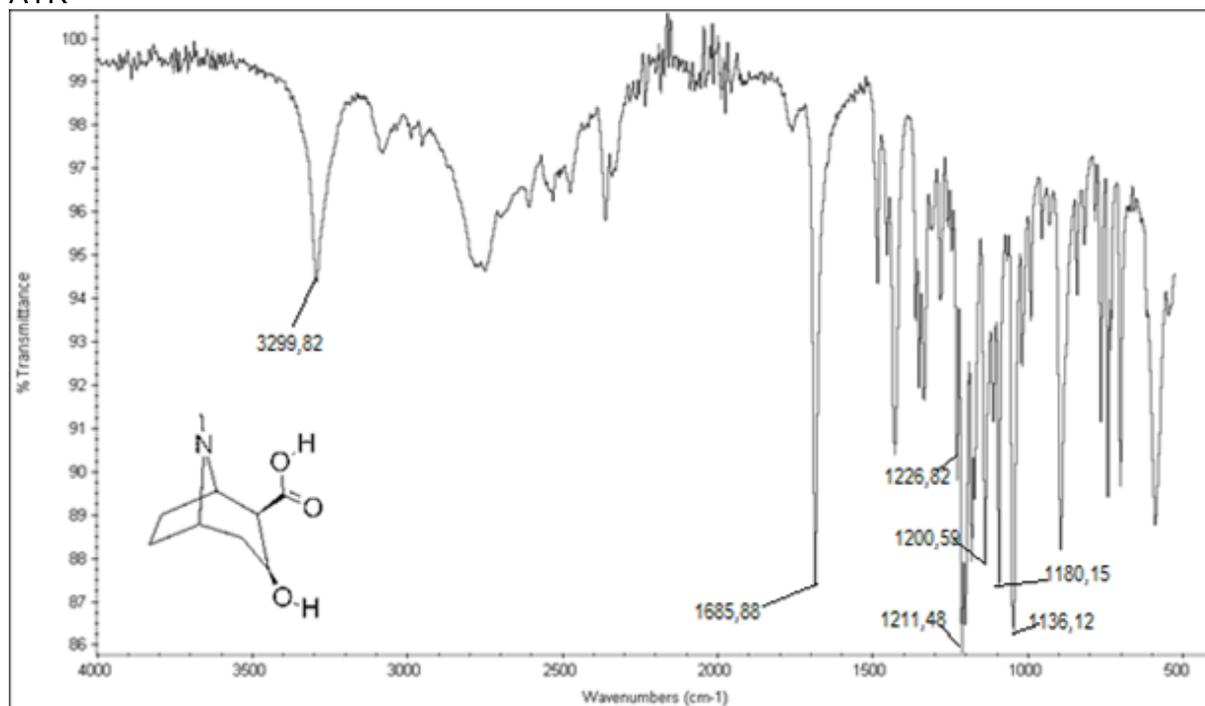


**Tabela 4.7** - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de cloridrato de anidroecgonina e suas atribuições

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
<b>2812</b>	Deformação axial do O – H
<b>1712</b>	Deformação axial de carbonila (C=O) de ácido carboxílico
<b>1211</b>	Deformação angular do C - O de ácido carboxílico
<b>1651</b>	Deformação axial C = C
<b>1426</b>	Deformação angular de O – H do ácido carboxílico
<b>1035</b>	Deformação axial C – N

Fonte: Silverstein & Webster, 2000; Pavia et al., 2007

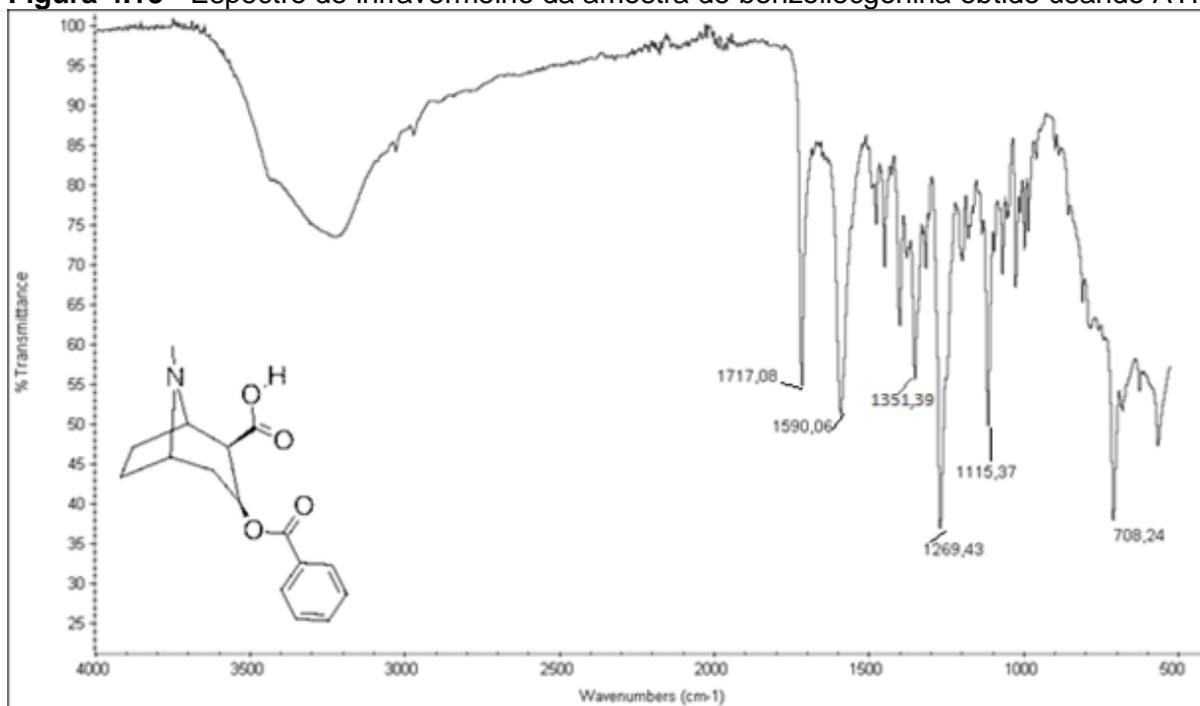
Não há relatos na literatura quanto ao espectro de IV do cloridrato de anidroecgonina. Porém, com o auxílio de tabelas de correlação foi possível identificar as possíveis bandas referentes aos principais grupamentos da molécula.

**Figura 4.14** - Espectro de infravermelho da amostra cloridrato de ecgonina obtido usando ATR**Tabela 4.8** - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de cloridrato de ecgonina e suas atribuições

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3299	Deformação axial do O – H
1685	Deformação axial de carbonila (C=O) de ácido carboxílico
1211	Deformação angular do C - O de ácido carboxílico
1200	Deformação axial de C – O do álcool
1226	Deformação angular de O – H
1136	Deformação axial C – N
1180	C – O álcool secundário

Fonte: Silverstein & Webster, 2000; Pavia et al., 2007

As principais bandas encontradas para a substância cloridrato de ecgonina conferem com as bandas relatadas na literatura (MOFFAT et al., 2004; UNODC, 2012). Além disso, é possível observar a ausência da banda de éster e a presença da banda característica de álcool.

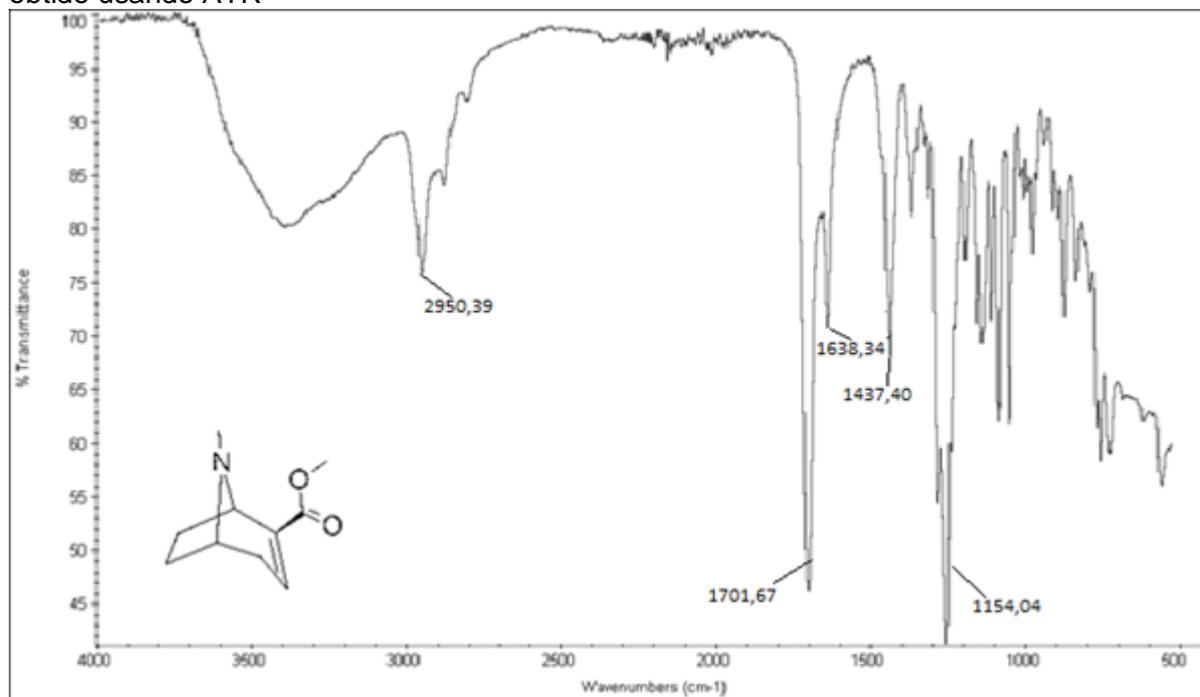
**Figura 4.15** - Espectro de infravermelho da amostra de benzoilecgonina obtido usando ATR**Tabela 4.9** - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de benzoilecgonina e suas atribuições.

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3450	Deformação axial de O – H (água)
1717	Deformação axial de carbonila (C=O) de ácido carboxílico
1590	Deformação axial de C = C do anel aromático
1351	Deformação axial do O – H de ácido carboxílico
1269	Deformação angular do C - O de ácido carboxílico
1115	Deformação axial de C – N
708	Deformação angular – anéis monossustituídos

Fonte: Silverstein & Webster, 2000; Pavia et al., 2007

As bandas principais encontradas para a substância benzoilecgonina conferem com as bandas relatadas na literatura (MOFFAT et al., 2004; UNODC, 2012; SIGMA-ALDRICH, 2001).

**Figura 4.16** - Espectro de infravermelho da amostra de éster metílico de anidroecgonina obtido usando ATR



**Tabela 4.10** - Frequências de absorção das bandas de IV principais para caracterização de éster metílico de anidroecgonina e suas atribuições.

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
2950	Deformação axial de C – H
1701	Deformação axial de carbonila (C=O) de éster
1638	Deformação axial de C = C
1154	Deformação axial de C-O
1115	Deformação axial de C – N

Fonte: Silverstein & Webster, 2000; Pavia et al., 2007

As principais bandas obtidas no espectro de IV para éster metílico de anidroecgonina conferem com as bandas relatadas na literatura (KLINE et al., 1990). É possível observar as bandas referentes à insaturação no anel tropânico, bem como a banda característica de éster. A banda larga presente próximo a 3400 cm<sup>-1</sup> refere-se a banda de água, uma vez que a substância é bastante higroscópica.

#### 4.12.9 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A RMN- $^1\text{H}$  é a técnica mais comumente usada devido à sua sensibilidade e à capacidade de fornecer grande quantidade de informações sobre a estrutura. A RMN- $^{13}\text{C}$  também é bastante usada, porém devido à baixa abundância do  $^{13}\text{C}$  a ressonância é relativamente baixa. Ambas serão usadas na caracterização das substâncias químicas de referência (WATSON, 2005; BREITMAEIR, 2002).

##### 4.12.9.1 Material e métodos

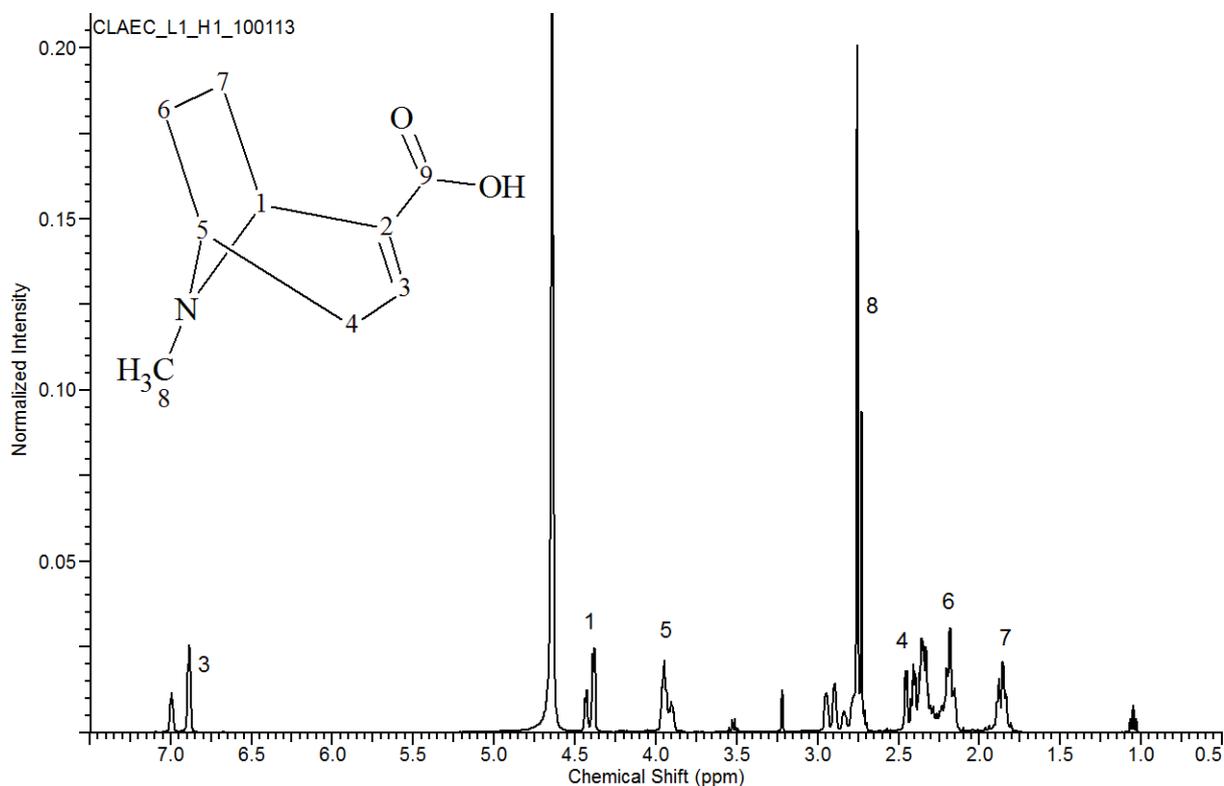
Para a realização dos ensaios, aproximadamente 25 mg das amostras, foram diluídos em 0,4 mL de solvente apropriado contendo tetrametilsilano (TMS) como agente de calibração e transferidos para tubos de vidro para RMN (0,5 cm x 18 cm). As análises foram realizadas em espectrômetro Varian 400MR com campo de 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 9,4 Tesla para  $^{13}\text{C}$ . As análises foram realizadas no Centro de Nanociência e Nanotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CNANO-UFRGS).

A água deuterada foi usada como solvente para o cloridrato de anidroecgonina e cloridrato de ecgonina. A benzoilecgonina e o éster metílico de anidroecgonina foram diluídos com metanol deuterado.

##### 4.12.9.2 Resultados e discussão

As Figuras de 4.17 a 4.24 apresentam os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina. Assim como as Tabelas de 4.11 a 4.18 apresentam os deslocamentos químicos e as atribuições para cada  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

**Figura 4.17** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cloridrato de anidroecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm

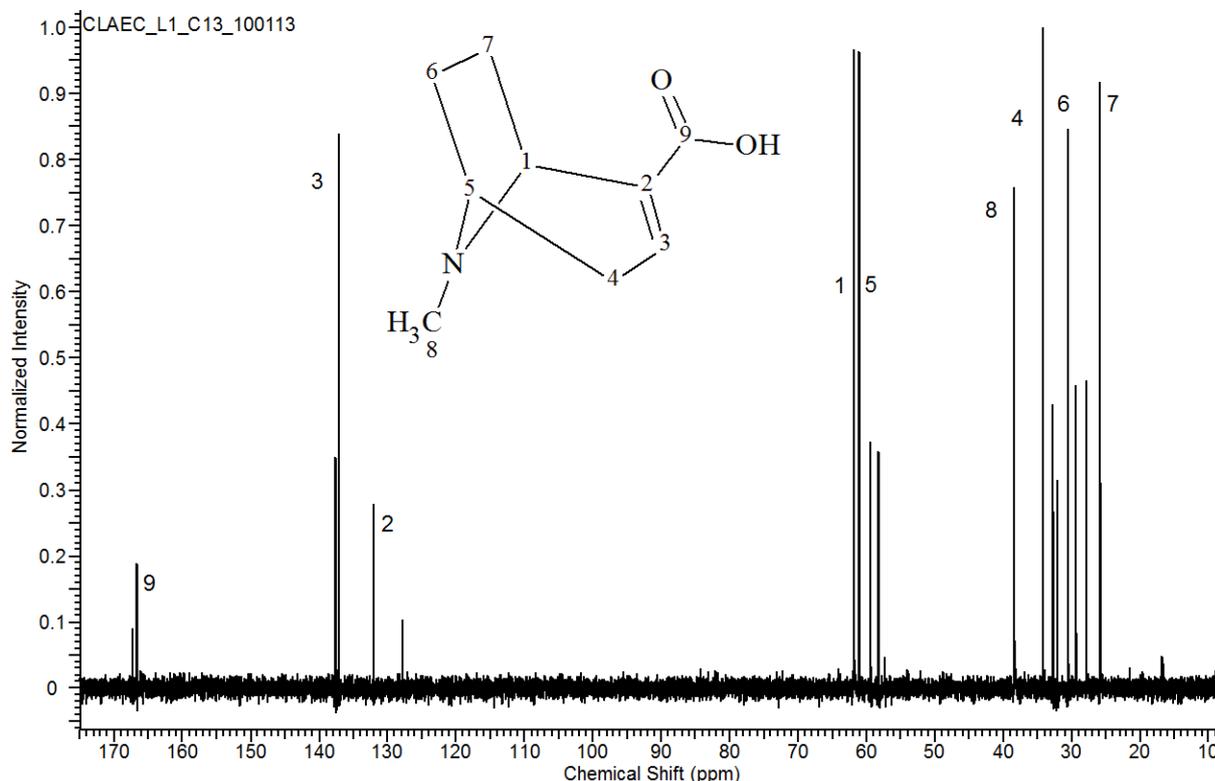


**Tabela 4.11** - Dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cloridrato de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz

Posição	Deslocamento	Nº Hidrogênios	Multiplicidade	Atribuição
3	6,90	1	d	H de CH = C
1	4,38	1	dd	H ligado a C-N
5	3,95	1	dd	H ligado a C-N
8	2,76	3	s	H de metila ligada a N
4	2,36	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH
6	2,21	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
7	1,89	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>

Fonte: Breitmaier, 2002; ACDLAB, 2013

**Figura 4.18** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de cloridrato de anidroecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm



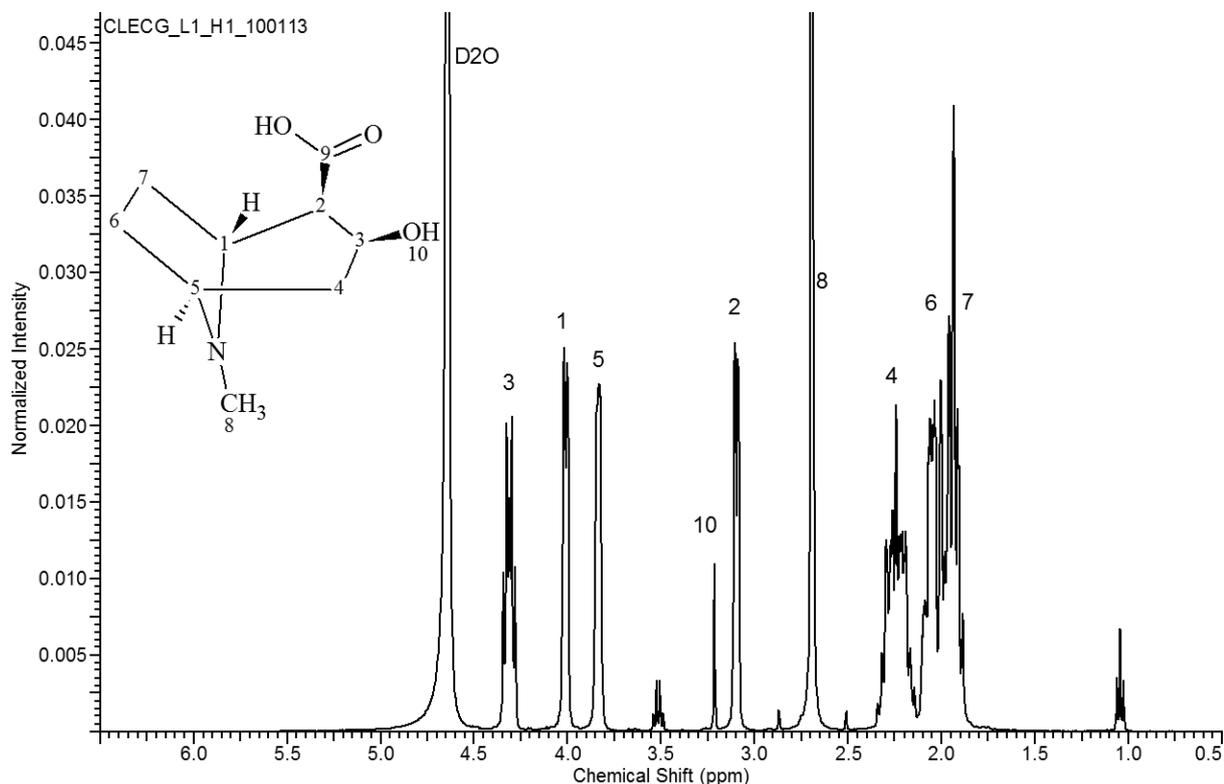
**Tabela 4.12** - Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de cloridrato de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 9,4 Tesla

Posição	Deslocamento	Atribuição
1	61,83	CH ligado a N
2	132,06	C ligado a COOH
3	137,59	HC = C
4	34,18	CH <sub>2</sub> ligado a C=C
5	59,42	CH ligado a N
6 e 7	30,57 e 25,87	CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub>
8	38,38	C de CH <sub>3</sub>
9	166,70	C de COOH

Fonte: Breitmaier, 2002; ACDLAB, 2013

Através da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  é possível caracterizar a molécula como sendo anidroecgonina. No entanto, ocorreu uma duplicação do número de carbonos no espectro de  $^{13}\text{C}$ . Isso pode ter ocorrido devido a formação, durante a síntese, das formas cis e trans na ligação dupla entre os carbonos 2 e 3. Os carbonos podem estar um pouco deslocados gerando sinais duplicados. Não foram encontrados na literatura os espectros para possíveis comparações.

**Figura 4.19** - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de cloridrato de ecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm

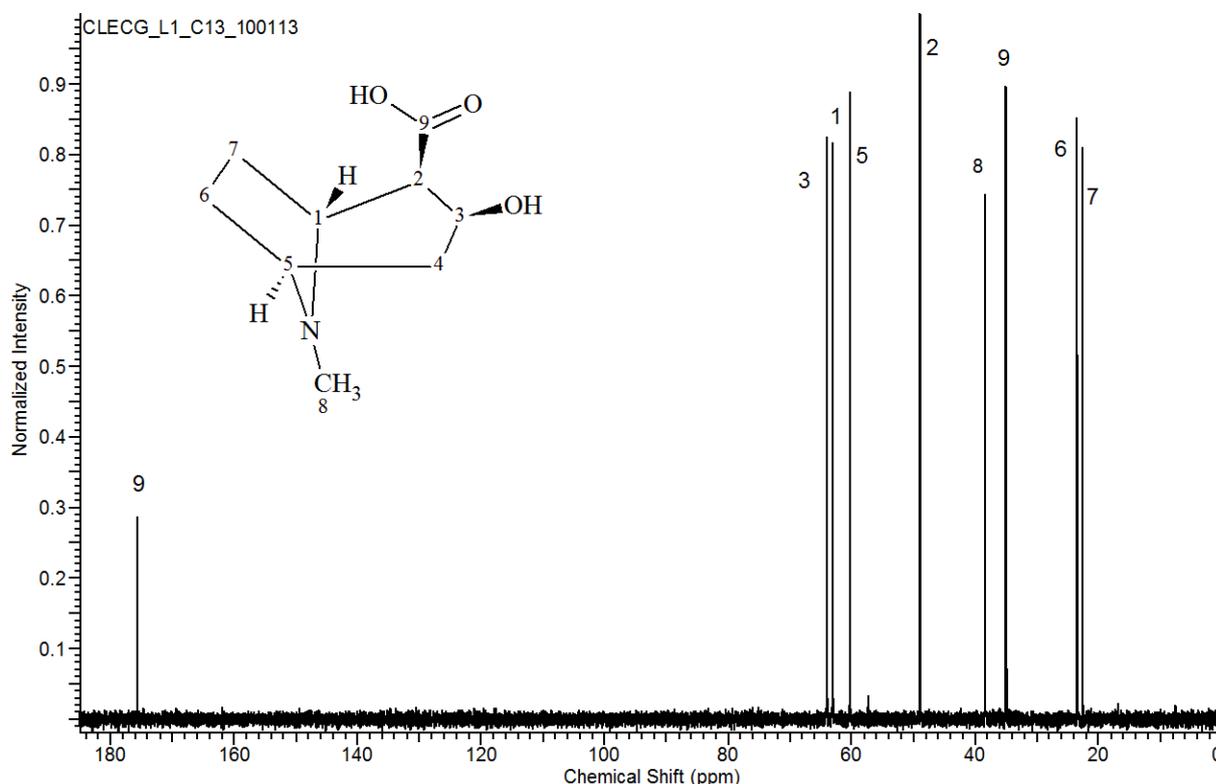


**Tabela 4.13** - Dados do espectro de RMN <sup>1</sup>H de cloridrato de ecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz

Posição	Deslocamento	N° Hidrogênios	Multiplicidade	Atribuição
3	4,31	1	m	H ligado a C-OH
1	4,02	1	dd	H ligado a C-N
5	3,85	1	dd	H ligado a C-N
10	3,21	1	s	H de OH
2	3,11	1	m	H ligado a CCOOH
8	2,59	3	s	H de metila ligada a N
4	2,25	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH
6	2,06	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
7	1,96	2	m	H de CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>

Fonte: Breitmaier, 2002; UNODC, 2012; ACDLAB, 2013

**Figura 4.20** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de cloridrato de ecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm



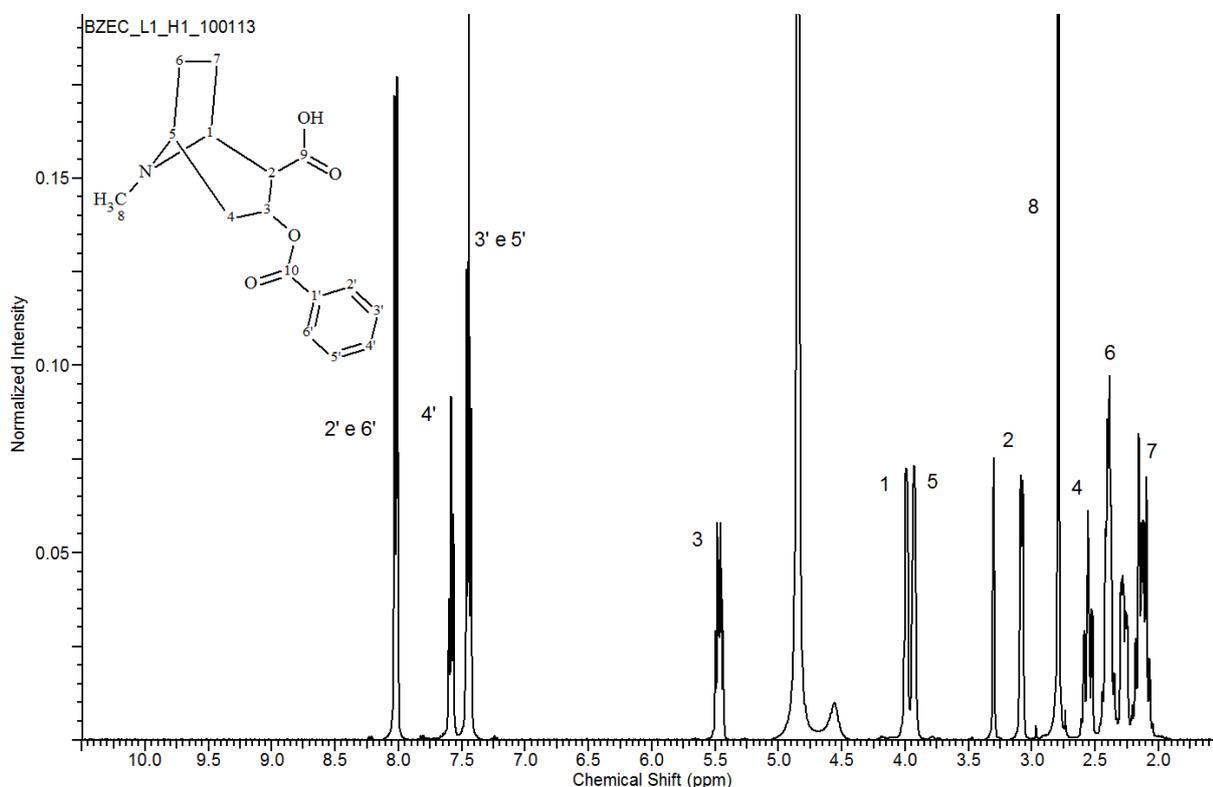
**Tabela 4.14** - Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de cloridrato de ecgonina utilizando espectrômetro de 9,4 Tesla

Posição	Deslocamento	Atribuição
1	63,08	CH ligado a N
2	48,95	CH ligado a COOH
3	64,05	CH ligado a OH
4	35,00	CH <sub>2</sub> ligado a CHO
5	60,28	CH ligado a N
6 e 7	23,50 e 22,69	CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub>
8	38,42	C de CH <sub>3</sub>
9	175,74	C de COOH

Fonte: Breitmaier, 2002; UNODC, 2012; ACDLAB, 2013

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a substância cloridrato de ecgonina estão de acordo com os espectros relatados na literatura (UNODC, 2012; AIRAKSINEN et al., 1999). No espectro de  $^1\text{H}$  é possível observar a ausência dos sinais de H aromáticos próximo a 7 ppm. Já no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  nota-se a ausência do sinal atribuído à metila do éster em 53 ppm.

**Figura 4.21** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de benzoilecgonina utilizando metanol- $\text{d}_4$  como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm

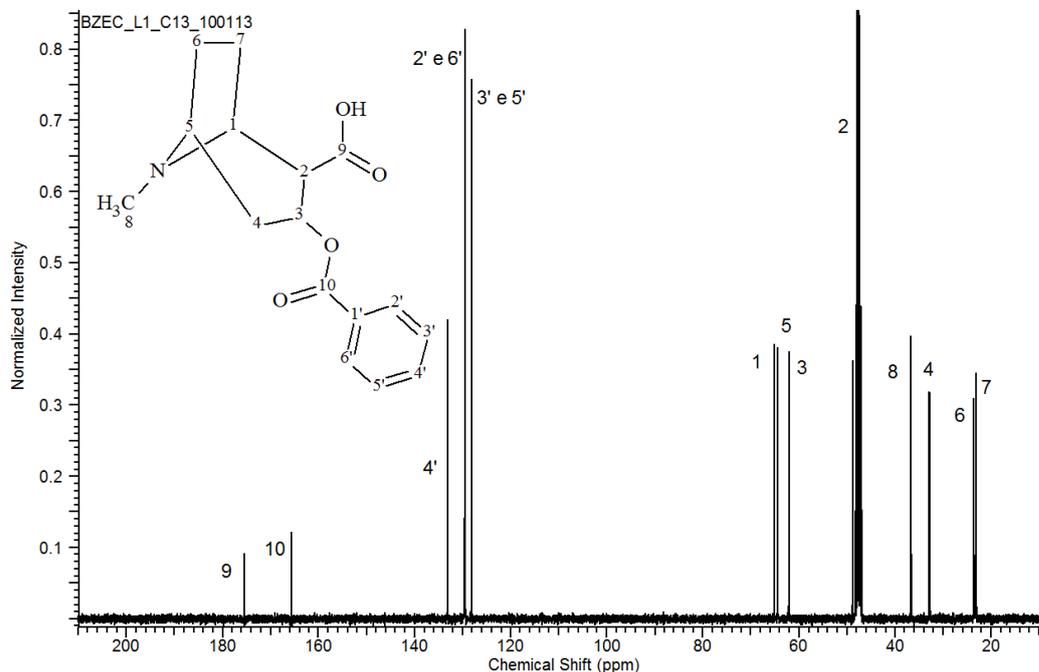


**Tabela 4.15** - Dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da benzoilecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS em espectrômetro de 400MHz

Posição	Deslocamento	Nº Hidrogênios	Multiplicidade	Atribuição
2' 6'	8,03	2	dd	H na posição orto do anel aromático
4'	7,60	1	t	H na posição para do anel aromático
3' 5'	7,46	2	dd	H na posição meta do anel aromático
3	5,48	1	m	H ligado a C-OCO
1	4,00	1	dd	H ligado a C-N
5	3,94	1	dd	H ligado a C-N
2	3,08	1	dd	H ligado a C-COO
8	2,79	3	s	H de metila ligada a N
4	2,56	1	m	H de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$
6	2,41	3	m	H de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$
7	2,29	2	m	H de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$

Fonte: Breitmaier, 2002; UNODC, 2012; ACDLAB, 2013

**Figura 4.22** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de benzoilecgonina utilizando água deuterada como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm



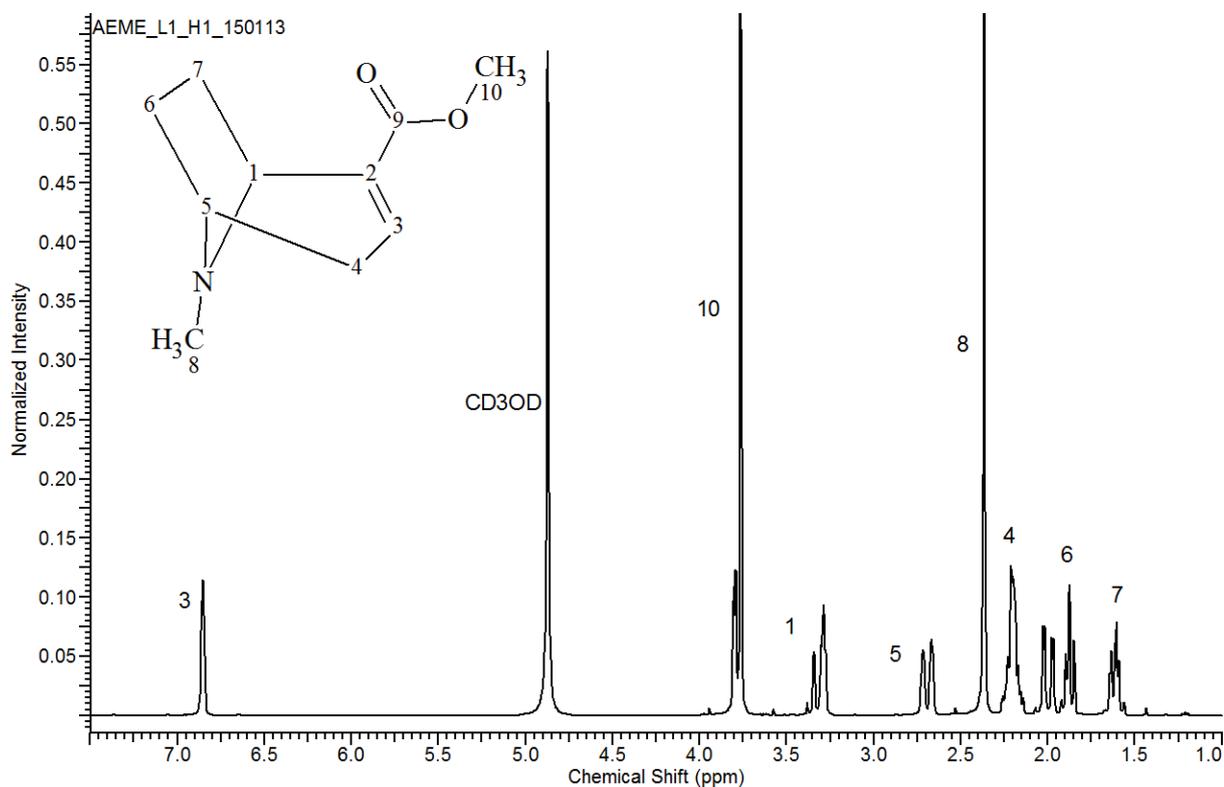
**Tabela 4.16** - Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da benzoilecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz

Posição	Deslocamento	Atribuição
1	64,39	CH ligado a N
2	48,04	CH ligado a COO
3	65,20	CH ligado a OCO
4	32,83	CH <sub>2</sub> ligado a COC=O
5	62,14	CH ligado a N
6 e 7	23,60 e 23,13	CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub>
8	36,72	CH <sub>3</sub> ligado ao N
9	175,46	C de COO
10	165,66	C de C=O
4'	129,73	CH de anel aromático ligado a C=O
2' 6'	129,42	CH de anel aromático em orto
3' 5'	128,06	CH de anel aromático em meta
4'	133,00	CH de anel aromático em para

Fonte: Breitmaier, 2002; UNODC, 2012; ACDLAB, 2013

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão de acordo com o descrito na literatura (UNODC, 2012). Além disso, é possível observar a ausência do sinal referente à  $\text{CH}_3$  do éster (53 ppm) presente no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da cocaína.

**Figura 4.23** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do éster metílico de anidroecgonina utilizando metanol- $d^4$  como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm

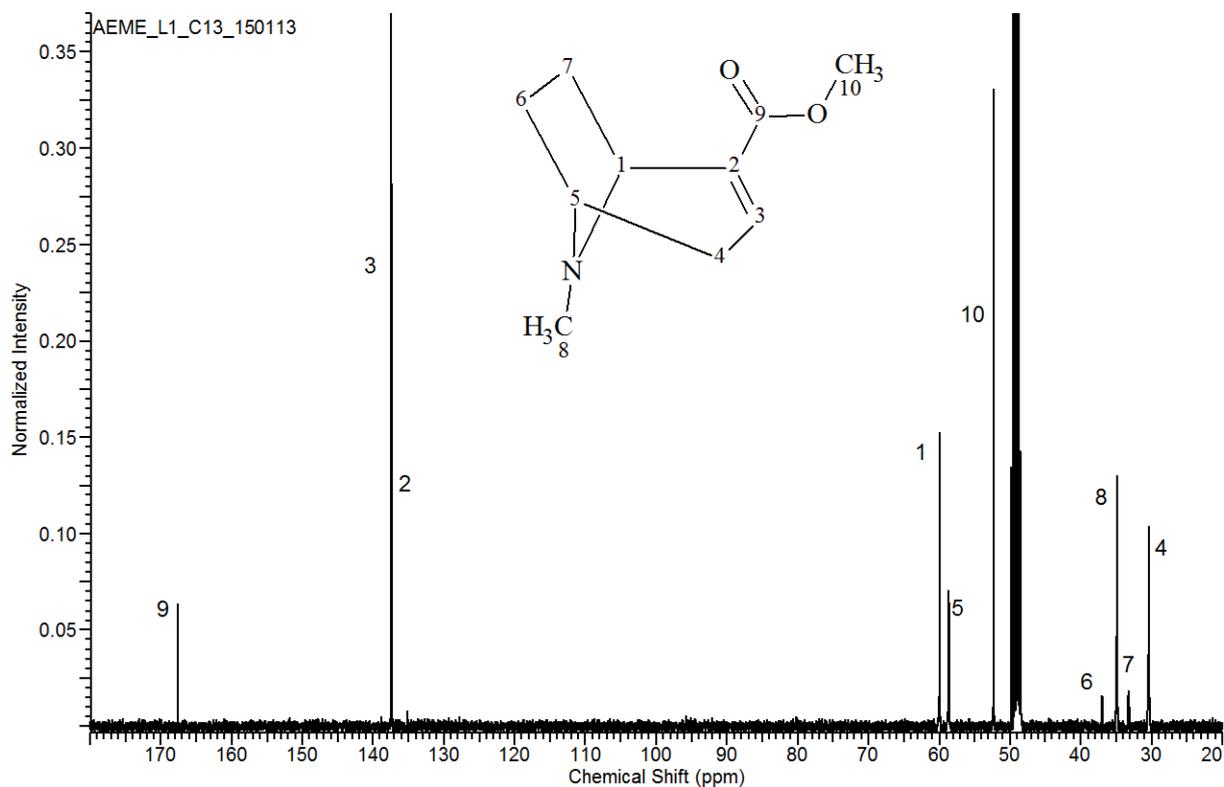


**Tabela 4.17** - Dados do espectro de RMN- $^1\text{H}$  de éster metílico de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 400MHz

Posição	Deslocamento	Nº Hidrogênios	Multiplicidade	Atribuição
3	6,86	1	d	H de $\text{CH} = \text{C}$
10	3,79	3	t	H de metila
1	2,78	1	dd	H ligado a C-N
5	2,72	1	dd	H ligado a C-N
8	2,36	3	s	H de metila ligada a N
4	2,17	2	m	H de $\text{CH}_2\text{-CH}$
6	1,90	2	m	H de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$
7	1,63	2	m	H de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$

Fonte: Breitmaier, 2002; ACDLAB, 2013

**Figura 4.24** - Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do éster metílico de anidroecgonina utilizando metanol- $\text{d}^4$  como solvente e TMS como referência de 0,0 ppm



**Tabela 4.18** - Dados do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do éster metílico de anidroecgonina utilizando espectrômetro de 9,4 Tesla

Posição	Deslocamento	Atribuição
1	60,02	CH ligado a N
2	135,13	C ligado a C=O
3	137,41	HC = C
4	33,23	CH <sub>2</sub> ligado a C=C
5	58,71	CH ligado a N
6 e 7	34,91 e 36,88	CH <sub>2</sub> – CH <sub>2</sub>
8	34,88	C de CH <sub>3</sub>
9	167,70	C=O do éster

Fonte: Breitmaier, 2002; ACDLAB, 2013

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a molécula de éster metílico de anidroecgonina estão de acordo com o descrito na literatura (ZHENG e MULHOLLAND, 1996). É possível observar no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a presença da metila do éster, além dos sinais correspondentes à dupla ligação.

#### **4.12.10 Balanço de massas por CLAE-UV e CLAE-CAD**

Balanço de massas é um método bastante exato para a determinação de impurezas e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO), Farmacopeia Internacional e Farmacopeia Europeia para estabelecimento de substâncias de referência (MA et al., 2009). Sendo assim, com a determinação de pureza através da técnica de balanço de massas, não há a necessidade de conduzir ensaios de doseamento com a utilização de padrões. Além disso, a incerteza analítica embutida na técnica é menor que no método tradicional de determinação de pureza através de doseamento (MA et al., 2009; LIU et al., 2007; GOROG, 2005).

##### 4.12.10.1 Material e métodos

Para as porcentagens de impurezas voláteis foram usados o resultados obtidos na perda por dessecação, descrito no item 4.12.5. As porcentagens de impurezas inorgânicas foram obtidas nos ensaios de determinação de cinzas sulfatadas descrito no item 4.12.5.1.

As determinações de impurezas orgânicas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de ultravioleta e aerossol carregado (CLAE-UV-CAD), em cromatógrafo SHIMADZU equipado com bomba LC-20AT, degaseificador DGU-14A, termostatizador para coluna CTO-10A, detectores de UV, SPD-10A, e Corona CAD com coluna Kinetex HILIC (150mm x 4,6 mm, 2,6 µm). O método utilizado foi em modo isocrático com proporção de fase móvel de 75% de acetonitrila e 25% de acetato de amônio 10 mM, pH 6,3 ajustado com ácido acético. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min, com temperatura do forno de 30 °C. Foram realizadas injeções de 20 µL de uma solução de 1 mg/mL da amostra diluída em acetonitrila e água (4:1). As condições cromatográficas e detalhes do método serão descritas no capítulo 4.

A pureza da amostra foi calculada usando a equação 4.4.

$$\begin{aligned} \% \text{ Teor} &= 100 - \sum \% \text{ impurezas} \\ &= 100 - \% \text{ Impurezas Voláteis} - \% \text{ Impurezas Inorgânicas} - \% \text{ Impurezas} \\ &\text{Orgânicas} \end{aligned}$$

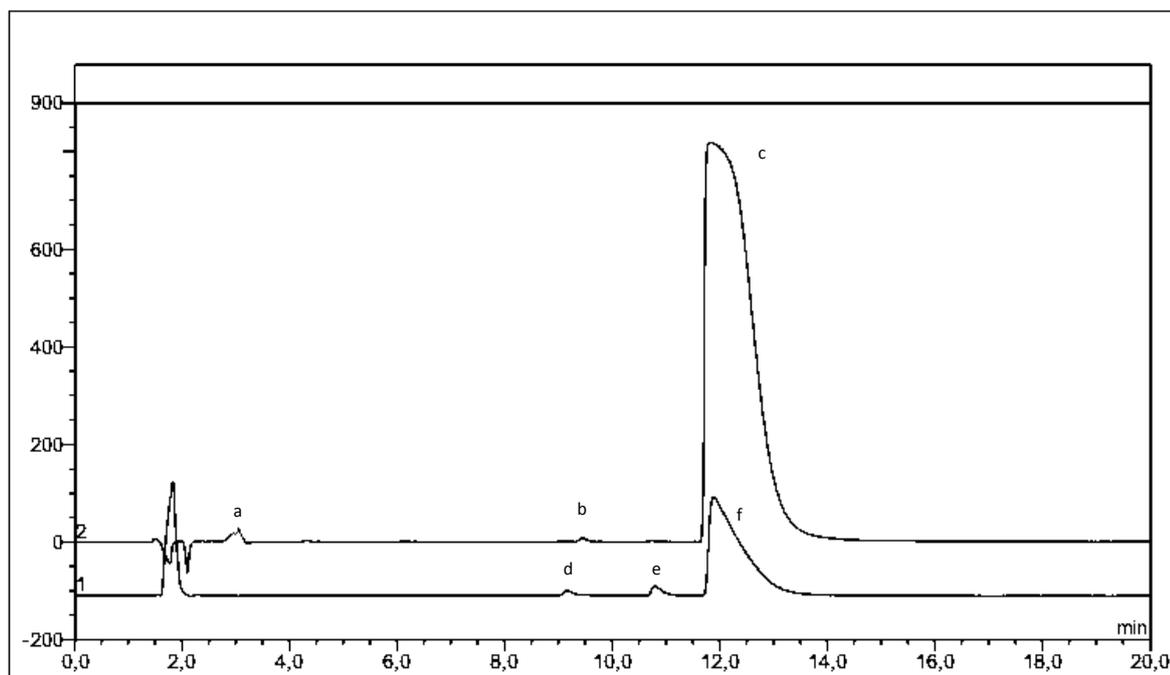
#### Equação 4.4

O somatório das impurezas orgânicas foi realizado levando em conta os picos de impurezas presentes em ambos detectores. Quando uma determinada impureza estava presente nos cromatogramas dos dois detectores, o pico do cromatograma do detector com maior área era usado na realização dos cálculos.

#### 4.12.10.2 Resultados e discussão

O cromatograma obtido para a substância cloridrato de anidroecgonina por CLAE-UV e CLAE-CAD é apresentado na Figura 4.25, onde é possível observar a presença de duas impurezas não identificadas usando o detector UV, para o detector CAD observam-se também duas impurezas presentes. Para o cálculo das impurezas orgânicas foi utilizada a relação de áreas de 1:1, assumindo que a intensidade dos sinais eram as mesmas do analito principal. Os valores obtidos para as porcentagens de impurezas inorgânicas e voláteis juntamente com as porcentagens de impurezas orgânicas são apresentados na Tabela 4.19.

**Figura 4.25** - Cromatograma obtido para cloridrato de anidroecgonina por CLAE- CAD (1) e CLAE- UV (2) usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetoneitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20  $\mu$ L, em 200 nm, mostrando impurezas por UV (a,b) e por CAD (d,e) e o pico do cloridrato de anidroecgonina por UV (c) e CAD (f)



**Tabela 4.19** - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de cloridrato de anidroecgonina

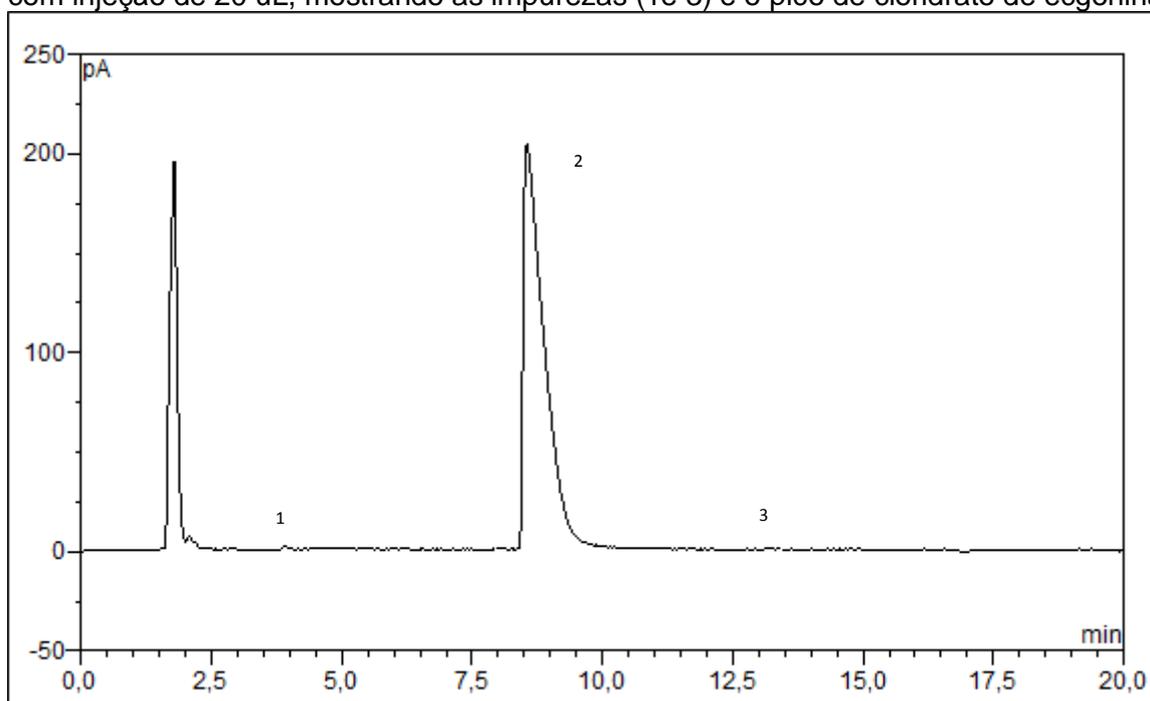
Impurezas	%
Impurezas orgânicas por CLAE-UV (200 nm)	1,08
Impurezas orgânicas por CLAE-CAD	3,04
Impurezas inorgânicas	0,0023
Impurezas voláteis	0,095

O teor de pureza obtido para a substância cloridrato de anidroecgonina por CLAE-UV foi de 98,8%, enquanto que por CLAE-CAD o teor foi de 96,8%. A diferença observada entre os dois detectores se deve ao princípio de detecção de cada método. Considerando as impurezas presentes nos dois métodos, a soma das porcentagens, pelo método que produziu o maior sinal, é 3,98 para as impurezas orgânicas, sendo este somado com as impurezas voláteis e inorgânicas, o teor real atribuído ao cloridrato de anidroecgonina foi de 95,9% (em relação à substância anidra). O cloridrato de anidroecgonina pode ser considerado uma SQR.

As análises da porcentagem de impurezas orgânicas para a substância cloridrato de ecgonina foram conduzidas apenas por CLAE-CAD uma vez que a

ecgonina não tem absorção na região do ultravioleta, pois não possui grupamentos cromóforos, porém é uma molécula pouco volátil, característica desejável para a análise por CLAE-CAD. Na Figura 4.26 é apresentado o cromatograma obtido para a substância cloridrato de ecgonina por CLAE-CAD. A Tabela 4.20 apresenta os valores obtidos para as porcentagens de impurezas inorgânicas e voláteis juntamente com as porcentagens de impurezas orgânicas.

**Figura 4.26** - Cromatograma obtido para cloridrato de ecgonina por CLAE-CAD usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20  $\mu$ L, mostrando as impurezas (1 e 3) e o pico de cloridrato de ecgonina (2)



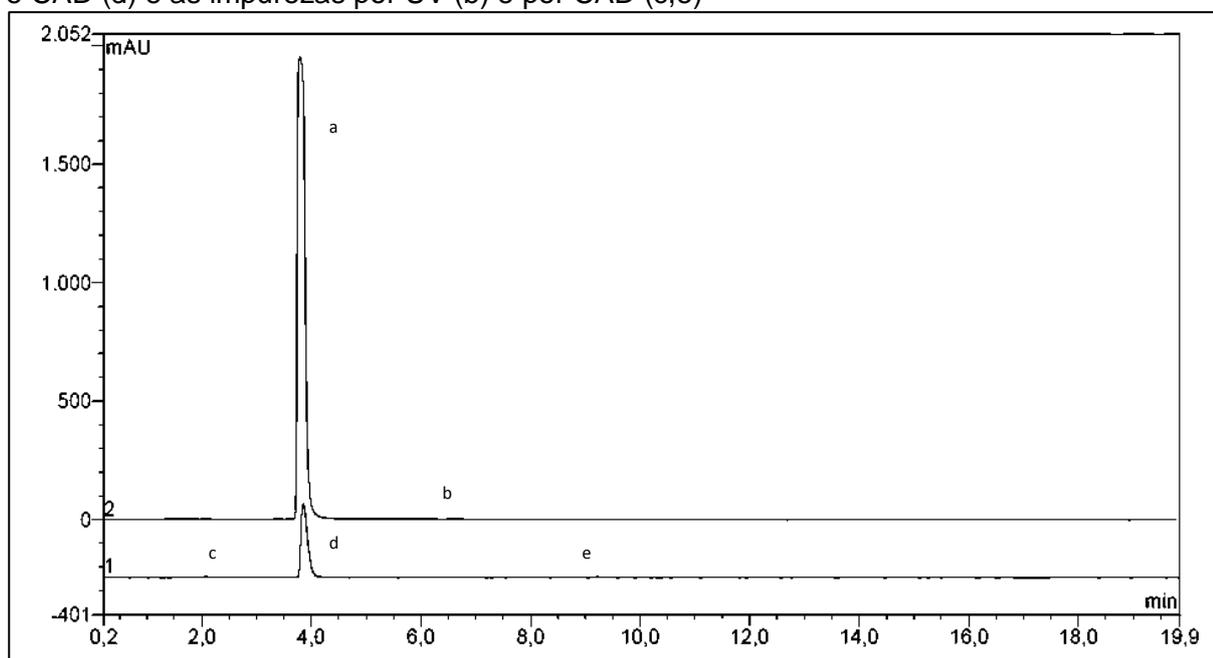
**Tabela 4.20** - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de cloridrato de ecgonina

Impurezas	%
Impurezas orgânicas por CLAE-CAD	0,45
Impurezas inorgânicas	0,014
Impurezas voláteis	0,082

O teor de pureza obtido para a substância cloridrato de ecgonina por CLAE-CAD foi de 99,4%, em relação à substância anidra. Após a caracterização através da identificação e determinação de pureza da substância cloridrato de ecgonina a substância pode ser considerada SQR.

A substância benzoilecgonina foi analisada por CLAE-UV e CLAE-CAD e os cromatogramas são apresentados na Figura 4.27, onde é possível observar a presença de uma impureza não identificada usando o detector UV, para o detector CAD observam-se, duas impurezas presentes. Os valores obtidos para as porcentagens de impurezas inorgânicas e voláteis juntamente com as porcentagens de impurezas orgânicas são apresentados na Tabela 4.21.

**Figura 4.27** - Cromatograma obtido para benzoilecgonina por CLAE-CAD (1) e CLAE-UV (2) usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20  $\mu$ L, em 200 nm, mostrando o pico de benzoilecgonina por UV (a) e CAD (d) e as impurezas por UV (b) e por CAD (c,e)



**Tabela 4.21** - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de benzoilecgonina tetraidratada

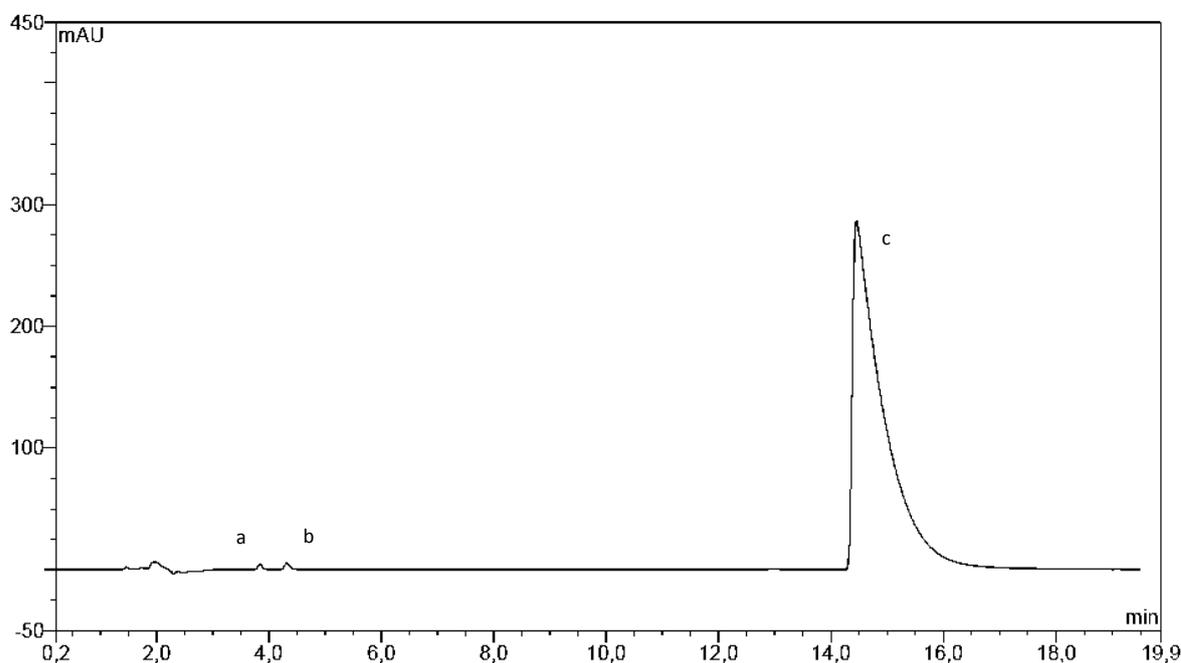
Impurezas	%
Impurezas orgânicas por CLAE-UV (200 nm)	0,43
Impurezas orgânicas por CLAE-CAD	0,93
Impurezas inorgânicas	0,090
Impurezas voláteis	18,61

O teor de pureza da substância benzoilecgonina tetraidratada foi de 99,5% para CLAE-UV e 98,9% para CLAE-CAD, em relação à base anidra. Considerando as diferentes impurezas presentes nos dois métodos, o teor real atribuído a benzoilecgonina é de 98,5%, sem considerar o teor de água presente, ou seja, em

relação à substância anidra (79,9% tal qual). A benzoilecgonina foi caracterizada através de ensaios de identificação e pureza podendo ser considerada SQR.

A análise da porcentagem de impurezas orgânicas para a substância éster metílico de anidroecgonina foi conduzida apenas por CLAE-UV. A análise não foi possível por CLAE-CAD devido à alta volatilidade da substância. Porém, a molécula possui um grupamento cromóforo, um éster conjugado com a liga dupla do anel tropânico absorvendo na região do ultravioleta, permitindo a utilização de CLAE-UV. Na Figura 4.28 é apresentado o cromatograma obtido para a substância éster metílico de anidroecgonina por CLAE-UV. A Tabela 4.22 apresenta os valores obtidos para as porcentagens de impurezas inorgânicas e voláteis juntamente com as porcentagens de impurezas orgânicas.

**Figura 4.28** - Cromatograma obtido para éster metílico de anidroecgonina por CLAE-UV usando coluna KINETEX HILIC e fase móvel acetonitrila: acetato de amônio 10 mM (75:25), pH 6,3, com injeção de 20  $\mu$ L, em 200 nm, mostrando os picos de impurezas (a, b) e o pico do éster metílico de anidroecgonina (c)



**Tabela 4.22** - Porcentagem de impurezas encontradas na amostra de éster metílico de anidroecgonina

Impurezas	%
Impurezas orgânicas por CLAE-UV (200 nm)	0,67
Impurezas inorgânicas	0,0018
Impurezas voláteis	--

O teor de pureza obtido para amostra de éster metílico de anidroecgonina foi de 99,3%, tal qual. O éster metílico de anidroecgonina apresenta-se na forma de um óleo viscoso volátil, sendo assim, o ensaio para impurezas voláteis não foi realizado. A substância foi caracterizada por ensaios de identificação e impureza, podendo ser considerada uma SQR.

#### **4.13 Substâncias Químicas de Referência**

As quatro substâncias foram caracterizadas usando métodos de identificação e análises de pureza. Sendo assim, é possível afirmar que o cloridrato de anidroecgonina, o cloridrato de ecgonina, a benzoilecgonina e o éster metílico de anidroecgonina apresentam pureza adequada para serem usadas como SQR em laboratórios forenses e de pesquisa, assim como a substância cloridrato de cocaína descrita anteriormente. Um estudo interlaboratorial será realizado utilizando as mesmas condições de análise e os mesmos métodos para a confirmação dos teores obtidos.

As substâncias serão envasadas em frascos de vidro âmbar contendo cada um 50 mg e serão armazenadas em frascos rotulados contendo nome químico, teor, cuidados a serem tomados com a substância e código de barras para assegurar a rastreabilidade.

O controle de estabilidade das substâncias será realizado após 6, 12 e 24 meses de armazenamento em diferentes condições de armazenagem, como em dessecador à temperatura ambiente, em geladeira, em freezer e à temperatura ambiente fora do dessecador.

Os testes interlaboratoriais e de estabilidade para as quatro substâncias descritas não serão contemplados neste trabalho em virtude dos prazos para a elaboração desta pesquisa.

#### 4.14 Conclusão

- Os métodos usados para a síntese de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina a partir do cloridrato de cocaína foram adequados;
- As purificações realizadas para cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, éster metílico de anidroecgonina e benzoilecgonina permitiram a obtenção de produtos de alta pureza;
- Os ensaios de identificação usados na caracterização do cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico de anidroecgonina forneceram informações úteis na determinação das substâncias de referência;
- Os ensaios de pureza determinaram a quantidade de impurezas orgânicas, inorgânicas e voláteis presentes nas amostras de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina tetraidratada, assim como impurezas orgânicas e inorgânicas para o éster metílico de anidroecgonina.
- A pureza determinada para cloridrato de anidroecgonina foi de 95,9%, para cloridrato de ecgonina foi 99,5%, para benzoilecgonina tetraidratada foi 98,5% e para éster metílico de anidroecgonina foi de 99,3%.

#### 4.15 Referências

ACDLAB. I-Lab - Advanced Chemistry Development v12.1.0.33936. Canada, 2013. Software gratuito.

AIRAKSINEN, A. J. et al. Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Orbital Study of Some Cocaine Analogues. v. 55, p. 10537-10546, 1999.

BILLINGS, K. E. Development of a Simple Method to Detect and Quantify Benzoyllecgonine , a Cocaine Metabolite , in Urine. **Honors Projects**, Illinois Wesleyan University, 2003.

BOUDREAU, D. K.; CASALE, J. F. An In-Depth Study of the Peruvian Base Llavada (“Washed Base”) Technique for Purification of Crude Cocaine Base. **Microgram Journal**, v. 6, n. 3-4, p. 72-76, 2008.

VAN BOCXLAER, J. F. CLAUWAERT, K. M.; LAMBERT, W. E.; DEFORCE, D. L.; VAN DEN EECKHOUT, E. G.; DE LEENHEER, A. P. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. **Mass spectrometry reviews**, v. 19, n. 4, p. 165-214, 2000.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5. Ed., Brasília: ANVISA, 2010, 546 p.

BREITMAIER, E. **Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide**. 3.ed., Chichester: Wiley, 2002, 257 p.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London : The Stationery Office BP Comission, 2011. 4 v. : il., 824 p.

BRUCKNER , R. **Advanced Organic Chemistry: Reactions mechanisms**. San Diego: Hartcourt Academic Press, 2002, 636 p.

CASALE, J. F.; WAGGONER, R. W. A Chromatographic Impurity Signature Profile Analysis for Cocaine Using Capillary Gas Chromatography. **Journal of Forensic Sciences, JFSCA**, v. 36, n. 5, p. 1312 -1330, set., 1991.

CLAS, S.; DALTON, C.; HANCOCK, B. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 2, n. 8, p. 311-320, ago. 1999.

DAVIES, H. M. L.; SAIKALI, E.; YOUNG, W. B. Synthesis of (A)-Ferruginine and (f)-Anhydroecgonine Methyl Ester by a Tandem Cyclopropanation/Cope Rearrangement. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 5696-5700, mai 1991.

DE JONG, A. W. K. Some properties of the ecgonines and their esters I. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 56, n. 2, p. 186–197, 1937. (abstract)

FINDLAY, S. P. The Three-dimensional Structure of the Cocaines. Part I. Cocaine and Pseudococaine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 11, p. 2855 - 2862, 1954.

HENRY, T.A., **The Plant Alkaloids**. 4.ed. Toronto: The Blakiston Company, 1949, 804 p.

LIU, S.; HU, C. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative. **Analytica Chimica ACTA**, v. 2, p. 114-121, 2007.

LUKASZEWSKI, T.; JEFFERY, W. K. Artifacts of Illicit Impurities and and Artifacts Illicit Cocaine Cocaine Impurities. **Journal of Forensic Sciences, JFSCA**, v. 25, n. 3, p. 499 - 507, 1980.

MA, K.; WANG, H.; ZHAO, M.; XING, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method , high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, p. 227-233, 2009.

MATCHETT, J. R.; LEVIN, J. Isolation of Ecgonidine Methyl Ester from Coca Seeds'. **Journal of American Chemical Society**, v. 63, n. 9, p. 2444 - 2446, set., 1941.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, D. M.; WIDDOP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons:** in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material\_3.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 2v.

MULLIN, J. W. **Cristalization**. 4. Ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001. 594p.

NORMAN, R. O.C.; COXON, J. M. **Principles of Organic Synthesis**. 3. ed. Florida: CRC Press 2000, 811p.

PAUL, B. D.; MCWHORTER, L. K.; SMITH, M. L. Electron Ionization Mass Fragmentometric Detection of Urinary Ecgonidine , a Hydrolytic Product of Methylecgonidine , as an Indicator of Smoking Cocaine †. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, p. 651-660, 1999.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; ENGEL, R.G. **Introduction to Organic Laboratory Techniques:** A microscale approach. 4. Ed. Belmont: Thomson 2007, 990 p.

REINHARD B. **Organic Mechanisms:** Reactions, Stereochemistry and Synthesis. 3. Ed. Berlin: Springer, 2010. 855 p.

SIGMA-ALDRICH.COM Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=benzoylecgonine&lang=pt&region=BR&focus=product&N=0+220003048+219853075+219853286>. Acesso em 14 jun. 2012

UNODOC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine Heroin and Cocaine:** Manual for use by national drug testing laboratories. New York: United Nations Publication, 2005. 81p.

UNODOC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials**. Vienna: 2012.

UNODOC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Coca paste - Residues from the industrial extraction of cocaine Ecgonine and anhydroecgonine**. Viena, 1965.

VAN BOCXLAER, J. F.; Clauwaert K. M.; Lambert, W.E.; Deforce, D.L.; Van den Eeckhout, E. G.; De Leenheer, A.P. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. **Mass spectrometry reviews**, v. 19, n. 4, p. 165-214, 2000.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis:** a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. London: Churchill Livingstone, 2005. 382 p.

ZHANG, C.; LOMENZO, S.A.; BALLAY II, C.J.; TRUDELL, M. L. An Improved Synthesis of (+) – 2 – Tropinone. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7888 – 7889, jun. 1997.

ZHENG, Q. H.; MULHOLLAND, G. K. Improved synthesis of beta-CIT and [11C]beta-CIT labeled at nitrogen or oxygen positions. **Nuclear medicine and biology**, v. 23, n. 8, p. 981-6, nov. 1996.

ZIRKLE, C. L.; GEISSMAX, T.A.; BLOOM, M.; CRAIG, P.N.; GERNES, F.R.; IXDIK, Z. K.; PAVLOFF, A. M. 3- Substituted Tropane Derivatives. I. The Synthesis and Stereochemistry of the Tropane-3-carboxylic Acids and Their Esters. A Comparison of Positional Isomers in the Tropane Series. **Journal of American Chemical Society**, v. 11, p. 1269 – 1279, abr, 1962.

---

**5 CAPÍTULO 3 –**

**Determinação de cocaína, seus metabólitos, produtos de pirólise  
por CL-EM usando abordagem quimiométrica**

---



## 5.1 Introdução

A cromatografia líquida acoplada a detector de massas (CL-EM) é uma ferramenta importante na detecção e quantificação de diversas substâncias, incluindo as substâncias de interesse toxicológico e forense, devido à sua alta sensibilidade e seletividade. O uso do CL-EM na toxicologia vem crescendo nos últimos anos, para suprir alguns problemas encontrados no uso da cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM), como a necessidade de derivatização de moléculas não voláteis e a degradação de algumas substâncias, como a cocaína, pela alta temperatura do injetor do cromatógrafo gasoso (VAN BOCXLAER et al., 2000;).

Em vista da necessidade de um método validado para avaliar as substâncias sintetizadas neste trabalho, foi realizado o desenvolvimento de método analítico por CL-EM para a determinação da cocaína e seus principais metabólitos e produtos de pirólise, além da determinação do levamisol, um contaminante presente na cocaína empregada como produto de partida nas sínteses realizadas neste trabalho.

Para o desenvolvimento do método, foi empregada a abordagem quimiométrica, uma ferramenta muito útil que fornece informações importantes para a escolha correta dos melhores parâmetros a serem utilizados na validação do método analítico.



**Determination of cocaine, its metabolites and pyrolytic products by  
LC-MS using a chemometric approach**

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy,  
Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil

✉ Corresponding author. Phone/fax: + 55(51)3308-5313

E-mail address: [andreagp.far@gmail.com](mailto:andreagp.far@gmail.com)

**Abstract**

A method to assay cocaine (COC), its metabolites benzoylecgonine (BZE), ecgonine (ECG), ecgonine methyl ester (EME), benzoylecgonine (BNE), pyrolytic products anhydroecgonine (AEC) and anhydroecgonine methyl ester (AEME) and adulterant levamisole (LEV) was developed and validated by LC-MS using a chemometric approach including a two-level factorial design in the screening step and face-centered central composite design (FCCCD) to achieve the optimization. The method was carried out on positive electro spray ionization (ESI<sup>+</sup>) with a flow of 1 mL.min<sup>-1</sup> in isocratic mode consisting of 53% methanol and 47% ammonium acetate 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 6.3. The chromatographic separation was obtained with a Phenomenex Luna C18(2) column (250 mm x 4.6 mm, particle size 5 µm), with the temperature set at 31 °C. Validation parameters such as selectivity, linearity, precision and accuracy were evaluated. The method was linear over the concentration range of 1-100 ng.mL<sup>-1</sup> for COC, AEME, EME, LEV, BZE and ECG and 5-100 ng.mL<sup>-1</sup> for AEC and BNE. The method was successfully applied to identify and quantify the analytes.

**Key words:** Cocaine, metabolites, pyrolytic products, LC-MS, chemometric approach

---

**6 CAPÍTULO 4 –**

**Desenvolvimento e validação de método para determinação de cocaína, seus principais metabólitos e produtos de pirólise por CLAE-UV e CLAE-CAD**

---



## 6.1 Introdução

Os detectores universais como detector de aerossol carregado (CAD) e o detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD) são amplamente utilizados na análise de compostos que não possuem absorção na região ultravioleta. Como alguns metabólitos ou produtos de degradação da cocaína não possuem grupamentos cromóforos, não são capazes de serem detectados por UV, porém talvez sejam detectados utilizando CAD.

A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) é uma alternativa na separação de compostos pequenos e muito polares, utilizando para tanto uma fase estacionária polar com fase móvel usada na cromatografia em fase-reversa. A técnica é propícia para solucionar o problema de separação e retenção dos metabólitos da cocaína que são moléculas muito polares (GHEORGHE et al., 2008; JIA et al., 2011).

Embora já existam trabalhos publicados usando HILIC na separação de metabólitos da cocaína (BISCEGLIA et al., 2010; GHEORGHE et al., 2008), não existem relatos do uso da técnica HILIC acoplada a detector CAD e UV para determinação dos metabólitos da cocaína.



**Desenvolvimento e validação de método para determinação de cocaína, seus principais metabólitos e produtos de pirólise por CLAE-UV -CAD**

*Pós-graduanda em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre-RS, Brasil*

✉ Corresponding author. Phone/fax: + 55 (51).3308-5313

*E-mail address:* andreagp.far@gmail.com

**Abstract**

A versatile mode of liquid chromatography, the hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), was done to determine cocaine (COC), its main degradation products, benzoylecgonine (BZE) and ecgonine (ECG), main pyrolytic products, anhydroecgonine (AEC) and ester methilanhdroecgonine (AEME), and a frequent contaminant of cocaine, levamisole (LEV). The detection of all compounds was achieved using two detectors: charged aerosol detector (CAD) and ultraviolet detector (UV), connected in series. No method was related using HILIC coupled to CAD and UV to determine the related compounds. The HILIC method was carried out with a Phenomenex Kinetex HILIC (150mm x 4,6 mm I.D.; 2,6  $\mu$ m) column with the mobile-phase acetonitrile: 10 mM ammonium acetate pH 6,3 (75:25 v/v) with a flow rate 0.8 mL/min and oven temperature set at 30 °C. CAD detection was performed using a nitrogen pressure of 35 psi, range of 100 pA and the UV detection at 200 nm. Validation parameters such as selectivity, linearity, precision and accuracy were evaluated. The method showed to be linear over the range of 40-120  $\mu$ g/mL in both detectors. The methods were successfully applied to determine COC, AEC, AEME, BZE, ECG and LEV. The CAD and UV methods were also compared for COC, BZE, AEC and LEV resulting in no significant difference between CAD and UV.

**Palavras-chave:**

Cromatografia líquida de interação hidrofílica; Detector de aerossol carregado; Detector de ultravioleta; Cocaína; Produtos de degradação; Produtos de pirólise;





- 
- A técnica para a purificação do cloridrato de cocaína foi adequada para a obtenção de um produto com teor de pureza de 99,2% (tal qual);
  - Os métodos de caracterização possibilitaram a identificação e o estabelecimento da pureza do cloridrato de cocaína;
  - Os métodos usados para a síntese de cloridrato de anidroecgonina, cloridrato de ecgonina, benzoilecgonina e éster metílico da anidroecgonina a partir do cloridrato de cocaína foram adequados;
  - Os métodos de purificação das substâncias de interesse permitiram a obtenção de SQR com teor de pureza de 99,5% para cloridrato de ecgonina, 95,9% para cloridrato de anidroecgonina, 98,5% para benzoilecgonina, e 99,3% para éster metílico de anidroecgonina;
  - A caracterização das substâncias de interesse proporcionou a determinação da identidade das SQR, assim como a determinação do teor de pureza das mesmas;
  - O método desenvolvido por CL-EM para a identificação e quantificação da cocaína, seus principais produtos de degradação e pirólise e o contaminante levamisol foi validado, demonstrando ser seletivo, linear, preciso e exato;
  - Os métodos desenvolvidos por CL-UV e CL-CAD para a determinação de cocaína, seus principais produtos de degradação e pirólise e o contaminante levamisol foram validados, demonstrando ser seletivos, lineares, precisos e exatos;
  - A análise comparativa dos métodos por CL-UV e CL-CAD para a determinação de cloridrato de cocaína, cloridrato de anidroecgonina, benzoilecgonina e levamisol demonstrou não haver diferença estatística entre os métodos.







- BILLINGS, K. E. Development of a Simple Method to Detect and Quantify Benzoylecgonine , a Cocaine Metabolite , in Urine. **Honors Projects**, Illinois Wesleyan University, 2003.
- BISCEGLIA, K. J.; ROBERTS, A. L.; SCHANTZ, M. M.; LIPPA, K. A. Quantification of drugs of abuse in municipal wastewater via SPE and direct injection liquid chromatography mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2701-12, nov. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 344, de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 mai. 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. RDC nº 39, de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 de jul. 2012.
- CARVALHO, V.M. **Pesquisa dos indicadores de uso do crack em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal**. São Paulo, 2006. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- CASALE, J. F.; COLLEY, V. L.; LEGATT, D. F. Determination of phenyltetrahydroimidazothiazole enantiomers (Levamisole/Dexamisole) in illicit cocaine seizures and in the urine of cocaine abusers via chiral capillary gas chromatography-flame-ionization detection: clinical and forensic perspectives. **Journal of analytical toxicology**, v. 36, n. 2, p. 130-5, mar. 2012.
- CHASIN, A. A. M., CARVALHO, V. M. Cocaína: análise de cocaína, benzoilecgonina e éster metilandroecgonina em urina com cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. In: MOREAU, Regina Lúcia de Moraes. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. P. 240-246
- FILHO, O.F.F.; TURCHI, M.D.; LARANJEIRA, R.; CASTELO, A. Perfil sociodemográfico e de padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 6,p. 751-9, 2003.
- FINDLAY, S. P. The Three-dimensional Structure of the Cocaines. Part I. Cocaine and Pseudococaine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 11, p. 2855 - 2862, 1954.
- GHEORGHE, A.; VAN NUIJS, A.;PECCEU, B.; BERVOETS, L.; JORENS, P. G.; BLUST, R.; NEELS, H.; COVACI, A. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 4, p. 1309-19, jun. 2008.
- HENRY, T.A., **The Plant Alkaloids**. 4.ed. Toronto: The Blakiston Company, 1949, 804 p.
- JIA, S.; PARK, J. H.; LEE, J.; KWON, S. W. Comparison of two aerosol-based detectors for the analysis of gabapentin in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2301-6, 15 out. 2011.
- LUKASZEWSKI, T.; JEFFERY, W. K. Artifacts of Illicit Impurities and and Artifacts Illicit Cocaine Cocaine Impurities. **Journal of Forensic Sciences, JFSCA**, v. 25, n. 3, p. 499 - 507, 1980.
- MATCHETT, J. R.; LEVIN, J. Isolation of Ecgonidine Methyl Ester from Coca Seeds'. **Journal of American Chemical Society**, v. 63, n. 9, p. 2444 - 2446, set., 1941.

MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 318 p.

PAUL, B. D., LALANI, S., BOSY, T., JACOBS, A. J., HUESTIS, M.A. Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography–mass spectrometry **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 677–688, 2005.

UNODOC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials** unodoc. Vienna: 2012.

VAN BOCXLAER, J. F.; Clauwaert K. M.; Lambert, W.E.; Deforce, D.L.; Van den Eeckhout, E. G.; De Leenheer, A.P. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. **Mass spectrometry reviews**, v. 19, n. 4, p. 165-214, 2000.

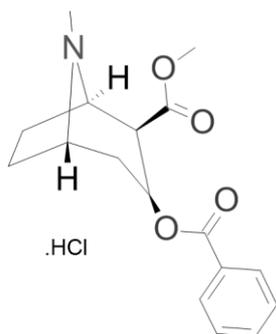
WORLD HEALTH ORGANIZATION, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 43 ed. Geneva: 2006. Annex 3: General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances **WHO Technical Report Series**, n. 943, 2006.

ZIRKLE, C. L.; GEISSMAX, T.A.; BLOOM, M.; CRAIG, P.N.; GERNS, F.R.; IXDIK, Z. K.; PAVLOFF, A. M. 3- Substituted Tropane Derivatives. I. The Synthesis and Stereochemistry of the Tropane-3-carboxylic Acids and Their Esters. A Comparison of Positional Isomers in the Tropane Series. **Journal of American Chemical Society**, v. 11, p. 1269 – 1279, abr, 1962.

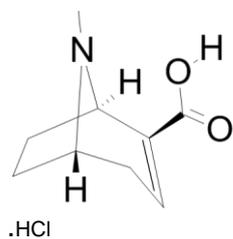




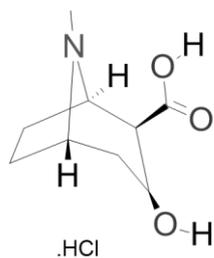
## APÊNDICE A – Ilustração das estruturas químicas das substâncias sintetizadas e purificadas no capítulo 2



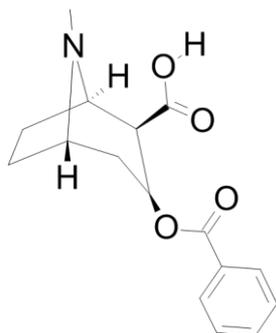
Cloridrato de cocaína



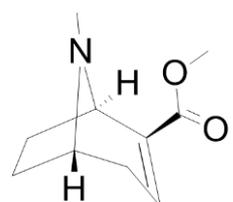
Cloridrato de anidroecgonina



Cloridrato de ecgonina

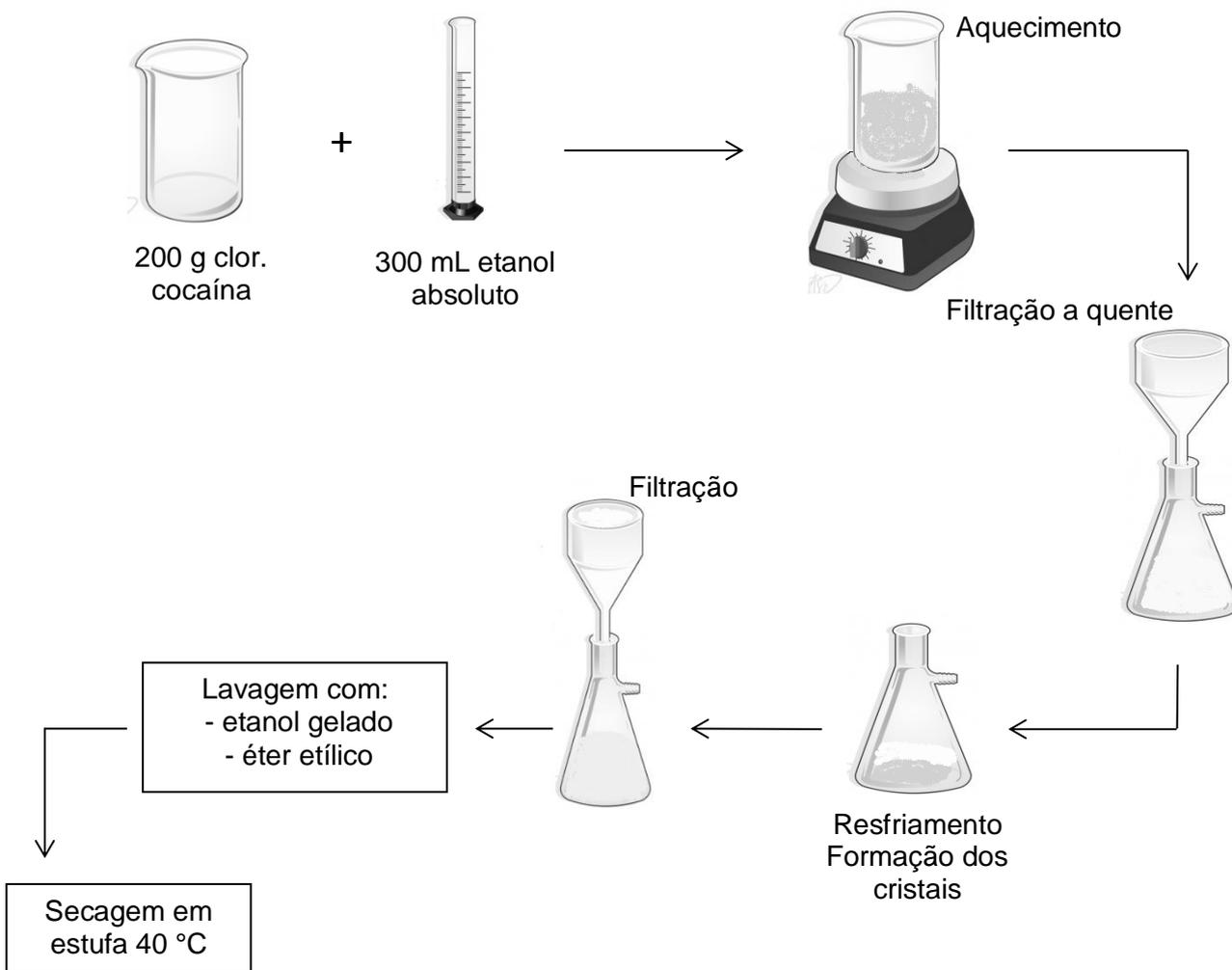


Benzoilecgonina

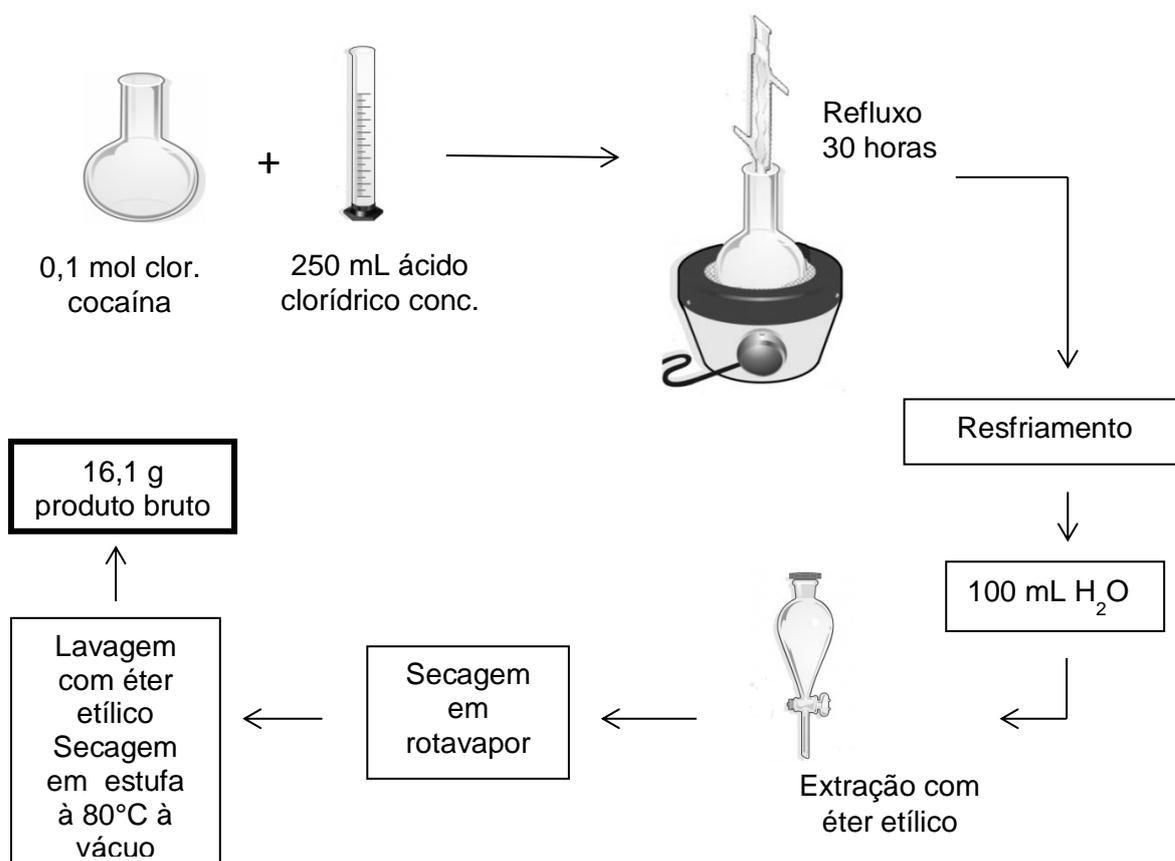


Éster metílico de anidroecgonina

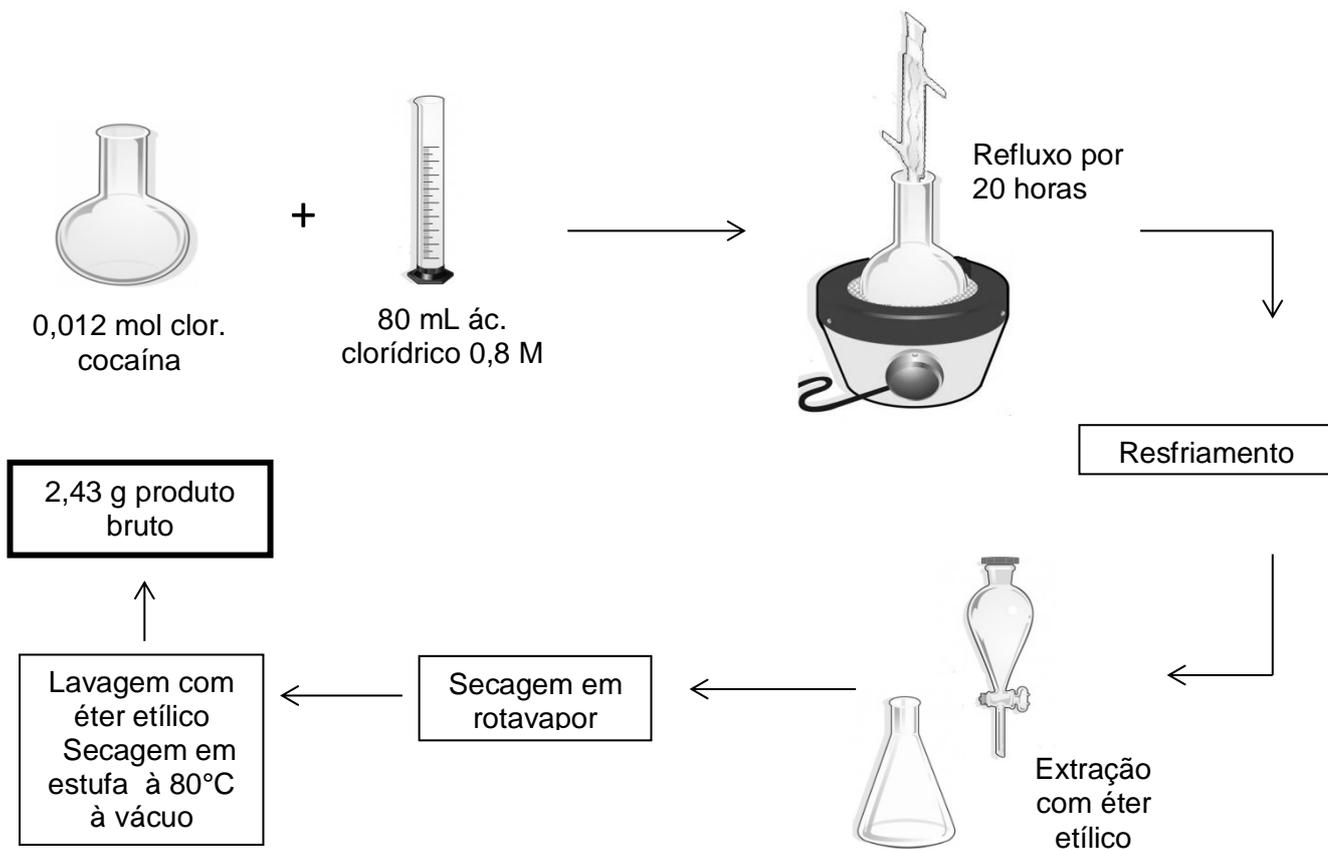
APÊNDICE B – Representação esquemática do método de purificação do cloridrato de cocaína



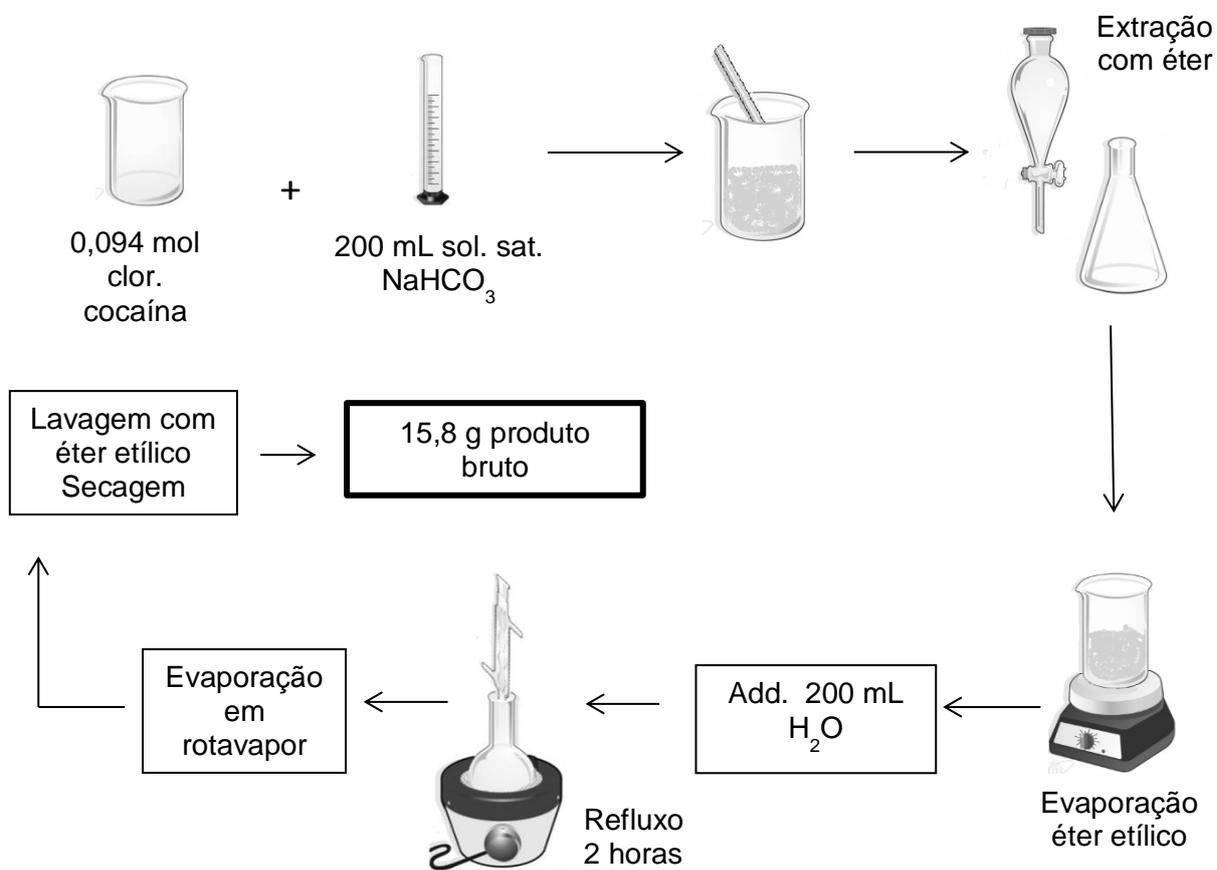
## APÊNDICE C – Representação esquemática do método de síntese do cloridrato de anidroecgonina



APÊNDICE D – Representação esquemática do método de síntese do cloridrato de ecgonina



## APÊNDICE E – Representação esquemática do método de síntese da benzoilecgonina



APÊNDICE F – Representação esquemática do método de síntese do ester metílico de anidroecgonina

