



Università degli Studi di Genova
Scuola di Scienze Matematiche,
Fisiche e Naturali
DISTAV

Dipartimento di Scienze della Terra,
dell'Ambiente e della Vita

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Applicata e Sperimentale
Curriculum Forense

Ricerca di inquinanti e derivati
minoritari nella cocaina:
sviluppo di un protocollo analitico

Relatori:

Prof. Massimo Grilli

Dott.ssa Antonella Riu

Correlatrice

Prof.ssa Chiara Cervetto

Candidata

Alice Marchelli

Anno Accademico
2025 - 2026

RIASSUNTO

Riassunto in italiano

Il presente lavoro di tesi, interamente svolto presso il Laboratorio Chimico dell'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli di Savona, si focalizza sullo sviluppo e sull'ottimizzazione di un protocollo analitico per l'identificazione e la quantificazione della cocaina e dei suoi derivati minoritari nei campioni provenienti da sequestri. L'obiettivo principale è l'ottenimento di un profilo chimico completo, essenziale per supportare le attività di intelligence, controllo doganale e tracciabilità, ponendo le basi per la creazione di un database interno in grado di individuare correlazioni tra lotti di diversa provenienza o filiera produttiva.

Lo studio ha previsto l'integrazione di diverse tecniche analitiche strumentali. È stata impiegata la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) per lo screening preliminare della matrice solida. Successivamente, si è proceduto su due binari di indagine: da un lato la profilazione quantitativa degli alcaloidi mediante gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID) e la relativa conferma strutturale in gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS); dall'altro, l'analisi qualitativa dei solventi organici volatili residui in GC-MS, finalizzata a tracciare i reagenti di estrazione e salificazione.

I risultati hanno evidenziato l'utilità dello screening FT-IR per una caratterizzazione preliminare dei campioni e per la formulazione di ipotesi sulla presenza dei principali agenti da taglio, rivelando l'esistenza di panetti caratterizzati da profili FT-IR compatibili prevalentemente con adulteranti, quali la fenacetina, o con materiali inerti, quali il solfato di calcio. Tali identificazioni, ottenute mediante confronto con le librerie spettrali, devono tuttavia essere considerate presuntive e richiedono, ove necessario, conferma mediante una tecnica analitica indipendente.

Per quanto riguarda la componente alcaloidea, la caratterizzazione del profilo minoritario ha rivelato la costante assenza di cocaetilene nei lotti esaminati e la presenza quasi ubiquitaria di benzoilecgonina, norcocaina e tropacocaina. Al contrario, l'ecgonina metilestere (EME) ha mostrato una fluttuazione tra i vari sequestri, mostrando una variabilità potenzialmente utile per la comparazione esplorativa dei campioni.

Con uguale importanza forense, l'indagine qualitativa dei solventi residui ha fornito un'impronta chimica complementare sulle procedure di raffinazione clandestina. La mappatura dei solventi ha permesso di distinguere chiaramente i solventi primari di occlusione intrappolati

nel reticolo cristallino (come l'acetato di etile o l'acetato di propile) dai contaminanti alifatici di trascinamento derivanti dalle fasi di macerazione, permettendo di validare la matrice comune di panetti visivamente eterogenei e di differenziare chimicamente lotti elaborati in laboratori differenti.

Infine, gli studi di stabilità a breve termine hanno evidenziato una buona conservazione di alcuni specifici alcaloidi nel tempo, mentre l'analisi GC-MS ha escluso la presenza di interferenze e co-eluzioni.

In conclusione, l'approccio analitico integrato esplorato suggerisce una potenziale utilità operativa a supporto dell'intelligence doganale. I profili chimici ottenuti potrebbero rappresentare un punto di partenza per la futura implementazione di un database interno, previa validazione statistica e ufficiale del metodo.

Riassunto in inglese

This thesis work, conducted entirely at the Chemical Laboratory of the Customs and Monopolies Agency in Savona, focuses on the development and optimization of an analytical protocol for the identification and quantification of cocaine and its minor derivatives in seized samples. The main objective is to obtain a comprehensive chemical profile, essential for supporting intelligence activities, customs control, and traceability, laying the groundwork for the creation of an internal database capable of identifying correlations between batches of different origins or production chains.

The study involved the integration of various instrumental analytical techniques. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) was used for the preliminary screening of the solid matrix. Subsequently, the investigation proceeded along two parallel tracks: on one hand, the quantitative profiling of alkaloids using gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) and the corresponding structural confirmation by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); on the other hand, the qualitative analysis of residual volatile organic compounds by GC-MS, aimed at tracking the extraction and salification reagents.

The results highlighted the usefulness of FT-IR screening for a preliminary characterization of the samples and for formulating hypotheses on the presence of the main cutting agents, revealing the existence of bricks characterized by FT-IR profiles predominantly compatible with adulterants, such as phenacetin, or with inert materials, such as calcium sulfate. Such identifications, obtained by comparison with spectral libraries, must however be considered

presumptive and require, where necessary, confirmation by an independent analytical technique.

Regarding the alkaloid component, the characterization of the minor profile revealed the constant absence of cocaethylene in the examined batches and the near-ubiquitous presence of benzoylecgonine, norcocaine, and tropacocaine. Conversely, ecgonine methylester (EME) showed fluctuations across the various seizures, showing a variability potentially useful for the exploratory comparison of the samples.

With equal forensic importance, the qualitative investigation of residual solvents provided a complementary chemical fingerprint of clandestine refining procedures. The mapping of solvents made it possible to clearly distinguish primary occlusion solvents trapped in the crystal lattice (such as ethyl acetate or propyl acetate) from aliphatic carry-over contaminants originating from the maceration phases, allowing for the validation of a common matrix in visually heterogeneous bricks and the chemical differentiation of batches processed in different laboratories.

Finally, short-term stability studies demonstrated good preservation of certain specific alkaloids over time, while the GC-MS analysis ruled out the presence of interferences and co-elutions.

In conclusion, the integrated analytical approach explored suggests a potential operational utility in supporting customs intelligence. The obtained chemical profiles could represent a starting point for the future implementation of an internal database, subject to statistical and official validation of the method.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	8
1.1 Introduzione generale.....	8
1.2 Origine e sviluppo dei Laboratori Chimici dell'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli	9
1.3 La cocaina: origine, struttura e caratteristiche chimiche	10
1.4 Farmacocinetica e metabolismo della cocaina	11
1.5 Farmacodinamica e meccanismo d'azione	16
1.6 Neuroplasticità indotta dalla cocaina	19
1.7 Aspetti normativi e regolatori	21
 2. SCOPO DELLA TESI.....	 24
 3. MATERIALI E METODI.....	 25
3.1 Strumentazione e principi analitici	25
3.1.1 Principi di cromatografia	25
3.1.2 Gascromatografia.....	27
3.1.3 GC-MS: gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa	28
3.1.4 GC-FID: gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma	29
3.1.5 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) e accessorio ATR ...	30
3.2 Determinazione della cocaina in ADM	31
3.3 Prelievo del campione e allestimento del corpo di reato.....	32
3.4 Screening preliminare in spettroscopia FT-IR	34
3.5 Protocollo operativo per l'analisi quantitativa degli alcaloidi	35
3.5.1 Scopo e applicazione del metodo	35
3.5.2 Precauzioni e norme di sicurezza	35
3.5.3 Principio del metodo	35
3.5.4 Materiali	35
3.5.5 Condizioni ambientali	36
3.5.6 Condizioni gascromatografiche	36
3.6 Procedimento per gli alcaloidi.....	37

3.6.1 Preparazione del campione di prova	37
3.6.2 Preparazione soluzioni di riferimento	38
3.6.3 Preparazione della soluzione di bianco del campione	39
3.6.4 Costruzione della retta di calibrazione	39
3.7 Protocollo operativo per l'analisi qualitativa degli alcaloidi	40
3.7.1 Analisi di conferma qualitativa mediante GC-MS	40
3.7.2 Condizioni strumentali per l'analisi di conferma qualitativa GC-MS	40
3.7.3 Analisi gascromatografica senza derivatizzazione	42
3.8 Protocollo operativo per l'analisi dei solventi e delle impurezze volatili	43
3.8.1 Scopo e applicazione del metodo	43
3.8.2 Precauzioni e norme di sicurezza	43
3.8.3 Principio del metodo	43
3.8.4 Materiali	44
3.8.5 Condizioni ambientali	44
3.8.6 Estrazione mediante microestrazione in fase solida (HS-SPME)	44
3.8.7 Condizioni gascromatografiche e spettrometriche	45
3.9 Procedimento per i solventi	46
3.9.1 Campionamento e conservazione per l'analisi dei VOCs	46
3.9.2 Preparazione della soluzione stock standard	46
3.9.3 Preparazione della soluzione di bianco del campione (VOCs)	46
3.9.4 Preparazione del campione di prova per l'analisi in spazio di testa	46
3.10 Conservazione dei campioni a breve e medio termine	48
3.11 Analisi di stabilità a breve e medio termine	48
 4. RISULTATI	
4.1 Caratterizzazione macroscopica e documentazione fotografica	50
4.2 Screening composizionale mediante spettroscopia FT-IR	56
4.3 Valutazione preliminare della linearità e curve di calibrazione	59
4.4 Analisi quantitativa degli alcaloidi	62
4.5 Analisi di stabilità a breve e medio termine	71

4.6 Analisi di conferma qualitativa degli alcaloidi mediante GC-MS	72
4.7 Analisi qualitativa dei solventi e delle impurezze volatili	77
5. DISCUSSIONE.....	79
5.1 Importanza dello screening FT-IR	79
5.2 Valutazione dei parametri di validazione del metodo	80
5.3 Caratterizzazione e discussione del profilo alcaloideo minoritario	81
5.4 Studio di stabilità a breve termine dell'estratto analitico	82
5.5 Analisi qualitativa degli alcaloidi mediante GC-MS	84
5.6 Analisi qualitativa dei solventi	86
5.6.1 Correlazione tra profilo chimico e dati visivi	86
5.6.2 Origine dei solventi e delle impurezze nella filiera produttiva della cocaina	88
5.7 Danni per la salute	89
6. CONCLUSIONI.....	90
7. BIBLIOGRAFIA.....	91
8. RINGRAZIAMENTI.....	94

INTRODUZIONE

1.1 Introduzione generale

La cocaina rappresenta una delle sostanze stupefacenti più diffuse e trafficate a livello mondiale. Nonostante il suo impiego illecito sia severamente vietato dalla normativa internazionale e nazionale, il consumo di cocaina continua a costituire un rilevante problema di sanità pubblica e di sicurezza, con un mercato illecito in continua espansione e adattamento. La costante evoluzione delle rotte di traffico, delle modalità di produzione e delle tecniche di adulterazione rende necessarie metodiche analitiche sempre più raffinate per garantire il controllo e l'identificazione dei campioni sequestrati.

Dal punto di vista chimico, la cocaina è un alcaloide tropanico estratto dalle foglie di *Erythroxylum coca*, pianta originaria del Sud America. A seconda dei processi di lavorazione e delle sostanze aggiunte, essa può presentarsi in diverse forme – cloridrato di cocaina, base libera o crack – ciascuna con proprie caratteristiche fisico-chimiche e farmacocinetiche. La sua elevata lipofilia e la capacità di attraversare rapidamente la barriera ematoencefalica ne determinano un effetto stimolante immediato e di breve durata, seguito da un rapido metabolismo epatico che porta alla formazione di metaboliti quali benzoilecgonina ed ecgonina metilestere.

Dal punto di vista analitico, l'identificazione della cocaina nei campioni sequestrati costituisce oggi una procedura consolidata. Tuttavia, l'attenzione della ricerca più recente si è spostata verso la caratterizzazione dei composti minoritari che accompagnano la sostanza principale: impurezze di sintesi, derivati minori, residui di reagenti o solventi, nonché adulteranti e agenti da taglio. Questi composti, pur presenti in concentrazioni molto basse, rappresentano un vero e proprio fingerprint chimico del campione, in quanto riflettono il metodo di sintesi, la qualità dei precursori utilizzati e le condizioni operative del processo produttivo.

L'analisi di questi derivati minoritari riveste una doppia importanza. Da un lato, consente di ottenere informazioni tossicologiche aggiuntive, poiché alcune impurezze o adulteranti possono contribuire ad aumentare la pericolosità del prodotto finale per l'assuntore. Dall'altro lato, questi profili chimici costituiscono un potente strumento di indagine forense e doganale, in quanto permettono di stabilire correlazioni tra campioni diversi, identificando quelli provenienti dalla stessa filiera produttiva o area geografica di origine.

1.2 Origine e sviluppo dei Laboratori Chimici dell’Agenzia delle Dogane e dei Monopoli

I laboratori chimici dell’Agenzia delle Dogane e dei Monopoli affondano le loro radici nel XIX secolo. Essi vennero istituiti nel 1886 con il “Regio Decreto n. 3929 del 7 giugno 1886”, su proposta del Ministro Magliani, sotto la denominazione di Laboratorio Chimico delle Gabelle. La loro nascita rispondeva all’esigenza di risolvere le controversie tra lo Stato e gli importatori in materia di dazi doganali, attraverso analisi chimiche condotte con criteri scientifici oggettivi e verificabili.

Inizialmente con sede a Roma, il laboratorio era suddiviso in due sezioni: la prima dedicata alle ricerche e alle analisi relative alla produzione di sali e tabacchi, la seconda incaricata dei controlli qualitativi su zuccheri e di analisi finalizzate alla corretta applicazione della tariffa doganale e delle imposte di fabbricazione. Con la riforma del 1893, attuata dal Ministro Gagliardo, il laboratorio fu integrato nell’amministrazione doganale. La direzione scientifica della struttura fu affidata al Senatore Stanislao Cannizzaro, chimico di fama internazionale, mentre tra i successivi direttori spicca la figura di Vittorio Villavecchia, autore del celebre “Dizionario di merceologia e chimica applicata”, considerato ancora oggi un riferimento fondamentale per la disciplina.

Nel corso del XX secolo, i laboratori chimici doganali si sono progressivamente evoluti, diventando un punto di riferimento scientifico per l’applicazione delle norme tecniche e fiscali sui prodotti soggetti a controllo. Come osservato dallo storico della scienza Antonio Di Meo, già nei primi anni del Novecento questi laboratori contribuirono in modo significativo alla nascita della moderna merceologia, grazie all’integrazione tra i più avanzati metodi della chimica analitica e le esigenze del commercio e dell’industria.

Oggi i laboratori ADM operano sotto la Direzione Antifrode e Controlli e svolgono un ruolo cruciale nel supportare le attività di contrasto al traffico illecito, nella tutela del consumatore e nella verifica di prodotti destinati all’import–export. Le sedi operative sono 16, distribuite su tutto il territorio nazionale, coordinate da un Ufficio Laboratori Centrale, che gestisce le attività di indirizzo tecnico-scientifico, la qualità analitica e i programmi di Proficiency Testing.

Tutti i laboratori sono accreditati da ACCREDIA come laboratorio multisito (n. accreditamento 00495), in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, che certifica la competenza tecnica, la tracciabilità dei risultati e l’adozione di un sistema qualità riconosciuto a livello internazionale. [1]

1.3. La cocaina: origine, struttura e caratteristiche chimiche

La cocaina è un alcaloide naturale estratto dalle foglie della pianta di coca, appartenente al genere *Erythroxylum*, originaria del Centro e Sud America. Tra le oltre 250 specie identificate, le più rilevanti sono *E. coca* e *Erythroxylum novogranatense*, mentre la maggior parte della cocaina commerciale viene estratta dalla varietà *E. coca* Lam. var. *coca*, nota anche come “Bolivian” o “Huanuco” coca. La pianta presenta foglie grandi, spesse, di colore verde scuro, di forma ellittica con un apice leggermente appuntito, e piccoli frutti rossi. Le foglie contengono circa 18 alcaloidi differenti, tra cui cinnamoylcocaine, tropacocaine, metilecgonina, benzoilecgonina e pseudotropina. Questi composti possiedono effetti significativamente meno euforici e tossici rispetto alla cocaina stessa. [2]

Tradizionalmente, le foglie di coca venivano utilizzate dalle popolazioni indigene andine, principalmente masticandole, sia a scopi religiosi e cerimoniali sia per applicazioni medicinali. La cocaina pura fu isolata per la prima volta da Albert Niemann tra il 1859 e il 1860 a partire dalle foglie di coca. Studi successivi hanno rilevato che le foglie secche di *E. coca* var. *coca* contengono circa 6,3 mg di cocaina per grammo di materiale vegetale. [3]

Dal punto di vista chimico, la cocaina è un alcaloide tropanico con proprietà basiche deboli. Nella sua forma base libera, la cocaina non è ionizzata ed è insolubile in ambiente acquoso, mostrando un punto di ebollizione di 187 °C; mentre il suo sale idrocloruro ionizzato si dissolve facilmente in acqua e presenta un’elevata stabilità anche a temperature molto alte, per cui non si volatilizza nel fumo.

La Tabella 1 riassume alcune delle proprietà fisiche e chimiche della cocaina. [2]

Cocaine Form	Cocaine Hydrochloride	Cocaine Free Base
Other names it is known by	‘coke’, ‘snow’, ‘blow’	‘crack’
CAS	53-21-4	50-36-2
Molecular formula	C ₁₇ H ₂₂ ClNO ₄	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄
Molecular weight	339.8 g mol ⁻¹	303.35 g mol ⁻¹
Boiling point	-	187 °C
Melting point	195 °C	98 °C
Solubility in water	2 g/mL	1.7 × 10 ⁻³ g/mL
pKa; pKb (at 15 °C)	-	8.61; 5.59
Log P	-	2.3

Tabella 1

1.4. Farmacocinetica e metabolismo della cocaina

Assorbimento

La forma di cocaina scelta dall'utilizzatore (sale cloridrato o base libera), la via di somministrazione e i modelli di consumo variano notevolmente.

Per via della sua natura idrofila, la cocaina cloridrato viene generalmente assunta per via intranasale ("sniffata").

La "crack" cocaina è invece l'unica forma comunemente fumata, poiché la cocaina cloridrato ha un punto di ebollizione elevato e non si vaporizza alle temperature di combustione. [4]

Le vie che coinvolgono il sistema respiratorio sono generalmente preferite per entrambe le forme, in quanto permettono alla sostanza di raggiungere la circolazione cerebrale in circa 6–8 secondi; la via inalatoria determina concentrazioni plasmatiche di picco più elevate e raggiunte più rapidamente rispetto alla via intranasale. Va notato che, per la via intranasale, le proprietà vasocostrittrici della cocaina ne rallentano l'assorbimento, causando un ritardo di circa 60 minuti nel raggiungimento delle concentrazioni plasmatiche massime. In termini di biodisponibilità, la via inalatoria presenta il valore più alto (oltre il 90%), mentre la via intranasale si aggira intorno all'80%. Per quanto riguarda i tempi di insorgenza e durata degli effetti, l'inalazione produce un picco di stimolazione entro 1–3 minuti dalla somministrazione, con effetti che durano 5–15 minuti. La via intranasale, invece, determina un effetto più prolungato, che dura 15–30 minuti. [2]

La somministrazione endovenosa di cocaina cloridrato, previa dissoluzione della polvere in un mezzo acquoso, è anch'essa utilizzata dai consumatori. Rispetto alle vie inalatoria e intranasale, quando la cocaina è somministrata per via endovenosa impiega il doppio del tempo per raggiungere la circolazione cerebrale, mentre le concentrazioni plasmatiche di picco risultano più elevate e raggiunte più rapidamente. La biodisponibilità è simile a quella della via inalatoria.

Nel 1995, Edward Cone pubblicò uno studio che confrontava direttamente la farmacocinetica della cocaina per via inalatoria, intranasale ed endovenosa (rispettivamente 42 mg di "crack" cocaina, 32 mg di cocaina HCl e 25 mg di cocaina HCl), utilizzando gli stessi soggetti per le diverse vie (disegno cross-over), e concluse che le concentrazioni plasmatiche di picco venivano raggiunte entro 5 minuti tramite iniezione endovenosa e inalazione, mentre la via intranasale richiedeva circa 50 minuti. [5]

La cocaina cloridrato può essere anche somministrata per via orale o applicata alle mucose della bocca, della vagina o del retto. La somministrazione orale è associata alla più bassa biodisponibilità, con un assorbimento più lento e irregolare. Il basso grado di biodisponibilità in questo caso è spiegato dalla degradazione gastrica e dal metabolismo intestinale. Questa via è spesso associata a un ritardo nell'insorgenza degli effetti, ma a una durata d'azione più lunga (1–2 ore). [2]

La masticazione delle foglie di coca, come metodo alternativo di consumo, favorisce notevolmente l'assorbimento sublinguale. Tuttavia, ciò comporta dosi più piccole di cocaina rispetto all'uso di cocaina in polvere; mentre la dose massima totale in 24 ore ottenuta masticando foglie di coca è di circa 200–300 mg (e poiché l'assorbimento non è del 100%, il valore reale è certamente inferiore), una “linea” media di cocaina cloridrato contiene 20–50 mg di sostanza, e gli utilizzatori spesso “sniffano” più linee in una singola sessione. Pertanto, la dose di cocaina assunta durante una sessione ricreativa può essere significativamente maggiore, e la concentrazione nel sangue intero quasi 50 volte superiore. [3]

Holmstedt et al. riportarono che la masticazione di foglie di coca in polvere (7–20 g) contenenti 17–48 mg di cocaina, produceva concentrazioni plasmatiche di picco di 11–139 ng/mL entro 0,4–2 ore. [6]

Inoltre, in due casi riportati di uso sublinguale di cocaina HCl (dopo neutralizzazione con bicarbonato per aumentarne l'assorbimento e ridurre l'acidità), fu descritto un inizio d'azione più lento, un picco di effetto ritardato e una durata d'azione più lunga rispetto alla via endovenosa.

Un altro modo di consumare foglie di coca è tramite infusi (“tè di coca”). [2]

Jenkins et al. riferirono che bustine di tè contenenti in media 4,86 mg (foglie dalla Bolivia) e 5,11 mg (foglie dal Perù) di cocaina per bustina, una volta infuse, producevano tè con rispettivamente 4,29 mg e 4,14 mg di cocaina. [7]

Distribuzione

La cocaina si distribuisce rapidamente nei tessuti, con un volume di distribuzione compreso tra 1 e 3 L/kg.

Essa si lega all'albumina e alla glicoproteina α 1-acida in una percentuale di circa 90%, e si trova nelle più alte concentrazioni in cervello, milza, reni e polmoni, seguiti da sangue, cuore e muscoli.

L'emivita media della cocaina varia tra 40 e 90 minuti, e può differire in base alla via di somministrazione (più breve per la via endovenosa, più lunga per l'insufflazione). [2]

Metabolismo

La cocaina genera due principali metaboliti: l'ecgonina metil estere (EME) e benzoylecgonina BE, entrambi suscettibili di ulteriore idrolisi ad ecgonina (EC).

EME è un metabolita farmacologicamente inattivo, formato nel plasma e nel fegato tramite l'azione rispettivamente della pseudocolinesterasi (PChE) e della carbossilesterasi di tipo 2 (hCE2).

L'altro principale metabolita inattivo della cocaina per tutte le vie di somministrazione, BE, può formarsi spontaneamente a pH fisiologico o nel fegato tramite hCE1.

La cocaina può anche subire N-demetilazione da parte dell'enzima CYP3A4 del citocromo P450, generando norcocaina (NCOC), un metabolita altamente epatotossico in grado di attraversare la barriera emato-encefalica.

La NCOC rappresenta circa il 5% della cocaina assorbita ed è descritta come un anestetico locale più potente e più efficace nell'inibire la ricaptazione di noradrenalina nei sinaptosomi cerebrali rispetto alla sostanza parentale.

BE ed EME possono subire ulteriore N-demetilazione da parte dei CYP, producendo rispettivamente norbenzoylecgonina (NBE) e norecgonina metil estere (NEME).

Altri metaboliti minori includono meta-idrossibenzoylecgonina (m-OH-BE), para-idrossibenzoylecgonina (p-OH-BE), meta-idrossicocaia (m-OH-COC), ecgonidina (ED) e norecgonidina metil estere (NEDME).

La Figura 1 riassume le vie metaboliche della cocaina. [2]

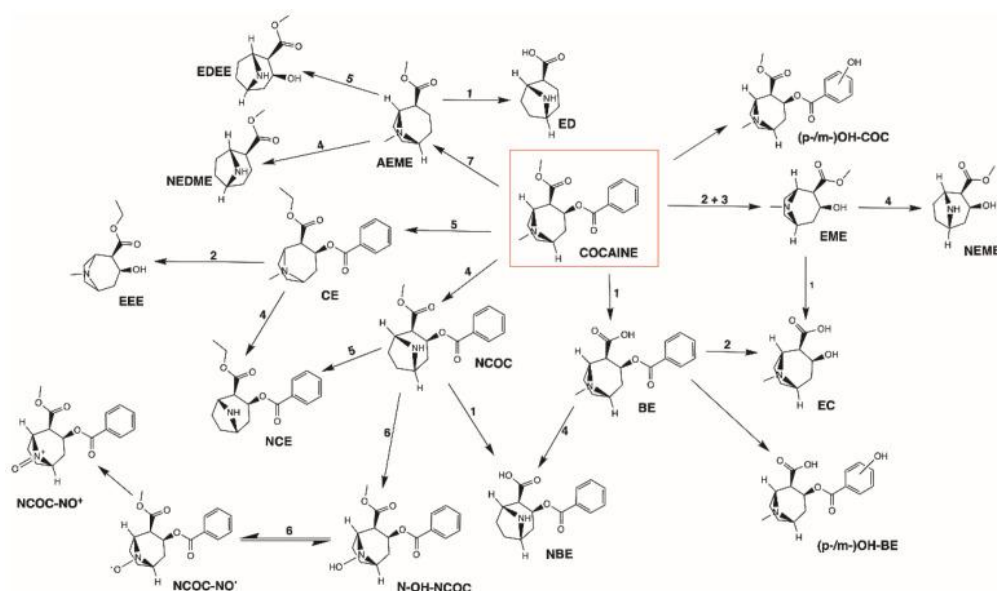


Figura 1: cocaina e i suoi principali metaboliti

Di particolare rilievo è la co-consumazione di cocaina e alcol, che porta alla formazione del cocaetilene (CE), un prodotto di transesterificazione di entrambe le sostanze. È interessante notare che questo composto viene prodotto solo in vivo, tramite catalisi da parte di hCE1. [8]

Il CE è un metabolita attivo che mostra attività farmacologica, con un'emivita media di 148 ± 15 minuti, più lunga rispetto alla cocaina. Alcuni studi riportano che esso può essere più letale e indurre reazioni tossiche acute più gravi, oltre a provocare un aumento più marcato della frequenza cardiaca rispetto alla cocaina. Il CE è utilizzato come biomarcatore per l'uso concomitante di alcol e cocaina, e può essere rilevato nelle urine (uso recente) o nei capelli (esposizione cronica). [4]

Il fumo di “crack” porta invece alla formazione di un altro biomarcatore di esposizione, l'anidroecgonina metil estere (AEME), principale prodotto della degradazione termica della cocaina. [2]

Studi in vitro e in vivo mostrano che l'AEME ha effetti sul sistema cardiovascolare, agendo come agonista muscarinico. Inoltre, sono stati riportati effetti neurotossici per questo metabolita. [2]

L'AEME può essere ulteriormente idrolizzato da hCE1 in ED, oppure in ecgonidina etil estere (EDEE) in presenza di alcol. La determinazione di AEME e ED in diversi fluidi biologici è stata proposta come biomarcatore del consumo di “crack”. L'EDEE è stato inoltre suggerito come possibile ulteriore marcatore forense per il caso particolare di co-consumo di crack ed etanolo. [9]

Escrezione

A seguito del metabolismo, la cocaina e i suoi principali metaboliti vengono escreti nelle urine. EME e BE costituiscono i principali prodotti di escrezione, indipendentemente dalla via di somministrazione (endovenosa, inalatoria o intranasale). Inoltre, circa l'1–3% dei prodotti metabolici escreti nelle urine deriva dalla N-demetilazione a un composto tipo nor-ecgonina, come NBE, oltre all'EC. [4]

Huestis et al. condussero uno studio su sei soggetti umani, nel quale indagarono il modello di escrezione urinaria della cocaina e di alcuni metaboliti (BE, EME, m-OH-BE, p-OH-BE, NBE ed EC) dopo il fumo di cocaina. Questo studio dimostrò un aumento dose-dipendente della concentrazione massima (C_{max}) di tutti gli analiti, mentre il parametro tempo al raggiungimento della concentrazione massima (T_{max}) non mostrò una proporzionalità diretta. Tra i metaboliti, l'EME presentava il tempo di rilevazione più lungo, fino a 164 ore dopo una dose di 40 mg. [10]

Un altro studio, condotto dallo stesso gruppo, valutò l'escrezione urinaria di ecgonina e di altri cinque metaboliti (BECG, EME, m-OH-BE, p-OH-BE, NBE) dopo somministrazioni controllate per via inalatoria, orale, endovenosa e intranasale di cocaina, dimostrando che la via di somministrazione non influiva significativamente su C_{max} o T_{max}.

Al contrario, Cone et al. realizzarono uno studio su sei volontari maschi sani ai quali furono somministrate dosi quasi equivalenti di cocaina per via endovenosa, tramite fumo e per via intranasale, e dimostrarono che i tempi di emivita della cocaina e dei metaboliti (BECG, EME, NCOC, NBE, m-OH-BE, p-OH-BE, m-OH-COC e p-OH-COC) erano tipicamente più brevi per la via inalatoria, intermedi per la via endovenosa e più lunghi per la via intranasale. [11]

1.5. Farmacodinamica e meccanismo d'azione

La cocaina presenta diverse proprietà farmacodinamiche che ne permettono l'uso sia come anestetico locale, sia come stimolante simpaticomimetico a livello del sistema nervoso centrale (SNC).

L'azione anestetica della cocaina è correlata alla sua capacità di bloccare i canali del sodio voltaggio-dipendenti, stabilizzandoli in uno stato inattivo (Figura 2). [2]

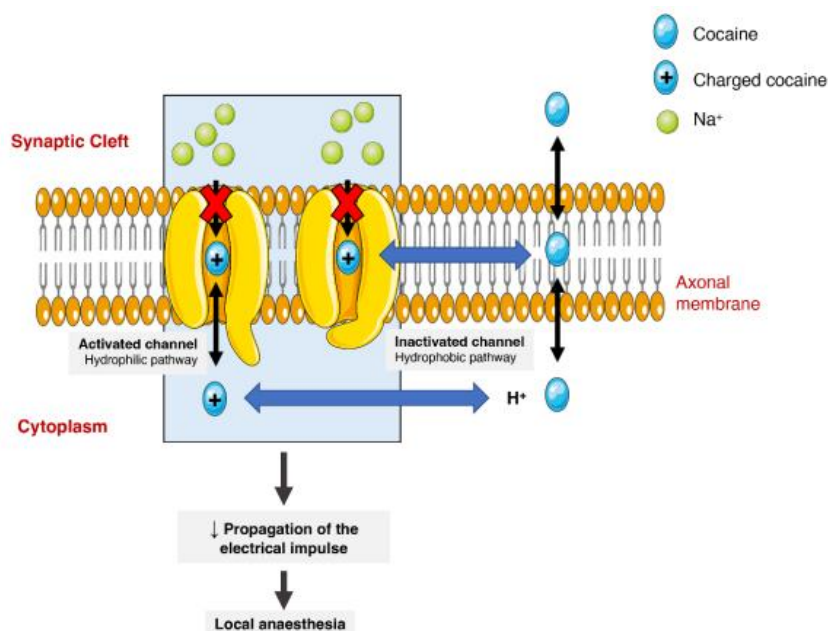


Figura 2: meccanismo d'azione della cocaina

Il legame della cocaina al porocanale impedisce al sodio di fluire attraverso di esso all'interno delle cellule, bloccando così il processo di depolarizzazione e la propagazione degli impulsi elettrici.

L'uso medico attuale della cocaina è molto limitato, poiché nella maggior parte dei paesi è considerata una sostanza obsoleta. Può tuttavia essere ancora impiegata come anestetico topico, in particolare utile durante interventi endoscopici ai seni paranasali, grazie ai suoi effetti vasocostrittori. Tuttavia, esistono controversie riguardo allo sviluppo di lievi morbidità, come ipertensione e tachicardia.

D'altra parte, gli effetti psicoattivi e simpaticomimetici della cocaina derivano dal blocco dei trasportatori presinaptici responsabili del recupero di serotonina, noradrenalina e dopamina. Nel caso di quest'ultima, il blocco del trasportatore presinaptico della dopamina (DAT) nella fessura sinaptica provoca un aumento extracellulare di dopamina, con una iperstimolazione dei recettori dopaminergici postsinaptici, inducendo la sensazione euforica di "rush". [2]

Ulteriori meccanismi di tolleranza a questo livello sono responsabili del successivo calo dei livelli di dopamina, percepito come un “crash” disforico.

Una recente meta-analisi ha dimostrato che i recettori dopaminergici D2 e D3 nello striato, nelle regioni cerebrali del caudato e del putamen, mostrano una riduzione significativa, così come un aumento marcato della disponibilità del trasportatore della dopamina (DAT) in tutto lo striato. [12]

Quando la cocaina viene consumata, si verifica un’attività dopaminergica esasperata lungo le vie mesocorticolimbiche. I neuroni di queste vie sono situati nell’area tegmentale ventrale e proiettano verso altre regioni cerebrali, tra cui il nucleo accumbens.

Ciò potrebbe spiegare il forte potenziale di dipendenza della sostanza, poiché è ampiamente riconosciuto che il nucleo accumbens svolge un ruolo importante nelle proprietà gratificanti e di dipendenza della cocaina e di altre droghe.

Tuttavia, va anche sottolineato che la capacità della cocaina di aumentare l’attività serotoninergica (che può indurre convulsioni) potrebbe anch’essa contribuire al potenziale di dipendenza del farmaco. [2]

La Figura 3 rappresenta schematicamente l’azione farmacodinamica della cocaina sul sistema monoaminergico. [2]

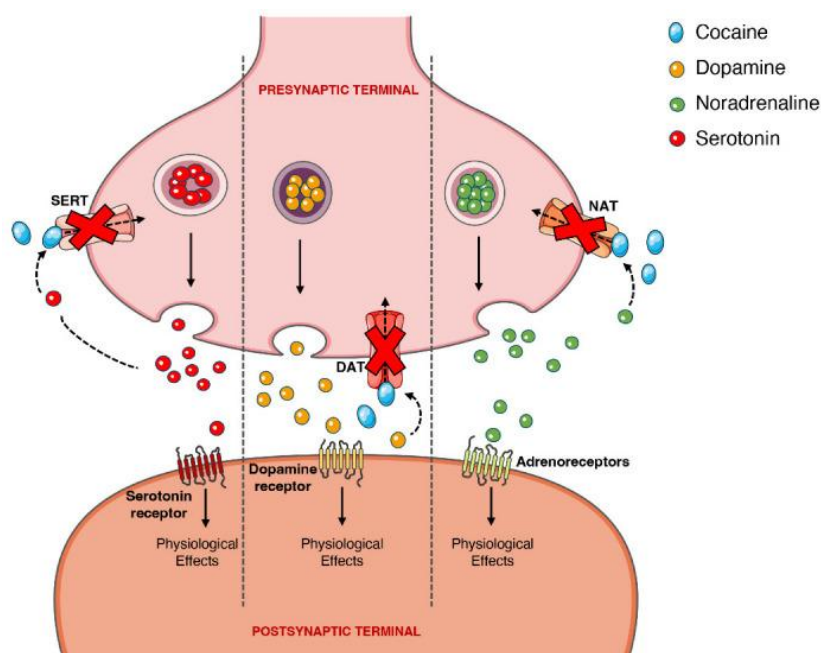


Figura 3: azione farmacodinamica della cocaina sul sistema monoaminergico

Le proprietà simpaticomimetiche della cocaina sono correlate alla già menzionata inibizione del reuptake della noradrenalina tramite il trasportatore della noradrenalina (NAT). Poiché la cocaina impedisce questo reuptake della noradrenalina, e quindi ne aumenta la disponibilità, si verifica un aumento della stimolazione dei recettori adrenergici α e β e una risposta adrenergica amplificata, fenomeno che è alla base delle marcate proprietà vasocostrittrici del farmaco (responsabili di alcuni dei suoi effetti cardiotossici). [13]

Inoltre, la cocaina ha la capacità di agire direttamente sui recettori adrenergici, N-metil-D-aspartato (NMDA), e sui recettori oppioidi sigma e kappa. La cocaina influenza i recettori NMDA, poiché l'esposizione alla sostanza modula (in senso positivo o negativo) l'espressione delle subunità recettoriali, altera la distribuzione dei recettori nella sinapsi e influenza l'interazione tra il recettore NMDA e il recettore dopaminergico D_1 in diverse aree cerebrali, come il nucleo accumbens, l'area tegmentale ventrale e la corteccia prefrontale. [14, 15]

Infine, la cocaina agisce direttamente sui recettori oppioidi sigma, legandosi con maggiore affinità per il recettore σ_1 rispetto al recettore σ_2 ; l'agonismo al recettore σ_1 da parte della cocaina media parzialmente l'iperlocomozione e le convulsioni, e questi recettori risultano fondamentali nell'instaurarsi della preferenza condizionata di luogo indotta dalla cocaina nei topi. [14, 15]

Recentemente, è stato suggerito che l'azione farmacologica della cocaina sul trasportatore della dopamina (DAT) non sia così semplice come la mera inibizione della funzione di reuptake del trasportatore, poiché il comportamento farmacologico della cocaina differisce da quello di altri inibitori del DAT di uguale o maggiore potenza (dotati di uguale capacità di attraversare la barriera ematoencefalica) e somiglia a quello del metilfenidato (un inibitore del reuptake della norepinefrina-dopamina che induce anch'esso il rilascio di dopamina sinaptica). Pertanto, è stato ipotizzato che, in modo simile alle amfetamine, la cocaina agisca come un modulatore allosterico negativo del DAT, ovvero come un "agonista inverso" del DAT, alterando la funzione del trasportatore e invertendo la direzione del trasporto. [16]

Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche in quest'area per chiarire meglio la farmacodinamica della cocaina.

1.6. Neuroplasticità indotta dalla cocaina

La dipendenza da sostanze non può più essere interpretata solo come una condizione farmacologica acuta, legata al blocco o all'attivazione dei recettori neurotrasmettitoriali, ma deve essere considerata una patologia della neuroplasticità.

La neuroplasticità è la capacità del sistema nervoso di modificare la propria struttura e funzione in risposta agli stimoli esterni, all'esperienza o a eventi patologici. Tale proprietà consente al cervello di adattarsi, apprendere e riorganizzarsi attraverso cambiamenti nell'efficacia sinaptica, nella morfologia neuronale e nell'espressione genica. Questi processi, fisiologici e fondamentali per l'apprendimento e la memoria, possono tuttavia assumere un significato patologico quando vengono attivati in modo anomalo da sostanze psicoattive, generando alterazioni persistenti nei circuiti della ricompensa e della motivazione che sostengono la dipendenza.

Nel caso della cocaina, l'azione iniziale è legata alla farmacodinamica acuta della sostanza: il blocco dei trasportatori presinaptici DAT, NET e SERT provoca un accumulo di questi neurotrasmettitori nello spazio sinaptico, con conseguente iperstimolazione dei recettori postsinaptici. Ne derivano un aumento della trasmissione monoaminergica e una potente attivazione dei sistemi dopaminergico, noradrenergico e serotoninergico, responsabile degli effetti euforizzanti, dell'aumento dell'energia e dell'attività psicomotoria, ma anche della tachicardia, dell'ipertensione e della vasocostrizione. L'aumento della dopamina nel circuito mesolimbico, in particolare tra l'area tegmentale ventrale e il nucleo accumbens, rappresenta il principale substrato neurobiologico del potere rinforzante della cocaina, poiché rafforza l'associazione tra l'assunzione della sostanza e la sensazione di piacere.

Con l'uso ripetuto, tuttavia, l'effetto acuto lascia spazio a una serie di adattamenti neuroplastici che determinano modificazioni durature nella struttura e nella funzione dei circuiti cerebrali coinvolti.

La stimolazione dopaminergica cronica attiva meccanismi di segnalazione intracellulare che modificano l'espressione di geni e proteine sinaptiche, portando a una riorganizzazione delle connessioni neuronali.

Nel nucleo accumbens, in particolare, la trasmissione glutammatergica viene profondamente alterata: i recettori AMPA tradizionali vengono sostituiti da forme permeabili al calcio (CP-AMPA), che aumentano l'eccitabilità neuronale e la risposta agli stimoli droga-correlati.

Allo stesso tempo, la riduzione dell'espressione del trasportatore gliale del glutammato (GLT-1) compromette la capacità degli astrociti di mantenere l'equilibrio sinaptico, favorendo un potenziamento patologico della trasmissione eccitatoria. [17]

Anche la corteccia prefrontale, area deputata al controllo cognitivo e alla regolazione dei comportamenti impulsivi, subisce alterazioni strutturali e funzionali: si riduce la densità delle spine dendritiche e la sensibilità dei recettori dopaminergici D2, con conseguente perdita di controllo sull'impulso di ricerca della sostanza. [17]

Questi cambiamenti, insieme alle alterazioni del nucleo accumbens, determinano uno squilibrio tra le aree corticali del controllo e le strutture sottocorticali della ricompensa, favorendo la transizione dall'uso occasionale a quello compulsivo.

Le modificazioni sinaptiche e morfologiche indotte dalla cocaina sono persistenti e possono mantenersi anche per mesi dopo la sospensione dell'uso, rendendo il soggetto vulnerabile alla ricaduta. Per questo motivo, la dipendenza deve essere considerata una condizione cronica in cui la sostanza, sfruttando i meccanismi fisiologici di apprendimento e memoria, imprime una traccia patologica nei circuiti cerebrali. In tale prospettiva, la farmacodinamica della cocaina non si limita all'effetto immediato sul sistema dopaminergico, ma comprende un più ampio processo di rimodellamento sinaptico e neurobiologico. [17]

Le moderne strategie terapeutiche si orientano dunque verso il ripristino della plasticità fisiologica. Interventi mirati al sistema del glutammato, come la somministrazione di N-acetilcisteina per ristabilire l'espressione di GLT-1 o la modulazione dei recettori metabotropici del glutammato di tipo 2/3 e 5 (mGluR2/3 e mGluR5), hanno mostrato un potenziale nel ridurre il "craving" e normalizzare la comunicazione sinaptica. Tecniche di neuromodulazione, come la stimolazione magnetica transcranica o la stimolazione cerebrale profonda, mirano invece a ripristinare la connettività tra corteccia prefrontale e nucleo accumbens, rafforzando il controllo cognitivo sulla motivazione patologica.

L'obiettivo finale è quello di riprogrammare la plasticità cerebrale, favorendo un equilibrio stabile tra i sistemi della ricompensa e del controllo, e promuovendo il recupero funzionale del comportamento motivazionale.

1.7. Aspetti normativi e regolatori

La cocaina è una sostanza stupefacente la cui produzione, distribuzione e uso sono rigidamente regolamentati a livello internazionale, europeo e nazionale. Il quadro giuridico globale si fonda sulle Convenzioni delle Nazioni Unite, che costituiscono il principale riferimento normativo per tutti gli Stati membri. La “Convenzione Unica sugli Stupefacenti” del 1961 (modificata dal Protocollo del 1972) stabilisce che la produzione e l’utilizzo di sostanze stupefacenti, tra cui la cocaina, devono essere limitati esclusivamente a scopi medici e scientifici. Tale principio è stato rafforzato dalla “Convenzione sulle Sostanze Psicotrope” del 1971 e dalla “Convenzione contro il Traffico Illecito di Stupefacenti e di Sostanze Psicotrope” del 1988, che hanno introdotto misure di cooperazione internazionale volte a contrastare la produzione e il traffico di droghe. [18, 19, 20]

Negli Stati Uniti, nel 1970, il “Comprehensive Drug Abuse Prevention and Control Act” ha classificato la cocaina come sostanza di Tabella II (una categoria che comprende sostanze con elevato potenziale di abuso, ma con uso medico riconosciuto in circostanze specifiche), una definizione mantenuta fino ad oggi dalla Drug Enforcement Administration (DEA). [21]

Per quanto riguarda i Paesi dell’America del Sud, la Bolivia prevede un regime di depenalizzazione per il possesso e la coltivazione della foglia di coca; mentre Cile, Colombia, Perù, Uruguay, Paraguay e Argentina hanno depenalizzato il possesso di cocaina quando viene dimostrato l’uso personale e non si superano le soglie quantitative stabilite dalla legge. [22]

Nel Regno Unito, il “Misuse of Drugs Act”, promulgato nel 1971, ha reso illegale il possesso di droghe di Classe A, tra cui la cocaina. [23]

In Europa, la cocaina è generalmente illegale da possedere, vendere o trasportare, così come è illegale coltivare la pianta di coca. Tuttavia, esistono alcune eccezioni legali: in Portogallo, ad esempio, è stata depenalizzata la detenzione per uso personale delle principali droghe illegali, tra cui cannabis, cocaina ed eroina, entro una soglia di quantità prestabilita (pari anche in questo caso a 2 g per la cocaina). Anche i Paesi Bassi hanno adottato un modello di depenalizzazione nel 1976, in base al quale non si applicano sanzioni legali o amministrative per il possesso di qualsiasi droga, purché entro il limite massimo di 0,5 g. [2]

Sul piano normativo europeo, il controllo della cocaina e dei suoi precursori è disciplinato dal Regolamento (CE) n. 273/2004, relativo al monitoraggio del commercio interno dei precursori, [24] e dal Regolamento (CE) n. 111/2005, che stabilisce le regole per il commercio con Paesi terzi. [25] Questi strumenti impongono obblighi di registrazione, autorizzazione e tracciabilità

per tutti gli operatori coinvolti nella produzione o commercializzazione di sostanze chimiche suscettibili di impiego illecito.

All'interno dell'Unione Europea è stato progettato un piano operativo, l'“EU Drugs Strategy 2021-2025”, [26] adottato dal Consiglio dell'Unione Europea su proposta della Commissione Europea, nell'ambito della EU Security Union Strategy. Questa strategia stabilisce un approccio basato sull'evidenza scientifica, integrato, equilibrato e multidisciplinare, che mira a ridurre simultaneamente l'offerta e la domanda di sostanze stupefacenti, proteggere la salute pubblica e garantire un elevato livello di sicurezza per la collettività.

L'attuazione della strategia si articola in tre aree principali di intervento:

1. riduzione dell'offerta di droga (*Drug supply reduction*), che comprende il contrasto alle reti criminali organizzate, la prevenzione della produzione e del traffico di sostanze e precursori, e il potenziamento della sicurezza nei punti di ingresso e uscita dell'UE.
2. riduzione della domanda di droga (*Drug demand reduction*), attraverso programmi di prevenzione, trattamento, cura e riabilitazione.
3. riduzione dei danni correlati all'uso di droghe (*Addressing drug-related harm*), mediante interventi di riduzione del rischio e del danno, nonché assistenza sanitaria e sociale per le persone detenute o in fase di reinserimento.

Accanto a queste aree operative, la strategia prevede tre tematiche trasversali:

- cooperazione internazionale, che rafforza il ruolo dell'UE come promotrice di una politica sulle droghe orientata ai diritti umani e alla salute pubblica;
- ricerca e innovazione, per sviluppare capacità predittive e scientifiche più efficaci nel monitoraggio del fenomeno;
- governance e coordinamento, per assicurare una risposta europea armonizzata e coerente.

La European Union Drugs Agency (EUDA) e Europol svolgono un ruolo centrale nel coordinamento delle azioni europee, collaborando con le autorità nazionali, le agenzie europee e le organizzazioni della società civile. L'attività di contrasto al traffico illecito è condotta in particolare attraverso la piattaforma EMPACT (European Multidisciplinary Platform Against Criminal Threats), che promuove operazioni congiunte contro le reti criminali a rischio elevato e le rotte del narcotraffico. [27]

Nel 2023, la Commissione ha inoltre adottato una “EU Roadmap to fight drug trafficking and organised crime”, [28] che definisce 17 azioni operative in quattro aree prioritarie:

1. la creazione di una European Ports Alliance, per rafforzare la sicurezza dei porti europei contro le infiltrazioni criminali;
2. lo smantellamento delle reti criminali ad alto rischio, mediante indagini finanziarie e digitali coordinate e l’uso del Sistema Informativo Schengen;
3. la prevenzione del crimine organizzato, con scambio di buone pratiche tra Stati membri e limitazione dell’accesso ai precursori chimici;
4. la cooperazione con i partner internazionali, attraverso lo scambio di informazioni, operazioni congiunte sulle principali rotte della cocaina e della droga sintetica, e il rafforzamento della collaborazione giudiziaria con Paesi terzi.

Dal 2005, l’Unione Europea ha inoltre istituito un sistema di allerta precoce (Early Warning System) per individuare le nuove sostanze psicoattive (NPS) immesse sul mercato e valutarne i rischi, al fine di vietare rapidamente quelle dannose. Le norme, aggiornate nel 2017, hanno reso più rapido e centralizzato il processo di controllo, rafforzando il ruolo della EUDA nella raccolta e nella condivisione di informazioni in tempo reale tra gli Stati membri. [26]

Per cooperare con gli altri Stati, l’Unione Europea partecipa attivamente ai lavori della “Commission on Narcotic Drugs” delle Nazioni Unite e promuove dialoghi regionali con l’America Latina e i Caraibi, l’Asia Centrale, i Paesi dei Balcani occidentali e i Paesi del partenariato orientale, oltre a partenariati bilaterali con Stati Uniti, Colombia e Cina. In queste aree, l’UE finanzia progetti di cooperazione tecnica volti a contrastare il traffico lungo le principali rotte della cocaina e a sostenere lo sviluppo socio-economico dei paesi produttori e di transito. [26]

In Italia, la normativa di riferimento è il D.P.R. 9 ottobre 1990, n. 309, che recepisce le convenzioni ONU e la disciplina europea. La cocaina è inclusa nella Tabella I delle sostanze sottoposte a controllo, e la sua produzione, detenzione o cessione non autorizzate sono punite penalmente (art. 73), mentre l’uso personale è soggetto a sanzioni amministrative (art. 75). [29]

SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito delle attività del laboratorio chimico dell'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli di Savona. L'obiettivo principale consiste nello sviluppo e nell'ottimizzazione di un protocollo analitico per l'identificazione della cocaina, degli inquinanti e dei derivati minoritari, al fine di ottenere un profilo chimico completo del campione e supportare le attività di tracciabilità e controllo doganale.

In particolare, il progetto prevede l'applicazione e il confronto di diverse tecniche cromatografiche e spettroscopiche, tra cui la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), la gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID), la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR). Queste metodiche permetteranno di identificare non solo il principio attivo principale, ma anche le impurezze di sintesi, gli adulteranti e i residui di solventi presenti, che costituiscono marcatori chimici utili per la caratterizzazione e la tracciabilità della sostanza.

Un obiettivo futuro riguarderà la creazione di un database interno ADM, nel quale raccogliere i profili chimici ottenuti dai campioni analizzati, in modo da favorire la comparazione tra sequestri differenti e individuare eventuali correlazioni tra lotti provenienti dalla stessa filiera produttiva o area geografica di origine.

Il lavoro, svolto in stretta collaborazione con il personale tecnico del laboratorio, consentirà di acquisire competenze pratiche nella gestione del campione, nella preparazione analitica e nell'elaborazione dei dati strumentali, contribuendo al miglioramento delle attività di controllo, intelligence e contrasto al traffico illecito di sostanze stupefacenti.

MATERIALI E METODI

3.1 Strumentazione e principi analitici

3.1.1 Principi di cromatografia

Per comprendere appieno il funzionamento della metodica e come essa consenta l'isolamento degli alcaloidi minoritari, è necessario citare i principi fondamentali della tecnica su cui si basa: la cromatografia.

Il termine "cromatografia" definisce un vasto insieme di tecniche analitiche e preparative impiegate per la separazione di miscele complesse, il cui principio si basa sulla distribuzione delle sostanze tra due fasi immiscibili tra loro: una fase fissa, detta stazionaria, e una fase mobile che fluisce costantemente attraverso di essa.

Il meccanismo di separazione si fonda sulla natura chimico-fisica delle molecole che compongono la miscela, le quali interagiscono in maniera differente con la fase stazionaria e con quella mobile. Questa dinamica è termodinamicamente regolata dal coefficiente di ripartizione, un valore che esprime il rapporto tra la concentrazione dell'analita all'interno della fase stazionaria e la sua concentrazione nella fase mobile all'equilibrio.

Man mano che la fase mobile scorre nel sistema, le molecole subiscono un processo continuo di ripartizione: gli analiti che interagiscono maggiormente con la fase stazionaria (ad esempio per maggiore affinità o polarità) vengono trattieneuti e rallentati, mentre quelli con una maggiore affinità per la fase mobile vengono trascinati ed eluiti più rapidamente. A seguito di queste diverse interazioni, le singole molecole migrano a velocità differenziate, uscendo dalla colonna cromatografica in momenti temporali distinti.

Il tempo impiegato da ciascun analita per attraversare l'intero sistema ed essere eluito dalla colonna è definito "tempo di ritenzione"; in condizioni strumentali e termodinamiche rigorosamente definite, questo valore è caratteristico, costante e riproducibile per ogni analita.

Il risultato finale della separazione viene acquisito da un rivelatore e tradotto in un grafico detto cromatogramma, in cui l'asse delle ascisse riporta il tempo di analisi e l'asse delle ordinate l'intensità del segnale registrato. Per giudicare l'efficacia di un'analisi cromatografica, è fondamentale valutare la "risoluzione" del sistema, ovvero la sua capacità di separare in

maniera completa due analiti che eluiscono in tempi ravvicinati. Essa dipende strettamente dal bilanciamento di due parametri fondamentali: la selettività e l'efficienza.

La selettività è il parametro che indica quanto i picchi cromatografici risultano distanti tra loro all'interno del cromatogramma. Essa è espressione delle diverse interazioni chimico-fisiche che le molecole instaurano con il sistema ed è calcolabile come il rapporto tra i fattori di capacità delle due sostanze in esame; affinché vi sia una buona separazione, tale valore deve risultare superiore a uno. Per ottimizzare e aumentare la selettività di una separazione, oltre a poter sostituire la natura della fase stazionaria, è possibile intervenire in modo pratico su diversi parametri operativi. Ad esempio, si può agire sulla temperatura del sistema, la quale influenza direttamente i tempi di ritenzione, oppure si può variare la composizione della fase mobile modificandone la polarità o il pH, un aspetto particolarmente cruciale per gli analiti che si comportano da elettroliti. Tuttavia, la sola selettività non è garanzia di successo: anche se i centri dei picchi risultano ben distanziati lungo l'asse del tempo, qualora le bande fossero eccessivamente larghe finirebbero inevitabilmente per sovrapporsi.

Per ovviare all'allargamento delle bande diviene essenziale l'efficienza, che rappresenta la capacità del sistema cromatografico di eluire tutte le molecole di un medesimo analita mantenendo velocità di migrazione estremamente simili tra loro. Un sistema altamente efficiente genera bande compatte all'interno della colonna, le quali si traducono in picchi molto stretti e definiti sul cromatogramma finale. Dal punto di vista pratico, l'efficienza si misura in "piatti teorici", ovvero zone immaginarie adiacenti lungo la colonna in cui l'analita raggiunge l'equilibrio tra la fase fissa e quella mobile. Un numero elevato di piatti teorici corrisponde a un'alta efficienza; sebbene questo numero possa essere incrementato allungando fisicamente la colonna, tale scelta comporta un inevitabile aumento dei tempi di analisi. Pertanto, l'approccio ottimale consiste nel diminuire le dimensioni del singolo piatto teorico limitando i tre fenomeni fisici responsabili dell'allargamento della banda: la diffusione vorticoso, la diffusione molecolare longitudinale e la resistenza al trasferimento di massa, descritti dall'equazione di van Deemter. Per minimizzare questi fenomeni e massimizzare l'efficienza è determinante impiegare fasi stazionarie costituite da particelle molto piccole e dalla forma regolare, utilizzare colonne dal diametro interno ridotto e, soprattutto, individuare e mantenere una velocità di flusso dell'eluente che rappresenti il miglior compromesso termodinamico.

3.1.2 Gascromatografia

Nel caso specifico del protocollo ADM, la tecnica utilizzata è la gascromatografia (GC).

Essa è una tecnica analitica impiegata per la separazione di composti sufficientemente volatili e termicamente stabili. In questo sistema, la fase mobile è un gas inerte, definito gas di trasporto o carrier gas (solitamente elio, idrogeno o azoto), il cui unico scopo è trascinare gli analiti lungo la colonna cromatografica senza competere per la loro ripartizione. La separazione chimico-fisica avviene pertanto all'interno della colonna posta in un forno termostato, basandosi esclusivamente sulle interazioni delle molecole vaporizzate con la fase stazionaria.

Nell'analisi forense moderna si impiegano quasi esclusivamente colonne capillari in silice fusa, caratterizzate da diametri interni ristretti (tipicamente da 0,25 a 0,4 mm) e dal deposito di un sottile film di fase stazionaria liquida sulle pareti interne (es. 0,25 μm di spessore). Queste colonne, che possono raggiungere lunghezze considerevoli (da 30 fino a 300 metri), si comportano internamente quasi come un "tubo vuoto" offrendo un'altissima efficienza separativa, testimoniata da un numero di piatti teorici estremamente elevato.

Perché il processo avvenga correttamente, la modalità di introduzione del campione all'interno dell'iniettore termostato deve essere adattata alle proprietà chimico-fisiche degli analiti target. Per le molecole con pesi molecolari più elevati e minore volatilità, come gli alcaloidi, il campione viene introdotto in forma liquida mediante una siringa di precisione. L'iniezione diretta nell'ambiente ad alta temperatura consente la vaporizzazione istantanea dell'estratto, con i vapori che si espandono fino a 1000 volte rispetto al volume liquido iniziale. Al contrario, per l'indagine di composti ad alta volatilità, come i solventi residui di produzione, si adotta un'introduzione indiretta basata sulla tecnica in spazio di testa combinata alla microestrazione in fase solida (HS-SPME). In questa configurazione non avviene alcuna iniezione di liquido; è la fibra polimerica, sulla quale si sono precedentemente concentrati gli analiti in fase gas, a essere inserita nell'iniettore caldo, rilasciando i composti mediante un rapido desorbimento termico.

Indipendentemente dal metodo di campionamento utilizzato, la miscela viene poi spinta dal gas carrier all'interno della colonna, il cui forno può operare a temperatura costante (analisi isoterma) oppure seguire un gradiente termico (programmata di temperatura) che stacca progressivamente dalla fase stazionaria le molecole in base al loro punto di ebollizione e polarità, riducendo i tempi di analisi e migliorando la risoluzione. L'ingresso in colonna è governato dalle tecniche di iniezione: la modalità split, in cui solo una porzione del campione

vaporizzato entra in colonna mentre il resto è scaricato all'esterno (ideale per evitare l'overloading di campioni concentrati); e la modalità splitless, nella quale la valvola di scarico resta temporaneamente chiusa per convogliare tutto il campione in colonna, rivelandosi essenziale per le analisi in tracce.

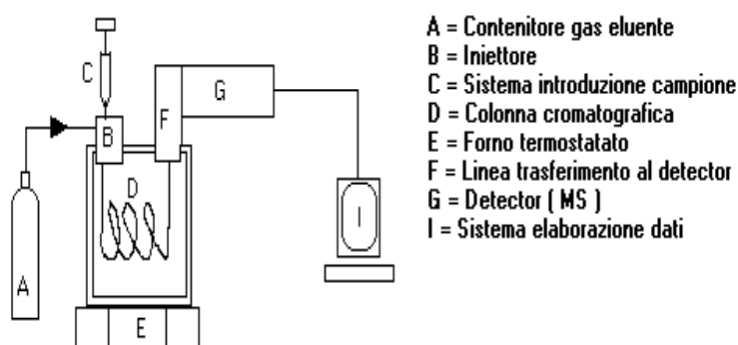


Figura 4: schema a blocchi di un gascromatografo

3.1.3 GC-MS: gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa

La spettrometria di massa rappresenta il gold standard come rivelatore in gascromatografia grazie alla sua universalità verso le molecole organiche e all'elevatissima sensibilità (fino all'ordine delle sub-picomoli e femtomoli). Affinché l'analisi sia possibile, l'intero spettrometro deve essere mantenuto sottovuoto spinto tramite pompe turbomolecolari, per evitare che gli ioni in corsa urtino molecole d'aria collassando prima della rivelazione.

Nel sistema GC-MS impiegato, gli analiti separati cromatograficamente sono trasferiti allo spettrometro di massa e ionizzati mediante una sorgente a ionizzazione elettronica (EI). In questa camera di ionizzazione, le molecole di analita giunte allo stato gassoso dalla colonna vengono bombardate da un fascio di elettroni accelerato ad alta energia (standardizzata a 70 eV). L'urto provoca l'espulsione di un elettrone dalla molecola neutra, generando un radicale catione definito "ione molecolare". Poiché le molecole assorbono un marcato eccesso di energia, lo ione molecolare, qualora instabile, subisce un processo di frammentazione strutturale. Operare alla canonica energia di 70 eV garantisce che i pattern di frammentazione siano altamente riproducibili, il che consente il confronto diretto degli spettri incogniti con enormi librerie di riferimento internazionali.

Gli ioni generati vengono spinti e accelerati verso l'analizzatore, generalmente un quadrupolo. Costituito da quattro barre parallele metalliche sottoposte a campi elettrici continui (DC) e a radiofrequenza (RF) variabili, il quadrupolo scarta gli ioni su traiettorie non risonanti, permettendo solo a ioni con uno specifico rapporto massa/carica (m/z) di attraversare il filtro e raggiungere il moltiplicatore di elettroni. I dati possono essere acquisiti in modalità Full Scan

(scansione completa del range di masse, per ottenere informazioni strutturali e l'identificazione incrociata); dai dati acquisiti si ottiene il Total Ion Chromatogram (TIC). L'acquisizione può avvenire anche in modalità SIM (Selected Ion Monitoring, in cui si fissa il filtro solo su specifici m/z noti della molecola target, sacrificando le informazioni strutturali totali ma massimizzando la sensibilità quantitativa).

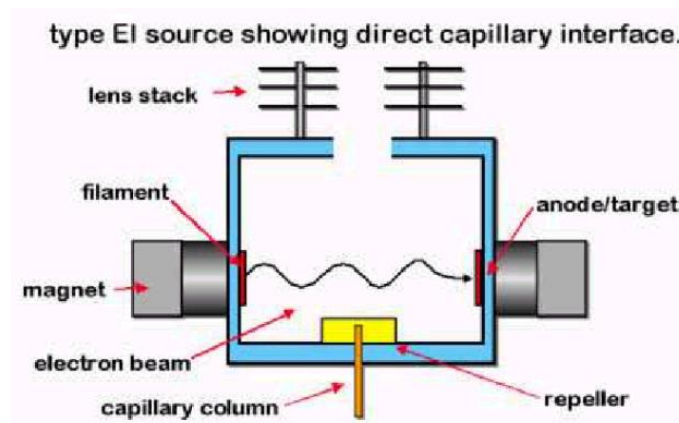


Figura 5: schema di una sorgente a impatto elettronico

3.1.4 GC-FID: gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma

Mentre la spettrometria di massa fornisce identificazione molecolare e strutturale inequivocabile, il rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) rappresenta lo strumento d'elezione per la quantificazione dei composti organici. Il principio di funzionamento sfrutta la variazione di conducibilità elettrica all'interno di una fiamma, alimentata da una miscela di idrogeno e aria, ogni qual volta essa bruci gli analiti in uscita dalla colonna cromatografica.

Durante la combustione delle molecole organiche, la fiamma ossida il carbonio generando frammenti ionizzati ed elettroni liberi. La migrazione di queste cariche verso l'elettrodo collettore (polarizzato rispetto all'ugello della fiamma) induce una debole corrente elettrica, che viene amplificata dal sistema. L'intensità della corrente misurata è lineare e proporzionale al numero di atomi di carbonio ossidati nell'unità di tempo.

Nonostante si tratti di un rivelatore distruttivo, il FID si distingue per due caratteristiche analitiche: è sensibile universalmente a pressoché tutte le molecole organiche, possedendo un eccezionale intervallo di linearità che spazia su 3-4 ordini di grandezza della concentrazione. Questa robustezza fa sì che il FID risulti la scelta più adeguata per la profilazione quantitativa dei composti stupefacenti, permettendo la costruzione di ampie rette di calibrazione stabili nel tempo.

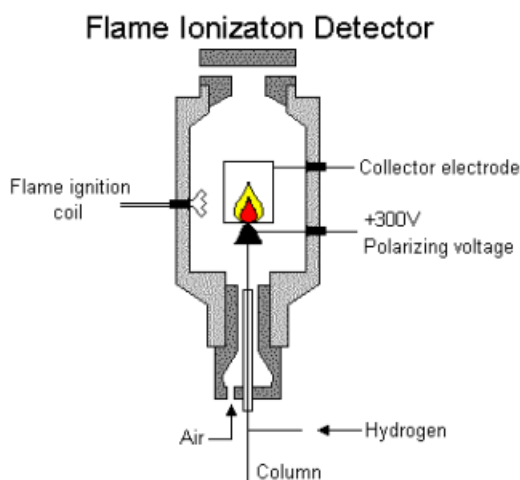


Figura 6: schema di un rivelatore a ionizzazione di fiamma

3.1.5 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) e accessorio ATR

A supporto delle tecniche gascromatografiche impiegate per le analisi in tracce, la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) rappresenta la tecnica ideale per lo screening preliminare e la caratterizzazione maggioritaria dei campioni forensi. Le analisi sono state condotte impiegando uno spettrometro FT-IR Thermo Scientific Nicolet iS5, equipaggiato con un accessorio iD7 ATR (Attenuated Total Reflectance) dotato di cristallo in diamante. L'impiego dell'accessorio ATR permette l'analisi diretta del campione solido sfruttando il fenomeno dell'onda evanescente: il raggio infrarosso non attraversa il campione, ma subisce una riflessione totale all'interno del cristallo in diamante. Nel punto di riflessione si genera un'onda elettromagnetica che penetra nel campione appoggiato al cristallo per pochissimi micrometri, venendo assorbita alle frequenze caratteristiche dei legami chimici presenti e restituendo così lo spettro della sostanza.



Figura 7: spettrometro FT-IR Thermo Scientific Nicolet iS5 presente nel laboratorio chimico delle Dogane di Savona

3.2 Determinazione della cocaina in ADM

L'analisi chimico-tossicologica e forense delle sostanze stupefacenti, come la cocaina, ha l'obiettivo fondamentale di identificare la natura della sostanza sequestrata e di quantificarne il principio attivo, gli eventuali adulteranti e i derivati minoritari. Le indagini di laboratorio si dividono in tecniche preparative, utili per isolare e raccogliere frazioni specifiche di analiti e tecniche analitiche, volte a caratterizzare strutturalmente e quantificare il campione senza necessità di conservarlo al termine dell'analisi. In ambito forense, l'analisi quali-quantitativa deve sottostare a rigorosi criteri di validazione per garantire l'affidabilità del dato in sede di giudizio.

Nell'ambito delle tecniche analitiche volte all'identificazione della cocaina e dei suoi derivati, un punto di riferimento fondamentale è rappresentato dal Metodo di Prova MAD 05:2017 (rev. 2) dell'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli, il quale si qualifica come metodo “seminormato”, in quanto emesso dall'Ufficio Laboratori della Direzione Antifrode (centro di riferimento nazionale per l'emissione di metodi ufficiali) impiegato da 15 laboratori chimici della rete e accreditato a livello nazionale presso ACCREDIA. Poiché l'ADM opera come organo tecnico dello Stato e i suoi funzionari rivestono la qualifica di Ufficiali di Polizia Giudiziaria nei controlli sulle sostanze controllate (D.P.R. 309/90), l'adozione di un metodo MAD garantisce la ripetibilità e la conformità legale.

Per quanto riguarda lo scopo e il campo di applicazione, tale metodica è finalizzata a determinare qualitativamente e quantitativamente, mediante gascromatografia, la cocaina base nei campioni di droghe d'abuso. Nello specifico, risultano analizzabili i campioni per i quali, sciogliendo un quantitativo compreso tra 10 e 150 mg in 10 ml di solvente, si ottiene una soluzione con una concentrazione di cocaina compresa tra 0,1 e 1,0 mg/ml. Il metodo permette altresì di rivelare la presenza di comuni sostanze da taglio quali lidocaina, procaina, fenacetina, caffeina e paracetamolo.

Il principio del metodo si basa sull'estrazione diretta del principio attivo dal campione mediante un'opportuna miscela solvente, la quale ha la proprietà di solubilizzare sia la cocaina che la maggior parte delle sostanze da taglio presenti (ad esclusione degli eventuali zuccheri), mantenendo in soluzione lo standard interno (SI). La concentrazione della cocaina viene quindi determinata impiegando un'apparecchiatura gascromatografica dotata di detector a ionizzazione di fiamma (FID); tale strumentazione, oltre a separare le sostanze in questione

riconoscendole tramite il rispettivo tempo di ritenzione, permette di determinarne la quantità utilizzando una retta di taratura costruita proprio con il metodo dello standard interno.

Partendo dai solidi presupposti analitici e strumentali forniti da questo protocollo ufficiale, nel presente lavoro di tesi ci si è basati su tale metodo per la determinazione e l'indagine degli alcaloidi minoritari presenti nella cocaina.

3.3 Prelievo del campione e allestimento del corpo di reato

Il campionamento di ingenti quantitativi di sostanze stupefacenti richiede l'applicazione di rigidi protocolli operativi, finalizzati a garantire la rappresentatività statistica del campione e l'assoluta integrità della catena di custodia. Il presente lavoro di tesi si inserisce nel contesto di alcune rilevanti operazioni antidroga condotte presso il porto di Vado Ligure durante il periodo di tesi, le quali hanno portato al sequestro complessivo di oltre 1,5 tonnellate di cocaina.



Figura 8: panetti sequestrati nel Porto di Vado Ligure

In conformità con le linee guida internazionali (es. UNODC, ENFSI) recepite dall'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli, il campionamento non viene effettuato sull'intera massa sequestrata. I funzionari chimici della sezione stupefacenti dei laboratori ADM, recandosi presso le strutture di custodia delle Forze dell'Ordine (Guardia di Finanza o Arma dei Carabinieri), procedono in primo luogo a definire il numero di unità da prelevare: esso viene calcolato applicando la regola empirica statistica della radice quadrata del numero totale di panetti presenti ($n = \sqrt{N}$), come stabilito dalle raccomandazioni ufficiali pubblicate dalle Nazioni Unite nel 2009 [30]. Tuttavia, l'individuazione fisica delle n unità all'interno del lotto non avviene in modo puramente casuale: la cernita si basa su un'attenta ispezione visiva degli involucri esterni, sulla presenza di loghi o marchiature differenti e su eventuali anomalie gravimetriche. Questo approccio garantisce che tutte le tipologie morfologiche presenti nel sequestro vengano correttamente intercettate e analizzate (si veda la sezione 4.1 per i dettagli fotografici e la catalogazione dei loghi riscontrati nei lotti in esame).

I reperti così selezionati vengono successivamente trasferiti presso il laboratorio chimico ADM. Considerato che il personale dell'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli non appartiene alle Forze Armate e non è autorizzato alla detenzione di armi, e valutato il rischio residuo connesso alla gestione di sequestri dal valore stimato di milioni di euro, il trasferimento avviene sotto scorta armata delle Forze dell'Ordine, per garantire la sicurezza dei dipendenti doganali.

Le operazioni di apertura e prelievo si svolgono all'interno di un'area dedicata, operando sotto cappa chimica di aspirazione per garantire la sicurezza degli operatori, e ogni singola fase è soggetta a documentazione fotografica e della misurazione del peso. Inizialmente, il panetto viene fotografato nella sua interezza per documentare il confezionamento primario e secondario, registrando eventuali loghi, scritte o nastro isolante esterno, e contestualmente si rileva il peso lordo del reperto. Si procede poi al disimballaggio aprendo il blocco per stratificazione e annotando i diversi strati di materiale isolante, come gomma, plastica o nastro adesivo. La sostanza viene portata a nudo e fotografata per evidenziare eventuali bassorilievi o simboli impressi a secco direttamente sulla droga dai cartelli produttori. Le foto vengono inviate dai funzionari dell'ADM o dalle Forze dell'Ordine operanti alla Direzione Centrale Servizi Antidroga (DCSA) per l'inserimento nel database Relief dell'Interpol. Successivamente, si passa alla misurazione del peso netto della droga isolata dal confezionamento.

Dal quantitativo complessivo sequestrato, che costituisce l'intero corpo di reato, viene prelevata una quota rappresentativa di alcuni grammi. Questa aliquota viene repertata, sigillata e conservata nella cassaforte del laboratorio ADM per le analisi ordinarie e per eventuali future perizie dirimenti, analisi ripetibile secondo l'art. 359 del codice di procedura penale.

Dal campione rappresentativo sono state prelevate le aliquote impiegate per lo screening in spettroscopia FT-IR, la profilazione degli alcaloidi minoritari e dei solventi volatili.



Figura 9: foto di campioni rappresentativi prelevati dai panetti

Al termine delle operazioni, ogni passaggio, pesata e anomalia viene trascritta sui verbali ufficiali di campionamento ADM. Il materiale di confezionamento originale e la restante massa del panetto vengono infine re-imbustati, sigillati con appositi contrassegni univoci e restituiti in custodia alle Forze dell'Ordine: il residuo del campionamento del corpo di reato sarà inviato all'Ufficio Corpi di Reato del Tribunale di Savona, mentre la maggior parte del sequestro può essere distrutto.

3.4 Screening preliminare in spettroscopia FT-IR

Prima di procedere con l'estrazione e l'analisi cromatografica dei componenti minoritari, un'aliquota del corpo di reato è stata sottoposta a un'analisi di screening mediante spettroscopia FT-IR. Dal punto di vista operativo, prima di ogni acquisizione il cristallo in diamante è stato deterso con metanolo al fine di rimuovere eventuali residui organici e prevenire contaminazioni incrociate.

Successivamente, è stato acquisito lo spettro di fondo (bianco strumentale).

Per l'analisi del campione incognito, una minima aliquota di polvere (pochi milligrammi) è stata deposta al centro del diamante. Il pressino è stato quindi abbassato per applicare la pressione necessaria a garantire il contatto tra i cristalli del reperto e la superficie del diamante, necessario per la corretta interazione con l'onda evanescente.

Lo spettro così registrato è stato processato tramite software OMNIC per il confronto e l'identificazione tramite librerie spettrali internazionali (es. libreria DEA).



Figura 10: campione di cocaina analizzato con spettroscopia FT-IR nel laboratorio chimico ADM di Savona

3.5 Protocollo operativo per l'analisi quantitativa degli alcaloidi

3.5.1 Scopo e applicazione del metodo

Il presente metodo descrive la procedura operativa per l'indagine, la caratterizzazione qualitativa e la quantificazione del profilo degli alcaloidi minoritari presenti nei campioni di cocaina in sequestro.

3.5.2 Precauzioni e norme di sicurezza

L'operatore deve rispettare le rigorose norme di sicurezza previste per la manipolazione di sostanze ad azione stupefacente. I solventi impiegati (eptano, isopropanolo) sono liquidi facilmente infiammabili, nocivi per inalazione e contatto, e potenzialmente irritanti per cute e mucose.

3.5.3 Principio del metodo

Il metodo si basa sull'estrazione diretta degli alcaloidi minoritari dal campione solido mediante un'opportuna miscela di solventi, in grado di favorire la disaggregazione della matrice minimizzando le interferenze. La separazione cromatografica e la successiva determinazione quantitativa avvengono mediante un sistema gascromatografico dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma. La quantificazione si ottiene attraverso l'impiego di una retta di taratura costruita con il metodo dello standard interno.

3.5.4 Materiali

- Gascromatografo Thermo Trace 1600 GC dotato di autocampionatore, iniettore split/splitless e rivelatore FID, gestito mediante software Chromeleon 7.3.2.
- Colonna capillare in silice fusa CC-5 MS Xil (lunghezza 30 m, diametro interno 0,25 mm, spessore del film della fase stazionaria pari a 0,25 μm).
- Bilancia analitica con sensibilità di 0,01 mg.
- Mortaio con pestello per l'omogeneizzazione.
- Matracci tarati da 10 mL.
- Bagno a ultrasuoni.
- Siringhe prive di ago e filtri a siringa in PTFE con porosità 0,45 μm .
- Micropipette di precisione e *vials* in vetro da 1,5 mL per autocampionatore.

3.5.5 Condizioni ambientali

Le operazioni di preparazione dei reagenti, dell'estrazione e dell'allestimento delle soluzioni devono essere eseguite a temperatura ambiente (tra i 20 e 25°C).

3.5.6 Condizioni gascromatografiche

Le condizioni operative strumentali ottimizzate sono le seguenti:

- Gas di trasporto: elio, mantenuto in modalità di flusso costante al valore di 0,800 mL/min.
- Modalità di iniezione: rapporto di split, mediante autocampionatore. Volume di iniezione impostato a 1,0 µL.
- Cicli di lavaggio della siringa: lavaggio della siringa pre- e post-iniezione per evitare fenomeni di trascinamento.
 - Fase di pre-iniezione: 2 cicli di lavaggio con 5,0 µL di eptano, seguiti da 2 cicli con 5,0 µL della miscela solvente eptano/isopropanolo (30:70 v/v).
 - Fase di risciacquo: 2 cicli effettuati prelevando 2,0 µL di campione.
 - Fase di post-iniezione: 3 cicli di lavaggio impiegando 5,0 µL di eptano.
- Iniettore: temperatura mantenuta costante a 280 °C, rapporto di ripartizione (*splitratio*) di 5:1, flusso di spurgo del setto di 5,0 mL/min.
- Programma di temperatura del forno: durata totale della corsa analitica pari a 18,00 minuti. Inizio con un'isoterma a 180 °C mantenuta per 2,00 minuti; successivo incremento termico con rampa di 10,00 °C/min fino a raggiungere il valore target di 310 °C; isoterma finale mantenuta a 310 °C per i restanti 3,00 minuti.
- Rivelatore FID: temperatura operativa settata a 310 °C, con frequenza di acquisizione dati di 10 Hz. Flussi dei gas di alimentazione della fiamma impostati ai seguenti valori: 350,0 mL/min per l'aria, 35,0 mL/min per l'idrogeno e 40,0 mL/min per il gas ausiliario, che in questo caso è azoto.

3.6 Procedimento

3.6.1 Preparazione del campione di prova

Per l'indagine e la caratterizzazione del profilo alcaloide minoritario, i campioni di cocaina in sequestro sono stati sottoposti a un protocollo di preparazione ed estrazione standardizzato, finalizzato a isolare gli analiti di interesse e minimizzare le interferenze strumentali.

In una prima fase, il reperto è stato finemente triturato e omogeneizzato mediante un mortaio; successivamente, un'aliquota di circa 30 mg è stata prelevata e pesata in una bilancia analitica con sensibilità di 0,01 mg. La polvere così ottenuta è stata trasferita quantitativamente all'interno di un matraccio tarato da 10 mL e portata a volume impiegando una miscela di solventi costituita da eptano e isopropanolo nel rapporto 30:70 (v/v).



Figura 11: materiale necessario per la preparazione del campione

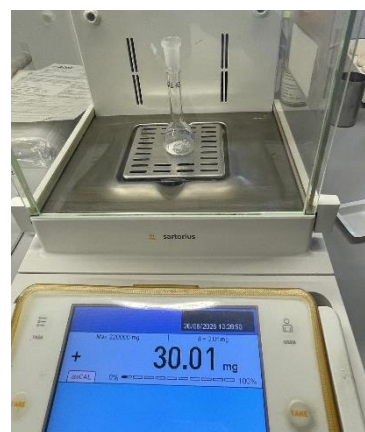


Figura 12: bilancia analitica

Al fine di garantire la completa disaggregazione della matrice e favorire l'estrazione ottimale degli alcaloidi, la miscela è stata sottoposta a sonicazione in un bagno a ultrasuoni per una durata di 10 minuti. Al termine della sonicazione, per allontanare gli eventuali agenti da taglio insolubili nella miscela solvente impiegata, si è proceduto alla filtrazione dell'estratto: un'aliquota del campione è stata caricata in una siringa priva di ago ed eluita meccanicamente attraverso un filtro a siringa in PTFE con porosità di 0,45 μm , raccogliendo il liquido limpido in una provetta di vetro.

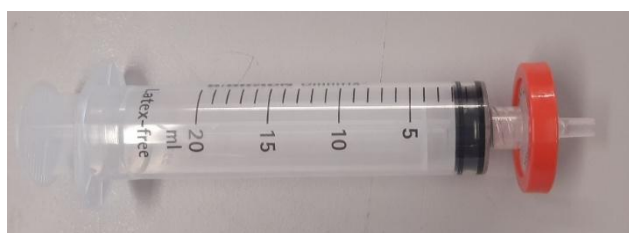


Figura 13: siringa utilizzata per la filtrazione



Figura 14: filtro

Per l'allestimento finale della miscela da sottoporre ad analisi cromatografica, 200 μL del campione così filtrato sono stati prelevati e addizionati a 200 μL di una soluzione standard di squalano avente concentrazione pari a 0,5 mg/mL, utilizzato in qualità di standard interno. La soluzione finale è stata trasferita negli appositi vial per l'inserimento nell'autocampionatore dello strumento.

3.6.2 Preparazione soluzioni di riferimento

- Standard interno (SI): utilizzare una soluzione standard di squalano avente una concentrazione esatta pari a 0,5 mg/mL.
- Soluzioni madre: impiegare materiali di riferimento certificati di origine commerciale (Lipomed o LGC Standards) con concentrazione nominale di 1 mg/mL. Gli alcaloidi di riferimento sono:
 - Cocaetilene ($1,000 \pm 0,020$ mg/mL in acetonitrile);
 - Ecgonina metilestere (certificato come $1,0060 \pm 0,0115$ mg/mL di base libera in metanolo);
 - Norcocaina (certificato come $0,9692 \pm 0,0180$ mg/mL di base libera in acetonitrile);
 - Benzoilecgonina ($1,000 \pm 0,024$ mg/mL in metanolo).
 - Tropacocaina (soluzione a 1,000 mg/mL in miscela eptano/isopropanolo 30:70 v/v, allestita a partire da polvere di cloridrato con purezza certificata del 99,950 $\pm$ 0,050%).
- Soluzioni di riferimento per la retta di taratura: a partire dalle soluzioni stock (1 mg/mL), allestire un set di cinque soluzioni a concentrazione nota (da CR1 a CR5) mediante diluizioni seriali direttamente in vial. Aggiungere a ciascun livello di calibrazione un volume costante di SI (squalano), portando il volume finale in ciascun vial a 1000 μL . L'analisi di tali soluzioni in GC-FID alle medesime condizioni del campione e la successiva normalizzazione delle aree rispetto allo SI consentono la costruzione della curva di calibrazione lineare.

3.6.3 Preparazione della soluzione di bianco del campione

Preparare la soluzione di bianco trasferendo in un vial per autocampionatore 200 μL della miscela solvente di estrazione (eptano/isopropanolo 30:70 v/v) e addizionandola con 200 μL di soluzione di standard interno (squalano 0,5 mg/mL). Agitare e avviare l'analisi per verificare l'assenza di interferenze strumentali.

3.6.4 Costruzione della retta di calibrazione

Per la costruzione della retta di calibrazione, è stato allestito un set di cinque soluzioni a concentrazione nota (da CR1 a CR5) effettuando diluizioni seriali in vial a partire dalle soluzioni stock a 1 mg/mL degli standard di riferimento, come indicato al punto 3.6.2.

Per garantire la massima precisione quantitativa e compensare le variazioni del volume di iniezione e della risposta strumentale, a ciascun livello di calibrazione è stato addizionato un volume costante di standard interno (squalano). Il volume finale in ciascun vial è stato portato a 1000 μL . I dettagli dei volumi prelevati e delle concentrazioni finali ottenute per ciascun punto della retta sono riportati nella Tabella 2.

	PRELIEVI IN VOLUME			CONCENTRAZIONI FINALI IN VIAL	
	Prelievo Alcaloide 1 mg/ml (μL)	Prelievo Solvente (μL)	Prelievo S.I. (μL)	CAcaloide (mg/ml)	C _{SI} (mg/ml)
CR1	10	490	500	0,01	0,25
CR2	25	475	500	0,025	
CR3	50	450	500	0,05	
CR4	75	425	500	0,075	
CR5	100	400	500	0,1	

Tabella 2

Tutti i livelli di calibrazione così preparati sono stati analizzati in GC-FID replicando le stesse condizioni strumentali utilizzate per i campioni incogniti. Le aree dei picchi cromatografici ottenute sono state riferite all'area dello standard interno, permettendo la costruzione di una curva di calibrazione lineare necessaria per la successiva fase di quantificazione degli alcaloidi minoritari.

3.7 Protocollo operativo per l'analisi qualitativa degli alcaloidi

3.7.1 Analisi di conferma qualitativa mediante GC-MS

L'identificazione cromatografica basata sul tempo di ritenzione richiede una conferma strumentale complementare. A tale scopo, è stata condotta un'analisi qualitativa mediante sistema GC-MS.

In una fase preliminare, sono state acquisite le corse cromatografiche in GC-MS delle singole soluzioni contenenti i materiali di riferimento certificati degli alcaloidi target. Questo passaggio è stato effettuato per registrare i tempi di ritenzione assoluti e i pattern di frammentazione ionica specifici per lo strumento e le condizioni operative in uso, permettendo la creazione di una libreria spettrale interna di riferimento.

Successivamente, per fornire una conferma qualitativa preliminare dell'identità degli analiti osservati in GC-FID e confermare l'identità degli analiti nella matrice reale, la verifica strutturale è stata eseguita su un campione in sequestro altamente rappresentativo. Per ottimizzare le tempistiche analitiche, la scelta è ricaduta sul reperto G2, il quale presentava in GC-FID una risposta analitica ottimale e ben definita per tutti gli alcaloidi target. Tuttavia, l'analisi del solo campione G2 non esclude possibili co-eluzioni negli altri campioni, le cui diverse composizioni potrebbero generare specifiche interferenze.

3.7.2 Condizioni strumentali per l'analisi di conferma qualitativa GC-MS

L'analisi di conferma strutturale è stata condotta impiegando un sistema gascromatografico accoppiato a spettrometro di massa Agilent 5977B GC/MSD.



Figura 15: spettrometro di massa Agilent 5977B GC/MSD

La separazione cromatografica è stata effettuata con una colonna capillare Agilent HP-5MS UI avente una lunghezza di 30 m, un diametro interno di 0,25 mm e uno spessore del film della fase stazionaria (5% difenil / 95% dimetil polisilossano) pari a 0,25 μm .

Il gas di trasporto utilizzato è stato l'elio, mantenuto in modalità di flusso costante a un valore di 0,8 mL/min.

L'introduzione del campione è avvenuta tramite autocampionatore con un volume di iniezione impostato a 1,0 μL . L'iniettore è stato operato in modalità split con un rapporto di ripartizione di 40:1 e mantenuto a una temperatura costante di 280 °C.

Per minimizzare i fenomeni di trascinamento, la sequenza di lavaggio della siringa è stata strutturata come segue:

- lavaggi con solvente A (eptano): 3 cicli in pre-iniezione e 2 cicli in post-iniezione (volume 4 μL).
- Lavaggi con solvente B (miscela eptano/isopropanolo 30:70 v/v): 3 cicli in pre-iniezione e 2 cicli in post-iniezione (volume 4 μL).
- Risciacquo con il campione: 2 cicli eseguiti prelevando 2 μL di campione prima dell'iniezione effettiva.

Il programma di temperatura del forno cromatografico ha previsto una corsa analitica della durata totale di 21,25 minuti.

Il gradiente termico è stato impostato con un'isoterma iniziale a 220 °C mantenuta per 2,00 minuti, seguita da una rampa di riscaldamento di 8 °C/min fino al raggiungimento della temperatura target di 310 °C. Tale valore è stato mantenuto in isoterma finale per i restanti 8,00 minuti.

Il trasferimento degli analiti dalla colonna allo spettrometro è avvenuto attraverso l'apposita linea di trasferimento termostata a 250 °C.

Lo spettrometro di massa ha operato avvalendosi di una sorgente a ionizzazione elettronica settata a un'energia di ionizzazione fissa di 70,0 eV. Le temperature operative della sorgente ionica e dell'analizzatore a quadrupolo sono state mantenute rispettivamente a 230 °C e 150 °C.

L'acquisizione degli spettri è stata effettuata in modalità Full Scan, registrando gli ioni generati in un intervallo di massa (m/z) compreso tra 40 e 600 amu. Per preservare l'integrità del filamento e del rivelatore durante l'eluizione della miscela solvente, è stato applicato un ritardo di acquisizione (Solvent delay) pari a 4,00 minuti dall'inizio della corsa cromatografica.

3.7.3 Analisi gascromatografica senza derivatizzazione

L'intero estratto analitico è stato sottoposto ad analisi senza previa derivatizzazione. Questo approccio, che coinvolge anche i derivati più polari della cocaina, prende spunto dalle procedure descritte nel manuale operativo internazionale UNODC per l'analisi dei materiali sequestrati [31]. Nella sezione dedicata all'analisi gascromatografica, il protocollo ufficiale prevede l'eluizione di questi analiti tal quali, riportandone i tempi di ritenzione relativi rispetto alla cocaina. Poiché i principi di separazione, i liner e le colonne capillari impiegate nei sistemi GC-FID e GC-MS sono affini, questa procedura è stata traslata all'analisi di conferma in massa. Sebbene la derivatizzazione (ad esempio la silylazione del gruppo carbossilico libero della benzoilecgonina) consenta di ottimizzare la volatilità e minimizzare l'allargamento della banda cromatografica, l'iniezione diretta adottata nel lavoro di tesi è risultata un compromesso adeguato. Ha permesso di snellire la fase di preparazione del campione e ha offerto il notevole vantaggio operativo di poter analizzare direttamente i medesimi vial sia in GC-FID sia in GC-MS, ottimizzando le tempistiche di laboratorio.

3.8 Protocollo operativo per l'analisi dei solventi e delle impurezze volatili

3.8.1 Scopo e applicazione del metodo

Il presente metodo descrive la procedura operativa per l'estrazione, la separazione e l'identificazione dei solventi residui e delle impurezze organiche volatili (VOCs) presenti nei campioni di cocaina in sequestro. L'obiettivo è l'ottenimento di un fingerprint chimico legato ai processi di raffinazione clandestina, utile per stabilire correlazioni tra panetti e tracciare le filiere di produzione.

3.8.2 Precauzioni e norme di sicurezza

Oltre alle norme previste per la manipolazione di sostanze ad azione stupefacente, l'operatore deve prestare particolare attenzione all'impiego del dimetilsolfossido (DMSO). Pur non essendo altamente infiammabile, il DMSO è un solvente in grado di penetrare rapidamente attraverso la cute e le membrane mucose, potendo veicolare nel circolo sistemico eventuali sostanze tossiche o stupefacenti in esso disciolte. È pertanto obbligatorio l'uso di adeguati dispositivi di protezione individuale, operando costantemente sotto cappa aspirante.

3.8.3 Principio del metodo

Il metodo si basa sull'estrazione indiretta degli analiti volatili mediante microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME). La disaggregazione della matrice solida è garantita dalla solubilizzazione in DMSO, mentre la migrazione dei composti organici volatili verso la fase gassosa è termodinamicamente favorita dall'aggiunta di una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio, tramite il cosiddetto "salting out". La separazione cromatografica e l'identificazione strutturale avvengono mediante un sistema gascromatografico accoppiato a uno spettrometro di massa, con desorbimento termico diretto degli analiti dalla fibra polimerica all'iniettore dello strumento.

Per lo sviluppo del protocollo analitico e l'ottimizzazione dei parametri strumentali relativi all'estrazione e all'identificazione dei solventi residui, si è fatto parzialmente riferimento all'impostazione metodologica descritta in letteratura [2], adattando le condizioni di campionamento in spazio di testa e le rampe termiche alle specifiche esigenze operative del laboratorio.

3.8.4 Materiali

- Gascromatografo Thermo Trace 1600 GC accoppiato a spettrometro di massa ISQ, dotato di autocampionatore per estrazione SPME (sistema TriPlus RSH) e gestito mediante software Chromeleon 7.3.2.
- Fibra Restek PAL SPME Arrow con rivestimento in polidimetilsilossano (PDMS), spessore del film pari a 100 μm e lunghezza di 10 mm.
- Colonna capillare in silice fusa Thermo Scientific TG-1MS (lunghezza 60,00 m, diametro interno 0,25 mm, spessore del film della fase stazionaria pari a 1,0 μm).
- Bilancia analitica con sensibilità di 0,01 mg.
- Vials in vetro da 20 mL per analisi in spazio di testa, dotati di tappi magnetici a vite con setti a tenuta ermetica in PTFE/silicone.
- DMSO di grado analitico.
- Soluzione acquosa satura di cloruro di NaCl.
- Micropipette Eppendorf a volume variabile.

3.8.5 Condizioni ambientali

Le operazioni di pesata, prelievo dei solventi e allestimento dei vials devono essere eseguite a temperatura ambiente (compresa tra i 20 e i 25 °C).

3.8.6 Estrazione mediante microestrazione in fase solida (HS-SPME)

Il campionamento degli analiti in spazio di testa viene eseguito in modalità completamente automatizzata mediante l'autocampionatore (sistema TriPlus RSH). Le fasi operative dell'estrazione sono così strutturate:

- incubazione: il vial sigillato viene trasferito nel forno dell'autocampionatore e incubato per 5,0 minuti alla temperatura di 70,0 °C, sotto agitazione costante impostata a 250 rpm (con cicli alternati di 10 secondi di attività seguiti da 2 secondi di pausa).
- Estrazione: al termine dell'incubazione, la fibra polimerica in PDMS viene introdotta ed esposta allo spazio di testa del vial per 15,0 minuti, mantenendo la temperatura a 70,0 °C, al fine di raggiungere l'equilibrio di ripartizione degli analiti tra la fase gas e il rivestimento della fibra.

- Desorbimento: la fibra arricchita viene inserita nell'iniettore del gascromatografo, dove rimane per 2,0 minuti a una profondità di penetrazione di 65 mm, consentendo rapidamente rilascio termico degli analiti verso la colonna capillare.
- Lavaggio e condizionamento: per prevenire fenomeni di trascinamento tra analisi successive, la procedura prevede il lavaggio della fibra in un'apposita “wash station” per 60 secondi prima e dopo ogni estrazione. Segue una fase di condizionamento termico nel “conditioning port” a 230 °C, composta da 2,0 minuti di pre-desorbimento e 5,0 minuti di post-desorbimento.

3.8.7 Condizioni gascromatografiche e spettrometriche

Le condizioni operative strumentali ottimizzate per la separazione e l'identificazione dei composti volatili sono le seguenti:

- Gas di trasporto: elio, mantenuto in modalità di flusso costante al valore di 1,000 mL/min.
- Modalità di iniezione: iniezione SPME con modalità splitless.
- Iniettore: temperatura mantenuta costante a 150,0 °C, con un flusso di spurgo del setto di 5,000 mL/min.
- Programma di temperatura del forno: durata totale della corsa analitica pari a 22,50 minuti. Inizio con un'isoterma a 40,0 °C mantenuta per 2,00 minuti; successivo incremento termico con rampa di 10,00 °C/min fino a raggiungere il valore di 150,0 °C; seconda rampa di riscaldamento a 20,00 °C/min fino al raggiungimento del valore target di 240,0 °C (mantenuto per 0,00 minuti in quanto termine della corsa).
- Rivelatore MS: temperatura operativa della linea di trasferimento a 290 °C e temperatura della sorgente ionica impostata a 300 °C. L'acquisizione dei dati è condotta in modalità Full Scan, registrando i segnali in un intervallo di rapporto massa/carica (m/z) compreso tra 35 e 400.

3.9 Procedimento

3.9.1 Campionamento e conservazione per l'analisi dei VOCs

Al fine di preservare l'integrità del profilo dei composti organici volatili (VOCs) ed evitare la dispersione dei solventi residui, immediatamente dopo l'apertura del panetto, un'aliquota di circa 1 g di cocaina viene prelevata dalla matrice solida e rapidamente trasferita all'interno di una Falcon da 50 mL. Per garantire una chiusura ermetica e inibire fenomeni di evaporazione o scambio con l'ambiente esterno, la giuntura del tappo a vite viene sigillata mediante l'applicazione di pellicola Parafilm.

I reperti così allestiti vengono stoccati alla temperatura di -18°C in un freezer, assicurando la conservazione del fingerprint chimico volatile fino al momento dell'effettiva estrazione analitica.

3.9.2 Preparazione della soluzione stock standard

Per la preparazione della soluzione stock standard, impiegata come standard interno per il monitoraggio analitico e la normalizzazione dei segnali cromatografici, sono stati prelevati 20 µL di toluene-D8 puro (materiale di riferimento certificato Lipomed). Tale aliquota è stata trasferita all'interno di un matraccio tarato da 10 mL e portata a volume impiegando dimetilsolfossido come solvente di diluizione. La miscela così ottenuta è stata omogeneizzata mediante ripetuti capovolgimenti del matraccio. Da questa soluzione madre sono stati prelevati gli esatti 20 µL da aggiungere a ciascun vial durante la successiva fase di allestimento del campione in spazio di testa.

3.9.3 Preparazione della soluzione di bianco del campione

Preparare la soluzione di bianco trasferendo in un vial per spazio di testa da 20 mL esattamente 4,3 mL di DMSO e 1 mL di soluzione satura di NaCl acquoso, addizionandoli con 20 µL della soluzione di standard interno (toluene D-8). Sigillare ermeticamente il vial, agitare e avviare l'analisi strumentale in HS-GC-MS per verificare l'assenza di interferenze o contaminanti di fondo.

3.9.4 Preparazione del campione di prova per l'analisi in spazio di testa

Per l'indagine dei solventi residui, all'interno di un vial in vetro da 20 mL per analisi in spazio di testa vengono pesati 200 mg di cocaina precedentemente omogeneizzata.

Al fine di garantire la completa disaggregazione della matrice solida, al campione vengono addizionati 4,3 mL di DMSO. Successivamente, per favorire termodinamicamente la ripartizione dei composti organici volatili verso la fase gassosa, si aggiunge 1,0 mL di una soluzione acquosa satura di NaCl. Infine, la miscela viene addizionata con 20 μ L della soluzione stock standard precedentemente allestita. Il vial viene immediatamente sigillato con l'apposito tappo magnetico a vite dotato di setto in PTFE/silicone, per garantire la perfetta tenuta ermetica ed evitare perdite precoci di analiti volatili verso l'ambiente esterno.



Figura 16: campione di cocaina pesato alla bilancia analitica



Figura 17: campione contenuto in tubo Falcon, vial da 20 ml per HS-SPME, spatola

3.10 Conservazione dei campioni a breve e medio termine

Le aliquote dei campioni estratti, non immediatamente sottoposte a determinazione analitica strumentale, sono state trasferite in tubi Falcon da 10 mL. Al fine di garantire la massima tenuta ermetica del sistema e prevenire fenomeni di evaporazione differenziale della miscela solvente (costituita da isopropanolo ed eptano), la chiusura filettata di ciascun tubo è stata ulteriormente sigillata mediante l'applicazione di pellicola di Parafilm.

I campioni così preparati sono stati stoccati in ambiente refrigerato alla temperatura controllata di 4°C, in totale assenza di luce, per minimizzare i processi di degradazione del principio attivo e delle altre sostanze presenti.



Figura 18: conservazione dei campioni

3.11 Analisi di stabilità a breve e medio termine

La scelta di monitorare la stabilità a breve e medio termine degli estratti conservati risponde a un'esigenza fondamentale sia scientifica che operativa per i laboratori ADM. Determinare l'intervallo temporale in cui un reperto mantiene inalterato il proprio profilo quantitativo in soluzione è infatti cruciale qualora si rendano necessarie controanalisi o in caso di fermo strumentale.

Lo studio ha preso in considerazione due variabili critiche legate al sistema solvente-contenitore:

1. stabilità chimica dell'analita: la conservazione a 4°C è stata finalizzata a rallentare la cinetica di idrolisi spontanea a cui la cocaina può andare incontro in soluzione, monitorando la potenziale comparsa di prodotti di degradazione.
2. Integrità del sistema di stoccaggio: l'utilizzo di una miscela di solventi a polarità differenziata come isopropanolo ed eptano ha richiesto una valutazione critica della

tenuta dei materiali. Sebbene il polipropilene dei tubi Falcon garantisca un'ottima inerzia chimica nel breve periodo, l'elevata volatilità dell'isopropanolo e l'affinità dei vapori di eptano con le matrici polimeriche (come il Parafilm) rappresentano i fattori limitanti principali per la stabilità a lungo termine, a causa del rischio di evaporazione e conseguente alterazione della concentrazione dell'analita.

L'indagine è stata condotta su 5 lotti rappresentativi, appositamente selezionati in quanto presi in carico dal laboratorio durante il mio tirocinio, permettendomi di seguire l'evoluzione del reperto fin dal suo ingresso. Da tali lotti sono state isolate un totale di 9 campioni. Nel dettaglio, lo studio di stabilità ha preso in esame i campioni:

- A1 e A4
- B1, B4 e B7
- C
- D1 e D5
- H

Per ciascuno dei campioni rappresentativi selezionati, le misurazioni in GC-FID sono state acquisite secondo il seguente schema:

- T_0 : analisi immediata a seguito dell'estrazione.
- T_1 : analisi dopo 1 settimana di stoccaggio a 4°C.
- T_2 : analisi dopo 2 settimane.
- T_3 : analisi dopo 3 settimane.
- T_4 : analisi dopo 4 settimane, termine del periodo di monitoraggio.

I dati ottenuti per ciascun intervallo sono stati successivamente confrontati con i valori registrati al T_0 per tracciare il profilo di stabilità in soluzione.

RISULTATI

4.1 Caratterizzazione macroscopica e documentazione fotografica

Prima di procedere con l'indagine chimico-analitica, l'ispezione visiva e la catalogazione macroscopica dei reperti hanno fornito i primi dati per l'attività di intelligence doganale. L'apertura dei panetti sequestrati ha permesso di mappare il confezionamento e i loghi impressi direttamente sulla matrice stupefacente dai cartelli produttori.

L'analisi dei lotti presi in esame ha restituito tre scenari operativi diversi ben rappresentati dai sequestri identificati come 1, 2 e 3, intercettati presso il Porto di Vado Ligure nell'estate 2026. La riproduzione dei dati e delle immagini è stata preventivamente autorizzata dall'autorità competente; le informazioni sono state riportate esclusivamente in forma autorizzata e anonimizzata

Il lotto 1, rinvenuto all'interno di un container di platani proveniente dalla Colombia, ha mostrato una omogeneità macroscopica. Come riassunto nella Tabella 3, l'intero campionamento (dal reperto 1A al 1T) presentava involucri esterni accomunati dalla dicitura "M<->3" seguiti da un numero variabile (Figura 19) e un unico logo impresso sul panetto a nudo, raffigurante la scritta "M<->3" su uno sfondo a rombi (Figura 20).

Campione	Involucro	Logo	Luogo di ritrovamento	Provenienza
1A	M<->3 (71)	M<->3 sfondo rombi	container platani	Colombia
1B	M<->3 (71)			
1C	M<->3 (68)			
1D	M<->3 (96)			
1E	M<->3 (65)			
1F	M<->3 (70)			
1G	M<->3 (77)			
1H	M<->3 (83)			
1I	M<->3 (96)			
1L	M<->3 (77)			
1M	M<->3 (83)			
1N	M<->3 (78)			
1O	M<->3 (96)			
1P	M<->3 (77)			
1Q	M<->3 (96)			
1R	M<->3 (96)			
1S	M<->3 (77)			
1T	M<->3			

Tabella 3



Figura 19: involucro panetti sequestro 1



Figura 20: logo panetti sequestro 1

Al contrario, il lotto 2, trovato in un container di banane proveniente dall'Ecuador, ha mostrato un'estrema eterogeneità (Tabella 4).

Campione	Involucro	Logo	Luogo di ritrovamento	Provenienza
2 A1	Serbia	D	Container banane	Ecuador
2 A2	Coniglio	BOSS		
2 B1	Serbia	BOSS		
2 B2	Coniglio	LEONE + 77		
2 C1	Serbia	D		
2 C2	Coniglio	BOSS		
2 D1	Serbia	D		
2 D2	Coniglio	BOSS		
2 E1	Serbia	D		
2 E2	Coniglio	LEONE + 77		
2 F1	Serbia	D		
2 F2	Coniglio	509		
2 G1	Serbia	D		
2 G2	Coniglio	22		
2 H1	Serbia	D		
2 H2	Coniglio	NO LOGO		
2 I1	Serbia	D		
2 I2	Coniglio	509		
2 L1	Serbia	D		
2 L2	Coniglio	BOSS		
2 M1	Coniglio	LEONE + 77		
2 M2	Coniglio	BOSS		
2 N1	Coniglio	TOYOTA		
2 N2	Coniglio	BOSS		
2 O1	Coniglio	509		
2 O2	Coniglio	509		

Tabella 4

L'involucro esterno era di due tipi: uno caratterizzato da nastro adesivo con la bandiera della Serbia (Figura 21) e l'altro contrassegnato dal disegno di un coniglio (Figura 22).



Figura 21: involucro "Serbia"



Figura 22: involucro "Coniglio"

Ancora più diversificata è risultata la marchiatura dei panetti a nudo: all'interno dello stesso carico sono stati rinvenuti sette loghi differenti ("LEONE + 77", "BOSS", "22", "TOYOTA", "509", "D" nelle Figure 22-28) e un solo campione del tutto privo di marchiatura ("NO LOGO", in Figura 29).

Un aspetto particolare è emerso proprio dall'ispezione di quest'ultimo reperto, la cui morfologia si è rivelata anomala. Come visibile nella sezione trasversale documentata nella Figura 29, il panetto presentava uno spesso strato esterno costituito da un materiale inerte riconducibile a gesso, sagomato per replicare la forma e il volume della sostanza pressata, che racchiudeva un nucleo interno riempito esclusivamente da polistirolo.



Figura 22: logo "LEONE"



Figura 23: logo "77"



Figura 24: logo "BOSS"



Figura 25: logo "22"



Figura 26: logo "TOYOTA"

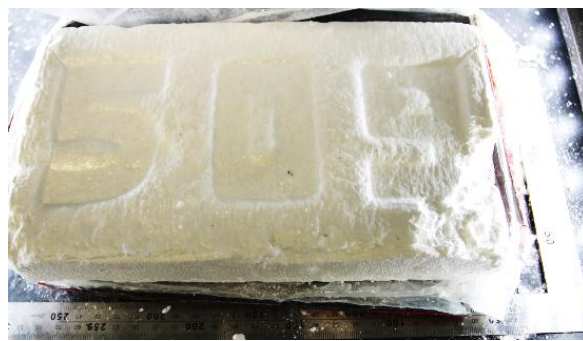


Figura 27: logo "509"



Figura 28: logo "D"

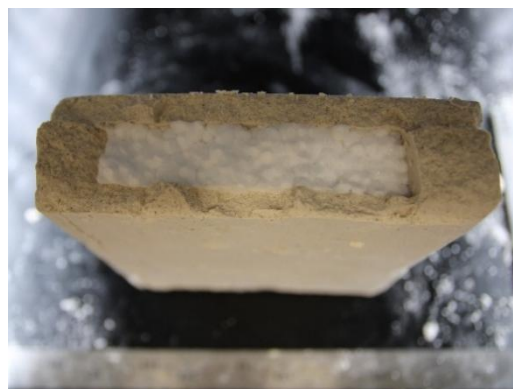


Figura 29: panetto "NO LOGO" con aspetto anomalo

Il terzo scenario è rappresentato dal lotto 3 (Tabella 5).

Campione	Involucro	Logo	Luogo di ritrovamento	Provenienza
3A	orologio	Sbo	Sott'acqua	Ignota
3B	orologio	Sbo		
3C	ufo	Fuoco		
3D	fedex	Fed		
3E	plastica gialla	Ignoto		
3F	fedex	Fed		
3G	orologio	Sbo		
3H	hermes	HERMES		
3I	orologio	Sbo		
3L	hermes	HERMES		
3M	orologio	Sbo		
3N	fedex	Fed		

Tabella 5

Recuperati in ambiente sottomarino, questi campioni hanno mostrato un grado di variabilità paragonabile al lotto 2, ma con la criticità aggiuntiva della prolungata esposizione all'acqua marina. La documentazione fotografica ha evidenziato un campionario eterogeneo di accoppiamenti tra involucro esterno e marchio a bassorilievo. Nello specifico, sono stati

reperiti panetti con involucro "FedEx" con logo "Fed", involucro "HERMES" e logo "HERMES", "involucro "ufo" con logo "fuoco", involucro "orologio" e logo "Sbo", oltre a un singolo campione avvolto in nastro di plastica gialla con logo non determinabile.



Figura 30: involucro "FedEx"



Figura 31: logo "Fed"



Figura 32: involucro "HERMES"



Figura 33: logo "HERMES"



Figura 34: involucro "ufo"



Figura 35: logo "fuoco"



Figura 36: involucro "orologio"

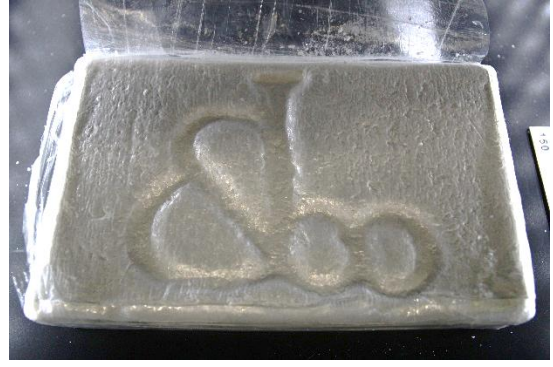


Figura 37: logo "Sbo"

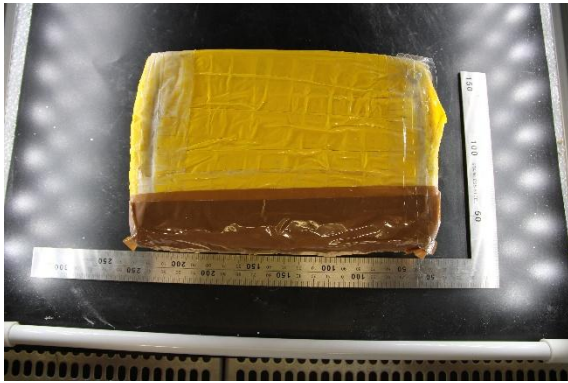


Figura 38: involucro plastica gialla



Figura 39: logo non determinabile

4.2 Screening composizionale mediante spettroscopia FT-IR

L'indagine preliminare condotta in spettroscopia FT-IR ha permesso di confermare la natura della sostanza e identificare gli agenti da taglio impiegati in concentrazioni maggioritarie dai cartelli produttori. L'elaborazione degli spettri acquisiti è stata effettuata attraverso la funzione “composite match” del software OMNIC, interrogando librerie forensi internazionali validate. Essendo un dato derivato dalla sola sovrapposizione spettrale e privo di riscontro con una curva di calibrazione a standard noti, il risultato va interpretato unicamente come screening qualitativo e semi-quantitativo preliminare.

A titolo esemplificativo, si riporta l'esito dell'analisi condotta sul Campione A1. L'algoritmo di deconvoluzione ha restituito un match composito indicando che il reperto non era costituito da una molecola pura, ma da una miscela binaria. Nello specifico, il miglior grado di correlazione statistica (Match 1) ha identificato la cocaina cloridrato come principio attivo e l'alpha-mannitolo come agente da taglio inerte. Il software ha ricostruito lo spettro sperimentale attribuendo pesi matematici del 69,92% e del 30,08% agli spettri di riferimento selezionati. Tali valori descrivono il contributo dei singoli spettri al modello matematico e non corrispondono direttamente alle percentuali in massa dei componenti né al grado di purezza del campione.

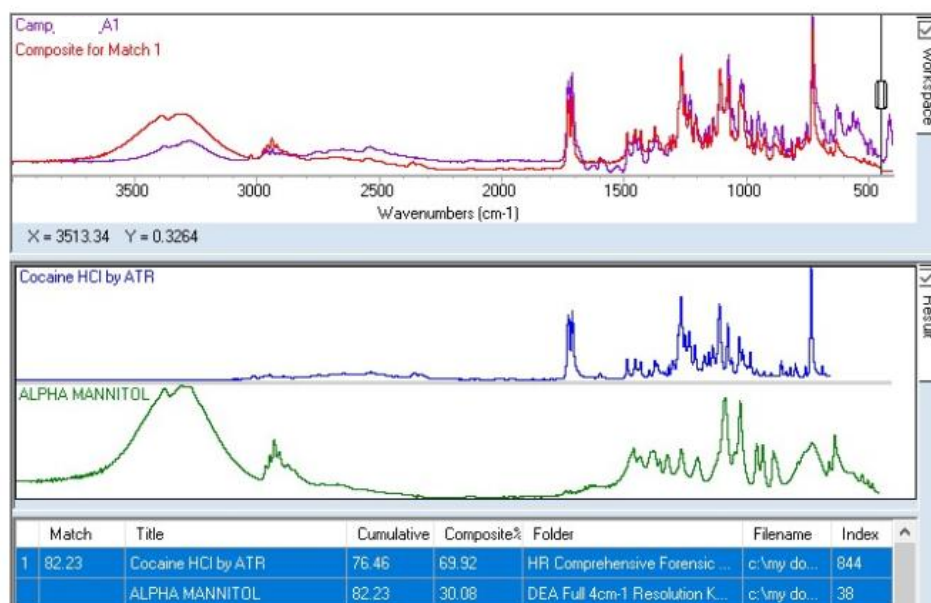


Figura 40: spettro FT-IR del campione A1, composto da cocaina e alfa-mannitolo

L'importanza dello screening preliminare in FT-IR si è rivelata determinante nell'identificazione di reperti anomali all'interno dello stesso lotto di sequestro, come nel caso del Campione A5.

Interrogando il software con la medesima funzione di “composite match”, l'algoritmo ha tentato matematicamente di combinare due spettri per riprodurre quello del campione in esame. Tuttavia, come si evince dai risultati, il sistema ha combinato per il 67,22% lo spettro dell'alfa-mannitolo e per il 32,78% lo spettro del D-mannitolo, al fine di raggiungere il 100% della composizione.

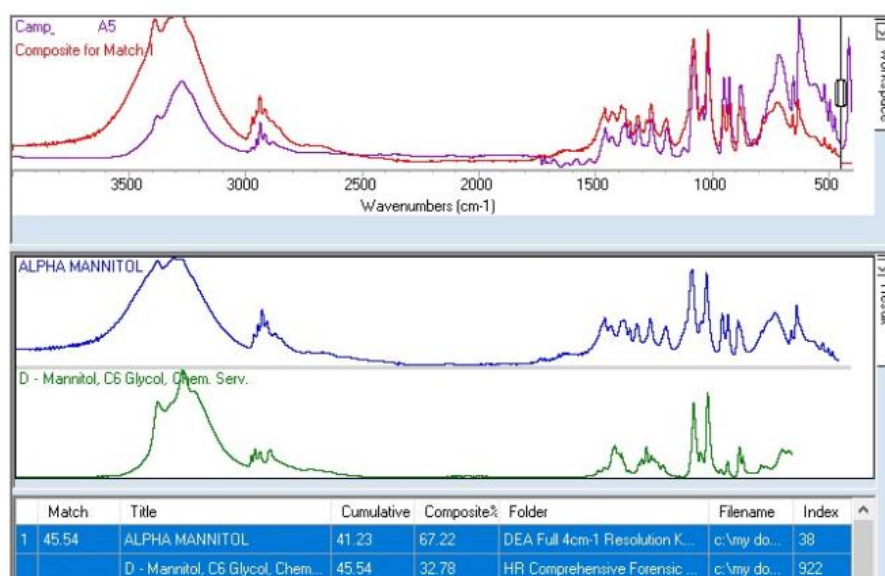


Figura 41: spettro FT-IR del campione A5, composto da alfa-mannitolo e D-mannitolo

L'analisi del campione G10 ha restituito un profilo spettroscopico distinto. Come si evince dai risultati della prima corrispondenza (Match 1), il sistema ha combinato per l'86,03% lo spettro della fenacetina e per il 13,97% lo spettro dell'azatioprina al fine di riprodurre il 100% della composizione stimata.

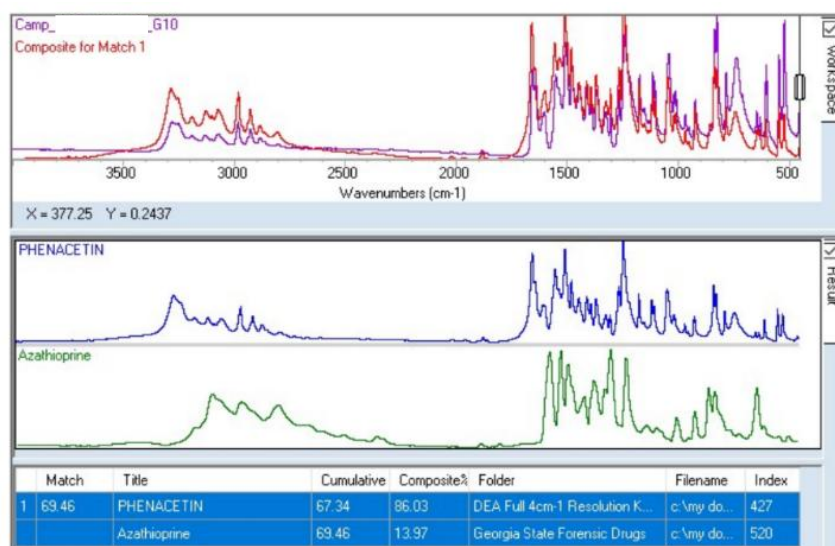


Figura 42: spettro FT-IR del campione G10, composto da fenacetina e azatioprina

Passando all'analisi del campione di natura gessosa (campione 2 H2) l'interrogazione del software tramite "composite match" ha restituito risultati del tutto compatibili con solfati di calcio. In questo caso, per la migliore corrispondenza, l'algoritmo ha calcolato una combinazione matematica costituita per il 52,90% dallo spettro del "Plaster of Paris, Hydrated Calcium Sulfate" (gesso di Parigi) e per il restante 47,10% dallo spettro del "Satin Spar, Gypsum, hydrated calcium sulfate" (gesso fibroso).

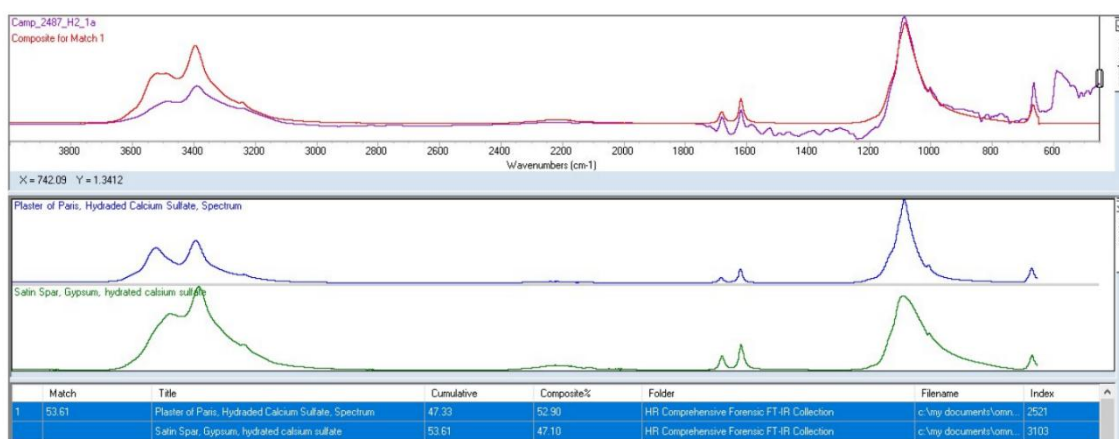


Figura 43: spettro FT-IR del campione 2 H2, composto da gesso

4.3 Valutazione preliminare della linearità e curve di calibrazione

I risultati ottenuti dall'analisi cromatografica dei cinque livelli di calibrazione hanno mostrato una relazione approssimativamente lineare della risposta del rivelatore FID per tutti e cinque gli alcaloidi minoritari indagati, nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,010 e 0,100 mg/mL.

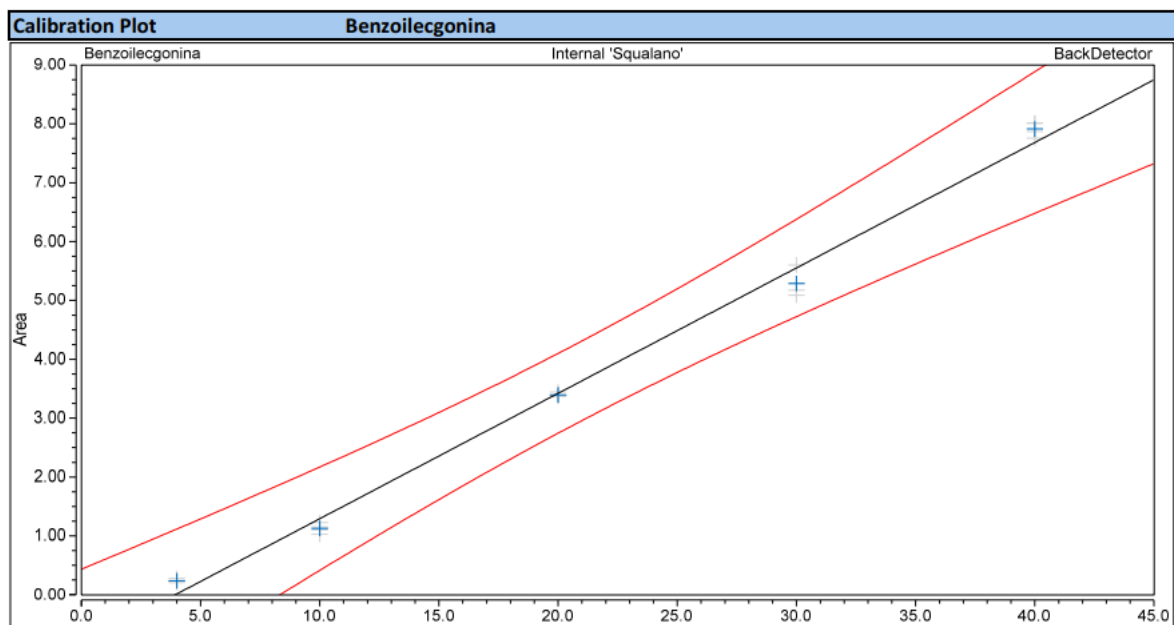
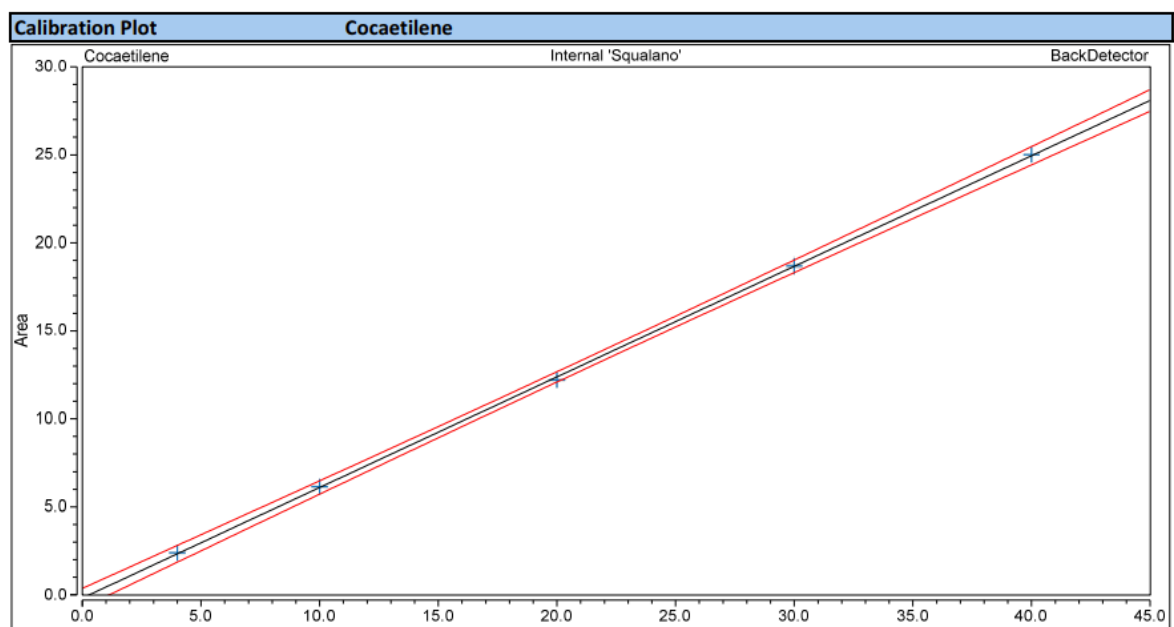
Le rette di calibrazione sono state generate dal software di acquisizione Chromeleon calcolando una regressione lineare. Le equazioni delle rette sono state espresse nella formula $y = mx + q$, dove y rappresenta il rapporto tra l'area del picco dell'analita e l'area del picco dello standard interno (squalano), mentre x rappresenta il rapporto tra le concentrazioni dell'analita e dello standard interno ($C_{\text{analita}}/C_{\text{S.I.}}$).

Nella Tabella 5 sono riassunti i parametri estrapolati per ciascun alcaloide di riferimento.

<i>Analita</i>	Equazione della retta	R^2
<i>Benzoilecgonina</i>	$y = 0,2131x - 0,008391$	0,9948
<i>Cocaetilene</i>	$y = 0,6283x - 0,001810$	0,9999
<i>Ecgonina metilestere</i>	$y = 0,4986x - 0,006048$	0,9985
<i>Tropacocaina</i>	$y = 0,5730x - 0,001305$	0,9993
<i>Norcocaina</i>	$y = 0,5746x - 0,001980$	0,9997

Tabella 5

Come si evince dai dati riportati in tabella, tutti gli alcaloidi hanno mostrato un coefficiente di determinazione (R^2) ampiamente superiore al limite di accettabilità ($> 0,99$), con valori prossimi all'unità (fino a 0,9999 per il cocaetilene).

*Figura 44: curva di calibrazione della benzoilecgonina**Figura 45: curva di calibrazione della cocaetilene*

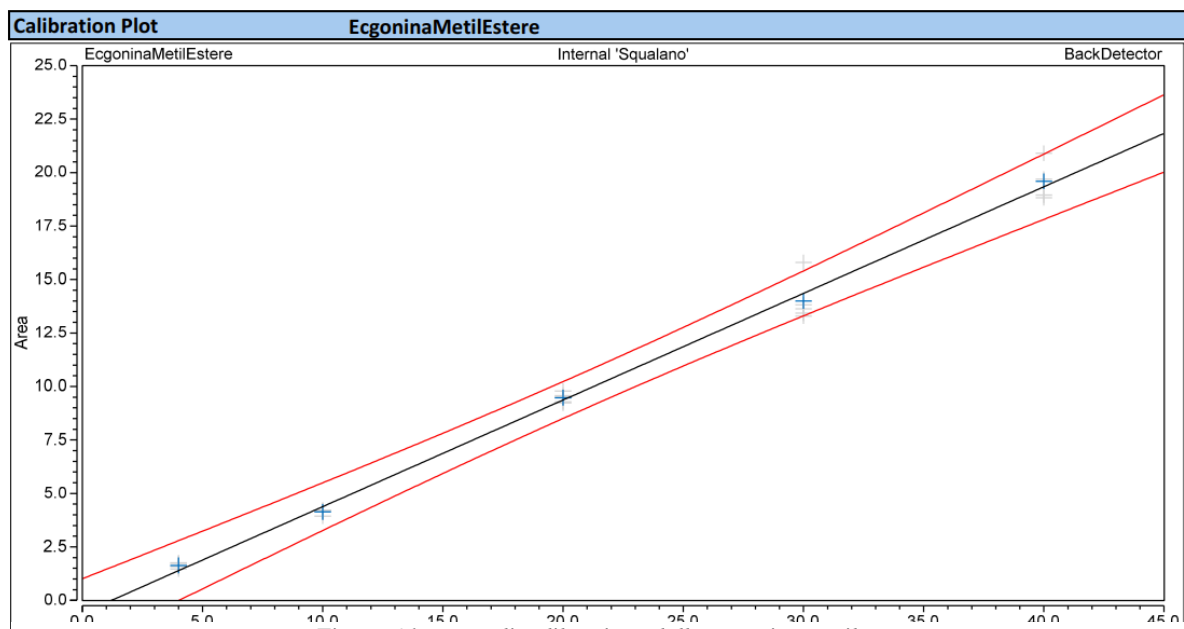


Figura 46: curva di calibrazione della ecgonina metilestere

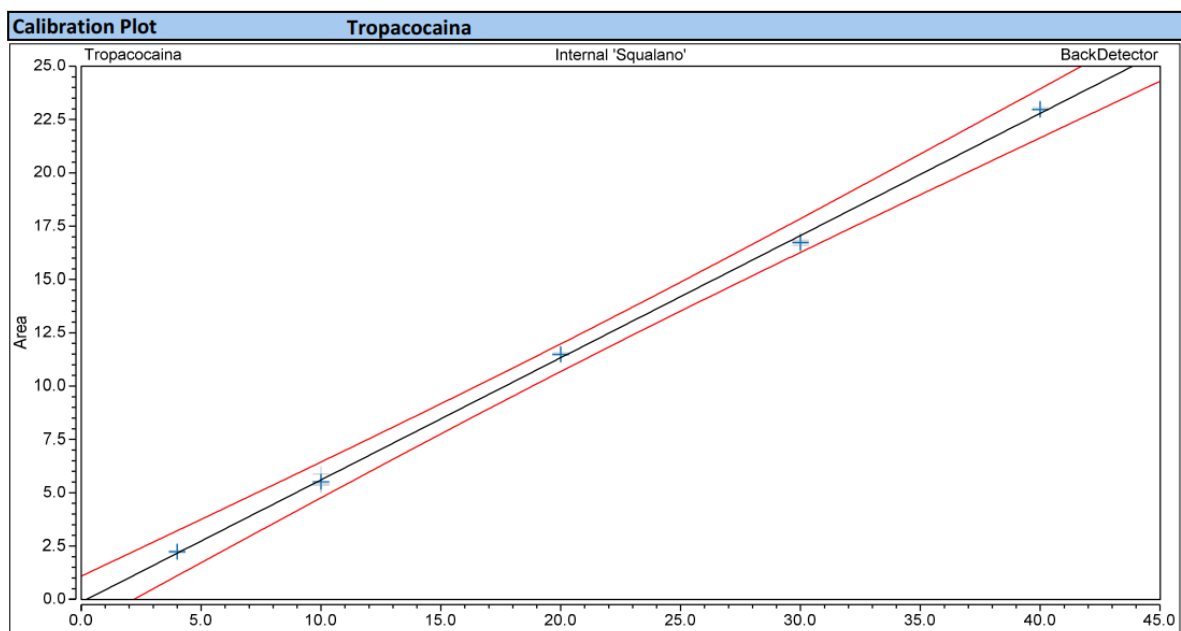


Figura 47: curva di calibrazione della tropacocaina

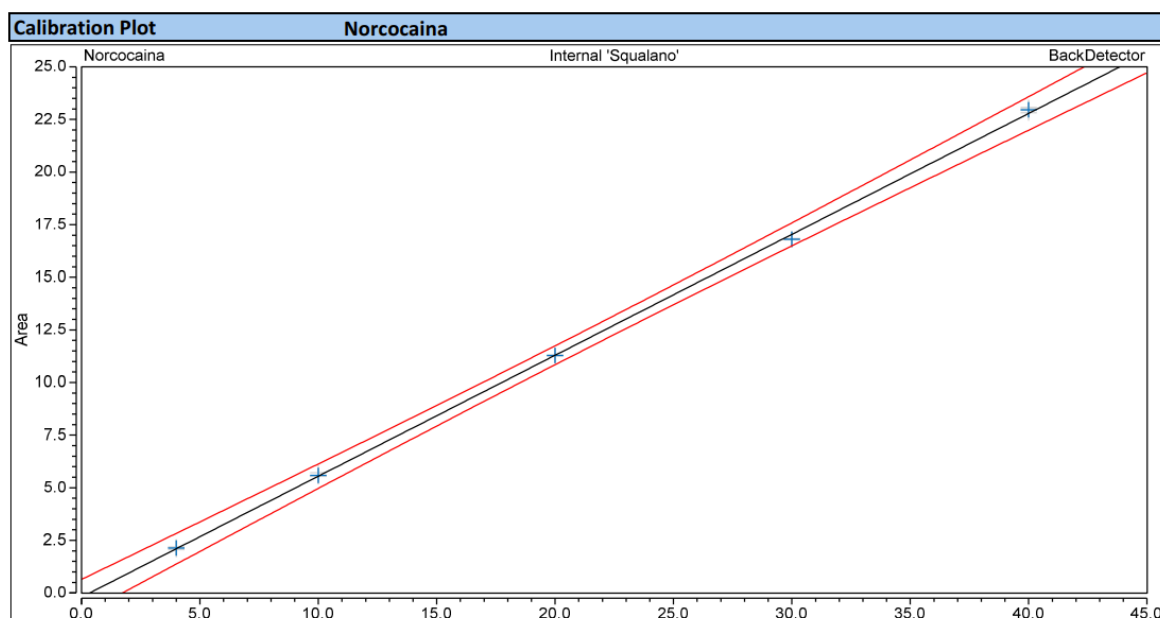


Figura 48: curva di calibrazione della norcocaina

4.4 Analisi quantitativa degli alcaloidi

Dopo aver verificato l'assenza di interferenze o contaminanti di fondo nella soluzione di bianco, i segnali cromatografici ottenuti dall'analisi dei campioni in sequestro sono stati classificati in base ai limiti di sensibilità del metodo strumentale. Nello specifico, il livello di concentrazione del primo punto della retta di calibrazione (CR1, pari a 0,010 mg/mL) è stato considerato come limite di quantificazione (LOQ) operativo per tutti gli analiti a condizione che il rapporto segnale rumore (S/N) per tale concentrazione non sia inferiore a 10:1. Sulla base di tale parametro, i risultati per ciascun alcaloide minoritario all'interno dei campioni sono stati suddivisi in tre categorie:

- Valori quantificabili ($\geq$ LOQ): corrispondono ai campioni in cui l'analita ha restituito un segnale superiore o uguale al primo punto della retta di calibrazione (CR1, pari a 0,010 mg/mL), a condizione che il rapporto S/N per tale concentrazione non sia inferiore a 10:1. Per questi composti è stato possibile calcolare un valore di concentrazione esatto interpolando l'area del picco con l'equazione della retta.
- Valori in tracce ($<$ LOQ e $>$ LOD): corrispondono ai campioni in cui l'analita è stato identificato dal rivelatore (rapporto segnale/rumore sufficiente), ma la cui concentrazione è risultata inferiore al primo punto della retta (0,010 mg/mL) e il rapporto S/N è compreso tra 10:1 e 3:1. In questi casi, il composto è qualitativamente presente ("in tracce"), ma non quantificabile con l'accuratezza statistica richiesta.

- Non rilevato: assegnato ai campioni in cui l'analita era assente o presente a concentrazioni inferiori al limite di rivelabilità (LOD) del sistema, non producendo alcun picco cromatografico integrabile.

Questa categorizzazione ha permesso di mappare le frequenze di comparsa degli alcaloidi minoritari e di evidenziare pattern specifici utili per l'inserimento nel database ADM, discriminando tra marker presenti in concentrazioni significative e impurezze a livello di tracce.

1	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEtere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
B1_1a	39,4	0,0	0,0	579,2	6,9
B1_2a	50,7	0,0	0,0	747,6	7,2
B2_1a	68,1	3,5	0,0	20,5	24,0
B2_2a	65,6	4,1	0,0	8,8	32,3
B3_1a	2,4	0,0	0,0	0,0	7,2
B3_2a	4,2	0,0	0,0	0,0	6,5
B4_1a	14,3	1,8	0,0	16,1	13,1
B4_2a	15,0	2,0	0,0	0,0	19,1
B5_1a	4,4	1,7	0,0	11,7	15,8
B5_2a	3,7	0,0	0,0	0,0	11,5

Tabella 6

2	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEtere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
B1_1a	78,4	1,0	0,0	133,3	5,3
B1_2a	90,6	1,1	0,0	158,0	4,7
B2_1a	112,4	2,6	0,0	182,5	4,4
B2_2a	99,9	1,8	0,0	94,2	3,6
B3_1a	233,2	4,3	0,0	242,2	5,3
B3_2a	61,8	3,7	0,0	196,2	0,0
B4_1a	175,1	4,0	0,0	145,7	4,0
B4_2a	47,6	3,2	0,0	170,6	3,6

Tabella 7

3	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A_1a	20,0	0,0	0,0	290,2	6,7
A_2a	8,1	0,0	0,0	158,0	7,3
B_1a	36,1	0,0	0,0	32,3	5,3
B_2a	12,5	0,0	0,0	79,8	3,3
C_1a	61,0	0,0	0,0	258,6	8,6
C_2a	17,1	0,0	0,0	157,5	5,7
D_1a	105,0	0,0	0,0	160,4	9,5
D_2a	27,7	0,0	0,0	191,7	4,6
E_1a	41,3	0,0	0,0	233,2	8,1
E_2a	9,6	0,0	0,0	18,7	4,0
F_1a	5,0	0,0	0,0	11,5	4,8
F_2a	13,6	0,0	0,0	105,3	8,2

Tabella 8

4	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A1_1a	3,4	0,0	0,0	7,6	0,0
A1_2a	0,0	0,0	0,0	8,7	2,4
A2_1a	0,0	0,0	0,0	47,4	2,0
A2_2a	4,6	0,0	0,0	11,7	0,0
A3_1a	8,8	0,0	0,0	4,1	0,0
A3_2a	7,2	0,0	0,0	3,3	0,8
A4_1a	2,3	0,0	0,0	7,9	0,0
A4_2a	2,2	0,0	0,0	25,9	0,0
A5_1a	3,7	0,0	0,0	11,0	0,0
A5_2a	4,4	0,0	0,0	13,2	2,2
A6_1a	2,5	0,0	0,0	9,8	0,0
A6_2a	2,6	0,0	0,0	11,5	2,1
A7_1a	0,0	0,0	0,0	4,9	0,0
A7_2a	0,0	0,0	0,0	5,8	0,0
A8_1a	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0
A8_2a	0,0	0,0	0,0	18,7	0,0

Tabella 9

5	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A_1a	95,0	0,0	0,0	234,2	4,1
A_2a	47,6	0,0	0,0	358,1	7,4

Tabella 10

6	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
E2_1a	5,7	0,0	0,0	8,1	26,7
E2_2a	8,5	0,0	0,0	12,5	15,3
E3_1a	22,7	1,7	0,0	14,8	29,1
E3_2a	24,5	2,2	0,0	20,8	26,5
E4_1a	10,2	1,1	0,0	11,8	16,5
E4_2a	12,6	0,0	0,0	12,0	21,2
E5_1a	8,1	0,0	0,0	0,0	16,7
E5_2a	6,9	1,4	0,0	0,0	0,0

Tabella 11

7	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A_1a	154,0	7,2	0,0	9,4	5,4
A_2a	39,9	2,6	0,0	7,6	9,6
B_1a	39,0	4,0	0,0	9,4	5,1
B_2a	147,4	2,7	0,0	9,3	6,8
C_1a	50,8	5,4	0,0	12,7	6,2
C_2a	57,9	3,2	0,0	1,6	4,0
D_1a	24,7	3,0	0,0	1,9	5,9
D_2a	241,1	4,3	0,0	6,1	5,4
E_1a	48,2	2,8	0,0	17,0	6,3
E_2a	52,3	3,8	0,0	18,2	7,3
F_1a	44,6	6,5	0,0	1,7	7,7
F_2a	50,0	3,0	0,0	14,1	3,9
G_1a	241,3	6,2	0,0	18,1	6,1
G_2a	52,0	2,4	0,0	13,1	0,0
H_1a	84,1	2,2	0,0	13,0	3,8
H_2a	23,2	8,4	0,0	17,9	5,6
I_1a	295,4	1,7	0,0	8,5	4,9
I_2a	250,6	2,8	0,0	8,8	6,6
L_1a	59,9	3,2	0,0	1,7	5,7
L_2a	75,0	2,7	0,0	10,2	4,3
M_1a	73,9	3,1	0,0	21,6	8,1
M_2a	79,0	2,4	0,0	20,1	5,6
N_1a	64,6	3,0	0,0	20,6	6,5
N_2a	74,4	2,4	0,0	12,6	8,3

Tabella 12

8	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
C_1a	86,1	0,0	0,0	34,0	3,8
C_2a	36,1	0,0	0,0	9,9	0,0

Tabella 13

9	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
B1_1a	6,4	0,0	0,0	8,6	0,0
B1_2a	9,9	0,0	0,0	13,8	0,0
B2_1a	22,4	0,0	0,0	0,0	1,6
B2_2a	161,0	0,0	0,0	0,0	2,6
B3_1a	57,5	0,0	0,0	11,2	0,0
B3_2a	58,2	0,0	0,0	12,6	0,0
B4_1a	16,6	0,0	0,0	0,0	0,0
B4_2a	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B5_1a	55,6	0,0	0,0	7,9	0,0
B5_2a	211,9	0,0	0,0	14,4	3,1

Tabella 14

10	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A_1a	58,0	2,4	0,0	24,7	42,3
A_2a	16,9	1,8	0,0	5,9	35,9
B_1a	15,9	3,4	0,0	11,1	33,9
B_2a	138,7	3,8	0,0	18,6	27,6
C_1a	29,4	4,2	0,0	1,6	36,6
C_2a	31,3	2,9	0,0	18,0	24,8
D_1a	35,9	3,5	0,0	9,8	28,2
D_2a	34,9	3,2	0,0	7,7	33,1

Tabella 15

11	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
H_1a	221,6	3,1	0,0	44,8	8,0
H_2a	276,6	6,0	0,0	77,1	4,6

Tabella 16

12	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A1_1a	68,7	6,4	0,0	83,0	7,0
A1_2a	65,3	6,5	0,0	92,1	5,3
A2_1a	39,0	4,2	0,0	8,1	3,2
A2_2a	218,0	3,8	0,0	73,6	6,4
A3_1a	32,2	2,3	0,0	6,7	4,0
A3_2a	16,8	5,1	0,0	7,2	2,9
A4_1a	56,9	3,2	0,0	3,5	8,0
A4_2a	39,4	6,3	0,0	21,6	10,5

Tabella 17

13	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A_1a	16,5	0,0	0,0	269,8	9,3
A_2a	20,2	0,0	0,0	178,5	6,1
B_1a	30,0	0,0	0,0	236,9	5,6
B_2a	13,4	0,0	0,0	20,7	4,5
C_1a	161,4	0,0	0,0	106,7	18,7
C_2a	196,3	0,0	0,0	143,6	17,7
D_1a	53,3	0,0	0,0	265,1	10,7
D_2a	444,5	0,0	0,0	218,7	9,7
E_1a	0,0	0,0	0,0	16,6	0,0
E_2a	215,7	0,0	0,0	2,8	0,0
F_1a	97,0	0,0	0,0	28,9	8,9
F_2a	71,2	0,0	0,0	25,5	11,9
G_1a	68,9	0,0	0,0	231,3	8,4
G_2a	303,7	0,0	0,0	378,7	10,3
H_1a	52,4	0,0	0,0	525,5	10,0
H_2a	238,1	0,0	0,0	388,9	7,6
I_1a	77,9	0,0	0,0	335,7	7,4
I_2a	82,4	0,0	0,0	237,6	4,8
L_1a	58,2	0,0	0,0	438,9	10,4
L_2a	51,2	0,0	0,0	380,3	9,6
M_1a	19,0	0,0	0,0	26,8	4,3
M_2a	26,9	0,0	0,0	25,7	5,9
N_1a	47,3	0,0	0,0	232,9	5,7
N_2a	178,4	0,0	0,0	344,7	8,7

Tabella 18

14	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
G1_1a	93,6	16,8	0,0	12,0	25,3
G1_2a	78,6	31,7	0,0	38,4	32,3
G2_1a	42,1	4,1	0,0	48,8	17,7
G2_2a	53,5	8,1	0,0	59,7	18,1
G3_1a	199,2	0,0	0,0	4,2	1,1
G3_2a	465,8	0,0	0,0	55,5	2,5
G4_1a	88,8	0,0	0,0	43,7	3,6
G4_2a	352,8	0,0	0,0	18,9	4,4
G5_1a	23,2	3,5	0,0	131,2	10,3
G5_2a	118,1	4,7	0,0	113,7	7,6
G6_1a	47,2	11,7	0,0	2,4	6,3
G6_2a	49,8	5,5	0,0	27,4	49,8
G7_1a	78,4	10,7	0,0	2,0	5,7
G7_2a	45,0	5,2	0,0	1,8	5,3
G8_1a	54,6	0,0	0,0	31,2	5,1
G8_2a	17,7	0,0	0,0	34,5	3,5
G9_1a	134,5	8,6	0,0	17,6	4,9
G9_2a	247,9	3,9	0,0	19,6	0,0
G10_1a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G10_2a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabella 19

15	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
B1_1a	216,7	0,0	0,0	31,6	21,6
B1_2a	310,2	0,0	0,0	13,9	9,3
B2_1a	26,9	0,0	0,0	17,6	7,9
B2_2a	24,0	0,0	0,0	20,4	9,2
B3_1a	88,1	0,0	0,0	0,0	1,8
B3_2a	14,5	0,0	0,0	0,0	3,2
B4_1a	146,1	0,0	0,0	0,0	4,6
B4_2a	48,5	0,0	0,0	0,0	4,8
B5_1a	164,5	0,0	0,0	21,5	8,0
B5_2a	132,2	0,0	0,0	16,4	7,0
B6_1a	45,1	0,0	0,0	14,8	n.a.
B6_2a	73,0	0,0	0,0	27,1	n.a.
B7_1a	136,7	0,0	0,0	21,0	9,6
B7_2a	115,8	0,0	0,0	24,0	11,9
B8_1a	128,1	0,0	0,0	0,7	5,5
B8_2a	1054,4	0,0	0,0	20,8	5,8
B9_1a	127,8	0,0	0,0	11,9	5,5
B9_2a	123,3	0,0	0,0	11,1	5,5

Tabella 20

16	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
D1_1a	89,1	16,8	0,0	2,6	7,6
D1_2a	67,3	31,7	0,0	17,3	8,4
D2_1a	58,7	4,1	0,0	38,4	5,0
D2_2a	84,5	8,1	0,0	31,2	4,3
D3_1a	64,0	0,0	0,0	2,1	10,6
D3_2a	24,5	0,0	0,0	2,3	5,7
D4_1a	32,4	0,0	0,0	0,0	21,5
D4_2a	26,0	0,0	0,0	31,6	13,4
D5_1a	197,5	3,5	0,0	5,2	4,9
D5_2a	72,2	4,7	0,0	56,7	10,6
D6_1a	53,1	11,7	0,0	1,8	12,3
D6_2a	15,1	5,5	0,0	11,0	11,0
D8_1a	86,1	10,7	0,0	0,0	4,0
D8_2a	414,0	5,2	0,0	0,0	5,6
D9_1a	22,1	0,0	0,0	1,6	4,2
D9_2a	58,0	0,0	0,0	1,4	1,7

Tabella 21

17	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A1_1a	91,8	0,0	0,0	39,3	42,4
A1_2a	73,0	0,0	0,0	43,4	17,6
A2_1a	128,6	0,0	0,0	7,4	6,4
A2_2a	104,3	0,0	0,0	73,6	5,9
B1_1a	107,6	0,0	0,0	47,0	21,3
B1_2a	119,4	0,0	0,0	4,8	26,4
B2_1a	82,5	0,0	0,0	75,0	4,5
B2_2a	158,2	0,0	0,0	29,6	13,7
C1_1a	100,0	0,9	0,0	59,0	35,9
C1_2a	62,7	0,0	0,0	68,4	37,2
C2_1a	1088,1	0,0	0,0	37,2	10,1
C2_2a	136,4	0,0	0,0	8,0	10,9
D1_1a	120,9	0,0	0,0	59,2	25,7
D1_2a	91,4	0,0	0,0	35,3	25,5
D2_1a	180,3	1,5	0,0	55,2	9,6
D2_2a	69,5	0,0	0,0	60,9	7,8
E1_1a	107,4	0,0	0,0	36,1	28,0
E1_2a	652,0	0,0	0,0	53,3	35,9
E2_1a	123,1	0,0	0,0	29,7	18,7
E2_2a	126,5	0,0	0,0	5,8	20,3
F1_1a	32,2	0,0	0,0	3,7	15,0
F1_2a	119,7	0,0	0,0	35,3	10,5
F2_1a	112,5	0,0	0,0	64,3	6,6
F2_2a	85,6	1,2	0,0	74,8	4,0
G1_1a	124,8	0,0	0,0	33,8	26,1
G1_2a	123,7	1,3	0,0	10,8	22,3
G2_1a	64,3	0,0	0,0	47,7	13,0
G2_2a	163,7	0,0	0,0	37,7	15,1
H1_1a	98,9	1,1	0,0	62,4	20,9
H1_2a	86,8	0,0	0,0	67,9	28,6
I1_1a	68,4	0,0	0,0	14,5	27,8
I1_2a	81,9	0,0	0,0	12,9	29,2
I2_1a	115,0	3,1	0,0	67,9	18,9
I2_2a	78,9	1,9	0,0	4,8	18,5
L1_1a	104,0	0,0	0,0	31,3	12,8
L1_2a	94,7	0,0	0,0	56,0	31,3
L2_1a	100,0	0,0	0,0	47,0	8,6
L2_2a	105,4	0,0	0,0	45,7	9,7
M1_1a	151,1	0,0	0,0	31,9	5,8
M1_2a	106,0	0,0	0,0	39,1	8,7
M2_1a	102,6	1,2	0,0	6,4	0,0
M2_2a	140,6	2,4	0,0	51,3	6,2
N1_1a	111,8	2,6	0,0	64,9	22,6
N1_2a	129,4	0,0	0,0	44,4	15,3
N2_1a	85,4	0,0	0,0	94,7	4,7
N2_2a	506,1	0,0	0,0	48,2	0,0
O1_1a	87,1	0,0	0,0	37,9	6,1
O1_2a	110,4	1,3	0,0	79,7	6,2
O2_1a	109,0	1,3	0,0	74,1	5,3
O2_2a	40,6	1,5	0,0	74,1	7,7

Tabella 22

18	S/N BackDetector Benzoilecgonina	S/N BackDetector EcgoninaMetilEstere	S/N BackDetector Cocaetilene	S/N BackDetector Norcocaina	S/N BackDetector Tropacocaina
A_1a	115,4	0,0	0,0	9,5	26,4
A_2a	68,4	0,0	0,0	48,4	13,0
B_1a	101,3	0,0	0,0	99,5	19,2
B_2a	66,2	0,0	0,0	77,1	17,2
C_1a	200,5	0,0	0,0	63,9	24,7
C_2a	121,2	0,0	0,0	11,6	23,7
D_1a	85,0	0,0	0,0	47,8	9,9
D_2a	71,5	0,0	0,0	59,4	20,9
E_1a	88,3	0,0	0,0	12,0	31,0
E_2a	114,1	0,0	0,0	11,1	16,0
F_1a	88,4	0,0	0,0	91,1	18,0
F_2a	70,7	0,0	0,0	131,3	10,4
G_1a	17,9	0,0	0,0	59,3	16,5
G_2a	613,8	0,0	0,0	121,9	25,6
H_1a	128,9	0,0	0,0	66,4	18,2
H_2a	761,0	0,0	0,0	66,5	16,9
I_1a	407,6	0,0	0,0	52,0	46,9
I_2a	97,1	0,0	0,0	63,5	18,6
L_1a	100,7	0,0	0,0	50,5	30,0
L_2a	379,5	0,0	0,0	54,1	17,5
M_1a	89,9	0,0	0,0	62,4	20,2
M_2a	320,5	0,0	0,0	45,4	39,1
N_1a	72,1	0,0	0,0	53,7	17,7
N_2a	458,0	0,0	0,0	51,3	23,8
O_1a	94,7	0,0	0,0	68,4	18,8
O_2a	299,6	0,0	0,0	66,2	24,4
P_1a	73,4	0,0	0,0	87,2	31,4
P_2a	619,8	0,0	0,0	98,7	17,7
Q_1a	249,7	0,0	0,0	61,5	22,8
Q_2a	164,4	0,0	0,0	67,3	19,2
R_1a	143,7	0,0	0,0	43,4	28,3
R_2a	32,8	0,0	0,0	40,5	16,7
S_1a	79,3	0,0	0,0	60,8	20,3
S_2a	286,8	0,0	0,0	44,6	30,0
T_1a	250,9	0,0	0,0	44,8	21,2
T_2a	270,8	0,0	0,0	42,0	38,6

Tabella 23

4.5 Analisi di stabilità a breve e medio termine

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati delle misurazioni effettuate per il monitoraggio della stabilità. Si specifica che i suffissi '1a' e '2a' indicano le iniezioni replicate effettuate campionando dal medesimo vial dello stesso estratto analitico.

	T0	T1	T2	T3	T4
% m/m	BECG	BECG	BECG	BECG	BECG
A1_1a	3.6	2.5	2.8	2.1	2.6
A1_2a	3.6	3.1	3.7	4.0	2.6
A4_1a	3.0	3.0	3.0	2.7	2.6
A4_2a	2.7	3.2	2.3	1.8	2.0
B1_1a	2.3	2.2	2.3	1.6	1.4
B1_2a	3.0	3.6	3.6	2.7	2.7
B4_1a	2.3	2.6	2.7	2.4	2.7
B4_2a	2.3	2.1	1.6	1.6	1.5
B7_1a	4.7	4.6	3.8	3.1	3.3
B7_2a	4.8	4.6	3.8	3.6	3.5
C_1a	1.8	1.8	2.8	1.3	1.2
C_2a	2.0	1.8	2.9	1.4	1.3
D1_1a	3.8	3.1	3.1	2.6	2.6
D1_2a	4.0	3.4	3.5	2.8	3.1
D5_1a	3.3	3.9	2.7	4.0	4.0
D5_2a	3.2	3.7	1.3	3.0	3.2
H_1a	3.1	3.8	2.9	2.5	2.5
H_2a	3.4	3.9	3.1	3.2	3.1

Tabella 24

	T0	T1	T2	T3	T4
% m/m	NC	NC	NC	NC	NC
A1_1a	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
A1_2a	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
A4_1a	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3
A4_2a	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
B1_1a	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
B1_2a	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3
B4_1a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B4_2a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B7_1a	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
B7_2a	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C_1a	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C_2a	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
D1_1a	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
D1_2a	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
D5_1a	0.3	0.3	0.2	0.3	0.4
D5_2a	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3
H_1a	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
H_2a	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Tabella 25

	T0	T1	T2	T3	T4
% m/m	EME	EME	EME	EME	EME
A1_1a	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4
A1_2a	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5
A4_1a	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4
A4_2a	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3
B1_1a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B1_2a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B4_1a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B4_2a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B7_1a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B7_2a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C_1a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C_2a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D1_1a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D1_2a	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D5_1a	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
D5_2a	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4
H_1a	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
H_2a	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4

Tabella 26

A partire dai dati grezzi, è stata determinata la concentrazione media tra le repliche (Cm) a T0 e T4, per ricavare lo scostamento percentuale rispetto al valore misurato al T0 ($\Delta\%T0$). I risultati sono riassunti nella Tabella 27.

Campione	Benzoilecgonina (BECG)			Norcocaina (NC)			Ecgonina Metilestere (EME)		
	Cm T0 (%)	Cm T4 (%)	$\Delta\%T0$	T0 (%)	T4 (%)	$\Delta\%T0$	T0 (%)	T4 (%)	$\Delta\%T0$
A1	3,60	2,60	-27,78%	0,40	0,45	+12,50%	0,45	0,45	0,00%
A4	2,85	2,30	-19,30%	0,20	0,25	+25,00%	0,35	0,35	0,00%
B1	2,65	2,05	-22,64%	0,20	0,25	+25,00%	N.D.	N.D.	-
B4	2,30	2,10	-8,70%	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	-
B7	4,75	3,40	-28,42%	0,20	0,20	0,00%	N.D.	N.D.	-
C	1,90	1,25	-34,21%	0,20	0,20	0,00%	N.D.	N.D.	-
D1	3,90	2,85	-26,92%	0,20	0,20	0,00%	N.D.	N.D.	-
D5	3,25	3,60	+10,77%	0,30	0,35	+16,67%	0,40	0,45	+12,50%
H	3,25	2,80	-13,85%	0,40	0,40	0,00%	0,45	0,40	-11,11%
Media	3,16	2,55	-19,01%	0,26	0,29	+9,90%	0,41	0,41	+0,35%

Tabella 27

4.6 Analisi di conferma qualitativa degli alcaloidi mediante GC-MS

Come primo step della validazione qualitativa, vengono di seguito presentati gli spettri di massa acquisiti dall'analisi delle singole soluzioni standard certificate degli alcaloidi target. L'elaborazione di queste corse cromatografiche preliminari ha permesso di registrare i tempi di ritenzione assoluti e di identificare in modo univoco i pattern di frammentazione e i principali ioni diagnostici per ciascun analita, operando in totale assenza di interferenze della matrice.

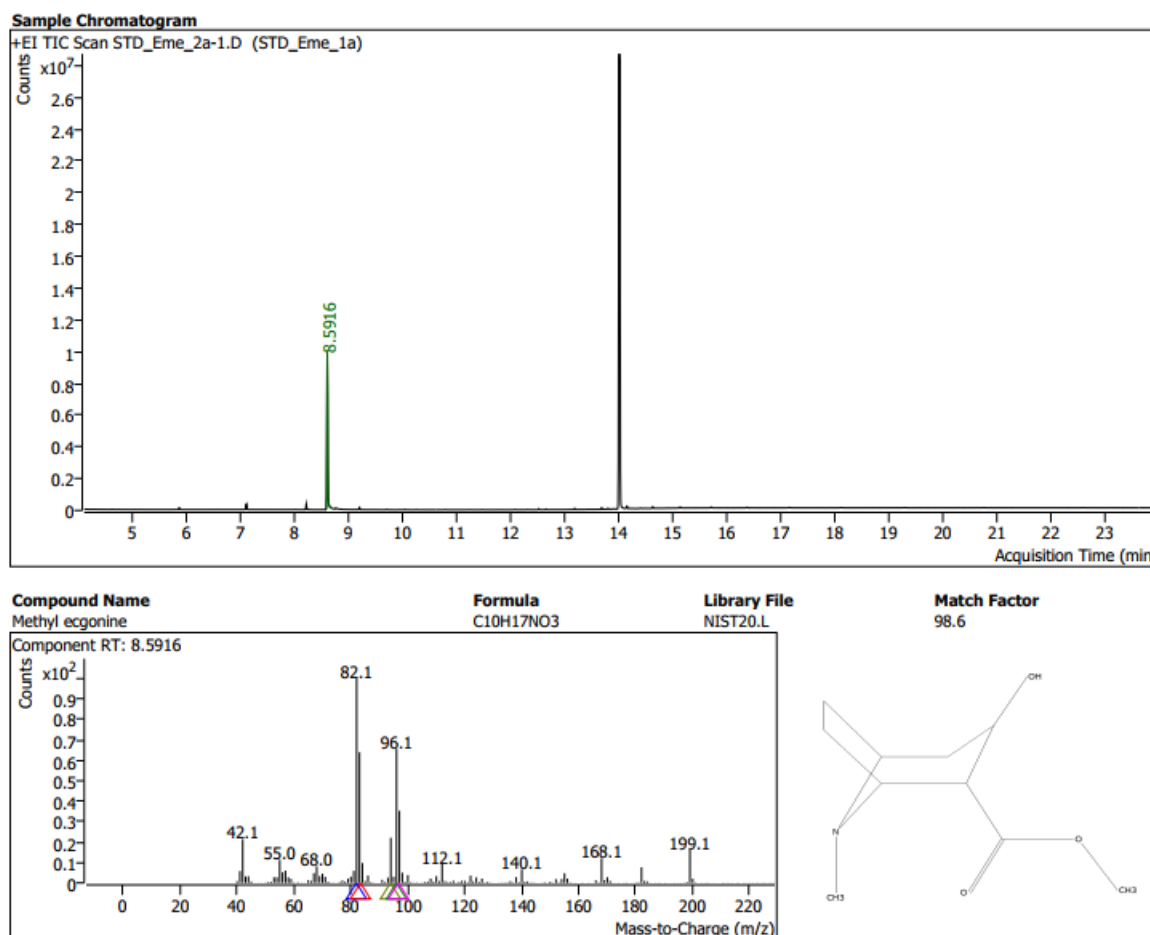


Figura 49: spettro di massa STD ecgonina metilestere

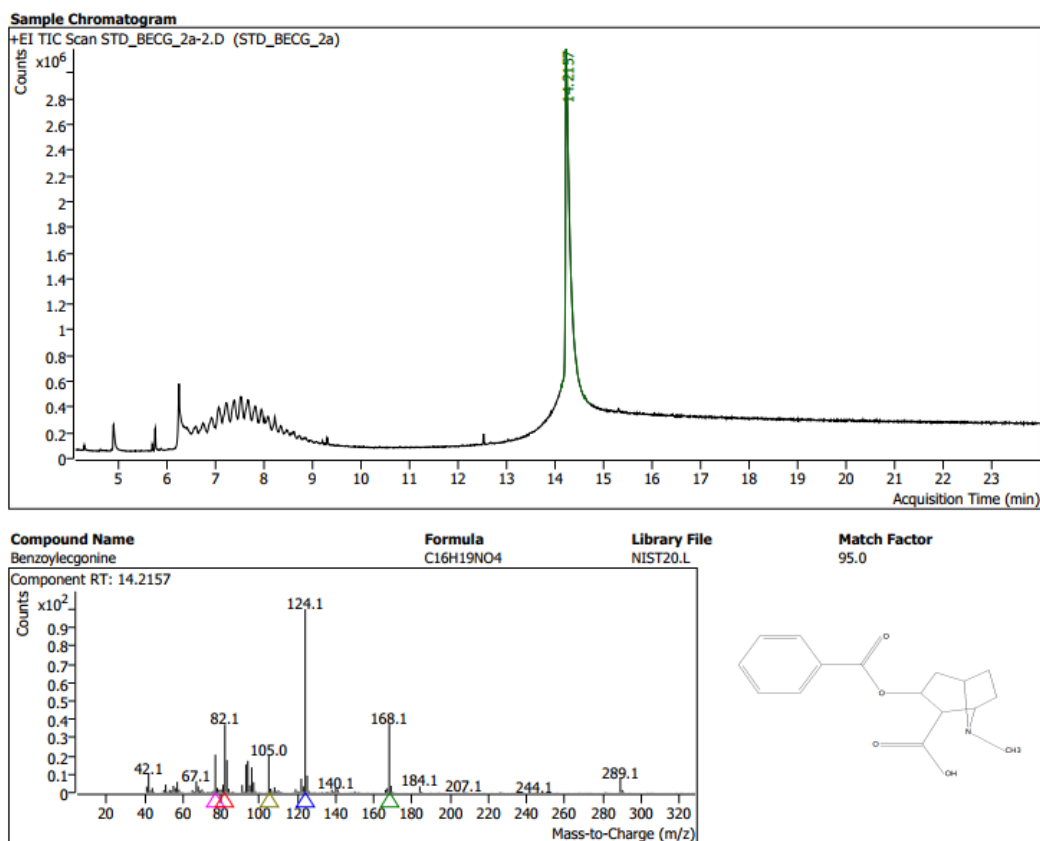


Figura 50: spettro di massa STD benzoilecgonina

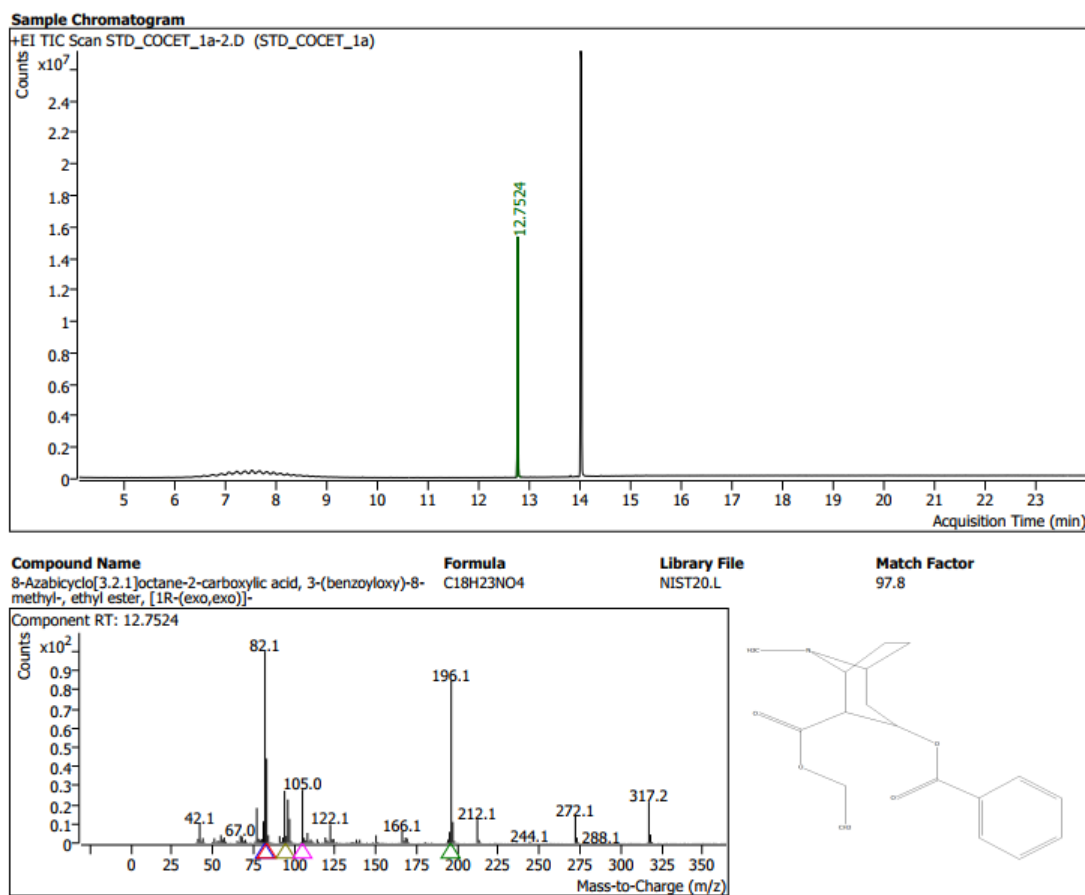


Figura 51: spettro di massa STD cocaetilene

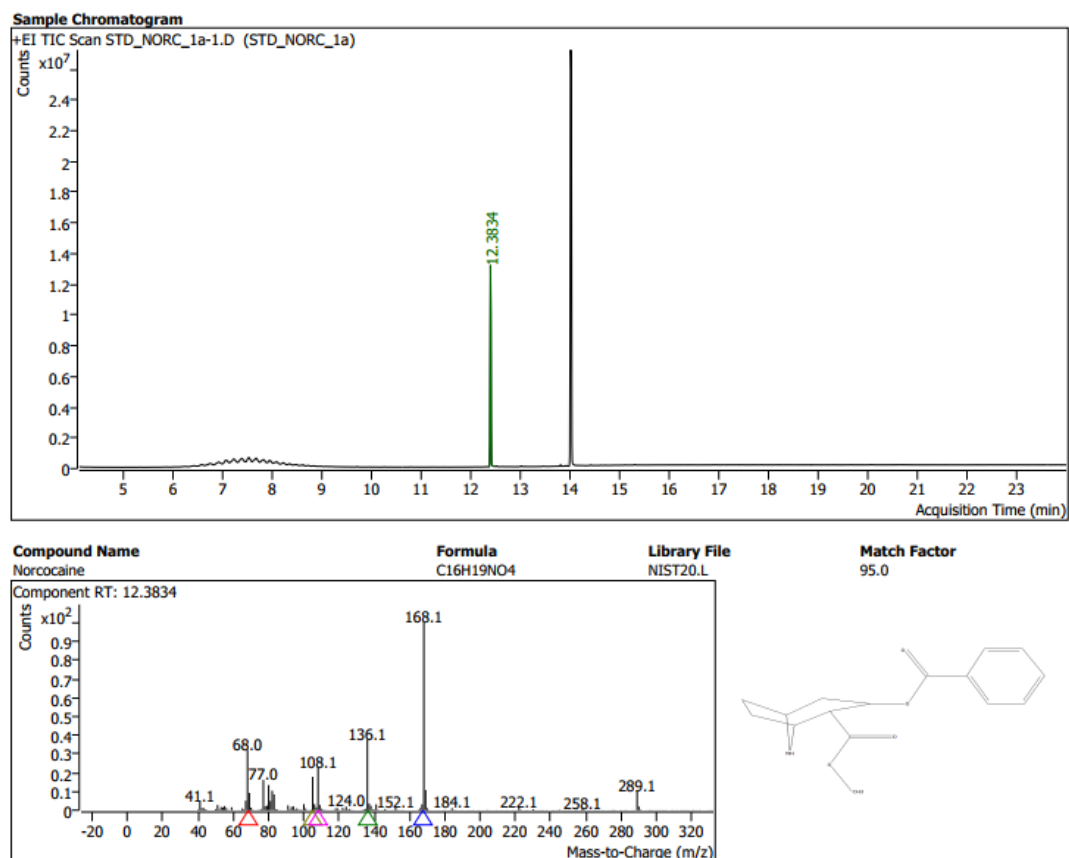


Figura 52: spettro di massa STD norcocaina

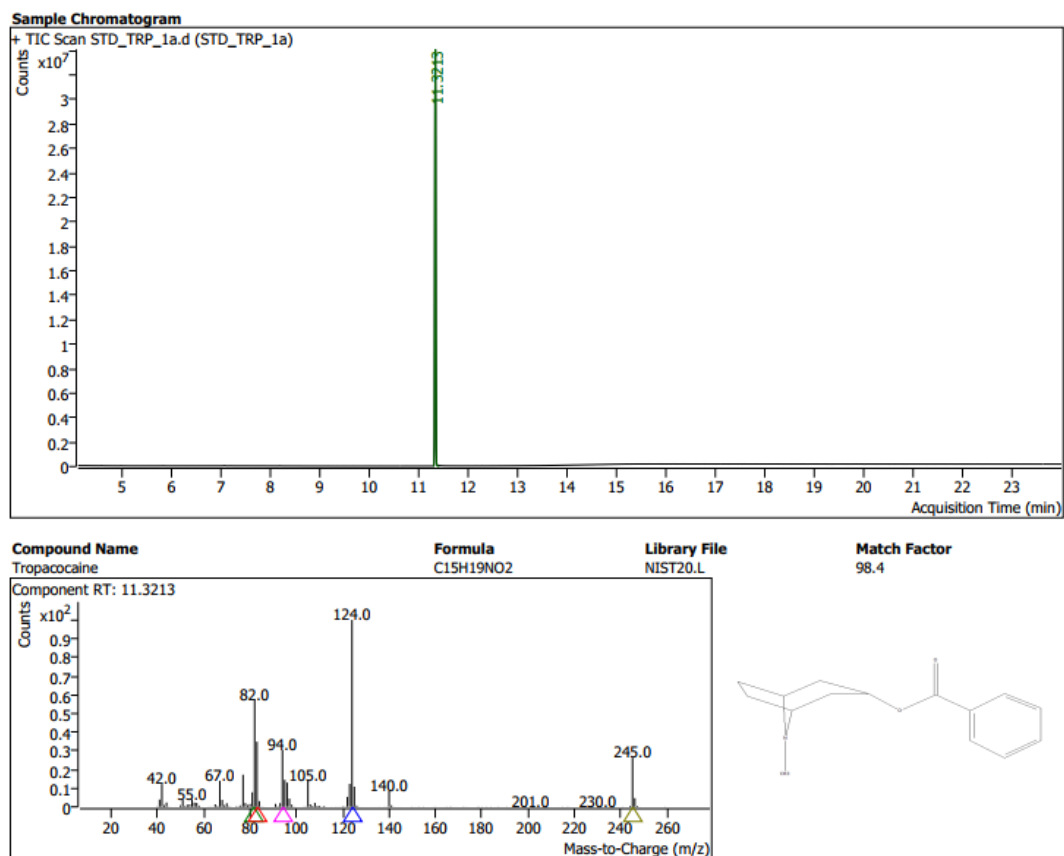


Figura 53: spettro di massa STD tropacocaina

Per escludere qualsiasi fenomeno di co-eluzione tra gli alcaloidi minoritari e potenziali interferenti della matrice è stata effettuata un'analisi GC-MS sul campione G2.

L'analisi in TIC ha permesso di individuare nettamente i picchi cromatografici corrispondenti agli alcaloidi d'interesse. L'estrazione dei relativi spettri di massa, ottenuti operando con una sorgente a ionizzazione elettronica a 70 eV, ha restituito pattern di frammentazione perfettamente sovrapponibili a quelli dei materiali di riferimento certificati e conformi alle librerie internazionali.

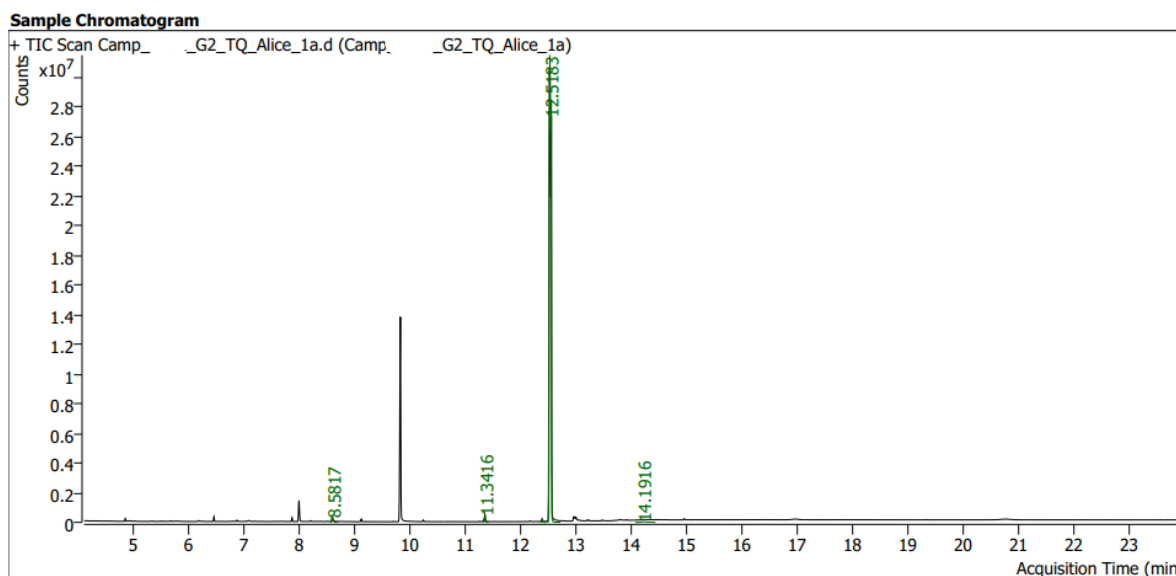


Figura 54: spettro di massa STD campione G2

Nello specifico, l'analisi degli spettri ha confermato la presenza dei seguenti ioni diagnostici per ciascun alcaloide:

- Ecgonina metilestere: ione base m/z 82; ione molecolare m/z 199.

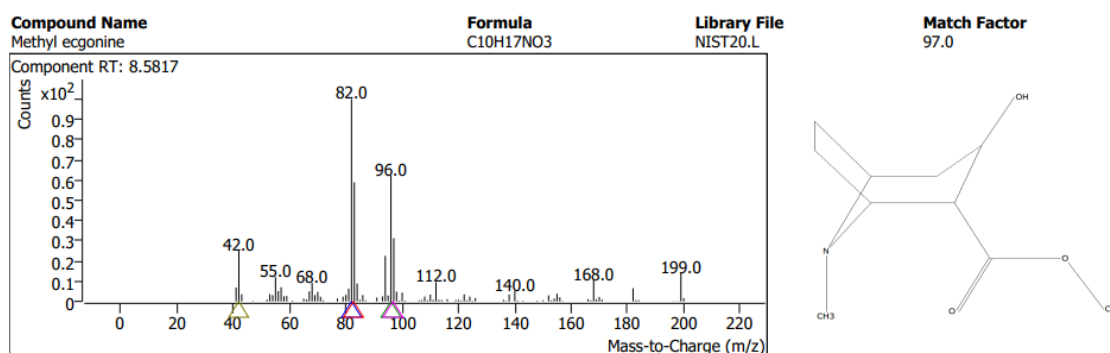


Figura 55: spettro di frammentazione e struttura chimica ecgonina metilestere

- Tropacocaina: ione base m/z 124; frammento m/z 82; ione molecolare m/z 245.

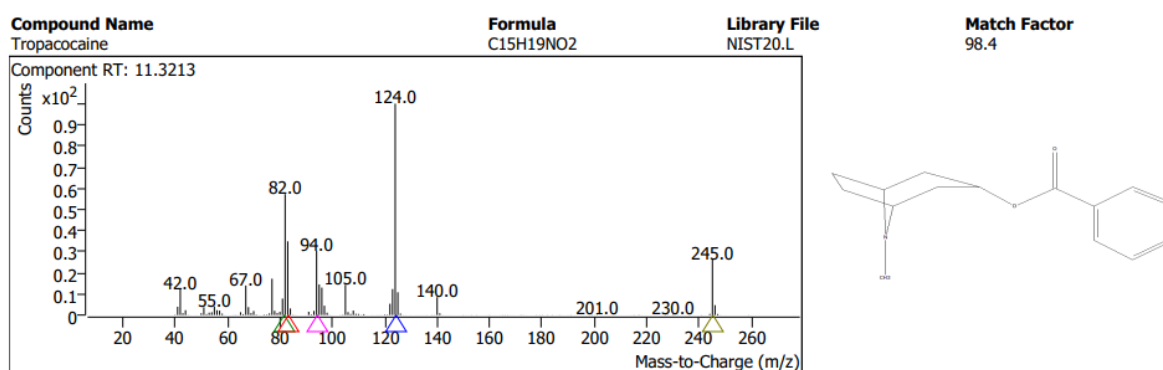


Figura 56: spettro di frammentazione e struttura chimica tropacocaina

- Norcocaina: ione base m/z 168; frammento m/z 82; ione molecolare m/z 289.

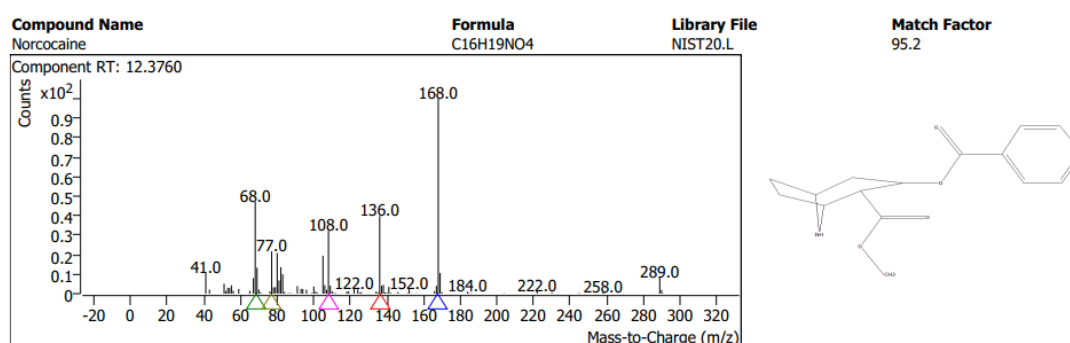


Figura 57: spettro di frammentazione e struttura chimica norcocaina

- Benzoilecgonina: ione base m/z 124; frammenti m/z 82, 168; ione molecolare m/z 289.

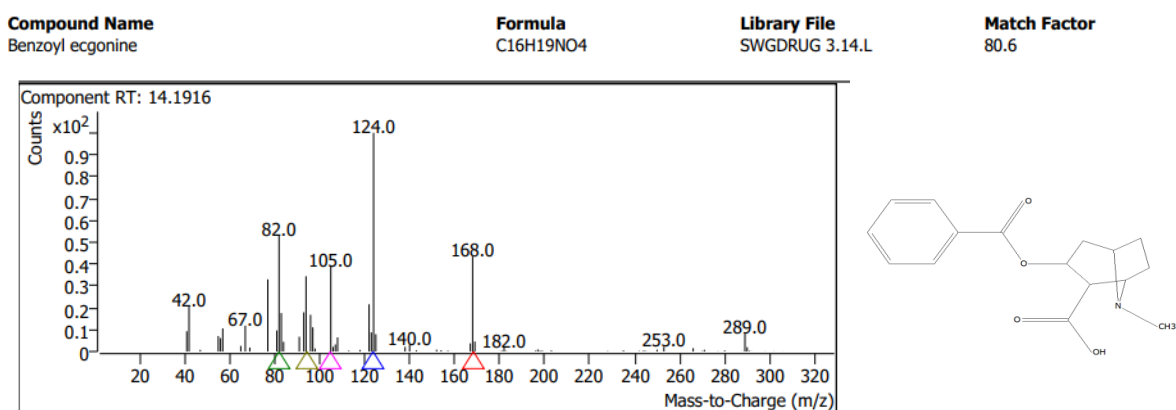


Figura 58: spettro di frammentazione e struttura chimica benzoilecgonina

4.7 Analisi qualitativa dei solventi e delle impurezze volatili

L'indagine qualitativa mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa ha permesso di caratterizzare il profilo dei composti organici volatili residui, intrappolati nel reticolo cristallino della cocaina cloridrato durante le fasi di raffinazione clandestina. Lo studio ha preso in esame i panetti provenienti dai sequestri doganali, codificati come 1, 2 e 3.

Al fine di sistematizzare l'enorme mole di dati cromatografici acquisiti, sono state elaborate specifiche matrici di profilazione per ciascun lotto. Queste tabelle riassuntive sono state strutturate per mappare la presenza, l'assenza e l'abbondanza relativa dei principali marcatori chimici di processo, dopo aver verificato l'assenza di interferenze o contaminanti di fondo nella soluzione di bianco. L'estrapolazione di questi profili completi, estesi fino a 20 analiti target per singolo campione, ha fornito l'impronta digitale organica di ogni panetto, propedeutica alla successiva fase di studio delle correlazioni logistiche. Inoltre, nella Tabella 31, si riportano i tempi di ritenzione dei composti organici volatili residui individuati.

Campione	2MB	Pen	AcMe	22DMB	2MP	2But	3MP	EtAc	Esa	22DMP	MCP	Ben	33DMP	2ME	3ME	AcPr	Ept	MCH	Tol	2MEp
2 A1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 A2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 B1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 B2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 C1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 C2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 D1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 D2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 E1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 E2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 F1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 F2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 G1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 G2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 H1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 I1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 I2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 L1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 L2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 M1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 M2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 N1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 N2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 O1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2 O2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Tabella 28: **2MB**: 2-metilbutano | **Pen**: Pentano | **AcMe**: Acetato di metile | **22DMB**: 2,2-dimetilbutano | **2MP**: 2-metilpentano | **2But**: 2-butanone | **3MP**: 3-metilpentano | **EtAc**: Acetato di etile | **Esa**: Esano | **22DMP**: 2,2-dimetilpentano | **MCP**: Metilciclopentano | **Ben**: Benzene | **33DMP**: 3,3-dimetilpentano | **2ME**: 2-metilesano | **3ME**: 3-metilesano | **AcPr**: Acetato di propile | **Ept**: Eptano | **MCH**: Metilcicloesano | **Tol**: Toluene | **2MEp**: 2-metileptano

Campione	2MB	Pen	AcMe	2MP	2But	3MP	EtAc	Esa	2M1P	22DMP	MCP	223TMB	EPE	2ME	23DMP	AcPr	Ept	MCH	AcIso	Tol
1A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1L	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1M	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1N	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1O	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1P	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1Q	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1R	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1S	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1T	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Tabella 29: **2M1P**: 2-metil, 1-propanolo | **223TMB**: 2,2,3-trimetilbutano | **EPE**: esil pentil etere | **AcIso**: Acetato di isobutile

Campione	Ace	Pen	2MP	2But	3MP	EtAc	MCP	Ben	Ept	MCH	Tol
3 A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 L	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 M	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3 N	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Tabella 30: **Ace**: acetone

Composto	Tr (min)	Composto	Tr (min)
Acetone	5.962	Metilciclopentano	8.978
2-Metilbutano	6.043	Benzene	9.519
Pentano	6.418	Esil pentil etere	9.598
Acetato di metile	6.628	2-Metilesano	9.781
2,2-Dimetilbutano	7.064	2,2,3-Trimetilbutano	9.790
2-Metilpentano	7.676	3-Metilesano	9.992
2-Butanone	7.781	Acetato di propile	10.359
3-Metilpentano	7.979	Eptano	10.502
Acetato di etile	8.212	Metilcicloesano	11.164
Esano	8.302	Acetato di isobutile	11.706
2-Metil-1-propanolo	8.526	Toluene	11.886
2,2-Dimetilpentano	8.859	2-Metileptano	11.972

Tabella 31: tempi di ritenzione (Tr) dei VOCs individuati

DISCUSSIONE

5.1 Importanza dello screening FT-IR

L'elaborazione degli spettri ottenuti tramite spettroscopia FT-IR ha evidenziato come alcuni campioni analizzati presentassero l'alfa-mannitolo come agente da taglio maggioritario. A titolo esemplificativo, l'algoritmo strumentale ha identificato nel reperto A1 una miscela binaria composta da cocaina cloridrato e alfa-mannitolo, proponendo come migliore combinazione matematica gli spettri di cocaina cloridrato e alfa-mannitolo, senza consentirne una quantificazione in massa. La presenza di tali zuccheri in una quota dei campioni ha giustificato lo step di filtrazione meccanica inserito nel protocollo preparativo, prevenendo la precipitazione di residui insolubili all'interno della strumentazione cromatografica.

L'indagine ha rivelato panetti costituiti esclusivamente da agenti da taglio o adulteranti, del tutto privi del principio attivo primario. Se da un lato l'impiego di gesso (riscontrato nel campione 2 H2) o di miscele zuccherine inerti (alfa-mannitolo e D-mannitolo nel campione A5) documenta l'utilizzo di esche volumetriche per eludere i controlli doganali o frodare gli acquirenti intermedi, dall'altro il rinvenimento di panetti costituiti da principi attivi farmacologici puri (fenacetina e azatioprina nel campione G10) evidenzia una precisa strategia logistica basata sul "materiale da taglio viaggiante". Spedire l'adulterante puro e già confezionato permette infatti ai distributori di tagliare la cocaina direttamente a destinazione.

Nel caso specifico del campione G10, l'analisi ha rivelato una miscela costituita integralmente da fenacetina e azatioprina. La fenacetina viene scelta per il suo blando potere analgesico, utile a simulare l'effetto anestetico locale della cocaina genuina; tuttavia, si tratta di un farmaco ritirato dal mercato globale da decenni a causa della sua severa nefrotossicità e della comprovata cancerogenicità a carico delle vie urinarie [32]. Dall'altra parte, l'azatioprina è un potente farmaco immunosoppressore e antimetabolita la cui aggiunta è ingiustificata dal punto di vista degli effetti psicoattivi. L'assunzione accidentale e incontrollata di questa molecola induce una mielosoppressione, inibendo la produzione cellulare nel midollo osseo e privando il consumatore delle proprie difese immunitarie, esponendolo a infezioni opportunistiche spesso letali e a un elevato rischio di neoplasie secondarie [32].

5.2 Valutazione dei parametri di validazione del metodo

Sebbene allo stato attuale il protocollo analitico per la profilazione degli alcaloidi minoritari non sia ancora stato validato ufficialmente, il suo sviluppo è stato condotto seguendo la procedura operativa ADM PO03AZ rev. 5. Trattandosi di un metodo quantitativo in tracce, l'iter sperimentale è stato strutturato per soddisfare i futuri requisiti prestazionali richiesti in sede di accreditamento.

La specificità, ovvero l'attitudine a determinare il misurando inequivocabilmente e senza interferenze, è garantita dall'approccio complementare GC FID e GC MS. In tutti i campioni analizzati, compreso il falso reperto G10 saturo di fenacetina e azatioprina, non si è mai registrata alcuna coeluizione, confermando la totale immunità del protocollo alle interferenze generate dagli adulteranti o dalla matrice.

La linearità è ampiamente soddisfatta, con coefficienti di determinazione R^2 superiori a 0,9948, indicando un buon adattamento preliminare del modello nell'intervallo considerato, da confermare attraverso l'analisi dei residui e prove replicate. In vista della validazione, i limiti operativi (LOD e LOQ) sono stati definiti in base al rapporto S/N. Il limite di quantificazione LOQ è fissato sul primo punto di calibrazione, per cui il rapporto S/N è maggiore o uguale a 10 a 1, mentre il limite di rivelabilità LOD individua le sostanze presenti in tracce per valori di S/N compresi tra 3 a 1 e 10 a 1, allineandosi agli altri metodi accreditati da ADM.

Il requisito di precisione beneficia dell'uso sistematico dello standard interno, lo squalano. Compensando le piccole fluttuazioni nei volumi di iniezione e le derive del rivelatore, lo standard ha garantito un'elevata riproducibilità quantitativa nelle misure replicate.

Per quanto riguarda la robustezza, definita come la resistenza del metodo a variazioni deliberate, il suo studio è stato cruciale nello sviluppo del protocollo qualitativo per i solventi residui. I parametri strumentali, come liner, colonne e rampe di temperatura, sono stati ampiamente modificati e testati empiricamente per definire la configurazione separativa migliore.

Sempre per i solventi residui la specificità è assicurata da un duplice isolamento. A livello estrattivo la tecnica in spazio di testa separa i volatili dalla matrice pesante in soluzione, prevenendo contaminazioni del sistema. A livello strumentale la spettrometria di massa identifica i singoli solventi inequivocabilmente, poiché l'estrazione degli ioni diagnostici risolve le sovrapposizioni tra isomeri restituendo un profilo chimico puro.

5.3 Caratterizzazione e discussione del profilo alcaloideo minoritario

La determinazione delle percentuali in massa degli alcaloidi target è stata condotta basandosi sul fatto che la loro presenza non derivi da processi di sintesi chimica *ex novo*, ma da un legame diretto con la botanica della pianta di coca, il suo profilo metabolico ereditario e le successive modifiche di degradazione o estrazione. Come evidenziato in letteratura [32], gli alcaloidi isolati nei reperti riflettono le caratteristiche delle varietà vegetali e delle regioni di coltivazione di provenienza. In questa ottica, i singoli composti si suddividono in base alla loro origine: gli alcaloidi nativi della pianta, come la tropacocaina, si ritrovano inalterati e fungono da marcatori botanici primari per risalire alla foglia d'origine, mentre i sottoprodotti di degradazione o alterazione, come la benzoilecgonina e la norcocaina, non sono prodotti di biosintesi ma derivano rispettivamente dall'idrolisi della cocaina e da reazioni ossidative di lavorazione.

Dall'analisi dei campioni è emersa in primo luogo un'assenza sistematica del cocaetilene, che è risultato costantemente non rilevato. Essendo il cocaetilene un metabolita che si forma prevalentemente in vivo per assunzione concomitante di cocaina ed etanolo, oppure in vitro in presenza di etanolo e catalizzatori, questo risultato non fornisce evidenza della sua formazione nelle condizioni considerate. Tuttavia, il mancato rilevamento non consente da solo di escludere l'impiego di etanolo durante la lavorazione.

Si è invece riscontrata la presenza ubiquitaria e quasi costantemente quantificabile di benzoilecgonina e norcocaina. La benzoilecgonina è il principale prodotto di idrolisi della cocaina e la norcocaina è prodotta da reazioni di ossidazione: la loro presenza costituisce un indicatore delle inefficienze nei processi di estrazione o delle precarie condizioni di stoccaggio e trasporto. Possono essere considerati quindi dei marcatori.

Accanto a questi composti, l'esame dei dati evidenzia la presenza costante e quantificabile della tropacocaina nella quasi totalità dei lotti. Essendo questo alcaloide un metabolita nativo biosintetizzato direttamente nei tessuti della pianta, la sua rilevazione sistematica agisce da marcatore botanico primario, utile per collegare la composizione del reperto alle caratteristiche intrinseche della foglia d'origine a monte dei processi di raffinazione industriale.

Di particolare interesse investigativo è risultata la distribuzione eterogenea dell'ecgonina metilestere. Questo analita si può formare tramite reazioni di idrolisi chimica in soluzione acquosa, degradazione termica e stress ambientale. Questo alcaloide si è rivelato assente in alcuni reperti e quantificabile in altri. Proprio per via di questa sua naturale fluttuazione interlotto, l'ecgonina metilestere costituisce una variabile candidata per future analisi

comparative, la cui capacità discriminante dovrà essere verificata mediante una casistica più ampia e metodi statistici validati.

5.4 Studio di stabilità a breve termine dell'estratto analitico

È stato condotto uno studio di stabilità a breve termine per valutare l'eventuale degradazione degli estratti conservati a 4°C, simulando le reali condizioni di stoccaggio operativo di un reperto. L'analisi è stata protratta per quattro settimane (da T0 a T4), monitorando l'andamento delle concentrazioni percentuali in massa (% m/m) per benzoilecgonina, ecgonina metilestere e norcocaina. Per quantificare tale andamento, è stato calcolato lo scostamento percentuale delle concentrazioni al termine del monitoraggio rispetto al valore iniziale misurato al tempo zero ($\Delta\%T0$).

L'elaborazione dei dati ha permesso di evidenziare due comportamenti chimico-fisici distinti a seconda della natura dell'alcaloide, come si può vedere dalla Figura 59, che indica l'andamento dello scostamento medio nel tempo.

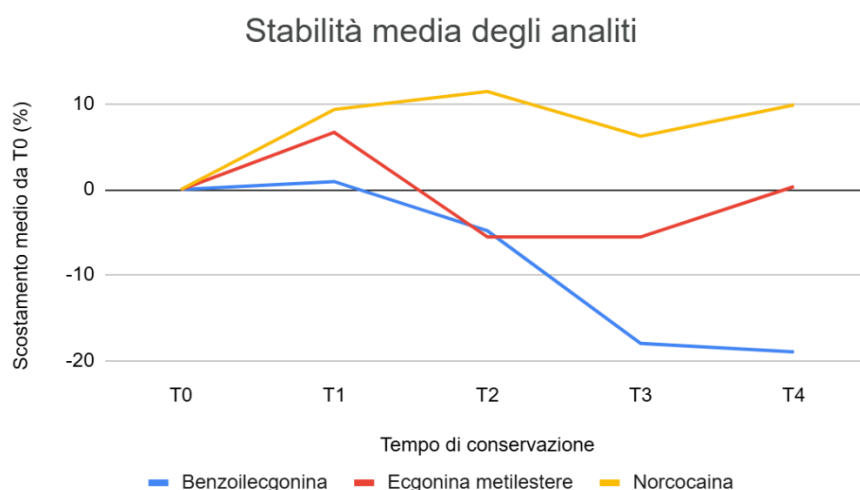


Figura 59

Da un lato si osserva un'elevata stabilità per l'ecgonina metilestere e la norcocaina, i cui risultati indicano una buona conservazione del profilo analitico in soluzione. Per l'ecgonina metilestere i campioni che presentavano l'analita al T0, come A1, A4, D5 e H, hanno mantenuto concentrazioni pressoché costanti, registrando una variazione media complessiva a T4 del tutto trascurabile. In modo analogo, le concentrazioni di norcocaina hanno mostrato deviazioni minime, con un lieve incremento percentuale medio a T4, indicando una buona stabilità dell'analita nel periodo osservato. Inoltre, i campioni inizialmente privi di entrambi gli analiti e marcati come non rilevati al tempo zero, tra cui B1, B4, B7 e C, sono rimasti non rilevati per

tutte le quattro settimane, escludendo l'innescò di reazioni di formazione *ex novo* in vitro o la comparsa di falsi positivi imputabili alla degradazione della matrice.

Dall'altro lato, la benzoilecgonina ha evidenziato una maggiore fluttuazione intra-lotto nel corso del periodo di stoccaggio. Pur partendo da valori quantitativamente più alti a T0, si osserva in svariate aliquote un cambiamento progressivo della concentrazione: a T4, la benzoilecgonina ha registrato un calo medio prossimo al -20%.

L'andamento per singolo campione è dettagliato nel grafico a barre relativo alla degradazione a T4 (Figura 60): a eccezione del campione D5, che registra un incremento anomalo di circa il +10%, tutti gli altri estratti subiscono una perdita significativa, che tocca la punta massima di degradazione superando il -30% nel campione C.

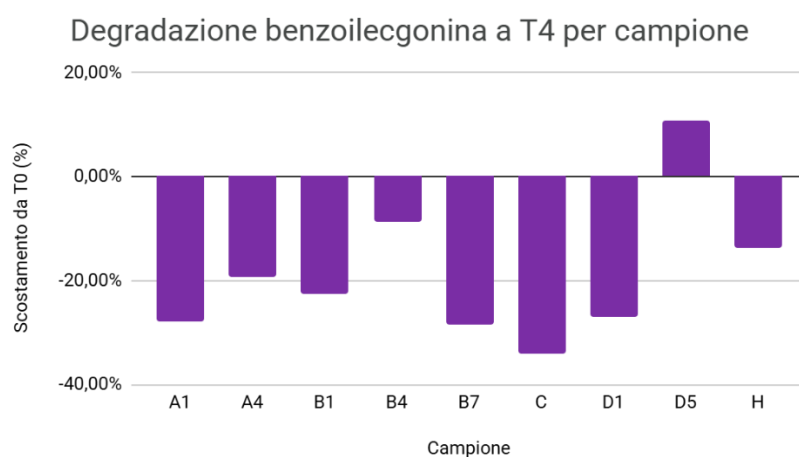


Figura 60

Tale fluttuazione, che non compromette comunque l'identificazione qualitativa del profilo chimico, potrebbe trovare giustificazione nella natura della molecola: essendo dotata di maggiore polarità e carattere zwitterionico rispetto alla cocaina e ai derivati più lipofili, risentirebbe in maniera più marcata delle minime evaporazioni differenziali dell'isopropanolo, utilizzato come solvente polare nella miscela di isopropanolo ed eptano.

In conclusione, lo studio di stabilità supporta l'efficacia della miscela eptano/isopropanolo (30:70 v/v) e l'utilizzo dello squalano come standard interno per il congelamento del campione a breve termine. Tuttavia, i dati suggeriscono che, qualora si renda necessaria una rianalisi quantitativa di precisione mirata specificamente alla benzoilecgonina, le indagini strumentali in GC-FID potrebbero dare risultati diversi a seconda del tempo di conservazione del campione stesso.

5.5 Analisi qualitativa degli alcaloidi mediante GC-MS

L'analisi qualitativa GC-MS sul campione G2 è fondamentale per la validazione del metodo. La corrispondenza tra i pattern di frammentazione sperimentali e gli spettri delle librerie internazionali garantisce infatti un riscontro analitico affidabile.

I tempi di ritenzione osservati in precedenza non sono alterati da interferenze della matrice o dalla sovrapposizione con agenti da taglio non identificati, fornendo la certezza analitica che le aree integrate dal rivelatore FID siano ascrivibili esclusivamente agli alcaloidi target.

Questo doppio livello di controllo, basato sulla quantificazione in FID e sulla conferma strutturale in MS, garantisce che i profili inseriti nel futuro database ADM siano strumenti robusti per la possibile analisi comparativa dei sequestri.

5.6 Analisi qualitativa dei solventi

5.6.1 Correlazione tra profilo chimico e dati visivi

L'integrazione tra l'analisi dei solventi residui e l'esame visivo dei reperti, basata sui loghi e sui tipi di confezionamento, permette di valutare le reali dinamiche logistiche alla base dei sequestri. Questo confronto dimostra come l'aspetto esteriore della merce possa rivelarsi fuorviante se non viene supportato da una caratterizzazione chimica.

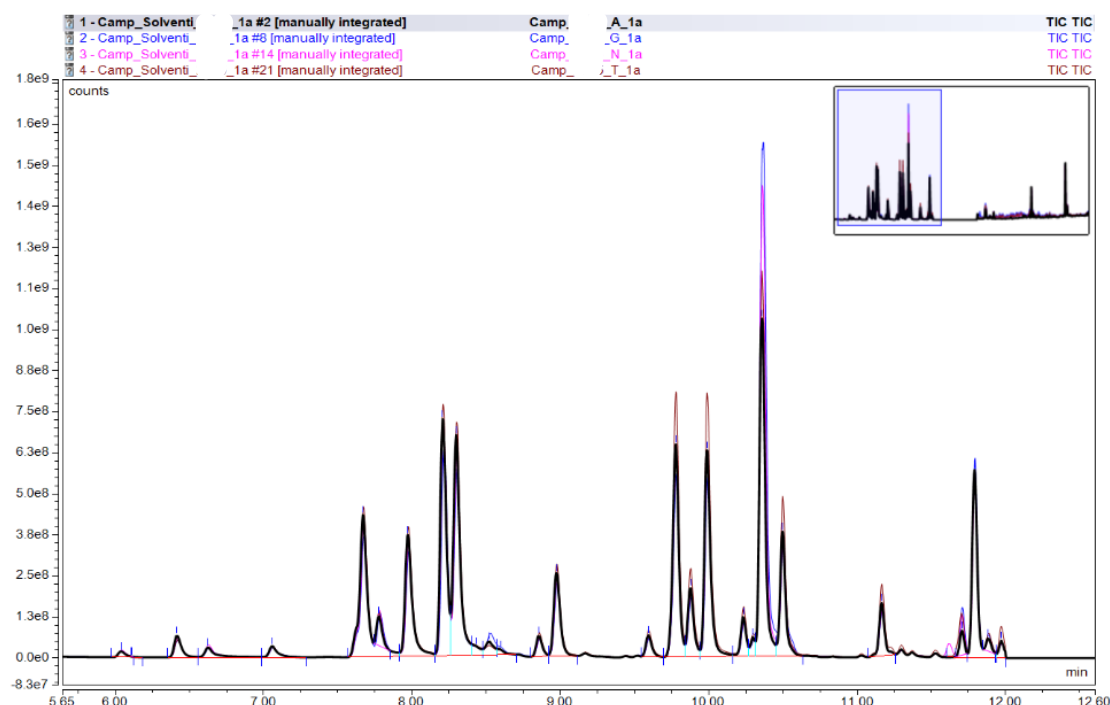


Figura 61: sovrapposizione degli spettri MS dei campioni A, G, N, T del sequestro 1.

Nel lotto 1 l'indagine visiva e quella chimica delineano uno scenario coerente. Tutti i panetti condividono lo stesso involucro e lo stesso logo, mentre il profilo gascromatografico evidenzia un'origine comune, caratterizzata dalla presenza costante di acetato di etile e da una contaminazione omogenea da idrocarburi alifatici. Questo indica che l'intero blocco deriva da un'unica lavorazione all'interno di un singolo laboratorio clandestino, trasportato senza subire rimescolamenti intermedi.

Una situazione opposta si osserva nel sequestro 3. Visivamente il carico appare eterogeneo, con diversi tipi di imballaggio, ma l'analisi chimica rivela una grande uniformità: la maggior parte dei campioni mostra un'impronta identica, dominata dall'acetato di etile e priva di contaminanti di macerazione. I differenti loghi non indicano quindi una pluralità di produttori, ma sono stati probabilmente applicati in una fase successiva di stoccaggio per indirizzare la

merce a committenti diversi. Un'eccezione è rappresentata dal campione 3 E, che presenta un involucro anomalo e solventi chetonici, suggerendo un inserimento estraneo alla filiera principale.

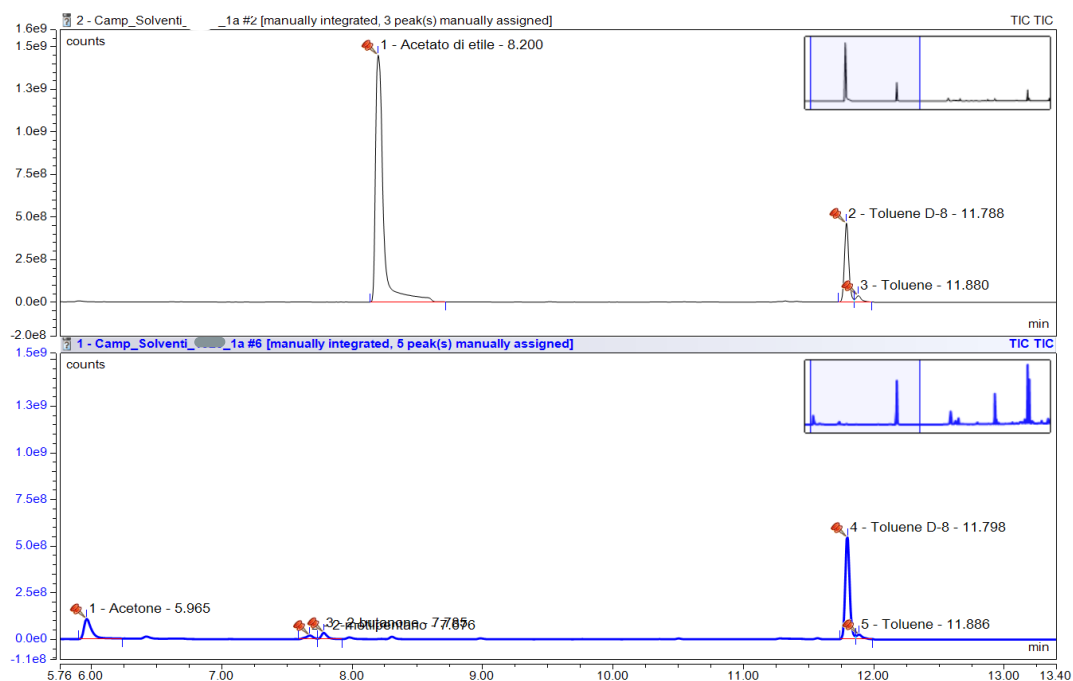


Figura 62: confronto tra lo spettro MS del campione 3E e del campione 3A

Il confronto incrociato dei dati relativi al lotto 2 ha evidenziato che, da un lato, il sottogruppo caratterizzato dall'involucro "Serbia" (contrassegnato prevalentemente dal logo D, con la sola eccezione del campione B1 con logo BOSS) mostra una spiccata omogeneità chimica sia all'interno della stessa confezione che tra confezioni differenti. C'è un'alta probabilità che questo blocco derivi da un processo produttivo originato da un unico laboratorio clandestino e trasportato senza subire alterazioni o rimescolamenti intermedi.

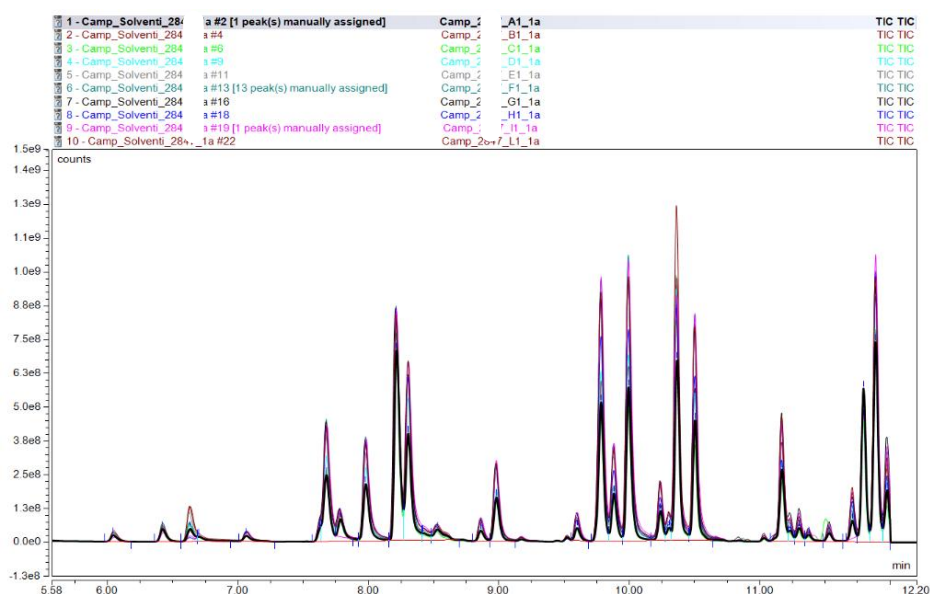


Figura 63: sovrapposizione degli spettri MS dei campioni aventi l'involucro "Serbia"

Dall'altro lato, il sottogruppo associato all'involucro "Coniglio" (da A2 a O2) presenta una varietà di marchi impressi (tra cui BOSS, LEONE + 77, 509, 22, TOYOTA), a cui corrisponde una disomogeneità chimica: panetti recanti lo stesso logo, come le diverse varianti del marchio BOSS nei campioni A2, C2, D2, L2, M2 e N2, rivelano profili di solventi differenti. Tale evidenza dimostra che i loghi impressi sui panetti con involucro "Coniglio" non riflettono l'effettiva origine produttiva della sostanza, ma potrebbero rispondere a logiche commerciali e di etichettatura messe in atto a valle della produzione, le quali assemblano e raggruppano lotti di cocaina sintetizzati in laboratori clandestini completamente indipendenti tra loro.

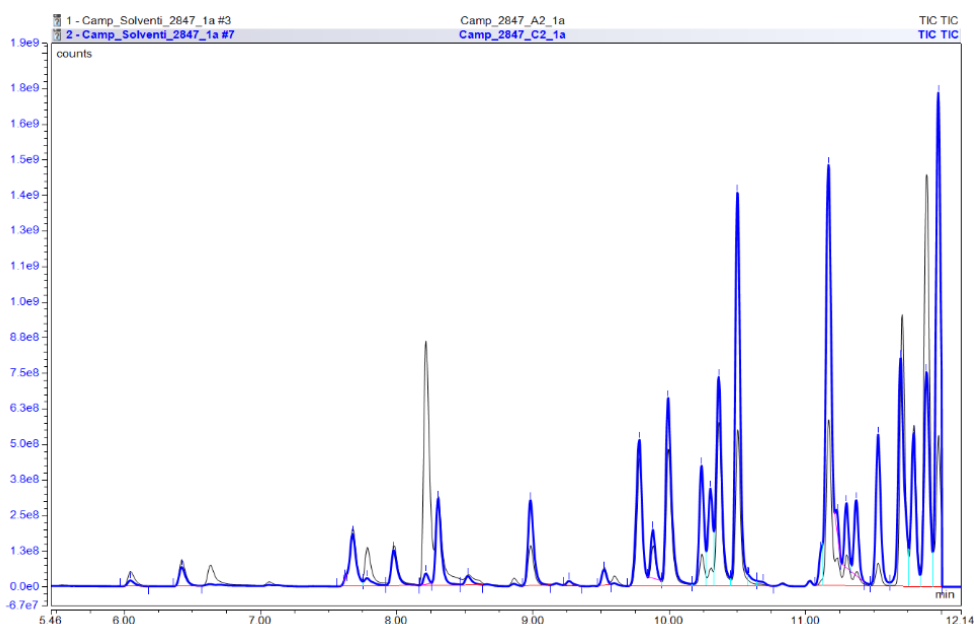


Figura 64: sovrapposizione degli spettri MS dei campioni A2 e C2, con profili chimici diversi

Nel complesso, questi dati dimostrano che classificare i sequestri basandosi solo sul packaging è riduttivo. I loghi potrebbero riflettere le strategie di distribuzione e non l'effettiva origine produttiva; per questo motivo l'analisi dei solventi residui si conferma uno strumento indispensabile per superare l'apparenza dell'imballaggio e ricostruire la vera filiera della cocaina.

5.6.2 Origine dei solventi e delle impurezze nella filiera produttiva della cocaina

Per comprendere l'origine dei solventi e delle impurezze volatili rilevate nei panetti, è necessario inquadrare l'intero processo di produzione della cocaina e ipotizzare i punti del ciclo in cui questi composti vengono incorporati nel prodotto, la cui filiera si articola tradizionalmente in tre macrofasi, ovvero l'estrazione primaria dalle foglie di *Erythroxylum coca*, la conversione della pasta base in cloridrato di cocaina attraverso la raffinazione e la successiva cristallizzazione o salificazione.

Nella prima fase, le foglie di coca vengono tritate e trattate all'interno di fosse di macerazione con soluzioni acquose basiche, come calce o carbonato di sodio, e solventi organici di estrazione a basso costo per isolare gli alcaloidi totali, ed è proprio in questo stadio iniziale che si ipotizza l'ingresso dei contaminanti alifatici e aromatici riscontrati nei profili GC-MS. L'impiego di carburanti commerciali di bassa lega, tra cui cherosene, virgin nafta o miscele di solventi ricche di pentano, esano, eptano, metilciclopentano, toluene e, nei casi di maggiore contaminazione industriale, tracce di benzene, lascia un'impronta persistente dal momento che questi idrocarburi agiscono come residui di trascinamento che, imprigionati nella matrice organica della pasta base, sopravvivono ai trattamenti successivi.

In questa fase si procede alla purificazione della pasta base e alla sua conversione in cocaina cloridrato, aggiungendo un acido (solitamente HCl) in un solvente organico per far precipitare il sale. Durante questo passaggio rimangono intrappolati i solventi residui che ritroviamo come marcatori nei cromatogrammi. L'impiego massiccio di acetato di etile o di acetato di propile, nonché in lotti specifici di chetoni come l'acetone e il 2-butanone, risponde all'esigenza del laboratorio clandestino di ottenere una cristallizzazione efficiente e un prodotto ad alta purezza, mentre la presenza esclusiva di uno o dell'altro estere, o di miscele bilanciate, riflette direttamente le disponibilità di reagenti chimici sul mercato locale e la scelta dell'operatore.

5.7 Danni per la salute

L'individuazione di solventi residui, sottoprodotti di degradazione e contaminanti all'interno dei reperti sequestrati evidenzia come il profilo chimico della cocaina non rivesta unicamente un ruolo chiave ai fini dell'intelligence investigativa, ma costituisca un fattore di rischio per la salute pubblica. Dal punto di vista farmacocinetico e farmacodinamico, l'assunzione di una matrice complessa e contaminata può alterare la tossicità della sostanza d'abuso, rendendo ogni sequestro un sistema con tossicità sinergica e imprevedibile.

Dal punto di vista metabolico, la norcocaina si distingue dalla cocaina per una maggiore reattività. Agisce a livello mitocondriale come potente induttore di specie reattive dell'ossigeno, aumentando la neurotossicità centrale e determinando un danno endoteliale diretto associato a un'elevata incidenza di aritmie ventricolari e complessi eventi coronarici acuti [2].

Il cocaetilene è un metabolita attivo che mostra attività farmacologica, con un'emivita media di 148 ± 15 minuti, più lunga rispetto alla cocaina. Alcuni studi riportano che esso può essere più letale e indurre reazioni tossiche acute più gravi, oltre a provocare un aumento più marcato della frequenza cardiaca rispetto alla cocaina [4].

Il benzene, residuo di solventi aromatici impiegati in sintesi grossolane, è un noto agente cancerogeno di classe I. La sua assunzione cronica interferisce direttamente con l'emopoiesi a livello del midollo osseo, inducendo quadri di citopenia e incrementando in modo drastico il rischio di patologie neoplastiche di natura ematologica [33].

La fenacetina è un farmaco ritirato dal mercato globale da decenni a causa della sua severa nefrotossicità e della comprovata cancerogenicità a carico delle vie urinarie [34], mentre l'azatioprina è un potente farmaco immunosoppressore la cui assunzione incontrollata inibisce la produzione cellulare nel midollo osseo, esponendo il consumatore a infezioni opportunistiche spesso letali e a un elevato rischio di neoplasie secondarie [35].

Questo riscontro dimostra come le sostanze aggiunte a valle della produzione non rappresentino semplici diluenti inerti, ma agenti eziologici determinanti nell'aggravamento della morbosità associata al consumo di stupefacenti.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro si è focalizzato sulla messa a punto e l'ottimizzazione di protocolli analitici integrati per la quantificazione e l'identificazione degli inquinanti e dei derivati minoritari della cocaina, con l'obiettivo di essere efficace sia per l'analisi dei grandi carichi di sostanza intercettati lungo le filiere di importazione, sia per i sequestri su strada, rivelandosi un metodo versatile.

L'integrazione tra le analisi spettroscopiche e cromatografiche fornisce infatti uno strumento conoscitivo di elevato valore per i funzionari dell'ADM e per tutte le forze dell'ordine impegnate quotidianamente nella repressione del narcotraffico internazionale e locale, offrendo elementi che superano l'esame ordinario dei campioni di cocaina effettuati all'interno dei laboratori.

Guardando alle prospettive future, il percorso avviato apre a diversi sviluppi operativi. In primo luogo, si rende necessaria la validazione ufficiale del metodo analitico secondo gli standard previsti dalla normativa di riferimento (UNI CEI EN ISO/IEC 17025), così da certificarne la ripetibilità e la robustezza in ambito giudiziario. Sul fronte della ricerca applicata, l'attività dovrà proseguire attraverso il costante arricchimento del database interno ADM, alimentato dalla ricezione e catalogazione di nuovi campioni di sequestro. Tale implementazione consentirà di avviare, in una fase successiva, la correlazione informatica e statistica di tutti i dati accumulati.

Infine, questa esperienza di tirocinio e tesi ha rappresentato per me un momento di crescita sul piano formativo e personale. L'opportunità di operare direttamente all'interno di questo laboratorio mi ha permesso di confrontarmi con la complessità della chimica analitica applicata all'ambito forense, traducendo in competenze pratiche e professionalizzanti le nozioni teoriche acquisite nel corso del ciclo di studi magistrale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] <https://www.adm.gov.it/portale/laboratori-chimici>
- [2] Roque Bravo, R., Faria, A. C., Brito-da-Costa, A. M., Carmo, H., Mladěnka, P., Dias da Silva, D., Remião, F., & On Behalf Of The Oeonom Researchers (2022). Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. *Toxins*, 14(4), 278. <https://doi.org/10.3390/toxins14040278>
- [3] Biondich, Amy Sue, Joslin, Jeremy David, Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition, *Emergency Medicine International*, 2016, 4048764, 5 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4048764>
- [4] Goldstein, R. A., DesLauriers, C., Burda, A., & Johnson-Arbor, K. (2009). Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. *Seminars in diagnostic pathology*, 26(1), 10–17. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2008.12.001>
- [5] Cone E. J. (1995). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *Journal of analytical toxicology*, 19(6), 459–478. <https://doi.org/10.1093/jat/19.6.459>
- [6] Bo Holmstedt, Jan-Erik Lindgren, Laurent Rivier, Timothy Plowman (1979). Cocaine in blood of coca chewers. *Journal of Ethnopharmacology* Volume 1, Issue 1, January 1979, 69-78. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(79\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(79)90017-5)
- [7] Amanda J. Jenkins, Teobaldo Llosa, Ivan Montoya, Edward J. Cone, Identification and quantitation of alkaloids in coca tea, *Forensic Science International*, Volume 77, Issue 3, 1996, Pages 179-189, ISSN 0379-0738, [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01860-3](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01860-3)
- [8] Laizure, S. C., Mandrell, T., Gades, N. M., & Parker, R. B. (2003). Cocaethylene metabolism and interaction with cocaine and ethanol: role of carboxylesterases. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 31(1), 16–20. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.1.16>
- [9] AL Myers, HE Williams, JC Kraner, PS Callery; Identification of Anhydroecgonine Ethyl Ester in the Urine of a Drug Overdose Victim. *J. Forensic Sci.* 1 November 2005; 50 (6): JFS2005118–5. <https://doi.org/10.1520/JFS2005118>
- [10] Marilyn A. Huestis, W. David Darwin, Eric Shimomura, Shairose A. Lalani, Daniel V. Trinidad, Amanda J. Jenkins, Edward J. Cone, Aaron J. Jacobs, Michael L. Smith, Buddha D.

Paul, Cocaine and Metabolites Urinary Excretion after Controlled Smoked Administration, *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 31, Issue 8, October 2007, Pages 462–468, <https://doi.org/10.1093/jat/31.8.462>

[11] Edward J. Cone, Angela H. Sampson-Cone, William D. Darwin, Marilyn A. Huestis, Jonathan M. Oyler, Urine Testing for Cocaine Abuse: Metabolic and Excretion Patterns following Different Routes of Administration and Methods for Detection of False-Negative Results, *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 27, Issue 7, October 2003, Pages 386–401, <https://doi.org/10.1093/jat/27.7.386>

[12] Proebstl, L., Kamp, F., Manz, K., Krause, D., Adorjan, K., Pogarell, O., Koller, G., Soyka, M., Falkai, P., & Kambeitz, J. (2019). Effects of stimulant drug use on the dopaminergic system: A systematic review and meta-analysis of in vivo neuroimaging studies. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*, 59, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2019.03.003>

[13] Phillips, K., Luk, A., Soor, G.S. *et al.* Cocaine Cardiotoxicity. *Am J Cardiovasc Drugs* 9, 177–196 (2009). <https://doi.org/10.1007/BF03256574>

[14] Lever, J.R., Fergason-Cantrell, E.A., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Lord, S.A., Xu, R., Miller, D.K. and Lever, S.Z. (2016), Cocaine occupancy of sigma₁ receptors and dopamine transporters in mice. *Synapse*, 70: 98-111. <https://doi.org/10.1002/syn.21877>

[15] Richards JR, Hollander JE, Ramoska EA, et al. β -Blockers, Cocaine, and the Unopposed α -Stimulation Phenomenon. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2016;22(3):239-249. doi:[10.1177/1074248416681644](https://doi.org/10.1177/1074248416681644)

[16] Heal, D. J., Gosden, J., & Smith, S. L. (2014). Dopamine reuptake transporter (DAT) "inverse agonism"--a novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine. *Neuropharmacology*, 87, 19–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.012>

[17] Wolf M. E. (2025). Targeting Neuroplasticity in Substance Use Disorders: Implications for Therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 65(1), 259–280. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-061724-080548>

[18] https://www.unodc.org/pdf/convention_1961_en.pdf

[19] https://www.unodc.org/pdf/convention_1971_en.pdf

[20] https://www.unodc.org/pdf/convention_1988_en.pdf

- [21] United States Drug Enforcement Administration. Drug Scheduling. <https://www.dea.gov/drug-information/drug-scheduling>
- [22] Talking Drugs. Drug Decriminalization Across the World. <https://www.talkingdrugs.org/drugdecriminalisation>
- [23] Misuse of Drugs Act. Misuse of Drugs Act 1971. <https://www.legislation.gov.uk/ukpga/1971/38/section/5>
- [24] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX%3A32004R0273>
- [25] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=celex%3A32005R0111>
- [26] <https://www.consilium.europa.eu/media/49194/eu-drugs-strategy-booklet.pdf>
- [27] <https://www.europol.europa.eu/crime-areas-and-trends/eu-policy-cycle-empact>
- [28] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52023DC0641>
- [29] <https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:presidente.repubblica:decreto:1990-10-09;309>
- [30] https://www.unodc.org/documents/scientific/Drug_Sampling.pdf
- [31] https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_Manual_Rev_1.pdf
- [32] Ehleringer, J. R., Casale, J. F., & Lott, M. J. (2016). Geographically sourcing cocaine's origin – Delineation of the nineteen major coca growing regions in South America. *Scientific Reports*, 6, 23520. doi:[10.1038/srep23520](https://doi.org/10.1038/srep23520)
- [33] Snyder, R., Witz, G., & Goldstein, B. D. (1993). The toxicology of benzene. *Environmental Health Perspectives*, 100, 293–306. <https://doi.org/10.1289/ehp.93100293>
- [34] McCredie, M., Stewart, J. H., & Day, N. E. (1993). Different roles for phenacetin and paracetamol in cancer of the kidney and renal pelvis. *International Journal of Cancer*, 53(2), 245–249. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910530212>
- [35] Maltzman, J. S., & Koretzky, G. A. (2003). Azathioprine: old drug, new actions. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(8), 1122–1124. <https://doi.org/10.1172/JCI18384>

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Professor Grillo e la Professoressa Cervetto per avermi accompagnata fin dall'inizio nella stesura di questo progetto e per i loro preziosi consigli.

Un ringraziamento speciale va ad Antonella, Roberto, Nancy, Carletto, Sara e Giovanni, per la splendida esperienza di tirocinio vissuta al laboratorio della Dogana di Savona. Mi avete supportato e sopportato in questi mesi, rendendo questo traguardo possibile. Ho imparato tantissimo da voi, sia dal punto di vista professionale, sia da quello umano e farò tesoro di ogni insegnamento... E chissà, magari un giorno potremo essere colleghi per davvero.

Un grazie speciale va ad Elisa, la mia compagna fedele di studi e di sventure: questo risultato è anche per metà tuo. Senza le nostre chiamate, senza i file condivisi e senza la nostra sorellanza, non sarei qui oggi. Sono immensamente grata di aver intrapreso questo percorso, che mi ha permesso di trovare un'altra persona che posso definire veramente amica.

Vorrei poi ringraziare i miei amici, qui con me in questo giorno speciale. Condividere questo momento è un altro tassello che si aggiunge alle nostre esperienze insieme, e so che ce ne saranno ancora tantissime fino alla fine dei tempi.

Un grazie enorme va alla mia famiglia, il mio porto sicuro da sempre e per sempre, senza la quale sarei persa. Vi amo con tutto il cuore e siete la cosa più preziosa che ho.

A tutti voi, il mio più grande grazie