

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Espectrometria de massas por *Paper Spray*
Ionization: técnica analítica versátil para os
desafios da Química forense**

Thays Colletes de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia,
2018

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Thays Colletes de Carvalho

Título do trabalho: Espectrometria de massas por *Paper Spray Ionization*: técnica analítica versátil para os desafios da Química forense.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 19 / 11 / 2018.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Espectrometria de massas por *Paper Spray*
Ionization: técnica analítica versátil para os
desafios da Química forense**

Thays Colletes de Carvalho

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do título de Doutor
em Química.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia,
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Colletes de Carvalho, Thays

Espectrometria de massas por Paper Spray Ionization: técnica analítica versátil para os desafios da Química forense. [manuscrito] / Thays Colletes de Carvalho. - 2018.

XVII, 107 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2018. Bibliografia.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Paper Spray Ionization. 2. Química Forense. 3. Drogas de Abuso. 4. Sangue. 5. Polímero Molecularmente Impresso.. I. Gontijo Vaz, Boniek , orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

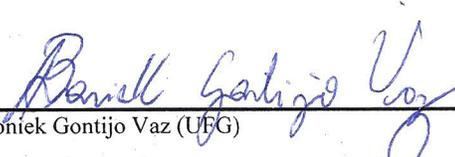
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

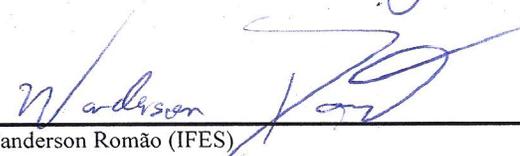
Ata da defesa de Tese de Doutorado de Thays Colletes Carvalho, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutora em Química.

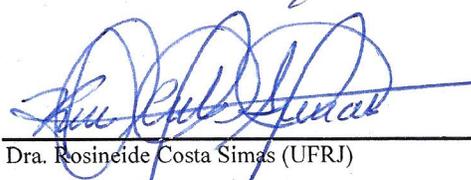
Aos dias 05 (cinco) de outubro do ano de 2018 (dois mil e dezoito), com início às 14:00 horas no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Boniek Gontijo Vaz (UFG), Wanderson Romão (IFES), Rosineide Costa Simas (UFRJ), Andréa Rodrigues Chaves (UFG) e Ana Paula Terezan (UFG), sob a presidência do primeiro, para julgar a tese de Thays Colletes de Carvalho, intitulada: "Espectrometria de massas por *Paper Spray Ionization*: técnica analítica versátil para os desafios da Química forense". O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

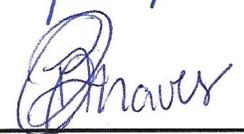
Dr. Boniek Gontijo Vaz: Aprovada
Dr. Wanderson Romão: Aprovada
Dra. Rosineide Costa Simas: Aprovada
Dra. Andréa Rodrigues Chaves: Aprovada
Dra. Ana Paula Terezan: Aprovada

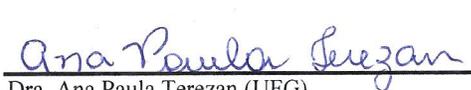
A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Thays Colletes de Carvalho, candidata ao título de doutora em Química foi: Aprovada (X); Reprovada (), conforme justificativa em documento anexo a esta ata. Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o senhor Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lídia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 05 de outubro de 2018.


Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG)


Dr. Wanderson Romão (IFES)


Dra. Rosineide Costa Simas (UFRJ)


Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG)


Dra. Ana Paula Terezan (UFG)

Dedico aos meus pais, Paulo e Cristina, que estiveram sempre me apoiaram, ao meu noivo, Vinícius, e ao meu irmão, Thiago, e minha cunhada, Lorena.

Agradecimentos

No término desta fase da minha vida, tenho muito a agradecer pelo apoio, ajuda e correções.

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me iluminou durante esta caminhada.

Aos meus pais, que me apoiaram quando decidi fazer o curso de química, no meu mestrado e me apoiaram a fazer o doutorado. Sempre que precisei me ouviram, me deram conselhos e me ajudaram a ficar firme até o final.

Ao meu irmão e minha cunhada, por todo apoio que me deram.

Ao meu noivo, que foi muito paciente comigo quando eu estava estressada. Ele me ajudou bastante em várias situações difíceis.

Aos meus amigos por continuarem sempre do meu lado. Principalmente a Lidya, que sempre que eu precisei esteve ao meu lado, principalmente na hora dos doces.

Ao meu orientador, Boniek, sem o qual não teria chegado aqui. Sei que muito aprendi com ele e ainda muito aprenderei. Por ter me corrigido, incentivado e sempre tentando tirar o melhor de mim.

Aos alunos do LACEM, que além de me ajudarem quando precisei, compartilhando o conhecimento, também ajudaram fazendo essa etapa ser mais fácil e divertida.

Aos meus amigos da Superintendência da Polícia técnico-científica do Estado de Goiás, por toda amostra, ajuda, conselho, conhecimento que me trouxeram para ajudar no desenvolvimento do meu trabalho. Principalmente a Flávia, Kelly e Maiulle.

A banca de qualificação, Profa. Dra. Andrea Rodrigues Chaves, Profa. Dra. Lucília Kato e Dra. Patrícia Verardi Abdelnur, e a minha banca de doutorado, Prof. Dr Wanderson Romão, Profa. Dra. Rosineide Costa Simas e Dr. Ana Paula Terezan, por todas as orientações.

A CAPES e o CNPQ por todo o fomento oferecido durante o doutorado, como a bolsa universitária e a possibilidade de compra de materiais e reagentes.

Agradeço, também, a muitos outros que passaram por esses anos de doutorado, dando conselho e preciosa ajuda com todas as etapas dessa fase.

Sumário

| | |
|---|------|
| Tabela de Figuras..... | viii |
| Lista de Tabelas | xi |
| Lista de Equações..... | xii |
| Lista de siglas | xiii |
| Resumo | xv |
| Abstract..... | xvii |
| Capítulo 1: Introdução Geral..... | 1 |
| 1.1. Química Forense..... | 2 |
| 1.2. Espectrometria de Massas..... | 3 |
| 1.3. <i>Paper Spray Ionization</i> | 4 |
| 1.4. Analisadores de massas | 8 |
| 1.5. Objetivos..... | 14 |
| 1.5.1. Objetivo Geral..... | 14 |
| 1.5.2. Objetivo Específico..... | 14 |
| Capítulo 2. <i>Paper spray Ionization: Análise Direta de Designers Drugs</i> | 15 |
| 2.1. Introdução..... | 16 |
| 2.2. Materiais e métodos..... | 20 |
| 2.2.2. PS-MS..... | 20 |
| 2.2.3.ESI (+) -FT-ICR-MS..... | 20 |
| 2.3. Resultados e discussão | 22 |
| 2.3.1. PS-MS..... | 22 |
| 2.3.2.ESI (+) - FT-ICR-MS..... | 29 |
| 2.4. Conclusão..... | 33 |
| Capítulo 3. Análises de extratos dos <i>spots</i> de cromatografia de camada delgada de cocaína e adulterantes com espectrometria de massas por <i>Paper Spray Ionization</i> | 34 |
| 3.1. Introdução..... | 35 |
| 3.2. Metodologia | 42 |
| 3.2.1. Materiais e reagentes..... | 42 |
| 3.2.2. TLC | 42 |
| 3.2.3. PS-MS..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.2.4. Repetibilidade e Reprodutibilidade | 44 |
| 3.3 Resultados e discussão | 45 |
| 3.3.1. Otimização da CCD | 45 |
| 3.3.2. Identificação de padrões de cocaína e adulterantes..... | 49 |
| 3.3.3. Repetibilidade e reprodutibilidade..... | 56 |
| 0.46 | 57 |
| 3.3.4. Identificação de cocaína e adulterantes em amostras apreendidas | |
| 57 | |
| 3.4. Conclusão..... | 63 |
| Capítulo 4. <i>Screening</i> de benzodiazepínicos em amostras de sangue por <i>Paper Spray Ionization</i>..... | |
| 64 | |
| 4.1. Introdução..... | 65 |
| 4.1.1. Validação analítica | 67 |
| 4.2. Metodologia..... | 72 |
| 4.2.1. Padrões, reagentes e solventes. | 72 |
| 4.2.2. Preparo da amostra de sangue..... | 72 |
| 4.2.3. MIP-PS-MS e MIP-PS-MS / MS..... | 73 |
| 4.2.4. Síntese da membrana de MIP e NIP | 73 |
| 4.2.5. Validação analítica | 74 |
| 4.3. Resultados e discussão | 76 |
| 4.3.1. Performance do MIP-PS-MS..... | 76 |
| 4.3.2. Seletividade da membrana do MIP | 78 |
| 4.3.3. Quantificação do diazepam e do Lorazepam com o MIP-PS-MS | 80 |
| 4.3.3.1. Linearidade..... | 80 |
| 4.3.3.2. Limite de detecção e Limite de Quantificação | 81 |
| 4.3.4. Precisão, exatidão e recuperação | 82 |
| 4.3.5. Aplicação do método desenvolvido de MIP-PS-MS em amostras reais de vítimas de BZD..... | 83 |
| 4.4. Conclusão..... | 87 |

| | |
|---|------------|
| Capítulo 5. Conclusão Geral | 88 |
| Capítulo 6. Referências bibliográficas. | 91 |
| Capítulo 7. Curriculum Vitae | 103 |
| Capítulo 8. Artigos Publicados | 107 |

Tabela de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema geral de um sistema de PS-MS adaptado de Cooks e colaboradores(Liu, Wang, Manicke, Lin and Cooks, 2010). | 5 |
| Figura 2: Esquema do espectrômetro de massas Ion trap LTQ-XL, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2006). | 10 |
| Figura 3: Ejeção dos íons pelo <i>ion trap</i> de acordo com a razão <i>m/z</i> do íon (Thermo Fisher Scientific, 2006). | 11 |
| Figura 4: Esquema do espectrômetro de massas Ion trap LCQ Fleet, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2006). | 12 |
| Figura 5: Esquema do analisador <i>Ion trap</i> LCQ Fleet, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2006). | 12 |
| Figura 6: Estruturas químicas das designers drugs analisadas por PS-MS: (A) LSD, (B) DOC, (C) DOB, (D) 25C-NBOMe, (E) 25B-NBOMe e (F) 25I-NBOMe. ... | 19 |
| Figura 7. Espectro de PS(+)-MS dos selos de papel do DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, LSD, e 25I-NBOMe..... | 22 |
| Figura 8. Espectro de PS(+)-MS/MS dos íons $[M + H]^+$ para DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe e LSD. | 23 |
| Figura 9. Mecanismo das fragmentações referente ao íon protonado do LSD, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 324..... | 25 |
| Figura 10. Mecanismo das fragmentações referente aos íons protonados do DOC, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 230, e DOB, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 274. | 26 |
| Figura 11: Mecanismo das fragmentações referente aos íons protonados do 25C-NBOMe, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 336, 25B-NBOMe, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 380, e 25I-NBOMe, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 428. | 27 |
| Figura 12: Mecanismo das fragmentações referente aos íons protonados das isômeros do 25C-NBOMe, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 336, 25B-NBOMe, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 380, e 25I-NBOMe, $[M + H]^+$ <i>m/z</i> 428. | 28 |
| Figura 13. Espectro de ESI(+)-FT-ICR-MS do extrato do selo de LSD na resolução de 670000 (a) e resolução 130000 (b), com os respectivos erros obtidos..... | 29 |
| Figura 14: ESI(+)-MS/MS do íon protonado do LSD, $[M + H]^+$, <i>m/z</i> 324. | 30 |
| Figura 15. Espectro de ESI (+) -FT-ICR do DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe. | 31 |
| Figura 16. ESI (+) -MS/MS dos íons protonados de DOC, DOB, 25C-NBOMe e 25I-NBOMe..... | 32 |
| Figura 17. Estrutura química da cocaína na forma de base, em equilíbrio ácido-base com o cloridrato de cocaína..... | 35 |
| Figura 18. Números de cultivo, apreensão, produção e usuários de cocaína em 2016. Fonte: <i>World drug Report 2018</i> ,(United Nations Office on Drugs and Crime, 2018)..... | 37 |
| Figura 19. Principais adulterantes químicos de amostras de cocaína e crack. 38 | |

| | |
|--|----|
| Figura 20. Representação gráfica de placas de TLC e os possíveis resultados. Onde em A) se tem uma amostra com o resultado negativo para o analito desejado e em B) uma amostra com resultado positivo para o analito desejado. | 40 |
| Figura 21. Sistemas de eluição por TLC avaliados para identificação de cocaína e seus adulterantes. | 43 |
| Figura 22: Ilustração do projeto experimental. Cada <i>spot</i> da CCD foi transferido a um tubo de eppendorf com 0,1% de ácido fórmico em metanol (v/v%). A solução resultante foi então aplicada em um papel triangular e todos os compostos do <i>spot</i> foram analisados por PS-MS. | 44 |
| Figura 23. Otimização do sistema de CCD variando a aplicação do método (a), o volume de amostra aplicado (b) e a concentração do analito (c). | 46 |
| Figura 24. Sistema de CCD para otimização das fases móveis: a) CHCl ₃ :CH ₃ OH: HCOOH glacial, 75:20:5 v/v%); b) CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃ :CHCl ₃ (50:50%); e (c) CH ₃ OH:NH ₄ OH (100:1.5 v%) | 47 |
| Figura 25. Variação da razão dos solventes do sistema de eluição CH ₃ OH:NH ₄ OH em: (a) 99.5: 0.5 v%; (b) 99:1.0 v%; (c) 97.5: 2.5 v%; (d) 97:3 v%; (e) 96.5: 3.5 v%. | 48 |
| Figura 26. Placas de CCD dos padrões Benzocaína, Cafeína, Lidocaína, Fenacetina e Cocaína. | 49 |
| Figura 27: Espectros de PSI-MS da cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina nas concentrações 0,5; 4,0; 10,0 e 14,0 mg mL ⁻¹ . | 50 |
| Figura 28. Espectro de PS-MS/MS da cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina e benzoilecgonina. | 51 |
| Figura 29. Mecanismo de fragmentação do pico <i>m/z</i> 304 referente a cocaína protonada, [M + H] ⁺ <i>m/z</i> 304. | 52 |
| Figura 30: Mecanismo de fragmentação do pico <i>m/z</i> 290 referente a benzoilecgonina protonada, [M + H] ⁺ <i>m/z</i> 290. | 52 |
| Figura 31. Mecanismo de fragmentação do pico <i>m/z</i> 166 referente a benzocaína protonada, [M + H] ⁺ <i>m/z</i> 166. | 53 |
| Figura 32: Mecanismo de fragmentação do pico <i>m/z</i> 195 referente a cafeína protonada, [M + H] ⁺ <i>m/z</i> 195 | 53 |
| Figura 33: Mecanismo de fragmentação do pico <i>m/z</i> 235 referente a lidocaína protonada, [M + H] ⁺ <i>m/z</i> 235. | 53 |
| Figura 34: Mecanismo de fragmentação do pico <i>m/z</i> 180 referente a fenacetina protonada, [M + H] ⁺ <i>m/z</i> 180. | 54 |
| Figura 35: Curvas de calibração para a cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina. | 55 |
| Figura 36. Representação das placas de TLC das amostras apreendidas de cocaína com o método otimizado. | 58 |
| Figura 37. Representação das placas de TLC das amostras apreendidas de crack com o método otimizado. | 59 |
| Figura 38. Estruturas Químicas do diazepam e do lorazepam. | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 39: esquema da extração do analito do sangue realizada como preparo de amostra. | 72 |
| Figura 40: Esquema da síntese da membrana de MIP e do NIP na membrana de celulose. Como primeira etapa tem-se a lavagem da membrana seguida por sua preparação com benzofenona. Após isso é realizado a síntese da membrana MIP e do NIP e a aplicação da radiação para formação do polímero. Por fim é a membrana modificada é lavada para remoção do <i>template</i> | 74 |
| Figura 41. Espectro MIP-PS (+)-MS do branco da membrana com o solvente (acetonitrila), para comprovar a eliminação do <i>template</i> durante a limpeza da membrana. | 76 |
| Figura 42. Espectro de PS-(+)MS (a) e MIP-PS-(+)-MS (b) da amostra de sangue dopada com diazepam, [M + H] ⁺ , <i>m/z</i> 285. | 77 |
| Figura 43. MIP-PS-MS/MS da amostra de sangue com diazepam, [M + H] ⁺ , <i>m/z</i> 285. | 78 |
| Figura 44: Gráfico de barra dos sinais de intensidades do extrato de sangue (1000 ng mL ⁻¹) usando as membranas de MIP e NIP para os benzodiazepínicos (diazepam, lorazepam, 7-aminoclonazepam, hydroximidazolam, cocaína, LSD, DOB e MDMA). | 80 |
| Figura 45: Análise quantitativa do sangue com diazepam e seu padrão interno Lorazepam (400 ng mL ⁻¹) (a) e do lorazepam com seu padrão interno diazepam (400 ng mL ⁻¹) (b) | 81 |
| Figura 46. MIP-PS (+) -MS (a), PS (+) -MS (b) e MIP-PS (+) -MS/MS (c) de amostra de sangue de possível vítima de assédio sexual. | 84 |
| Figura 47 MIP-PS (+) -MS (a), PS (+) -MS (b) e MIP-PS (+) -MS/MS (c) de amostra de sangue de possível vítima de assédio sexual. | 85 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Caracterização dos analisadores de espectrometria de massas de acordo com seu princípio de separação, limite de massa, resolução, exatidão, vantagem, desvantagem e preço. | 9 |
| Tabela 2. Fórmula molecular, valores de m/z experimenta e fragmentos (MS^2) do espectro de PS(+)-MS/MS para as seis drogas sintéticas analisadas nos selos. | 24 |
| Tabela 3. Formula molecular, DBE, m/z experimental e teorico e o erro do DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOME e 25I-NBOMe..... | 31 |
| Tabela 4: Valores de Rf para os padrões de fenacetina, cafeína, cocaína, benzocaína e lidocaína. | 47 |
| Tabela 5: Valores de Rf dos padrões para diferentes proporções da fase móvel (em % de volume) de CH ₃ OH:NH ₄ OH..... | 48 |
| Tabela 6: Comparação do LOD obtido apenas para a CCD e do acoplamento da técnica cromatográfica com o PS..... | 56 |
| Tabela 7. Valores da razão de m/z 304/290 correspondentes a cocaína/ benzoilecgonina obtido por PS (+) -MS de nove replicatas em cinco dias diferentes..... | 57 |
| Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos em 5 dias por PS (+) -MS da cocaína/benzoilecgonina. | 57 |
| Tabela 9: Compostos detectados em cada spot da CCD provenientes da análise de cada amostra de cocaína (Ax) apreendida | 60 |
| Tabela 10: Compostos detectados em cada spot da CCD provenientes da análise de cada amostra de crack (Bx) apreendida. | 61 |
| Tabela 11: Faixas de concentrações obtidas nas amostras apreendidas de pó de cocaína e do crack. | 62 |
| Tabela 11 Condição de MS/MS para o LCQ Fleet..... | 79 |
| Tabela 12: Limites de detecção e quantificação para o diazepam e lorazepam | 82 |
| Tabela 13. Exatidão, precisão e recuperação para a análise de MIP-PS-MS do diazepam em sangue | 83 |
| Tabela 14: Exatidão, precisão e recuperação para a análise de MIP-PS-MS do lorazepam..... | 83 |

Lista de Equações

| | |
|---|----|
| Equação 1: Equação para o cálculo do índice de retenção..... | 40 |
| Equação 2: Equação da regressão linear. | 68 |
| Equação 3: Equação do coeficiente de correlação R^2 | 68 |
| Equação 4. Equação do Limite de detecção, onde “DPa” é o desvio padrão do branco, “K” é um número fatorial escolhido como grau de confiança (aceita-se 3 para LOQ e 10 para LOD) e “a” o coeficiente angular da curva analítica..... | 69 |
| Equação 5. Equação da precisão do método, onde “DP” é o desvio padrão e “CMD” é a concentração média determinada experimentalmente. | 70 |
| Equação 6: Equação da exatidão do método, onde CMD é a concentração média experimental e CN a concentração nominal da amostra. | 70 |
| Equação 7: Equação para o cálculo da recuperação, onde " CE" é a concentração experimental e CN a concentração nominal. | 71 |

Lista de siglas

| | |
|-----------------|--|
| ANOVA | Análise de variância |
| ANVISA | Agência Nacional da Vigilância Sanitária |
| GC | Cromatografia gasosa |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| CRM | Do inglês <i>Charged residue model</i> |
| DART | Análise direta em tempo real do inglês <i>Direct analysis in real time</i> |
| DBS | Mancha de sangue seco do inglês <i>Dry Blood Spot</i> |
| DESI | Ionização de dessorção por eletrospray do inglês <i>Desorption electrospray ionization</i> |
| ESI | Do inglês <i>Electrospray Ionization</i> |
| ICR | Ressonância Ciclotrônica de íons do inglês <i>ion cyclotron resonance</i> |
| IEM | Mecanismo de evaporação do íon do inglês <i>Ion evaporation mechanism</i> |
| LOD | Limite de detecção |
| LOQ | Limite de quantificação |
| <i>m/z</i> | Razão massa/carga |
| MS | Espectrometria de massas do inglês <i>Mass spectrometry</i> |
| MS ⁿ | Espectrometria de massas tandem do inglês <i>Tandem Mass spectrometry</i> |
| PS (+) – | Análise por Paper Spray no modo positivo |
| MS PS | Do inglês <i>Paper Spray</i> |
| S | Desvio padrão |

| | |
|-----------|--|
| TOF-MS | Espectrômetro de massas por tempo de voo do inglês <i>Time of Flight mass spectrometry</i> |
| LSD | Dietilamida do ácido Lisérgico do inglês <i>Lysergic acid diethylamide</i> |
| DOC | 2,5-dimetoxi-4-cloronfetamina do inglês <i>2,5-dimethoxy-4-chloroamphetamine</i> |
| DOB | 2,5-dimetoxi-4-bromonfetamina do inglês <i>2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine</i> |
| TLC | Do inglês <i>Thin Layer Chromatographic</i> |
| MIP | Polímero molecularmente impresso do inglês <i>Molecularly imprinted polymer</i> . |
| FT-ICR-MS | A espectrometria de massa de ressonância de ciclotron de íons com transformada de Fourier do inglês <i>Fourier transform ion cyclotron</i> |
| LC | Cromatografia líquida do inglês <i>liquid chromatography</i> |
| SNC | Sistema nervoso central. |
| UNODC | Escritório das nações unidas sobre drogas e crimes |
| DE | Drogas de estupro |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| Dpa | Desvio padrão do branco |
| B | Coefficiente linear da curva analítica |
| Dp | Desvio padrão |
| CMD | Concentração média determinada experimentalmente |
| CE | Concentração experimental |
| CN | Concentração Nominal |
| MDMA | Metilendioximetanfetamina |
| NIP | Polímero não impresso do inglês <i>non-imprinted polymer</i> |

Resumo

A ionização é uma etapa crucial em espectrometria de massas (MS) e rege a versatilidade desta importante técnica analítica. A ionização é a responsável por transferir átomos e moléculas, em suas respectivas formas ionizadas, para o ambiente de alto vácuo dos espectrômetros de massas, onde são discriminados em função de sua razão massa sobre carga (m/z). Dentre as diversas técnicas de ionização de MS, a técnica de ionização por *Paper spray* (PS) é uma das mais simples, versátil e pode ser implementada facilmente em sistema de MS. Nesse trabalho diversas aplicações do PS-MS na área forense foram desenvolvidas, demonstrando sua capacidade para *screening* de novas drogas sintéticas, como ferramenta complementar ao método de cromatografia de camada delgada (TLC) e como ferramenta para monitorar “boa noite cinderela” em sangue. Na primeira aplicação, o PS-MS mostrou ser um método eficaz e rápido para identificação de drogas sintéticas dietilamida do ácido lisérgico (LSD), 2,5-dimetoxi-4-cloroanfetamina (DOC), 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB), 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe) em selos, tanto pelo perfil isotópico das substâncias, quanto pela fragmentação apresentada na espectrometria de massas tandem. Já na segunda aplicação, acoplou-se TLC ao PS-MS visando alcançar maior confiabilidade nos resultados de TLC. Desta maneira, otimizou-se um método de TLC para análise de cocaína e adulterantes (caféina, benzocaína, lidocaína e fenacetina) avaliando sua sensibilidade e seletividade. Com intuito de melhorar os Limites de Detecção e Quantificação para a cocaína e adulterantes, os *spots* foram analisados por PS-MS, obtendo melhorias nos resultados. Por fim, com o intuito de resolver a baixa seletividade do PS-MS, um novo substrato foi desenvolvido, principalmente quando o alvo analítico está em misturas complexas, como sangue. Trata-se de uma membrana recoberta com um polímero molecularmente impresso (MIP) com dupla função: extração e ionização simultânea de alvos em um mesmo dispositivo. A membrana desenvolvida foi aplicada na determinação de benzodiazepínicos em amostras de sangue de supostas vítimas de benzodiazepínicos. O sangue é uma amostra complexa que contém vários compostos que podem suprimir o sinal do analito. Com essa modificação qualquer supressão é evitada, conseguindo-se ótimos resultados, tanto qualitativos quanto

quantitativos. Sendo assim, o PS-MS é uma técnica rápida e de baixo custo, que pode substituir ou complementar as análises convencionais em um laboratório perícia, aumentando a produtividade da justiça brasileira.

Abstract

Ionization is a crucial step in mass spectrometry (MS) and governs the versatility of this important analytical technique. Ionization is responsible for transferring atoms and molecules, in their respective ionized forms, into the high vacuum environment of mass spectrometers, where they are discriminated as a function of their m/z ratio. Among the several techniques of ionization of MS, the technique of ionization by Paper spray (PS) is one of the simplest, versatile and can be implemented easily in MS system. In this work, several PS-MS applications in the forensic area were developed, demonstrating their ability to screen new synthetic drugs as a complementary tool to the thin layer chromatography (TLC) method and as a tool to monitor Date-rape Drugs in blood. In the first application, PS-MS was shown to be an effective and rapid method for the identification of synthetic drugs lysergic acid diethylamide (LSD), 2,5-dimethoxy-4-chloroamphetamine (DOC), 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB), 25C-NBOMe, 25B-NBOMe and 25I-NBOMe) in bottles, both by the isotopic profile of the substances and by the fragmentation presented in tandem mass spectrometry. In the second application, the TLC was coupled to the PS-MS in order to achieve greater reliability in the CCD results. In this way, a CCD method for the analysis of cocaine and adulterants (caffeine, benzocaine, lidocaine and phenacetin) was optimized by evaluating its sensitivity and selectivity. In order to improve the Detection and Quantification Limits for cocaine and adulterants, the spots were analyzed by PS-MS, obtaining improvements in the. Finally, in order to solve the low PS-MS selectivity, a new substrate was developed, especially when the analytical target is in complex mixtures, such as blood. It is a membrane coated with a molecularly printed polymer (MIP) with dual function: simultaneous extraction and ionization of targets in the same device. The developed membrane was applied in the determination of benzodiazepines in blood samples from alleged date rape-drugs victims. Blood is a complex sample containing several compounds that can suppress the analyte signal. With this modification, any suppression is avoided, obtaining excellent results, both qualitative and quantitative. In conclusion, PS-MS is a fast and low-cost technique that can replace or complement conventional analyzes in a laboratory of expertise, increasing the productivity of Brazilian justice.

Capítulo 1: Introdução Geral.

1.1. Química Forense.

A química forense é a aplicação dos conhecimentos da química e da toxicologia para produzir provas materiais para a justiça, analisando diversas substâncias nas mais variadas matrizes, como: drogas lícitas e ilícitas, venenos, acelerantes, resíduos de incêndio, explosivos, resíduos de disparo de armas de fogo, combustíveis, tintas e fibras.

Essa ciência é um tema que desperta bastante interesse perante a sociedade, no entanto, a aplicação da química no campo da criminalística ainda constitui uma nova linha de pesquisas no Brasil. Diversas técnicas de análises químicas, bioquímicas e toxicológicas são utilizadas para compreender o crime, seja roubo, assassinato, ou qualquer outro processo criminal. Embora dotadas de excelentes profissionais na área de perícia criminal, as forças policiais existentes no país necessitam constantemente de melhorias no tocante a novas metodologias de análises, visando sempre um maior aprimoramento destes serviços, e conseqüentemente, apresentando um maior retorno para a sociedade.

A química forense é dividida em diversas áreas, como as drogas de abuso, a balística, documentoscopia, adulterações de bebidas e adulterações de drogas terapêuticas. Entretanto, nessa tese de doutorado, iremos trabalhar apenas com a área Drogas de Abuso.

O termo “Drogas de Abuso” é comumente associado ao uso indiscriminado de substâncias tanto lícitas (álcool, tabaco) quanto ilícitas (cocaína, maconha, ecstasy e LSD) que provocam dependência. Drogas de abuso são definidas pela farmacopeia como quaisquer substâncias usadas através de qualquer via de administração, que alterem o humor, o nível de percepção ou o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo medicamentos, álcool e solventes.

Para um laboratório de Química Forense, as drogas de abuso apresentam diversos desafios, como o grande número de amostras a serem analisadas, a obtenção de perfil químicos destas drogas para obter informações sobre a origem e a correlação entre as amostras e a criação de novas drogas de abuso. De forma a diminuir o número desses desafios, em 2006 a Polícia Federal desenvolveu um projeto a fim de obter um banco de dados de perfis químicos de diversas drogas apreendidas, com ênfase inicial na cocaína e no ecstasy, que

visam estabelecer origens geográficas e rotas de tráfico de drogas de abuso e obter dados e estatísticas que consigam assinalar as tendências desde mercado, esse projeto é chamado de Projeto PeQui (Perfil Químico). Para os demais desafios, é necessário o investimento no desenvolvimento de novas metodologias eficientes para análise química e toxicológica das diversas amostras recebidas em laboratórios de perícia.

As técnicas já usadas nos laboratórios de perícia podem ser divididas em dois tipos: as rápidas, de baixo custo, baixa seletividade, mas que podem gerar falsos positivos, como os testes colorimétricos (Conceição *et al.*, 2014); as de maior eficiência, com alto custo, alta seletividade, alta exatidão, porém laboriosas, necessitam de preparo de amostras e podem não ser de fácil manuseio, como é o caso da Cromatografia gasosa (GC) (Lian *et al.*, 2018; Mercieca *et al.*, 2018) acoplada a diferentes tipos de detectores (Chen *et al.*, 2018; Corona *et al.*, 2018; Jagtap and Tapadia, 2018). Dentre as técnicas usadas tem-se destaque a Espectrometria de Massas (MS) por ser uma técnica com ampla gama de aplicação.

1.2. Espectrometria de Massas.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica com grande aplicação nas mais variadas áreas da ciência. Nos últimos anos, a MS vem experimentando um extraordinário desenvolvimento, especialmente com a introdução de novas fontes de ionização que, sistematicamente, ampliam o leque de aplicação desta proeminente ferramenta analítica.

A força motriz que subsidia este grande desenvolvimento é a busca pela simplicidade e portabilidade dos espectrômetros de massas. Com métodos de ionização diretos e rápidos e espectrômetros de massas portáteis, a MS poderá atuar em praticamente todos os campos, do interior de um poço de petróleo ao espaço sideral.

Atualmente, estão sendo experimentadas novas tendências com objetivo de aumentar as áreas de aplicação da técnica e torna-la apta para os atuais desafios analíticos: como a portabilidade do espectrômetro de massas (Guo *et al.*, 2018) e a simplicidade, expressa pelo desenvolvimento de fontes de

ionização direta (Correa *et al.*, 2016), o que proporciona análises rápidas, de baixo custo e eficientes

Ocorreu em 2004 a criação de uma nova família de técnicas conhecidas como fonte de ionização ambiente (Alberici *et al.*, 2010). Estas técnicas preconizam análises rápidas, com mínimo ou nenhum preparo de amostra, em condições ambientes, sendo a ionização realizada no ambiente natural do analito, ou seja, diretamente na amostra. As fontes de ionização pioneiras desta nova família são a *Desorption Electrospray Ionization* (DESI) (Takáts *et al.*, 2004) e *Direct Analysis in Real Time* (DART) (Cody, Laramée and Durst, 2005). Após a criação dessas duas técnicas, outras surgiram com o mesmo intuito. Exemplos dessas técnicas são: *desorption atmospheric pressure photon ionization* (DAPPI), *atmospheric pressure solid analysis probe* (ASAP), *desorption atmospheric pressure chemical ionization* (DAPCI), *dielectric barrier discharge ionization* (PADI), *low-temperature plasma ionization* (LTP), *laser ablation-electrospray ionization* (LAESI), *paper spray ionization* (PS) e *easy ambiente sonic spray ionization* (EASI) (Domin and Cody, 2015). Dentre as técnicas de ionização ambiente, a *Paper Spray Ionization* (PS) apresenta um grande potencial, devido a simplicidade e a possibilidade de acoplá-las com qualquer sistema que opere com uma fonte de ionização atmosférica.

1.3. Paper Spray Ionization.

A fonte de ionização PS foi criada em 2009 pelo Cooks e colaboradores (Liu, Wang, Manicke, Lin, Cooks, *et al.*, 2010), composta por um fio soldado a uma garra jacaré fixada a um suporte. Consiste na aplicação de alta voltagem em um papel de formato triangular umedecido com uma solução contendo o analito, que por capilaridade espalha-se pelo papel alcançando as extremidades (Liu, Wang, Manicke, Lin, Cooks, *et al.*, 2010). O campo elétrico, oriundo da diferença da alta voltagem (3-5 kV) aplicada no papel e a voltagem do capilar do espectrômetro de massas, induz a formação de um *spray* na forma de cone de Taylor (Figura 1) (Yang *et al.*, 2012).

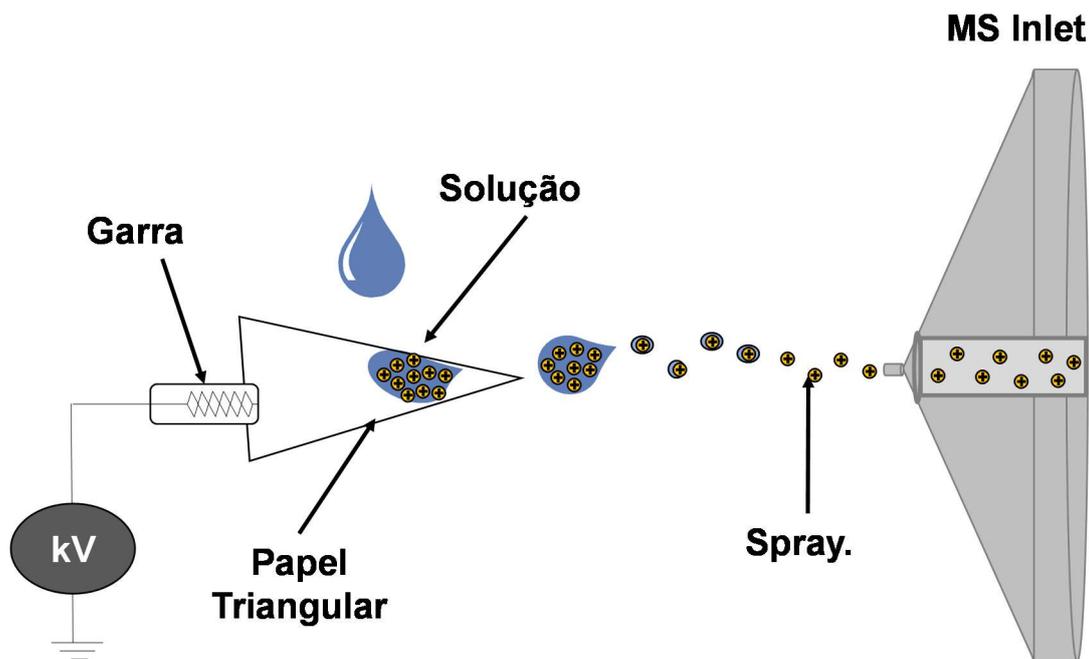


Figura 1. Esquema geral de um sistema de PS-MS adaptado de Cooks e colaboradores (Liu, Wang, Manicke, Lin and Cooks, 2010).

A geração de íons pelo PS tem os mesmos princípios que o Electrospray (ESI), porém em nano escala (Yang *et al.*, 2012). Os íons são gerados em solução, pH ácido ou básico. Com transferência da solução do papel e subsequente aplicação de uma diferença de potencial, tem-se a formação de um fino spray em formato de cone de Taylor (Fenn, 2002). Dessa forma, o contra-íon é oxidado ou reduzido e formam-se gotas com excesso de carga positiva ou negativa. Por conseguinte, o solvente evapora reduzindo o volume das gotas até que elas se dividam (Fenn, 2002). Após um tempo, devido a repulsão entre íons de mesma carga, ou formam-se gotas contendo apenas um íon (*charged residue model- CRM*) ou os íons evaporam das gotas para a fase gasosa (*ion evaporation mechanism- IEM*) (Fenn, 2002).

O PS é uma probe que foi projetada para análises de misturas complexas. Isso porque o substrato usado, o papel, contém em sua composição, majoritariamente, celulose, uma substância com grande número de hidroxilas em sua estrutura química. Essas hidroxilas, tem grande importância, pois elas interagem com as macromoléculas das misturas complexas (por exemplo as proteínas e hemoglobina do sangue) e as retém, não permitindo que estas são encaminhadas ao espectrômetro de massas. Diferentemente da fonte de

ESI, que por não ter nada que retém essas moléculas, tudo é encaminhado ao sistema de MS, podendo ter supressão do sinal de interesse ou entupimento dos capilares da fonte e do espectrômetro de massas.

O PS é um método de screening muito rápido, Ouyang e colaboradores mostram que em 45 segundos pode-se ter um monitoramento de fármacos diretamente do sangue (Wang *et al.*, 2010), sem nenhum preparo de amostra. Esse tempo quando comparados as demais técnicas de análises, se torna praticamente insignificativo. Como exemplo, Tokarczyk e colaboradores analisaram 143 novas substâncias psicoativas por LC-MS/MS em sangue. Entretanto, o preparo de cada amostra teve 15 minutos e cada análise teve 14 minutos de corrida (Adamowicz and Tokarczyk, 2016). Sendo a diferença de 38 vezes maior do que seria com PS, isso é uma vantagem do uso da técnica em um laboratório de perícia toxicológica que recebem em média 300 amostras por mês.

O principal material utilizado para a realização de análises por PS é o papel, um material comum e de baixíssimo preço. Devido à existência de uma variedade de tipos de papeis tem-se um grande potencial para o desenvolvimento de métodos incríveis de diagnóstico (Arnaud, 2009). Estas características tornam o PS muito atrativo e com grandes potencialidades em aplicações analíticas e bioanalíticas.

Desde sua criação, o PS é aplicado na área de química forense. Ouyang e colaboradores desenvolveram um método rápido de screening e quantitativo de cocaína, heroína, oxicodona em *dried blood spot* (DBS) (Su *et al.*, 2013). Neste contexto, em um outro trabalho, Kozac e colaboradores analisaram anfetaminas em DBS usando a *probe* de PS-MS Prosolia Velox 360™ *Paper Spray*™ System com alta exatidão e ótimas figuras de mérito (Prieto-Conaway, Manicke and Kozak, 2014). Também, Ouyang e colaboradores, usaram o PS-MS para análise de nicotina em DBS (Wang *et al.*, 2013), e Manicke e colaboradores, analisaram 134 drogas de abuso e metabolitos em sangue por PS-MS acoplado ao triplo quadrupolo (Jett, Skaggs and Manicke, 2017).

Outra aplicação comum do uso do PS na química forense é a comprovação do uso de drogas terapêuticas, como propranolol e atenolol no sangue usados para tratamento de pressão cardíaca (Manicke *et al.*, 2011). Zhang e colaboradores analisaram 6 drogas terapêuticas, como clonazepina e verapamil,

em sangue com papel modificado com zircônia (Zheng *et al.*, 2016). Por fim, Maurer e colaboradores, analisaram morfina, amiodarona, bisoprolol e 6-gluoronida em urina com PS-MS com espectrômetro de massas de alta resolução (Michely, Meyer and Maurer, 2017).

Em pesquisa no Scopus, encontra-se 104 artigos de PS, desses apenas 32 está ligado química forense, sendo que 90% é na área de toxicologia e apenas 10% na área de análise direta de droga de abuso. Essa aplicação é de grande importância devido aos desafios que se encontram em um laboratório de perícia química: grande número de amostras apreendidas, desenvolvimento de novas drogas e possibilidade de resultados com falso positivo nas análises de triagem usualmente realizadas nesses laboratórios.

O uso do PS em laboratório de perícia é vantajoso para os laboratórios de perícia pois é um método rápido screening de drogas de abuso, tanto diretamente quanto em biofluido, isso é de grande proveito devido as muitas amostras para ser analisadas. É usado apenas um método de análise com eficiência, baixo custo e sem possibilidade de falsos positivos. E ainda tem a vantagem de ser eficaz no descobrimento de novas drogas produzidas no mundo.

Com essa abordagem, essa Tese de Doutorado possui três capítulos com diferentes aplicações na química forense. O primeiro capítulo retrata a aplicação do PS na análise direta de selos de *designers drugs* (drogas sintéticas). Rotineiramente, o protocolo de análise de selos envolve a extração do analito do selo de papel e sua posterior análise pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). No entanto, este processo é laborioso e demorado. A proposta apresentada neste capítulo é a realização da análise direta no selo por PS-MS.

O segundo capítulo retrata o uso do PS como complemento da técnica de cromatografia de camada delgada (TLC) usada na separação e identificação de cocaína e adulterantes (cafeína, benzocaína, lidocaína e fenacetina). Rotineiramente, o protocolo de análise de amostras de cocaína e crack implica na análise com teste colorimétrico com utilização de tiocianato de cobalto, um processo pouco confiável e com baixa seletividade, seguido pela análise confirmatória usando técnicas cromatográficas como a TLC e o GC-MS que, como já citado, são processos laboriosos e demorados. A proposta

apresentada nesse capítulo é de se acoplar a TLC ao PS-MS para análise de cocaína e adulterantes.

O terceiro capítulo retrata o uso do PS revestido com polímero molecularmente impresso (MIP) para análise de “boa noite cinderela” em sangue. Essas drogas são comumente usadas para dopar as vítimas com intenção de rapto, roubo ou assédio sexual. Devido ao extenso número de substâncias usadas para esse propósito, suas baixas concentrações em fluidos biológicos e suas rápidas taxas de degradação, fazem com que o *screening* dessas drogas em biofluidos sejam um grande desafio para determinar seu uso. Rotineiramente, o biofluido passa por um processo de extração do analito e, em seguida, analisado por cromatografia como o GC-MS. A proposta apresentada nesse capítulo é o uso do PS-MS para análise de sangue coletados de supostas vítimas de benzodiazepínicos. Entretanto, essa técnica tem baixa sensibilidade para análises com em biofluidos. Portanto, o substrato do PS foi revestido por MIP para a criação de sítios ativos para a detecção de benzodiazepínicos.

1.4. Analisadores de massas

Após a ionização, os íons são direcionados para o analisador de massas, onde serão discriminados em função de suas razões massa/carga (m/z). Este processo ocorre de maneira diferente para cada analisador, e essas variáveis estão relacionadas com o valor de m/z do íon (Tabela 1). Para o *ion cyclotron resonance* (ICR) é em função da frequência ciclotrônica do íon na presença de um campo magnético (Marshall, Hendrickson and Jackson, 1998) ; no *Orbitrap* é em função da frequência de oscilação do íon em um campo eletrostático (Makarov, 2000); no *Time of Flight* é em função do tempo que o íon gasta para percorrer uma determinada distância(Weickhardt, C.; Moritz, F.; Grotemeyer, 1996); e no *Ion Trap* (IT) é em função do potencial de radiofrequência aplicado ao íon (Hoffmann and Stroobant, 2007)

Tabela 1. Caracterização dos analisadores de espectrometria de massas de acordo com seu princípio de separação, limite de massa, resolução, exatidão, vantagem, desvantagem e preço.

| Analisador | Princípio da separação do ion | Limite de massa (Th) | Resolução (m/z 1000) | Exatidão (ppm) | Vantagem | Desvantagem | Preço | Referência |
|------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------|---|--|------------|---|
| Setor magnético | Desvio do feixe de íons devido à momento magnético ou elétrico | 20 000 | 100 000 | <10 | Alta resolução | Pouco sensível e difícil manuseio | Moderado | (Hoffmann and Stroobant, 2007) |
| Quadrupolo | Separação de um feixe de íons pela estabilidade das trajetórias no campo de quadrupolo de frequência de rádio linear | 4000 | 2000 | 100 | Fácil manuseio e alta sensibilidade | Baixa resolução; baixo limite de massa. | Baixo | (Paul and Steinwedel, 1953) |
| Ion trap | Frequência de movimento iônico no campo eletrostático | 6000 | 4000 | 100 | Fácil manuseio, alta sensibilidade, possibilidade de Ms^n | Baixa resolução; baixa faixa de massa | Baixo | (Hoffmann and Stroobant, 2007) |
| TOF | Comprimento de tempo para íons de energia cinética definida viajarem pela trajetória de voo definida | 10000 | 20000 | 10 | Alta resolução | | Moderado | (Weickhardt, C.; Moritz, F.; Grottemeyer, 1996) |
| Orbitrap | Frequência de movimento iônico no campo eletrostático | 50000 | 100000 | <5 | Alta resolução, fácil manuseio | | Alto | (Makarov, 2000) |
| FT-ICR | Frequência do movimento de íons no campo magnético | 30000 | 500000 | <1 | Altíssima resolução | Difícil manuseio; alto custo de manutenção | Muito alto | (Marshall, Hendrickson and Jackson, 1998) |

1.4.1. Espectrômetro de massas Ion trap LTQ XL

O analisador de massas *ion trap* linear (LTQ) (Figura 2) é constituído por duas lentes, uma frontal e uma traseira, e uma câmara de trapeamento linear (Douglas, Frank and Mao, 2005). As lentes desempenham a função de controlar a quantidade dos íons na câmara de trapeamento aplicando-se uma voltagem contrária dos íons analisados por um determinado tempo pré-definido (Hoffmann and Stroobant, 2007). A câmara de trapeamento é formada por quadrupolo, onde duas hastes apresentam voltagem com a carga contrária do íon e as outras duas com carga igual, de modo que a atração e a repulsão dos íons, os confinam na câmara, com movimento oscilatório (Schwartz, Senko and Syka, 2002)

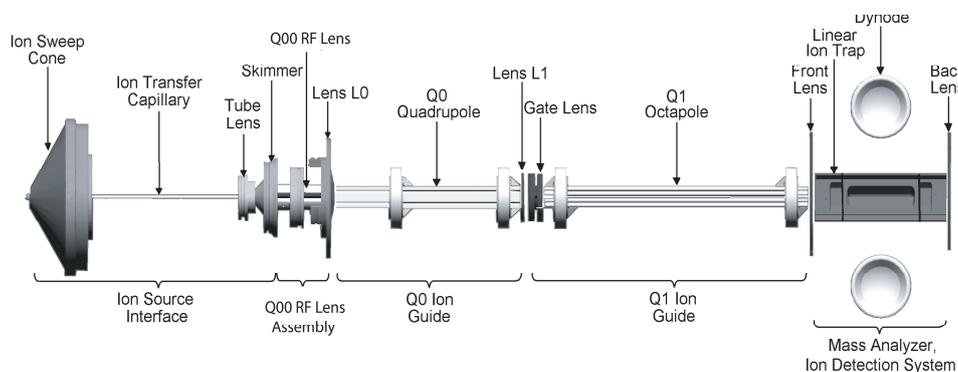


Figura 2: Esquema do espectrômetro de massas Ion trap LTQ-XL, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2006).

Quando a quantidade de íons ou o tempo pré-definidos forem atingidos, os íons são esfriados, diminuindo-se a energia cinética por gás inerte (He), o que faz os íons se movimentarem no eixo Z com mesma energia e de forma estável (Hoffmann and Stroobant, 2007). Então, aumenta-se a amplitude da voltagem ressonante aplicada, desestabilizando cada m/z que por consequência são ejetados para fora do analisador em direção ao detector, onde é registrado seu valor de m/z (Figura 3) (Schwartz, Senko and Syka, 2002). O valor desta variação de potencial de radiofrequência depende do valor de cada m/z e assim cada íon é discriminado (Thermo Fisher Scientific, 2006).

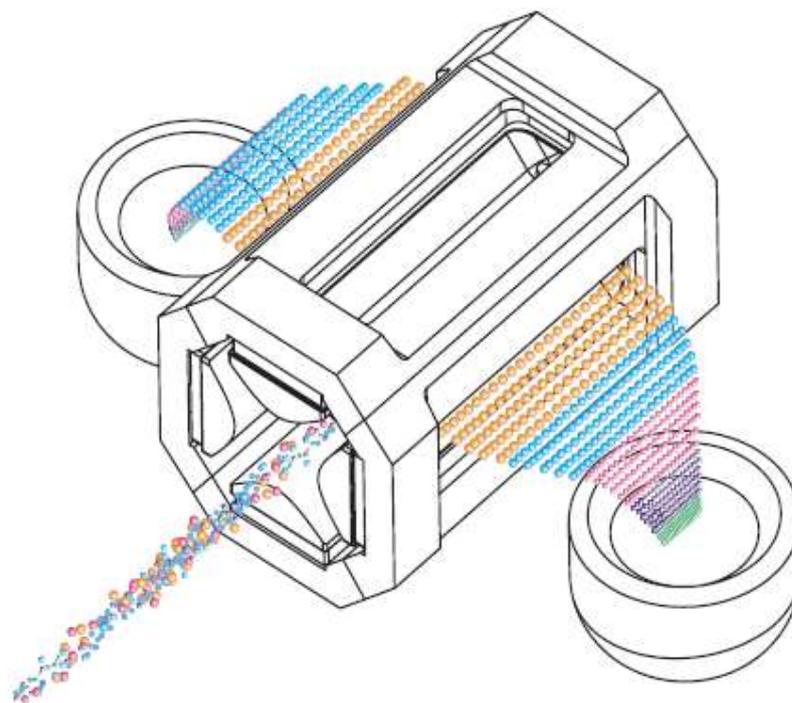


Figura 3: Ejeção dos íons pelo *ion trap* de acordo com a razão m/z do íon (Thermo Fisher Scientific, 2006).

Uma das vantagens do uso desse espectrômetro de massas é a possibilidade de análise de espectrometria de massas tandem (Ms^n), a qual é usada para elucidação de estruturas tanto do íon precursor, como dos íons fragmentos. O modo de operação tandem mais utilizado é modo de operação íons produtos, onde um íon é selecionado após uma varredura de massas, é ativado e fragmentado por colisões com um gás inerte, hélio. (Hoffmann and Stroobant, 2007) Uma desvantagem é a resolução do equipamento ser unitária, o que dificulta a diferenciação de isóbaros.

1.4.2. Espectrômetro de massas Ion Trap LCQ Fleet

O analisador de massas *ion trap* 3D (LCQ Fleet) (Figura 4) constitui-se de estrutura similar com o *ion trap* 2D, porém sua câmara de trapeamento é em formato tridimensional (Figura 5). É composto por três eletrodos hiperbólicos: dois *end caps* e um eletrodo *ring*.

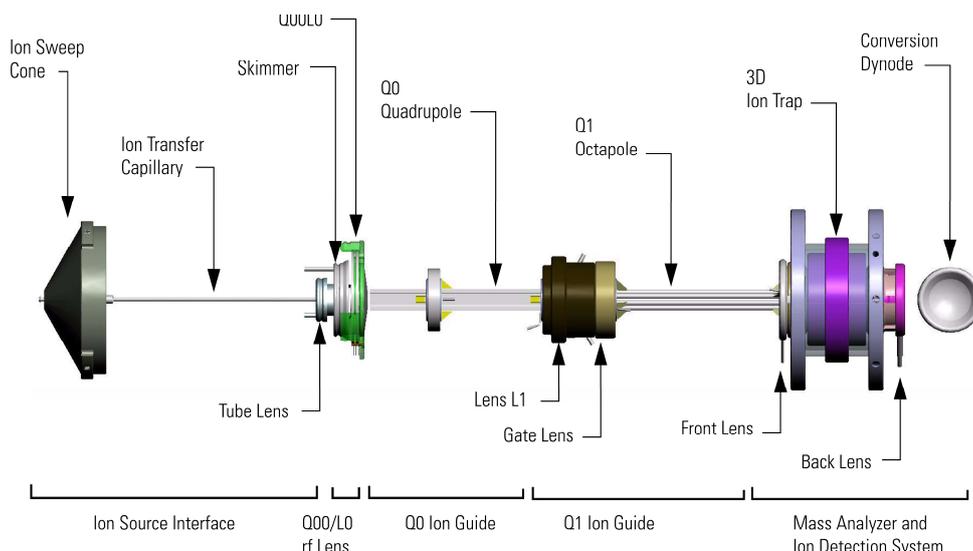


Figura 4: Esquema do espectrômetro de massas *ion trap* LCQ Fleet, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2006).

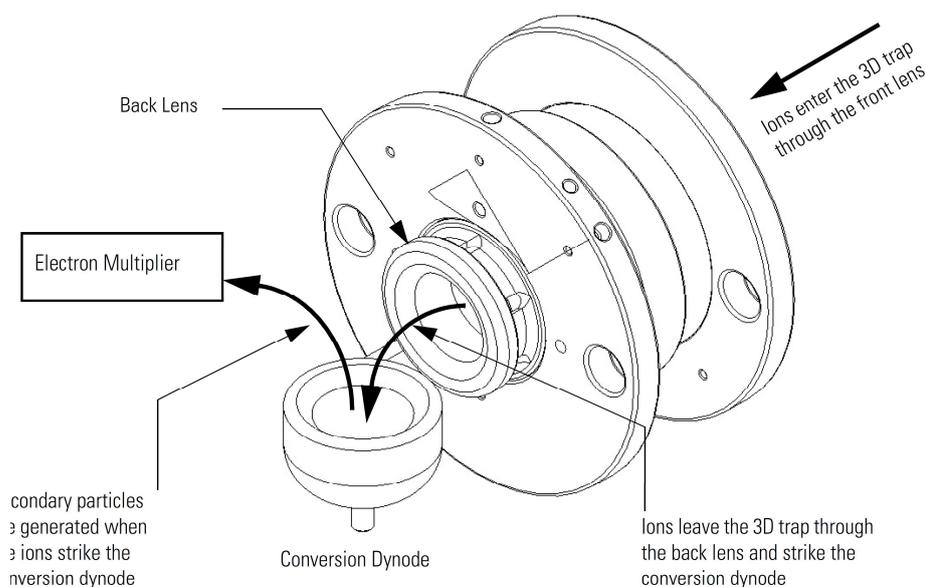


Figura 5: Esquema do analisador *ion trap* LCQ Fleet, Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2006).

Após a formação dos íons, eles são enviados ao analisador para ser discriminados por seus valores m/z . No analisador *ion trap*, tem uma sobreposição de potenciais de correntes alternada e direta, e isso faz com que os íons sejam trapeados em uma armadilha tridimensional. Após o trapeamento, há a diminuição da energia cinética dos íons, com gás hélio, para que todos, independentemente de seus valores de m/z , se movimentam no eixo Z com a

mesma energia. Como os íons se repelem no interior do trap, suas trajetórias aumentam em função do tempo (Hoffmann and Stroobant, 2007).

É aplicada uma voltagem de radiofrequência (RF) ao eletrodo *ring* (frequência constante e amplitude variável), e também, podem ser aplicadas voltagens de radiofrequência adicionais ao eletrodo *end cap* para produzir o trap dos íons. A seguir, com o aumento da amplitude da RF aplicada, ao eletrodo *ring*, os íons, em ordem decrescente de valores de m/z , se tornam instáveis e são ejetados do analisador, passando pelo orifício presente no *end cap* de saída, chegando ao detector (Watson and Sparkman, 2009).

O *ion trap* 3D também possui como vantagem a capacidade de análise de M_s^n (Hoffmann and Stroobant, 2007). E tem como desvantagens, a resolução do equipamento ser unitária e devido sua estrutura de quadrupolo, o *ion trap* 3D tem menor capacidade do que o *ion trap* 2D, formato linear. Isso faz com que a capacidade do *ion trap* 3D seja menor e, por consequência é habitual ter efeitos *space-charge*, o que compromete a sensibilidade.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é o uso do PS em diferentes aplicações da química forense: análise direta de selos de drogas sintéticas, o acoplamento do TLC com PS para aumentar a confiabilidade da técnica e o desenvolvimento de um novo substrato com a membrana de celulose coberta com MIP para detecção de benzodiazepínicos em sangue.

1.5.2. Objetivo Específico.

Como objetivos específicos têm-se:

- Desenvolver um método para análise direta de selos de drogas sintéticas (dietilamida do ácido lisérgico (LSD), 2,5-dimetoxi-4-cloroanfetamina (DOC), 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB), 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe) por PS-MS e PS-MS/MS.
 - Elucidar as *designers drugs* por espectrometria de massas tandem.
 - Comparar os resultados obtidos por PS-MS e PS-MS/MS do selo de drogas sintéticas com os obtidos por *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* (FT-ICR-MS).
 - Otimizar o método de TLC para obter as melhores condições de sensibilidade e seletividade.
 - Realizar a TLC com padrões de cocaína, cafeína, benzocaína, fenacetina e lidocaína em diferentes concentrações.
 - Analisar os *spots* obtidas pelos padrões de cocaína, cafeína, benzocaína, fenacetina e lidocaína por PS-MS.
 - Avaliar o método de TLC em amostras reais apreendidas de cocaína e crack.
 - Análise dos *spots* obtidos pelas amostras apreendidas de cocaína e crack por PS-MS.
 - Desenvolver o substrato de PS-MS modificado com MIP para aumentar a sensibilidade da técnica para PS;
 - Otimizar e validar do método MIP-PSI-MS;
 - Avaliar o método MIP-PS-MS com amostras reais de possíveis vítimas de benzodiazepínicos.

Capítulo 2. *Paper spray* *ionization*: Análise Direta de *Designers Drugs*

2.1. Introdução

As chamadas *designer drugs*, *Club drugs* ou drogas sintéticas estão entre as drogas de abuso mais utilizadas no Ocidente. Elas são cada vez mais utilizadas por adolescentes e jovens em saídas à noite em discotecas, *raves* e bares. Seus efeitos psicotrópicos específicos, que fundamentam sua utilização como drogas de abuso, são descritos como capacidade aumentada da comunicabilidade, empatia e autoconhecimento, o que distingue esta classe de compostos das substâncias estimulantes e alucinógenas propriamente ditas (Bulcão *et al.*, 2012; Guerreiro *et al.*, 2011)

O termo *designer drugs* é tradicionalmente utilizado para identificar substâncias sintéticas, mas, recentemente, foi ampliado para incluir outras substâncias psicoativas que imitam os efeitos de drogas ilícitas e são produzidos através da introdução de ligeiras modificações na estrutura química de substâncias controladas para burlar a legislação vigente. Além disto, a disponibilidade e a diminuição do custo tecnológico permitem que tais drogas sejam sintetizadas com facilidade em laboratórios clandestinos (United Nations Office on Drugs and Crime, 2013).

O Relatório Mundial de Drogas 2017 do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC) apresenta um capítulo todo relacionado sobre as drogas sintéticas (United Nations Office on Drugs and Crime, 2017). De acordo com esse relatório, esse tipo de droga, diferentemente da cocaína e da heroína, não depende apenas de uma região para sua fabricação, pois não precisa de extração de uma planta que é cultivada em determinado lugar, sendo assim, pode ser fabricado em qualquer lugar. Também de acordo com esse relatório, a apreensão até 2016 chegou a dobrar nos últimos anos, e de acordo com o Relatório Mundial de Drogas 2018, as drogas sintéticas chegaram a ser o 3º tipo de droga mais apreendido no mundo (United Nations Office on Drugs and Crime, 2018).

O Observatório Europeu de Droga e da Toxicodependência identificou os seguintes grupos de *designer drugs*: Feniletilaminas, triptaminas, piperazinas, benzilpiperazina (BZP) e canabinóides sintéticos.

O grupo maior e mais importante das designers drugs são as derivadas da feniletilamina, como o ácido lisérgico (LSD) (Hofman, 1980), 2,5-Dimetoxi-4-

cloroamfetamina (DOC) (Shulgin and Shulgin, 1991); 2,5-Dimetoxi-4-bromoamfetamina (DOB) (Shulgin, Sargent and Naranjo, 1971). O uso desse de droga vem crescendo entre os novos usuários e isso é de grande preocupação para a segurança pública (Nichols *et al.*, 2015). Entretanto, derivados de poderosas feniletilamina alucinógena tem sido sintetizado e introduzido ao mercado. Esses derivados são normalmente chamados de “NBOMes”, ou 2.5-dimetoxifeniletilaminas com diferentes substituições no C-4. Por exemplo: 25C-NBOMe, onde se tem a presença do cloro, 25B-NBOMe, que tem como substituinte o bromo e o 25I-NBOMe, com o iodo (Ninnemann and Stuart, 2013).

Do ponto de vista analítico, pode-se considerar um grande desafio a correta identificação desta classe de drogas (Nichols *et al.*, 2015). De acordo com o Relatório Mundial de Drogas 2017, o maior problema da droga sintética para a saúde humana, é que apesar do mercado ser pequeno em relação as outras drogas, o conteúdo e a dosagem dessas drogas, geralmente, são desconhecidas. De acordo com o Relatório Europeu de Drogas 2018, das drogas conhecidas, as drogas sintéticas estão em quarto lugar dos casos de emergência hospitalar (EMCDDA, 2018).

A dificuldade em se analisar *designer drugs* por métodos estabelecidos é devida à versatilidade das modificações efetuadas nas moléculas e à velocidade com que elas surgem no mercado, sendo mais rápido o desenvolvimento de novas moléculas do que de métodos adequados para identificação e, portanto, o seu diagnóstico de uso. Diferentemente das drogas clássicas, a maioria destes compostos não possui metodologias específicas para realização de triagens utilizadas na rotina laboratorial.

Os métodos mais comuns utilizados para triagem de drogas são frequentemente imuno-ensaio ou técnicas como GC-MS ou LC-MS. Enquanto os imuno-ensaios são simples e rápidos, eles têm problemas com sensibilidade e seletividade, tornando-os pouco adequados para o desafio. Já o GC-MS e LC-MS têm melhor seletividade e sensibilidade, mas requerem preparação da amostra e a etapa de cromatografia adiciona tempo de análise a cada amostra.

Em 2013, Nieddu e colaboradores analisaram 41 tipos de drogas sintéticas, incluindo DOB, DOC e 25-C NBOMe com o *Enzyme multiplied immunoassay*

technique (EMIT) (Nieddu *et al.*, 2013) e em 2014, o mesmo grupo usou essa técnica para analisar 39 tipos diferentes de drogas (Nieddu *et al.*, 2014) Apesar Apesar da técnica de imuno-ensaio ser conhecida como um método rápido e de baixo custo, essa técnica pode não ser confiável e precisar de outras metodologias confirmatórias que levam tempo e são laboriosas.

Goda e colaboradores usaram LC-MS para análises de canabinóides sintéticos em produtos herbais. Apesar do êxito da análise, o grupo necessitou de 15 minutos para o preparo de amostra e 10 para a corrida. Esse tempo parece ser pouco, porem para um laboratório que recebe toneladas de amostras de drogas sintéticas, pode-se tornar um longo tempo. Além disso, essa técnica utiliza grande volume de solventes e o equipamento usado é de alto custo.

Portanto, para acompanhar a evolução do mercado de drogas ilícitas é necessário adaptar continuamente os métodos de análise existentes ou desenvolver novos métodos que permitam a determinação correta destes novos compostos, assim como a aquisição de padrões de referência destes novos compostos (United Nations Office on Drugs and Crime, 2013). Idealmente, uma técnica de triagem seria simples e direta, com um mínimo de treinamento necessário e tempos de análise rápidos.

Essas *designers drugs* são vendidas em pequenos selos de papel, onde são imersos a soluções com os analitos e deixados secar. Esses selos são colocados na boca extraíndo as drogas para o organismo. Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo a análise direta dos selos das drogas sintéticas, dietilamida do ácido lisérgico (LSD); 2,5-Dimethoxy-4-cloroamphetamine (DOC); 2,5-Dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB); 25C-NBOMe; 25B-NBOMe; 25I-NBOMe (Figura 6) usando a técnica de PS-MS. Para isso, os selos das drogas foram cortados em formato triangular e usado como substrato do PS.

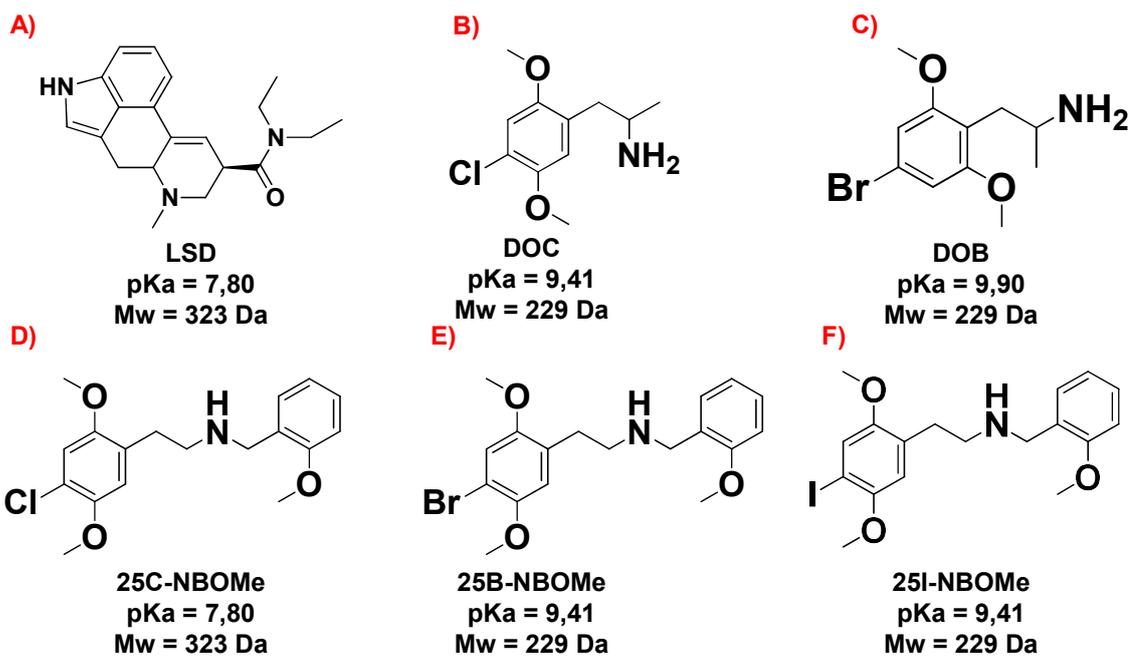


Figura 6: Estruturas químicas das designers drugs analisadas por PS-MS: (A) LSD, (B) DOC, (C) DOB, (D) 25C-NBOMe, (E) 25B-NBOMe e (F) 25I-NBOMe.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Materiais e Reagentes

Os selos das drogas sintéticas, dietilamida do ácido lisérgico (LSD); 2,5-Dimetoxi-4-cloroanfetamina (DOC); 2,5-Dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB); 25C-NBOMe; 25B-NBOMe; 25I-NBOMe foram fornecidos pela Superintendência da Polícia Federal do Distrito Federal. Para formação do *spray* usou-se metanol grau HPLC (JTBaker), ácido fórmico a 99% RPE ACS PA (Carlo Erba Reagentes).

2.2.2. PS-MS

A fonte de PSI foi montada prendendo-se papel em formato triangular (base e altura de 1 cm), a uma garra, do tipo jacaré, conectada a um fio ligado ao espectrômetro de massas *ion trap* LTQ XL (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemanha). As condições usadas no experimento foram: voltagem do *spray*: 3 kV, Temperatura do capilar: 275 °C, Voltagem do tube lens: 100 V, voltagem do capilar: 50 V, modo de leitura: positivo e faixa de massa: 100 a 1000. Também se realizou Ms^n para confirmação da estrutura usando a energia de colisão de 30 V.

Os selos com as drogas sintéticas foram cortados em formato triangular fixados na fonte de PS e analisados no modo positivo. Para isto foi adicionado 10 μ L de 0,1% ácido fórmico em metanol como solução eluente.

2.2.3.ESI (+) -FT-ICR-MS

Para análise no FT-ICR-MS foi feita a extração da droga sintética do selo de papel. 1g do papel foi submetido a extração com 1 mL de acetonitrila: água (1:1 v/v) durante 5 minutos de agitação. Essas amostras foram acidificadas com solução de 0,1 % de ácido fórmico em metanol. Por fim essas soluções foram analisadas por infusão direta no espectrômetro de massas 9.4 T solarix (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As condições usadas foram: voltagem do capilar: 4,2 kV, temperatura do capilar de transferência: 250 °C, pressão do gás nebulizador: 3 bar, faixa de massa: 200 a 1300, tempo de acumulação dos íons

na hexapolo: 10^{-2} s, tensões de trap das células de ICR: 0,8 V para frente e 0,85 V para trás (Nascimento *et al.*, 2015).

Foi realizado a elucidação dos analitos por espectrometria de massas tandem nos experimentos com FT-ICR-MS/MS para confirmação dos resultados por PS-MS. As condições foram as seguintes, taxa de fluxo: 5 mL/min, tensão do capilar: 3 kV, temperatura de nebulização: 250 °C, gás de colisão: Argônio, tempo de acumulação dos íons: 1s, janela de isolamento: 1 unidade (m/z), energia de colisão: 25 – 45%.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. PS-MS

Os espectros de PS (+) -MS dos selos de drogas sintéticas apresentam a identificação do LSD, $[M + H]^+$ m/z 324, DOC, $[M + H]^+$ m/z 230 e $[2M + H]^+$ m/z 459, DOB, $[M + H]^+$ m/z 274 e $[2M + H]^+$ m/z 549, 25C-NBOMe, $[M + H]^+$ m/z 335, 25B-NBOMe, $[M + H]^+$ m/z 380, e 25I-NBOMe, $[M + H]^+$ m/z 428 como ilustrado na Figura 7. A identificação desses íons corrobora com o encontrado o descrito na literatura. (Adamowicz and Kała, 2010; Costa, da *et al.*, 2007; Romão *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2015)

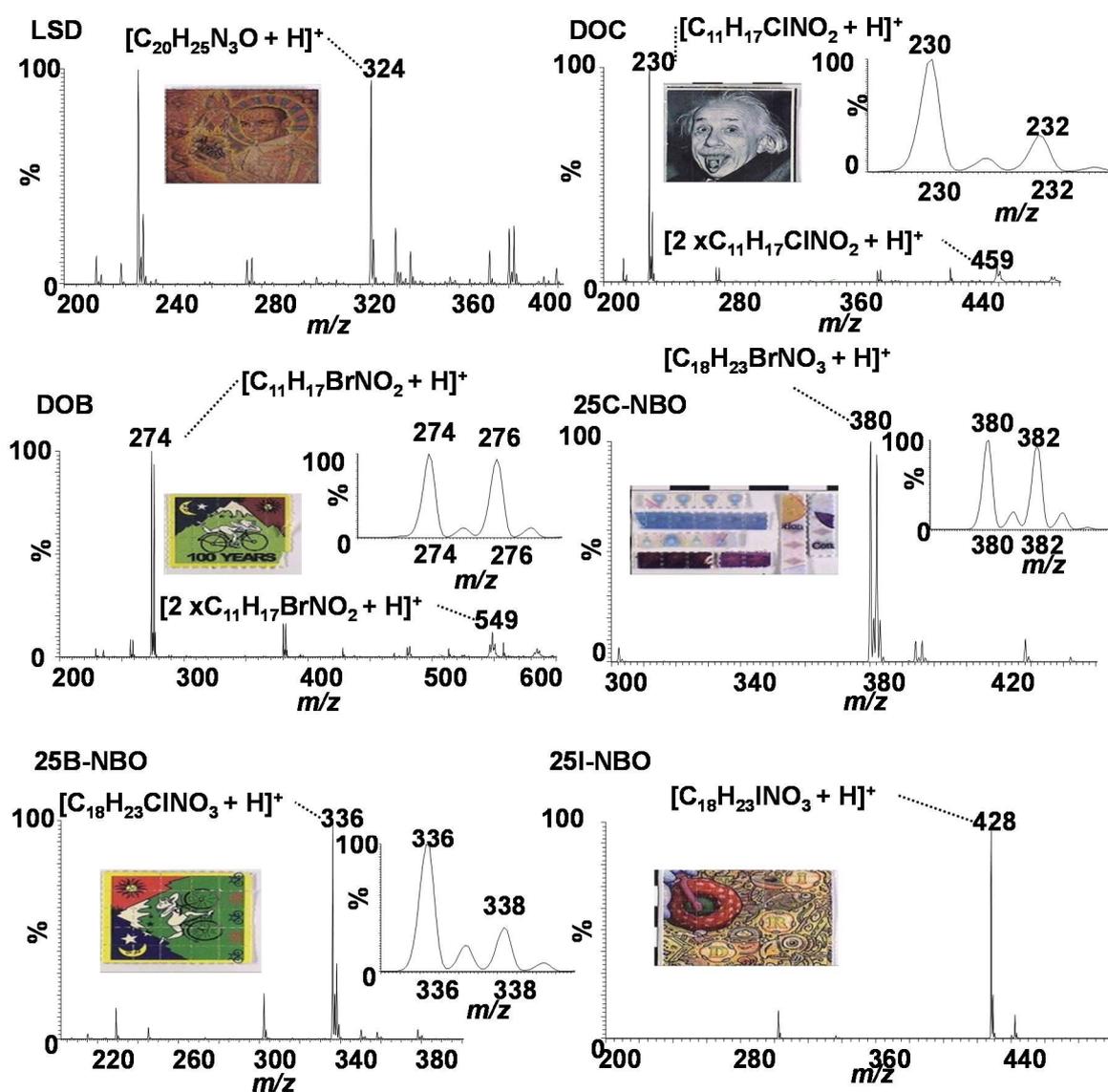


Figura 7. Espectro de PS(+)-MS dos selos de papel do DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, LSD, e 25I-NBOMe.

Para a confirmação da detecção dos compostos identificados foi realizado o experimento de MSⁿ (Figura 8). Esta análise permite o estudo dos fragmentos de um composto após a sua colisão com átomos de um gás presente na cela de colisão do espectrômetro de massas, neste caso, o hélio. Os fragmentos observados estão na Tabela 2.

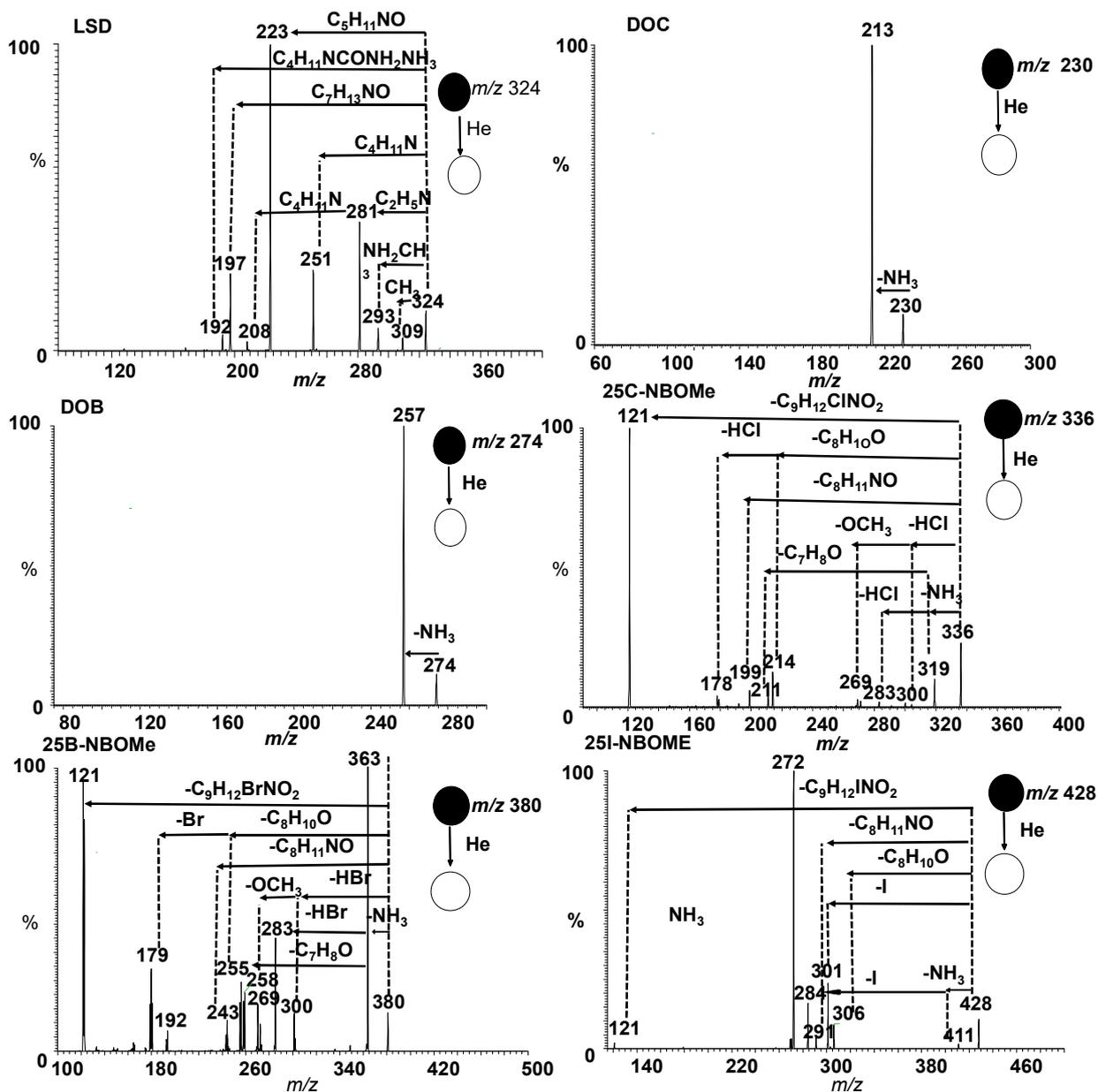


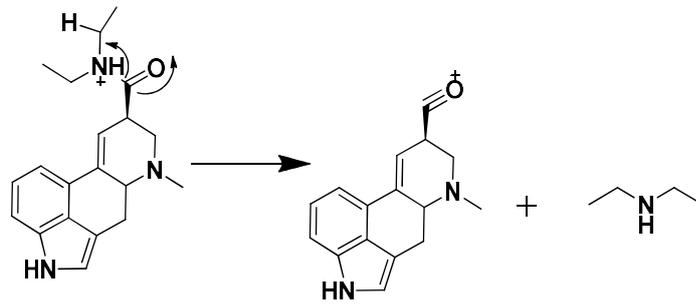
Figura 8. Espectro de PS(+)-MS/MS dos íons [M + H]⁺ para DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe e LSD.

Tabela 2. Fórmula molecular, valores de m/z experimental e fragmentos (MS^2) do espectro de PS(+)-MS/MS para as seis drogas sintéticas analisadas nos selos.

| Amostra | Fórmula $[M+H]^+$ | m/z experimental | Fragmentos - MS^2 |
|------------------|------------------------------|--------------------|--|
| DOC | $[C_{11}H_{16}ClNO_2 + H]^+$ | 230 | 213 |
| DOB | $[C_{11}H_{16}BrNO_2 + H]^+$ | 274 | 257 |
| 25C-NBOMe | $[C_{18}H_{22}ClNO_3 + H]^+$ | 336 | 300, 269, 214, 199, 178, 121 |
| | $[C_{18}H_{22}ClNO_3 + H]^+$ | 336 (isômero) | 319, 283, 211 |
| 25B-NBOMe | $[C_{18}H_{22}BrNO_3 + H]^+$ | 380 | 300, 269, 258, 243, 192, 179, 121 |
| | $[C_{18}H_{22}BrNO_3 + H]^+$ | 380 (isômero) | 363, 283, 255 |
| 25I-NBOMe | $[C_{18}H_{22}INO_3 + H]^+$ | 428 | 306, 301, 291, 121 |
| | | 428 (isômero) | 411, 284, 272 |
| LSD | $[C_{20}H_{24}IN_3O + H]^+$ | 324 | 309, 293, 281, 251, 223, 208, 197, 192 |

A fragmentação característica do LSD ocorre por três principais caminhos, o primeiro é pela perda neutra de uma molécula de dietilamina ($C_4H_{11}N$) gerando o pico de m/z 251. O segundo, também por uma perda neutra, perde-se a dimetilformamida gerando o pico de m/z 223. Por fim, ocorre devido a clivagem do canal pirimidina, seguido pela clivagem da ligação C-N, gerando o pico de m/z 281. Esse resultado corrobora com o citado por Ehorn e colaboradores (Sklerov, Kalasinsky and Ehorn, 1999) e pode ser visto na Figura 9, Mecanismos 1, 2 e 3 respectivamente.

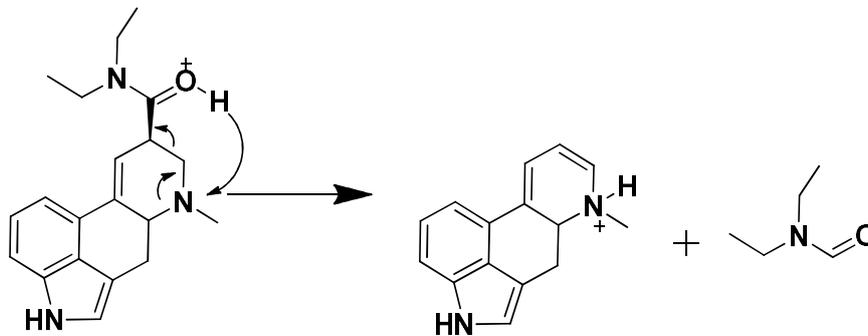
Mecanismo 1



m/z 324

m/z 251

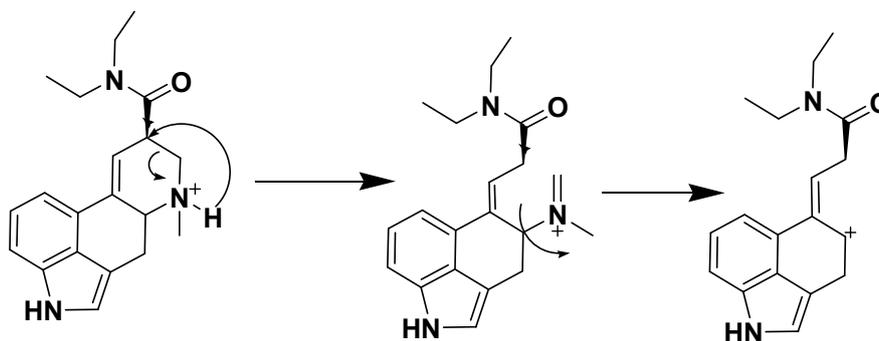
Mecanismo 2



m/z 324

m/z 223

Mecanismo 3



m/z 324

m/z 281

Figura 9. Mecanismo das fragmentações referente ao íon protonado do LSD, $[M + H]^+$ *m/z* 324.

A fragmentação do DOC e do DOB ocorre pela perda de uma molécula de NH_3 , obtendo-se o íon de m/z 213 e 257, respectivamente. Essa é uma perda característica de uma amina primária e corrobora com o citado por Tavares e colaboradores (Costa, da *et al.*, 2007), sendo assim, pode-se afirmar que o íon de m/z 230 e 274 refere-se ao DOC protonado e o DOB protonado, respectivamente (Figura 10- Mecanismo 4).

Mecanismo 4

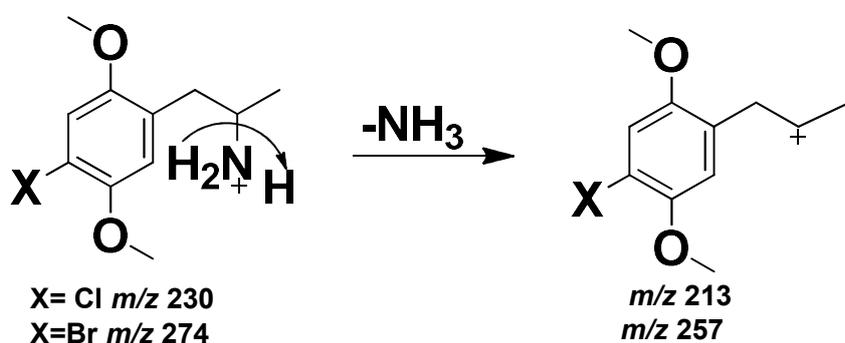


Figura 10. Mecanismo das fragmentações referente aos íons protonados do DOC, $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 230, e DOB, $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 274.

A fragmentação do 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe, ocorre por quatro caminhos principais. O primeiro pela perda neutra, devido a clivagem da ligação C-N, gerando os picos de m/z 199, 243, 291, respectivamente (Figura 11 - Mecanismo 5). O segundo caminho é por outra perda neutra, devido a outra clivagem da ligação C-N, gerando o pico de m/z 121 (Figura 11- Mecanismo 6).

O terceiro caminho ocorre para o 25C-NBOMe e para o 25B-NBOMe e acontece pelo rearranjo 1-3 do hidrogênio alfa ao nitrogênio, o que faz com que ocorra uma perda neutra de $\text{C}_8\text{H}_0\text{O}$, gerando os picos de m/z 214 e 258 respectivamente. Após isso, também tem a perda de HCl para o 25C-NBOMe gerando o pico de m/z 178 e perda radicalar do bromo para o 25B-NBOMe gerando o pico de m/z 179. Essa rota de fragmentação pode ser vista na Figura 11- Mecanismo 7.

Por fim, o quarto caminho é a clivagem da ligação C-X. Onde para o 25C-NBOMe há a perda de HCl, para o 25B-NBOMe a perda do radical Br, e para o

25I-NBOMe a perda do radical I, todas essas perdas geram o pico de m/z 300 (Figura 11- Mecanismo 8).

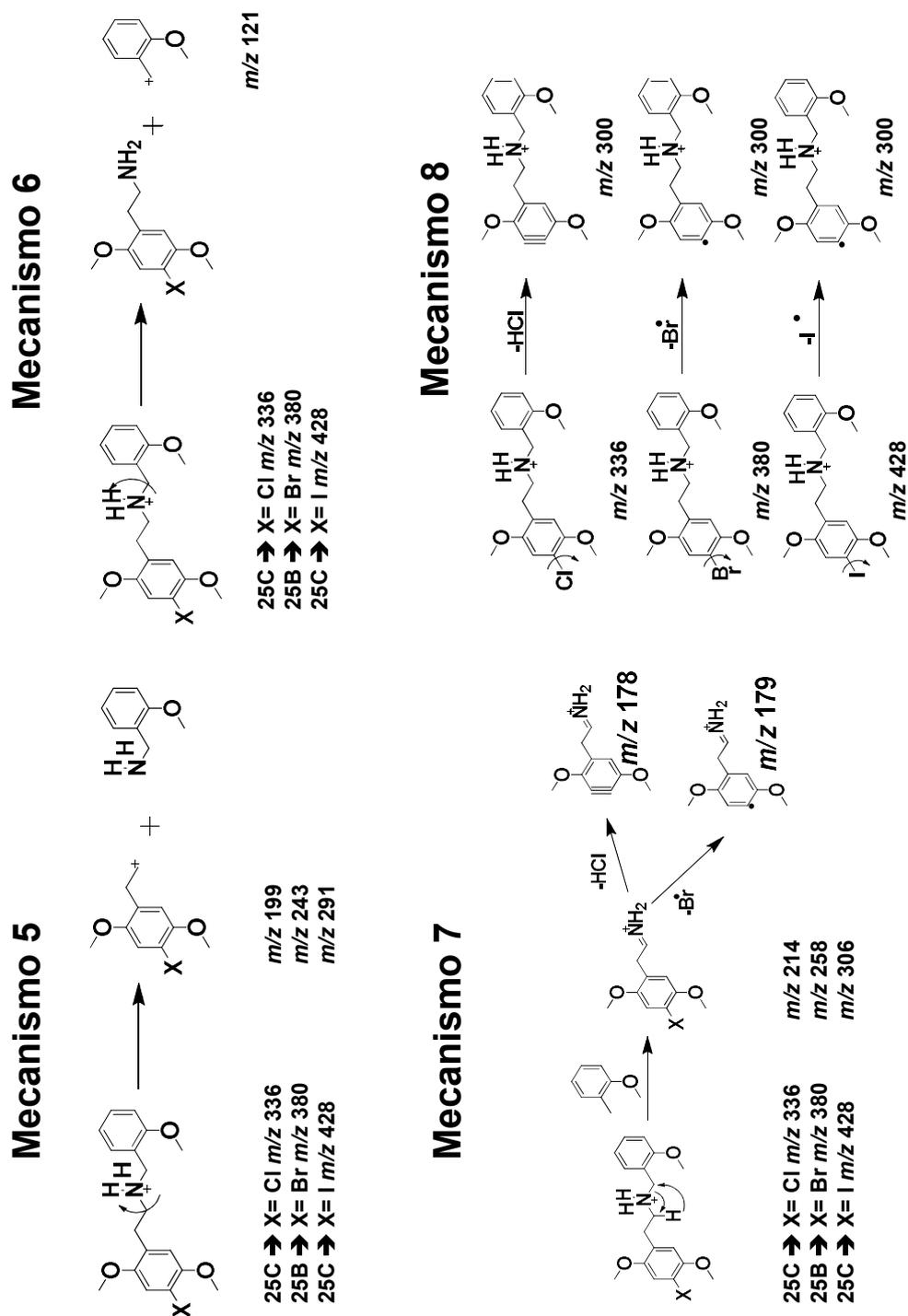


Figura 11: Mecanismo das fragmentações referente aos íons protonados do 25C-NBOMe, $[M + H]^+$ m/z 336, 25B-NBOMe, $[M + H]^+$ m/z 380, e 25I-NBOMe, $[M + H]^+$ m/z 428.

Nos espectros de PS-MS/MS do 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe apresentaram a perda de 15 Da, isso corresponde a uma perda de NH₃, essa perda é característica de aminas primárias e não secundárias como os compostos estudados. Portanto, essa perda, e outras também apresentadas no espectro de PS-MS/MS, demonstra que nos três selos há a presença de isômeros dos NBOMes, onde há uma amina primária. (Figura 12 – Mecanismo 9-10).

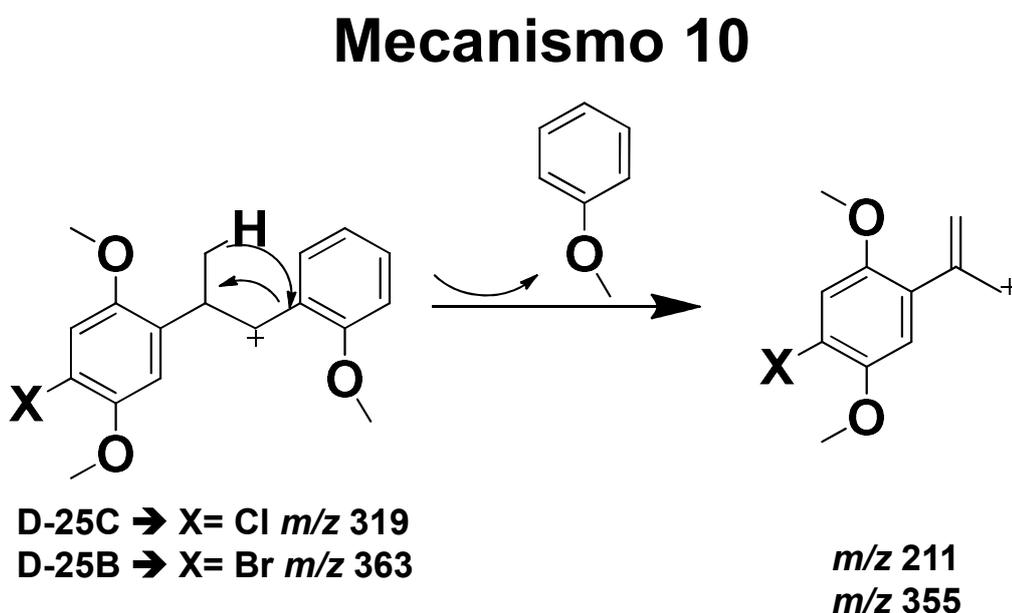
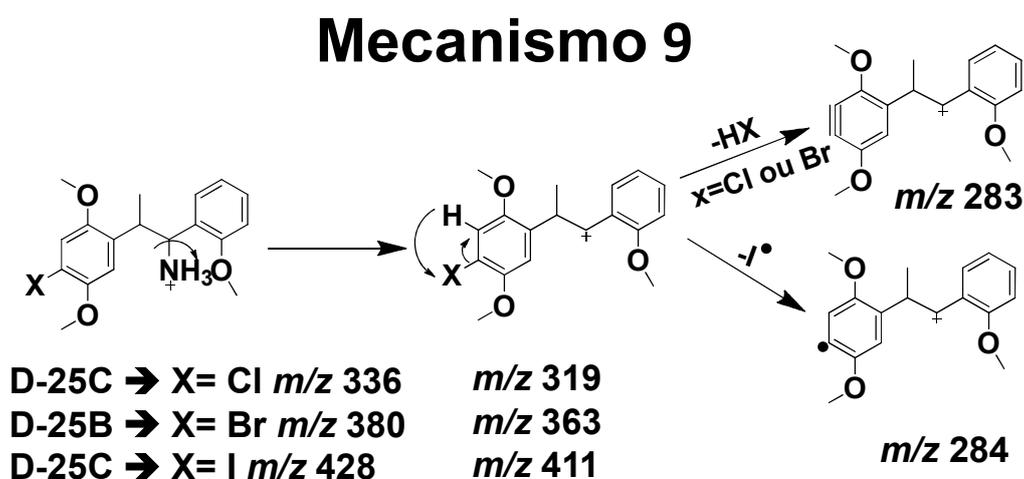


Figura 12: Mecanismo das fragmentações referente aos íons protonados das isômeros do 25C-NBOMe, [M + H]⁺ *m/z* 336, 25B-NBOMe, [M + H]⁺ *m/z* 380, e 25I-NBOMe, [M + H]⁺ *m/z* 428.

Portanto, todos os analitos das drogas sintéticas estudadas foram identificados por PS-MS e todos os espectros de fragmentação corroboram com a literatura confirmando a identificação da atribuição.

2.3.2.ESI (+) - FT-ICR-MS

Como a análise selo de papel foi realizada em um espectrômetro de massas de baixa resolução, realizamos a análise de extratos utilizando um espectrômetro de massa de ultra alta resolução. A Figura 13 apresentam um espectro de ESI (+) - FT- ICR para a amostra de LSD. A amostra LSD foi analisada com uma resolução ultra alta de $R \approx 670\ 000$ e $1\ 300\ 000$ (Figura 13a e b), sendo detectada como $[M + H]^+$ o íon de m/z 324.20719 onde $M = C_{20}H_{25}N_3O$ e $DBE = 10$. Para um $R \approx 1\ 300\ 000$, um melhor sinal-ruído é obtido, resultando em uma precisão de massa ainda menor que 1 ppm em todo o espectro de massa (erro =0,44 ppm, Figura 12b).

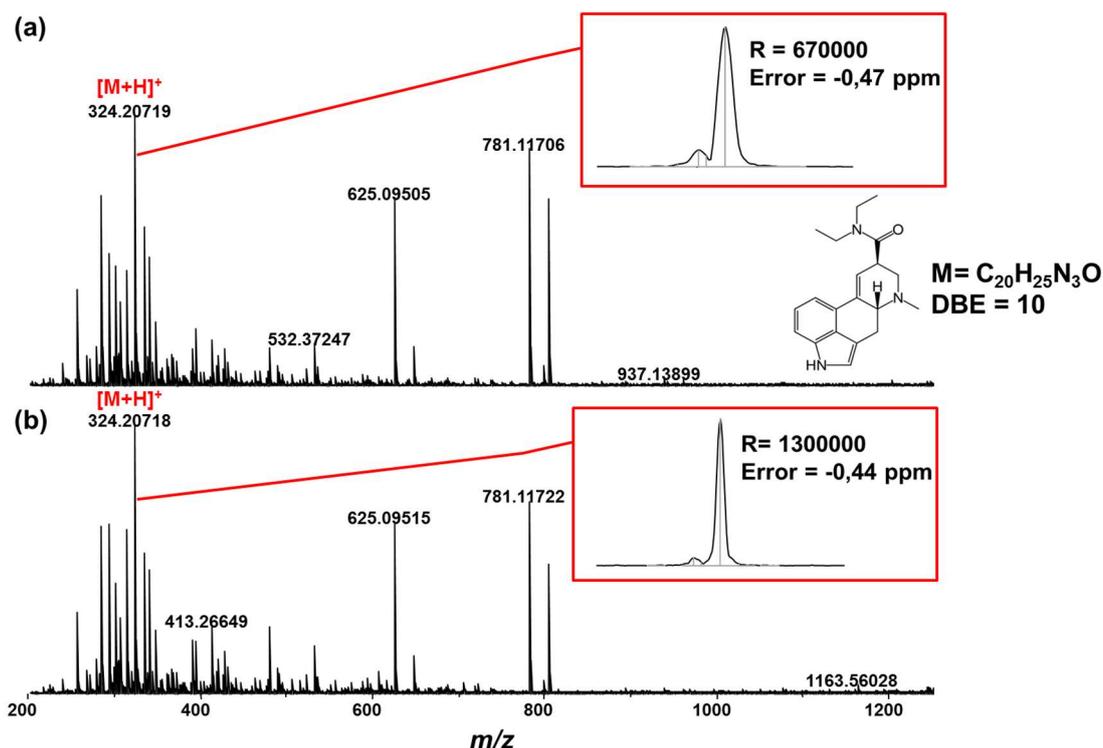


Figura 13. Espectro de ESI(+)-FT-ICR-MS do extrato do selo de LSD na resolução de 670000 (a) e resolução 130000 (b), com os respectivos erros obtidos.

Uma elucidação estrutural mais detalhada da amostra de LSD pode ser obtida a partir dos resultados de ESI (+) -MS/MS, como apresentado na Figura 14 no qual a fragmentação do íon de m/z 324 é encontrada para produzir os fragmentos a m/z 309, 281, 251, 223 e 208. A formação dos fragmentos m/z 324 \rightarrow 309 e m/z 324 \rightarrow 281 indica a perda dos grupos CH_3 e $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$, e a formação do m/z 324 \rightarrow 251 indica a perda da dietilamina ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$). As transições de m/z 251 \rightarrow 223 e m/z 223 \rightarrow 208 revelam a perda dos grupos CO e CH_3 , respectivamente. Esse perfil de fragmentação corrobora os dados de PS-MS/MS (Figura 8). A atribuição do pico de m/z 324 ao íon protonado de LSD também corrobora com a literatura.

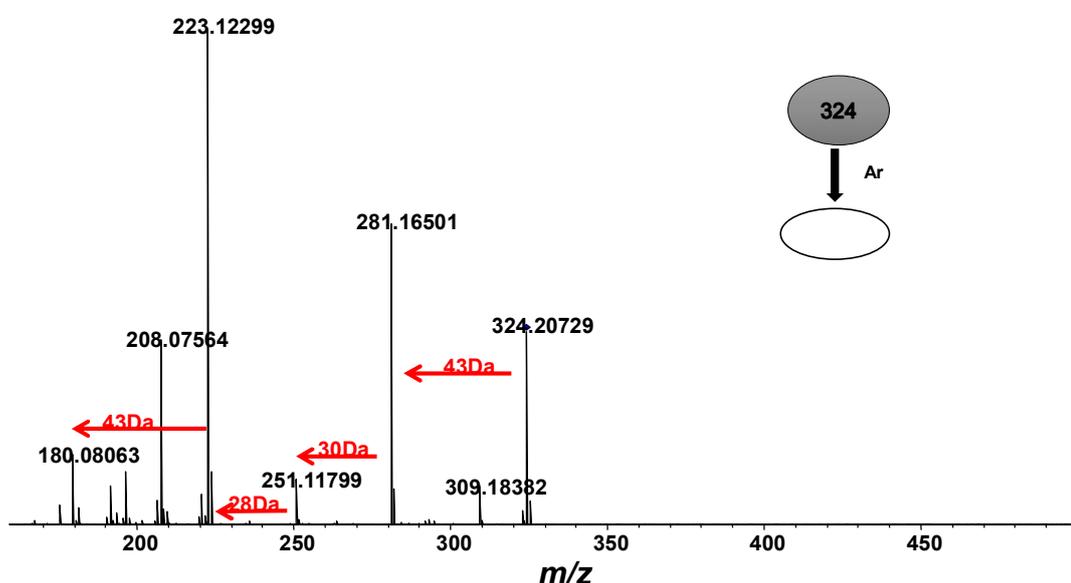


Figura 14: ESI(+)-MS/MS do íon protonado do LSD, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 324.

A Figura 15 apresenta o espectro de ultra-alta resolução de ESI (+) – FT-ICR-MS de cinco drogas sintéticas (na ordem de até 2 milhões) e fórmulas moleculares, valores m/z medidos e teóricos, erros de massa e DBEs são descritos na Tabela 3 Também foi observada uma boa concordância do perfil químico obtido a partir dos dados PS (+) - MS (Figura 6) e ESI (+) - FT-ICR-MS (Figura 15). A Figura 16 apresenta espectro de ESI (+) -MS/MS obtidos para amostras de selos de papel analisadas. As atribuições químicas estruturais são confirmadas através da fragmentação de íons protonados, $[\text{M} + \text{H}]^+$, da perda típica de grupos amina (17 Da NH_3), hidrocarbonetos (15 Da e 29 Da, CH_3 e

CH₃CH₂-), e outros grupos específicos de cada molécula. Os resultados estão em boa concordância com os espectros PS (+) - MS / MS (Figura 7).

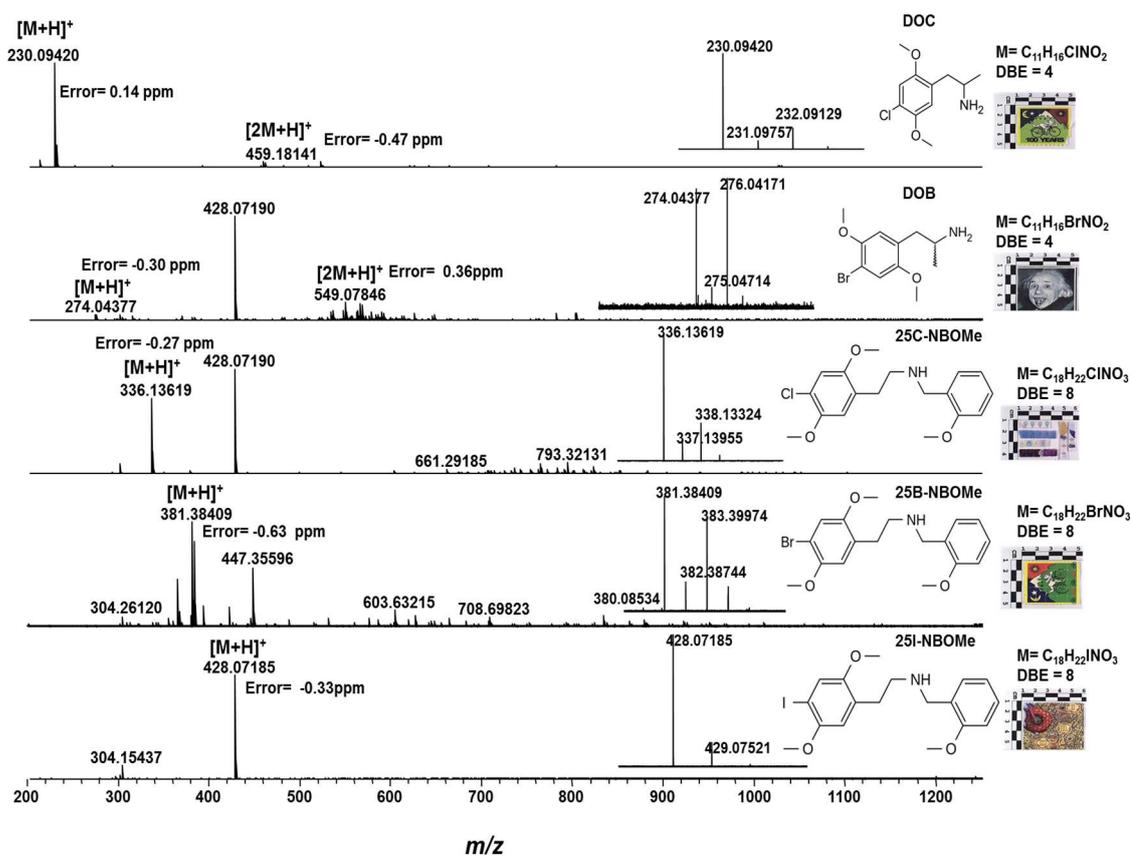


Figura 15. Espectro de ESI (+) -FT-ICR do DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe.

Tabela 3. Formula molecular, DBE, *m/z* experimental e teórico e o erro do DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe

| Amostra | Formula [M + H] ⁺ | <i>m/z</i> experimental | <i>m/z</i> teórico | DBE | Resolução | Erro [ppm] |
|------------------|--|-------------------------|--------------------|-----|-----------|------------|
| DOC | [C ₁₁ H ₁₆ ClNO ₂ + H] ⁺ | 230,09420 | 230,09423 | 4 | 1700000 | 0,14 |
| DOB | [C ₁₁ H ₁₆ BrNO ₂ + H] ⁺ | 274,04380 | 274,04372 | 4 | 1000000 | -0,30 |
| 25C-NBOMe | [C ₁₈ H ₂₂ ClNO ₃ + H] ⁺ | 336,13619 | 336,13610 | 8 | 1300000 | -0,27 |
| 25B-NBOMe | [C ₁₈ H ₂₂ BrNO ₃ + H] ⁺ | 380,08534 | 380,08558 | 8 | 560000 | -0,63 |
| 25I-NBOMe | [C ₁₈ H ₂₂ I NO ₃ + H] ⁺ | 428,07185 | 428,07171 | 8 | 1000000 | -0,33 |

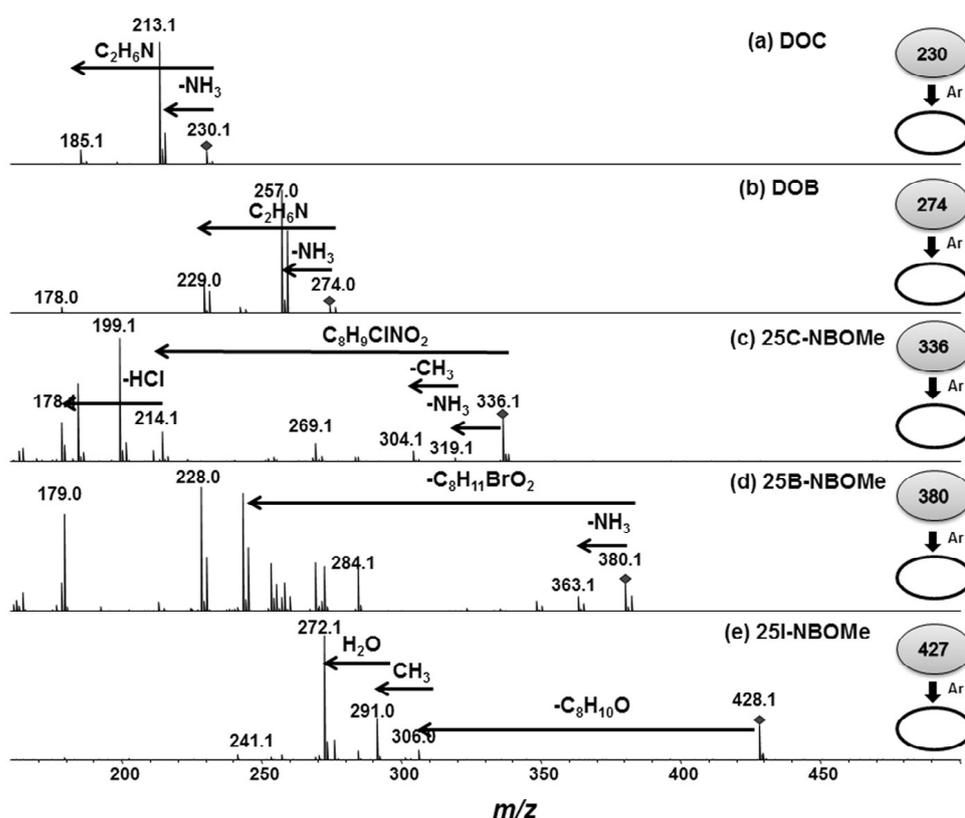


Figura 16. ESI (+) -MS/MS dos íons protonados de DOC, DOB, 25C-NBOMe e 25BNBOME.

Por meio dos resultados apresentados neste estudo, a análise direta de selos de drogas sintéticas por PS-MS se mostrou ser uma metodologia de grande vantagem para um laboratório de perícia, por apresentar uma análise rápida, em menos de 30 segundos obteve resultados tanto de *full scan* quanto de espectrometria de massas tandem, e sem preparo de amostra. Ao comparar os resultados com a literatura, tem-se que Cassels e colaboradores, necessitaram de 35 minutos para preparar e analisar cada amostra por GC-MS e ainda usou 30 mL de solvente, ou seja, o tempo é 70 vezes maior do que o que o método proposto leva e tem utilização de solvente (Duffau *et al.*, 2016).

O método proposto também se mostrou de baixo custo, uma vez que o custo para fazer a probe é em torno de 4 reais, utiliza-se baixíssimo volume de solvente e o substrato é a própria droga sintética apreendida. Por fim, essa aplicação tem grande potencial para análise em campo (*in loco*) através de seu acoplamento a espectrômetros de massas portáteis.

2.4. Conclusão.

Técnica de PS-MS demonstrou ser um método rápido, eficiente e confiável para de drogas sintéticas em selos de papel. Essa técnica tem grande potencial para substituição das técnicas convencionais que podem gerar falso positivo, apresentam alto custo e preparo de amostra

As atribuições das drogas sintéticas (LSD, DOC, DOB, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25I-NBOMe) identificadas nos selos de papéis, foram confirmadas tanto por seus perfis isotopólogos quanto por suas fragmentações características nos experimentos de espectrometria de massas tandem. A confirmação também foi feita, pela análise dos extratos dos selos por ESI-FT-ICR-MS e ESI-FT-ICR-MS/MS, onde resultados das duas técnicas, PS-MS e ES-FT-ICR-MS, foram similares.

Além disso, com as melhorias de espectrômetros de massa portátil, o método proposto tem o potencial para ser usado em laboratórios forenses, permitindo análises *in situ* imediatamente após as drogas sintéticas serem apreendidas.

**Capítulo 3. Análises de
extratos dos *spots* de
cromatografia de camada
delgada de cocaína e
adulterantes com
espectrometria de
massas por *Paper Spray
Ionization***

3.1. Introdução

A cocaína é uma droga estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) que causa severa dependência psicológica (Simões and Mariot, 2003). Essa droga proporciona sensação de bem-estar, euforia e contentamento. Geralmente, a cocaína é consumida como um sal (cloridrato de cocaína) ou como base (crack e merla). Sendo que o sal é administrado por aspiração e, por ser solúvel em água, por via intravenosa. A pasta base é administrada por inalação do vapor, uma vez que essa substância é pouco solúvel e muito volátil. A duração de seus efeitos depende da forma de consumo e administração, sendo seu tempo de meia vida média de 1 hora (Jufer *et al.*, 2000). A Figura 17 apresenta a estrutura química da cocaína na forma de base, em equilíbrio ácido-base com o cloridrato de cocaína.

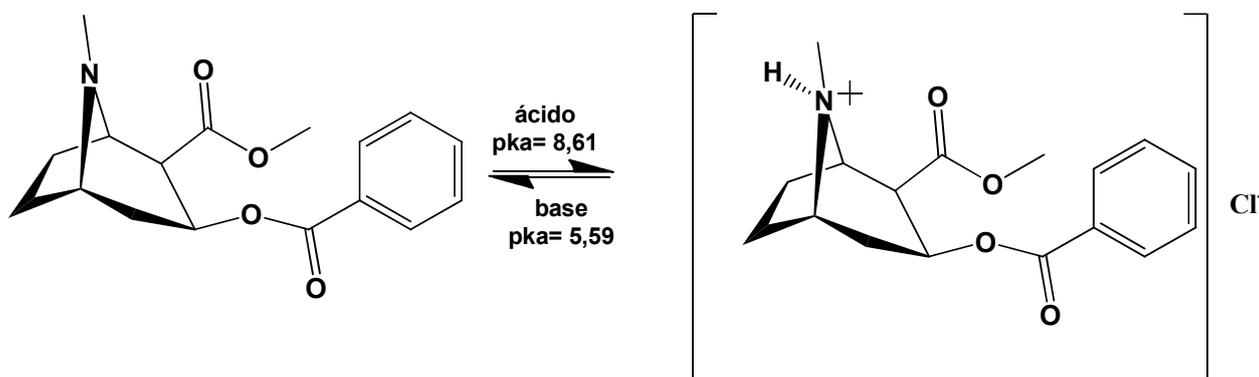


Figura 17. Estrutura química da cocaína na forma de base, em equilíbrio ácido-base com o cloridrato de cocaína.

A cocaína é obtida por extração sólido-líquida, com diversos solventes orgânicos (querosene, tiner, entre outros) e reações químicas ácido-base, da folha da coca (*Erythroxylum coca* Lam. -Erythroxylaceae). Na literatura é descrito que há mais de um caminho de extração e que cada um produz um produto. Também, pode haver restos dos reagentes utilizados e isso é de grande importância pois pode-se obter informações da rota de extração utilizada.

A principal classe extraída são os alcaloides, principalmente do tipo tropanos. Os tropanos são substâncias orgânicas nitrogenadas bicíclicas, originadas a partir da formação do anel pirrolidínico através dos aminoácidos arginina ou ornitina. Estes são agentes anticolinérgicos que inibem a ação da

acetilcolina, principal responsável por diversos processos no organismo, como o humor, o sono e respostas ao estresse, memória e recompensa.

De acordo com o Relatório Mundial de Drogas 2011 do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC), a cocaína é a segunda droga mais problemática a nível mundial em termos de consequências negativas para a saúde e a mais problemática no que diz respeito a violência relacionada ao tráfico (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011). Além disso, de acordo com o Relatório Mundial de Drogas 2013 do UNODC, o Brasil desempenha um papel importante no mercado global de cocaína como país de destino e de trânsito, devido às suas extensas fronteiras terrestres com os três principais países produtores de cocaína (Bolívia, Colômbia e Peru), à sua grande população, aos níveis significativos de uso, tanto de sal de cocaína como de crack, e a seu extenso litoral que proporciona fácil acesso ao Oceano Atlântico para o subsequente tráfico para a África e a Europa (United Nations Office on Drugs and Crime, 2013).

No Relatório Mundial de Drogas 2018, foi publicado que a produção de cocaína aumentou 53% nos últimos 5 anos e cerca de 18,2 milhões de pessoas usaram cocaína em 2016. Além disso, os valores de produção, uso e apreensão de cocaína, nunca foram tão altos (Figura 18) (United Nations Office on Drugs and Crime, 2018).

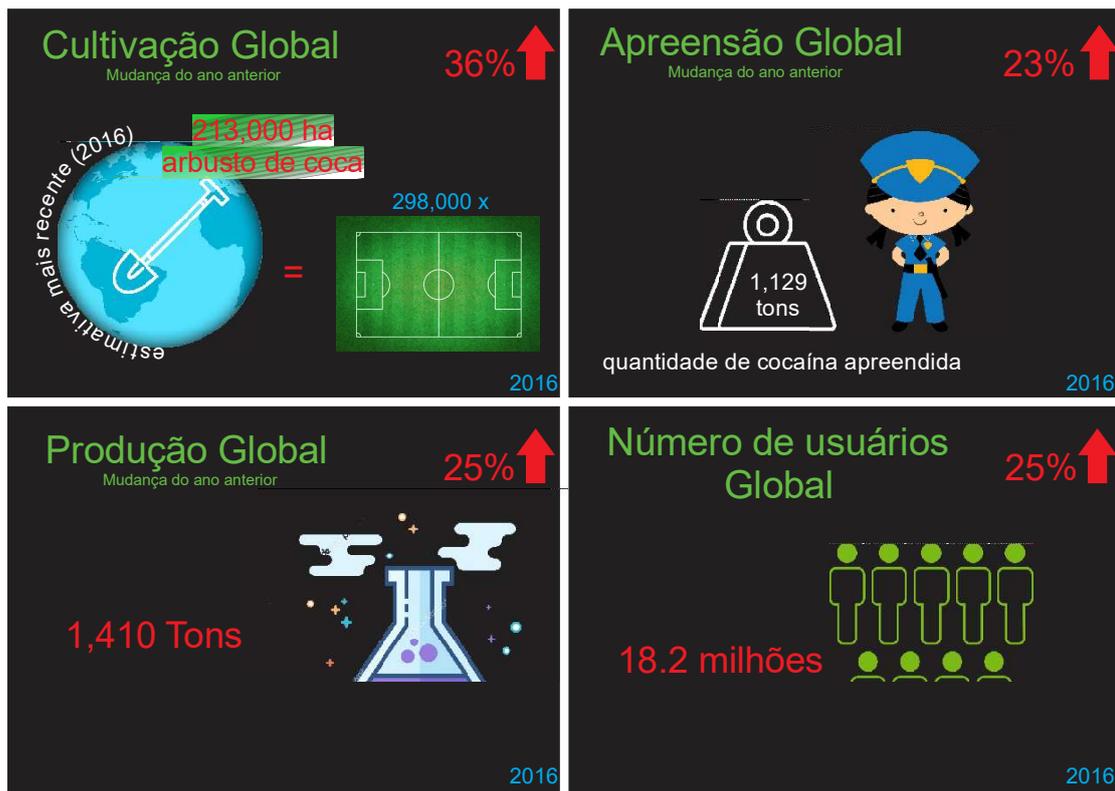


Figura 18. Números de cultivo, apreensão, produção e usuários de cocaína em 2016. Fonte: *World drug Report 2018*, (United Nations Office on Drugs and Crime, 2018).

Entretanto, para o laboratório forense, um dos maiores desafios para análises da cocaína apreendidas são os adulterantes e os diluentes. Diluentes são usados para o aumento do volume da droga produzida (como exemplo: leite em pó e fermento) (Souza, de *et al.*, 2016). E adulterantes são substâncias psicoativas usadas para modificar, sendo acentuar ou diminuir, o efeito toxicológico (por exemplo: cafeína, lidocaína e fenacetina) (Conceição *et al.*, 2014; Evrard, Legleye and Cadet-Taïrou, 2010). O uso dos diluentes e adulterantes tem objetivo de aumentar o lucro, uma vez que aumenta o volume produzido, a duração e intensidade do efeito e diminui o preço do custo de produção, porém dificulta a obtenção um veredicto real sobre a amostra apreendida (Sabino *et al.*, 2011). A Figura 19 apresenta as principais substâncias psicoativas utilizadas como adulterantes.

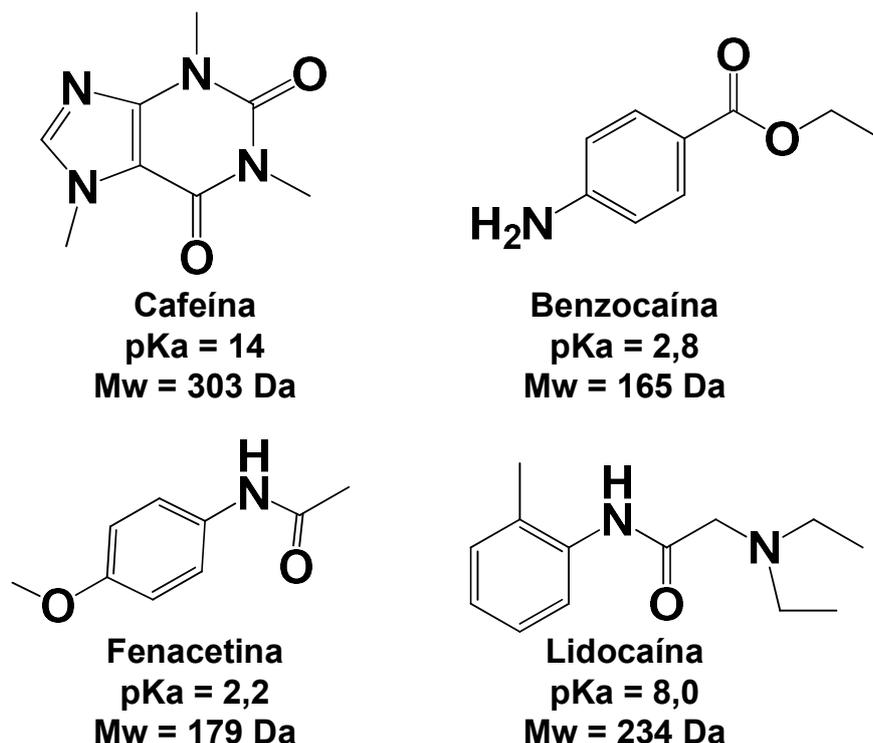


Figura 19. Principais adulterantes químicos de amostras de cocaína e crack.

Os métodos analíticos utilizados comumente durante a apreensão são qualitativos e caracterizados como testes de via úmida colorimétricos ou pré-testes. Eles apresentam vantagens de rapidez, baixo custo, fácil execução e interpretação. Entretanto, eles são testes de baixa especificidade, como por exemplo, na análise de amostras coloridas. Dentre os testes colorimétricos para determinar a presença de alcaloides destacam-se os testes com solução Tiocianato de Cobalto ou teste Scott (Conceição *et al.*, 2014). Entretanto, essa técnica tem alguns inconvenientes que podem fazer com que a análise gere resultados duvidosos ou apresentem uma análise laboriosa. Como é o caso do Teste de Scott, em outros estudos observou-se que substâncias como a lidocaína ou prometazina ao reagirem com o complexante de tiocianato de cobalto há a formação de um precipitado azul, do mesmo modo como ocorre ao reagir com a cocaína (Tsumura, Mitome and Kimoto, 2005).

Devido a não confiabilidade do teste e a possibilidade de um resultado falso-positivo, nas amostras que são dadas como positiva para a presença da cocaína, também são realizadas análises de cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês= Thin Layer Chromatography) (Haddoub *et al.*, 2011; Jukofsky, Vererey

and Mull, 1980; Sabino *et al.*, 2011), GC-MS (Haddoub *et al.*, 2011; Jukofsky, Vererey and Mull, 1980; Lillsunde and Korte, 1991; Magalhães *et al.*, 2013) e Cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chamas (Botelho *et al.*, 2014; Maldaner *et al.*, 2015).

Dentre as técnicas citas anteriormente, usadas como técnicas de confirmação, o estudo em questão utilizou a TLC. Este método é considerado de baixo custo e com um grande número de aplicações. Dentre elas tem-se a separação da cocaína e de suas impurezas (Haddoub *et al.*, 2011; Ilbeigi and Tabrizchi, 2015; Lillsunde and Korte, 1991; Sabino *et al.*, 2011). Nesta técnica a cromatografia é realizada em uma camada delgada de sílica ou alumina, como fase estacionária, e uma fase móvel que pode ser um solvente ou uma mistura de solventes de diferentes polaridades (Ilbeigi and Tabrizchi, 2015). Após aplicar-se a amostra na placa de TLC, tem-se a eluição da fase móvel onde, devido a diferença de polaridade dos componentes, ocorre a separação. Por fim, utiliza-se ou uma solução reveladora, ou luz UV (Ultra Violeta) ou vapor de iodo para revelar os locais (*Spot*) onde cada analito parou após sua eluição.

Como resultado da TLC tem-se a razão do caminho percorrido pelo analito (R_a) pelo caminho percorrido pelo eluente (R_m) (Figura 20), conhecido como índice de retenção (R_f) Equação 1. Esse valor é característico de cada substância e, por isso, pode-se utiliza-lo para atribuir o spot a substância. Por isso, quando se suspeita da presença de alguma substância, é comum realizar, simultaneamente, a análise com o padrão analítico para comparação.

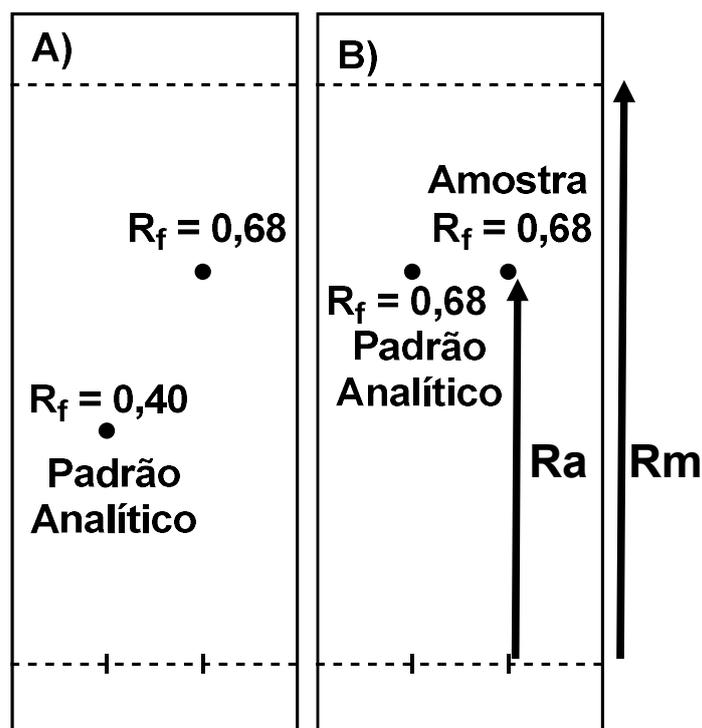


Figura 20. Representação gráfica de placas de TLC e os possíveis resultados. Onde em A) se tem uma amostra com o resultado negativo para o analito desejado e em B) uma amostra com resultado positivo para o analito desejado.

$$R_f = \frac{D_a}{D_m}$$

Equação 1: Equação para o cálculo do índice de retenção.

Portanto, a TLC tem algumas limitações como: alguns *spots* não serem revelados e não ser possível ter o conhecimento da natureza química dos compostos de cada *spot* (Ilbeigi and Tabrizchi, 2015) . Para contornar esse desafio, tem-se desenvolvido métodos de espectrometria de massas capazes de identificar os componentes de cada *spot* (Berkov *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2003). O PS-MS tem grande potencial para usar como o acoplamento, por ser uma técnica versátil e eficiente.

Estudos anteriores comprovam que ao aplicar a alta voltagem no papel previamente umedecido com a amostra, o spray é formado nas 3 pontas do triângulo (Yang *et al.*, 2012). Entretanto, a fim de evitar a formação do spray nas pontas adjacentes a garra de jacaré e guiar todo o analito a ponta oposta, Vaz e colaboradores desenvolveram o substrato do PS-MS com um canal de parafina.

Essa parafina é transferida de um papel de filtro previamente parafinado, com parafina líquida e deixado secar, pelo pressionamento do mesmo com um carimbo de aço antecipadamente aquecido a 180° forando um canal fino com bordas de parafina (Colletes *et al.*, 2016).

Desta forma, o escopo deste trabalho é o desenvolvimento de uma nova metodologia para analisar cocaína e seus adulterantes por TLC. Usaremos o acoplamento da técnica com o PS-MS para identificar e quantificar a cocaína e seus adulterantes (fenacetina, lidocaína, cafeína e benzocaína) a partir dos extratos obtidos de diferentes *spots* de TLC com o papel com canal de parafina.

3.2. Metodologia

3.2.1. Materiais e reagentes

Amostra padrão de referência de cocaína fornecida pelo Polícia Civil do Estado do Espírito Santo e padrões de fenacetina, benzocaína (ambos fornecidos pela Sigma-Aldrich, São Paulo), lidocaína e cafeína anidra (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro e Bandeirante Brazmo Industria e Comercio Ltda, São Paulo, respectivamente) foram usados para preparar soluções de estoque de 12, 14 e 20 mg mL⁻¹.

Os reagentes utilizados nas análises de TLC e PS foram metanol grau HPLC (JTBaker), ácido fórmico a 99% RPE ACS PA (Carlo Erba Reagentes), hidróxido de amônio (Sigma Aldrich), água Milli-Q, clorofórmio, ácido acético glacial e éter etílico (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro).

3.2.2. TLC

O primeiro passo para a análise de TLC foi a otimização da metodologia, onde se estudou os seguintes parâmetros: Volume de aplicação (5, 10, 15, 20 e 25 µL); a forma de aplicação (micropipeta, capilar de sílica e microseringa); e a Concentração do analito (4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 14,0 16,0 mg mL⁻¹). Para isso utilizou-se como analito o padrão de cocaína e placas de sílica gel com suporte de alumínio como fase estacionária. O eluente usado nessa primeira otimização foi metanol: hidróxido de amônio (99, 5:0,5 v/v%) e a câmara ultravioleta (UV) com a lâmpada de 254 nm como método de revelação.

Os melhores resultados foram usados para otimização da melhor fase móvel. Foram usados três sistemas indicados pelo UNODC. Os sistemas são: clorofórmio: metanol: ácido acético glacia (CHCl₃:CH₃OH: HCOOH glacia, 75:20:5 v/v%); éter etílico: clorofórmio ((C₂H₅) O: CHCl₃, 50:50 v/v%); e metanol: hidróxido de amônio (CH₃OH: NH₄OH, 100: 1,5 v/v%). Nesse estudo utilizou-se os padrões de cocaína e adulterantes (lidocaína, cafeína, benzocaína e fenacetina).

Por fim, apenas com o objetivo de melhorar a resolução cromatográfica a partir do pH do meio, otimizou-se a proporção dos reagentes da fase móvel. Para isso foram utilizadas as seguintes razões entre os solventes: 0,5: 99,5; 1:99; 97:3; 96, 5:3,5 v/v%.

A Figura 21 tem o resumo de toda a otimização realizada. Com os melhores parâmetros, foram realizadas as análises de soluções da cocaína e dos adulterantes nas concentrações de 0.5 a 10 mg mL⁻¹. Todas as placas foram reveladas em câmara ultravioleta (UV) a 254 nm. Os fatores de retenção foram calculados com a Equação 1 apresentada na seção introdução desse capítulo.

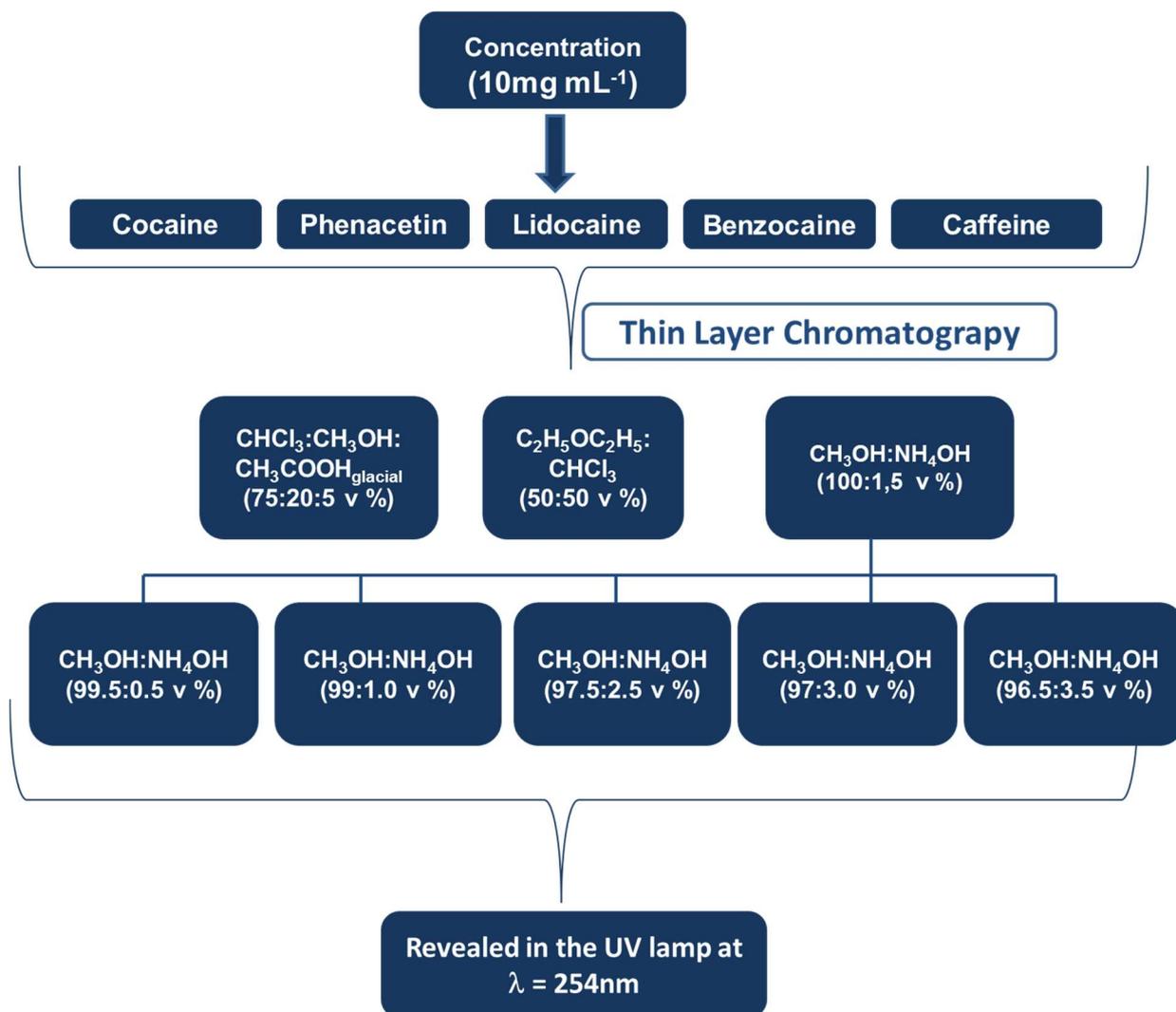


Figura 21. Sistemas de eluição por TLC avaliados para identificação de cocaína e seus adulterantes.

3.2.3. PS-MS

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com a fonte de PS acoplada no modo de ionização positivo.

A folha de papel (Whatman Grade 1, GE Healthcare, EUA) foi cortada em geometria triangular (base e alta de 1 cm) e fixada a uma garra jacaré, ligada a um fio conectado ao espectrômetro de massa. Em seguida, cada *spot* do CCD contendo os analitos foram transferidos para *ependorf* com metanol acidificado com ácido fórmico (0,1% v / v) e 10 μ L da solução resultante foi aplicada ao papel para análise de PS (+) - MS (Figura 22).

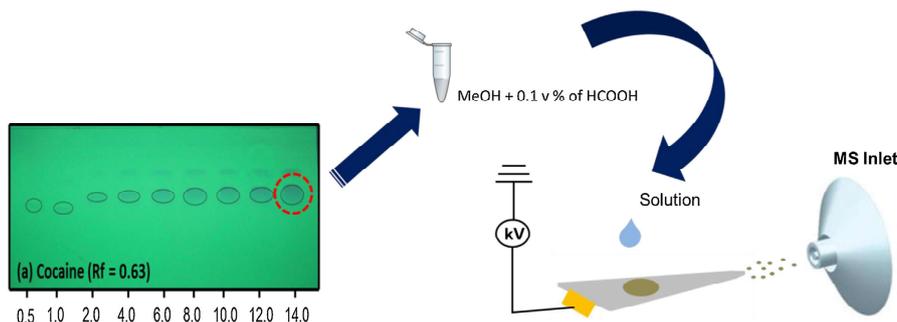


Figura 22: Ilustração do projeto experimental. Cada *spot* da CCD foi transferido a um tubo de ependorf com 0,1% de ácido fórmico em metanol (v/v%). A solução resultante foi então aplicada em um papel triangular e todos os compostos do *spot* foram analisados por PS-MS.

3.2.4. Repetibilidade e Reprodutibilidade.

A repetibilidade da técnica foi avaliada após a análise do extrato de TLC da cocaína ($10 \text{ mg} \cdot 10^{-1}$), em nove diferentes horários do dia. Para tanto, foram aplicados 10 μ L do extrato no papel foram realizadas as análises por PS-MS. As análises foram feitas em triplicatas. A diferença de tempo entre uma aplicação e outra foi de 30 minutos.

A reprodutibilidade foi realizada repetindo-se o estudo de repetibilidade por 5 dias. Os dados obtidos foram avaliados com o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) (Neto, Scarminio and Bruns, 2012) com confiança de 95%.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1. Otimização da CCD

A otimização do sistema de CCD foi feita para a obtenção das melhores condições cromatográficas. A primeira otimização envolveu os parâmetros de aplicação da amostra (Figura 23-a), volume aplicado (Figura 23-b) e da concentração do analito (Figura 23-c).

A aplicação da amostra na placa de CCD (micropipeta, capilar de sílica e microseringa), avaliou-se de acordo com o formato do *spot* e o valor de R_f (Figura 23-a). O formato do *spot* é bem definido, homogêneo e uniforme nos três casos avaliados, sendo assim, qualquer um dos tipos de aplicação pode ser empregado para análise.

Para o volume de aplicação, avaliou-se a área do *spot* (Figura 23-b). Note que a partir do volume de 15 µL de solução de cocaína, o *spot* apresenta um aumento da área. Isso pode ser desvantajoso para análises de amostras apreendidas, pois pode interferir na resolução cromatográfica devido a co-eluições. Portanto, o volume definido para o trabalho foi o de 10 µL.

Por fim estudou-se o parâmetro da concentração do analito (Figura 23-c). O estudo foi realizado nas concentrações de 4 a 16 mg mL⁻¹. Ainda que a técnica de TLC seja sensível para todas as concentrações estudadas, neste trabalho adotou-se a concentração de 10 mg mL⁻¹.

Sendo assim, os parâmetros usados nessa otimização é de que pode ser usado qualquer método de aplicação, o volume de aplicação é de 10 µL e a concentração do analito é de 10 mg mL⁻¹.

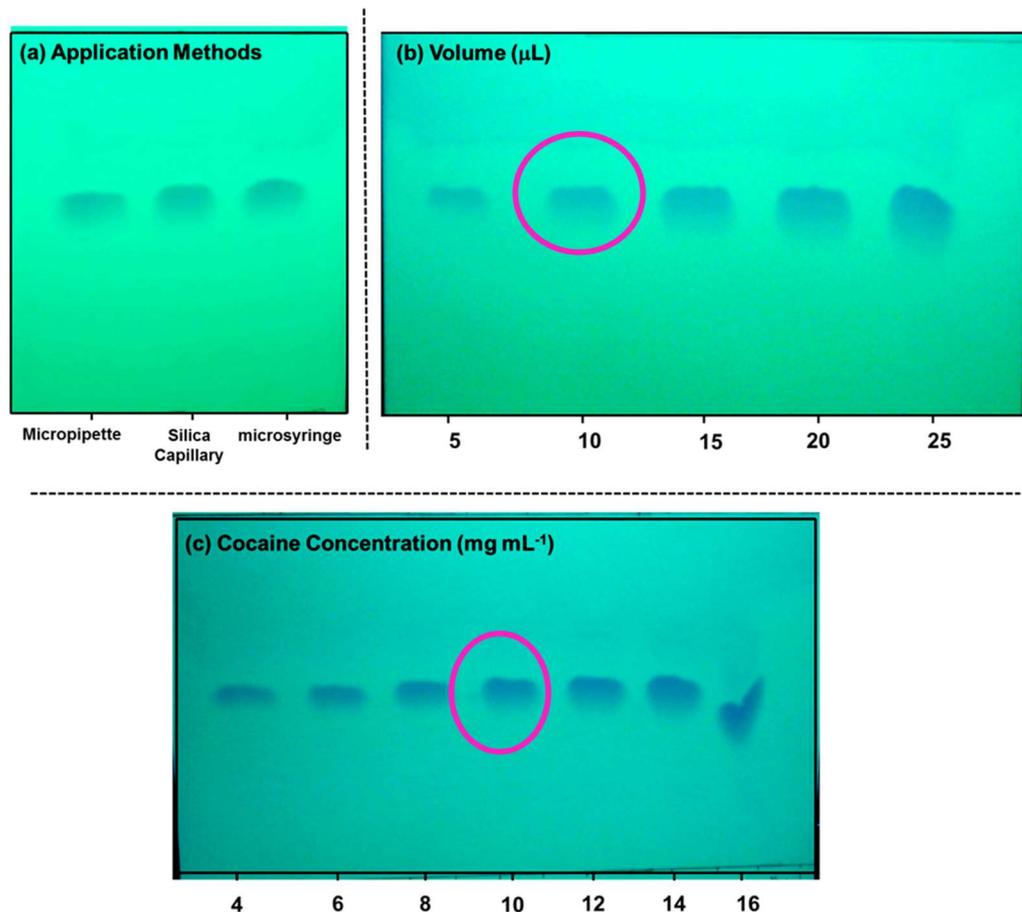


Figura 23. Otimização do sistema de CCD variando a aplicação do método (a), o volume de amostra aplicado (b) e a concentração do analito (c).

Como uma segunda otimização na detecção da cocaína e adulterantes, tem-se a otimização do eluente da CCD. Para isso estudou três sistemas: I) metanol: ácido acético glacial ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}$ glacial, 75:20:5 v/v%); II) éter etílico: clorofórmio ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}:\text{CHCl}_3$, 50:50 v/v%); e III) metanol: hidróxido de amônio ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$, 100: 1,5 v/v%) (Figura 24). As soluções de analitos (cocaína, lidocaína, fenacetina, benzocaína e cafeína) foram feitas na concentração de 10 mg mL^{-1} em metanol e aplicados na CCD via capilar de sílica.

A Figura 24 apresenta as placas de CCD para cada sistema estudado. O sistema I apresentou os valores RF parecidos para todos os analitos ($R_f = 0,71-0,76$ Tabela 4 e Figura 24-a) e, também, não houve boa resolução dos spots, fazendo com que alguns se misturassem. Sendo assim, esse sistema não é apto para separação da cocaína e dos adulterantes ($R_f = 0,71-0,76$ Tabela 4 e Figura 24-b). O sistema II também apresentou valores parecidos para quase todos os

analitos, apenas havendo a separação da cocaína. Entretanto, esse sistema é melhor do que o primeiro pois tem melhor resolução dos *spots*. Por fim, o sistema III apresentou o melhor resultado, uma vez que houve a separação de todos os analitos ($R_f = 0,69$ a $0,81$ Tabela 4 e Figura 24-c), com boa resolução.

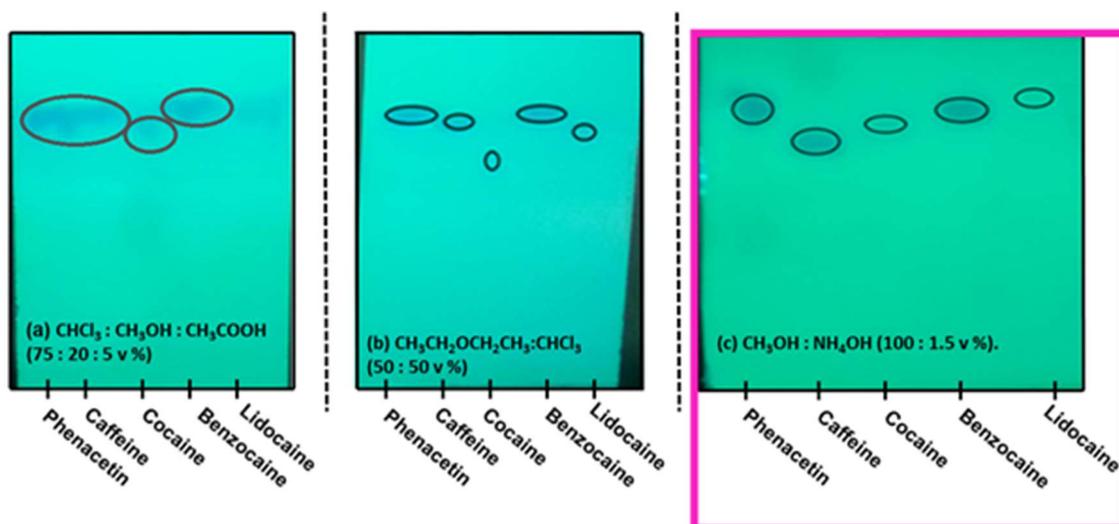


Figura 24. Sistema de CCD para otimização das fases móveis: a) $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}$ glacial, 75:20:5 v/v%; b) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3:\text{CHCl}_3$ (50:50%); e (c) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (100:1.5 v%).

Tabela 4: Valores de R_f para os padrões de fenacetina, cafeína, cocaína, benzocaína e lidocaína.

| Analito | Sistema I | Sistema II | Sistema III |
|------------|-----------|------------|-------------|
| Fenacetina | 0,74 | 0,76 | 0,79 |
| Cafeína | 0,74 | 0,74 | 0,69 |
| Cocaína | 0,71 | 0,63 | 0,74 |
| Benzocaína | 0,76 | 0,76 | 0,78 |
| Lidocaína | 0,76 | 0,71 | 0,81 |

Para melhorar ainda mais a separação e resolução da CCD, foi feita a otimização da proporção de metanol e hidróxido de amônio usada no sistema. As proporções usadas foram: 0, 5:99,5; 1:99; 97:3; 96, 5:3,5 v/v% (Figura 25 e Tabela 5). Com os resultados é observado que os melhores sistemas de análise são aqueles que apresentam baixas concentrações de NH_4OH (<1 v%). Isso por que o NH_4OH altera o equilíbrio ácido-base da molécula, como por exemplo, a

cocaína em sistemas com baixa concentração de NH_4OH está na forma de cloridrato de cocaína, fazendo com que a interação cocaína-fase estacionária seja maior do que em altas concentrações de hidróxido de amônio. Da mesma maneira, a cafeína, cuja a polaridade é alta e mais básica ($\text{pK}_a = 14$), também interagem mais com fase estacionária. Entretanto, os demais adulterantes, que são mais ácidos ($\text{pK}_a \leq 8$), interagem preferencialmente com a fase móvel. E isso é um fator importante para a separação dos compostos, sem que ocorra eluição. Portanto, o sistema metanol: hidróxido de amônio 99, 5:0,5 v% foi definido com o de trabalho.

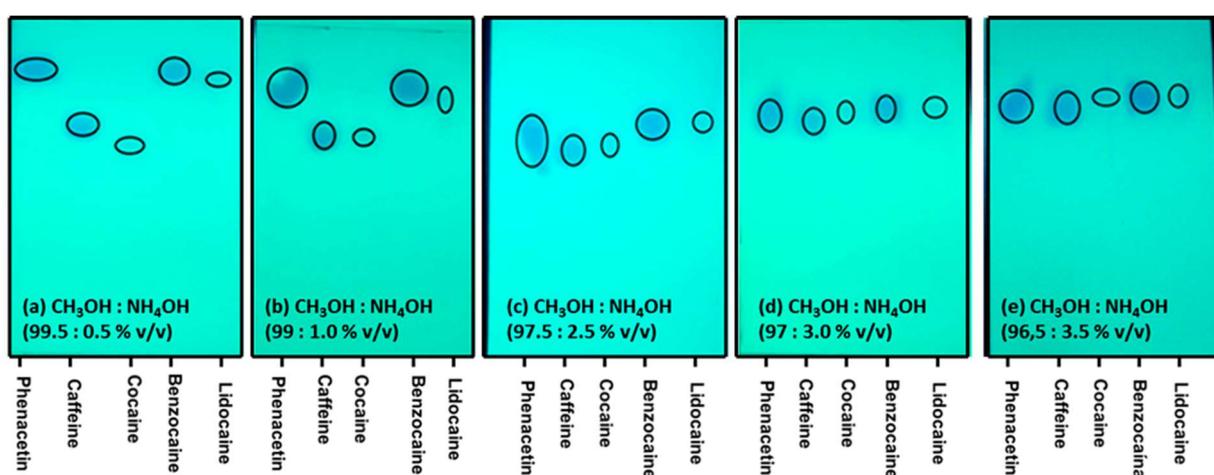


Figura 25. Variação da razão dos solventes do sistema de eluição $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ em: (a) 99.5: 0.5 v%; (b) 99:1.0 v%; (c) 97.5: 2.5 v%; (d) 97:3 v%; (e) 96.5: 3.5 v%.

Tabela 5: Valores de R_f dos padrões para diferentes proporções da fase móvel (em % de volume) de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$.

| Analito | Sistema I | Sistema II | Sistema III |
|------------|-----------|------------|-------------|
| Fenacetina | 0,74 | 0,76 | 0,79 |
| Cafeína | 0,74 | 0,74 | 0,69 |
| Cocaína | 0,71 | 0,63 | 0,74 |
| Benzocaína | 0,76 | 0,76 | 0,78 |
| Lidocaína | 0,76 | 0,71 | 0,81 |

3.3.2. Identificação de padrões de cocaína e adulterantes

Neste trabalho realizou-se a cromatografia por TLC de padrões de benzocaína, cafeína, cocaína, fenacetina e lidocaína nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 mg mL⁻¹ e diferentes amostras apreendidas de cocaína e crack, com o objetivo de caracterizar os constituintes químicos das amostras por seu valor de índice de retenção. Realizou-se a TLC utilizando como eluente uma solução Metanol e hidróxido de amônio (99,5: 0,5V/V).

A Figura 26 apresenta as placas de TLC para os padrões com os respectivos valores dos índices de retenção. Esses valores serão comparados com os spots encontrados nas amostras apreendidas. Porém, como observado na figura, a benzocaína, a fenacetina e a lidocaína, assim como a cocaína e a cafeína, têm esses valores próximos, o que pode gerar resultados falso positivo.

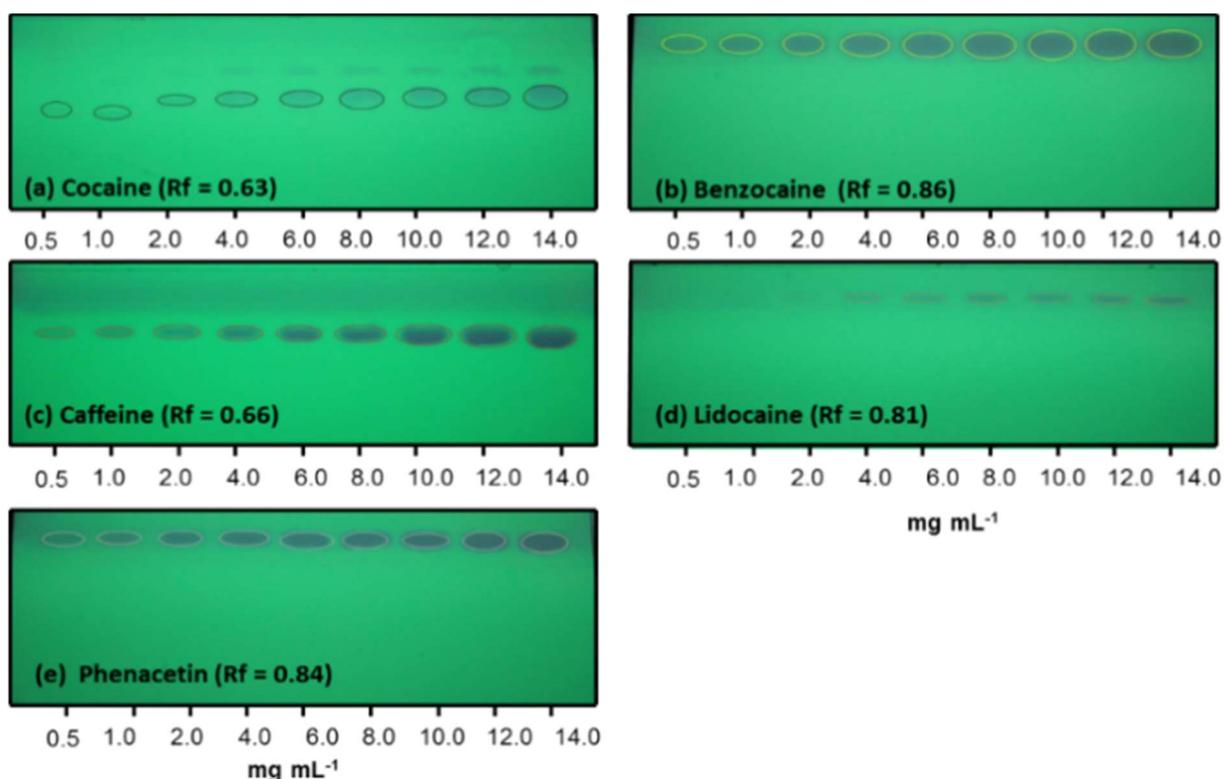


Figura 26. Placas de CCD dos padrões Benzocaína, Cafeína, Lidocaína, Fenacetina e Cocaína.

Tendo em vista este desafio, propôs-se o uso do PS-MS para a confirmação da detecção dos padrões analisados por CCD. Para isto, foram transferidos os spots revelados por lâmpada UV em tubos eppendorf, acrescentados 1 mL de metanol e extraído o padrão da sílica por 24 horas. Foi aplicado 10 μ L do sobrenadante em um papel de formato triangular com canal de parafina, esperado secar em temperatura ambiente por 4 horas e analisado por PSI.

A Figura 27 apresenta os espectros de PS-MS dos padrões benzocaína, $[M + H]^+$ m/z 166, cafeína, $[M + H]^+$ m/z 195, lidocaína, $[M + H]^+$ m/z 235, fenacetina, $[M + H]^+$ m/z 180 e $[M + Na]^+$ m/z 202 e cocaína, $[M + H]^+$ m/z 304 nas concentrações 0,5; 4,0; 10,0 e 14,0 mg mL⁻¹. Uma vez que os analitos de interesse foram identificados, o método mostrou-se apto para a realização das análises das amostras de cocaína e crack apreendidos.

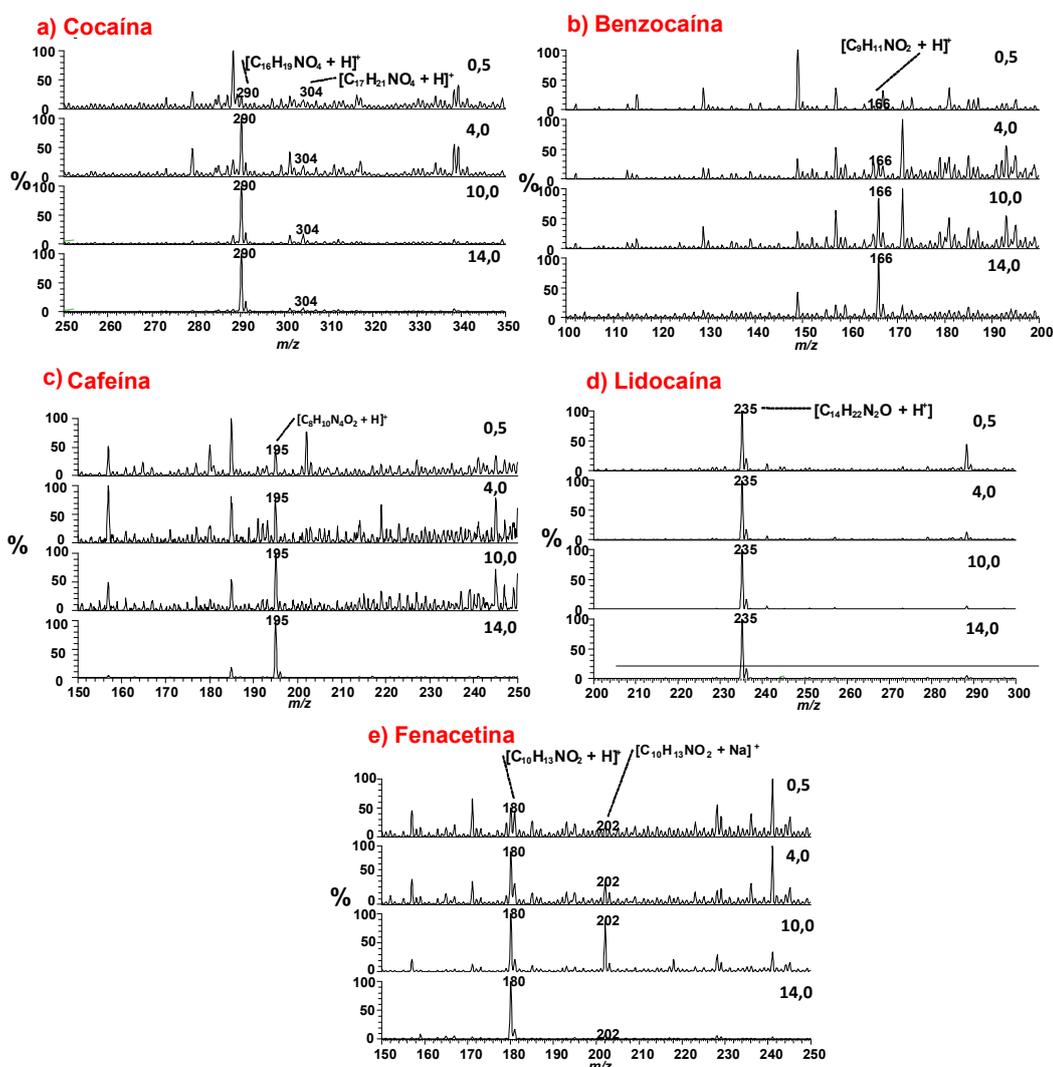


Figura 27: Espectros de PSI-MS da cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina nas concentrações 0,5; 4,0; 10,0 e 14,0 mg mL⁻¹.

A Figura 28 apresenta os espectros de PS-MS/MS da cocaína e adulterantes (benzocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina). Também apresenta o espectro de PS-MS/MS do metabólito da cocaína, benzoilecgonina, encontrado nas análises de cocaína. Esses experimentos foram realizados para confirmação da atribuição dos picos de m/z 304, 166, 195, 235, 180 e 290 as suas respectivas substâncias.

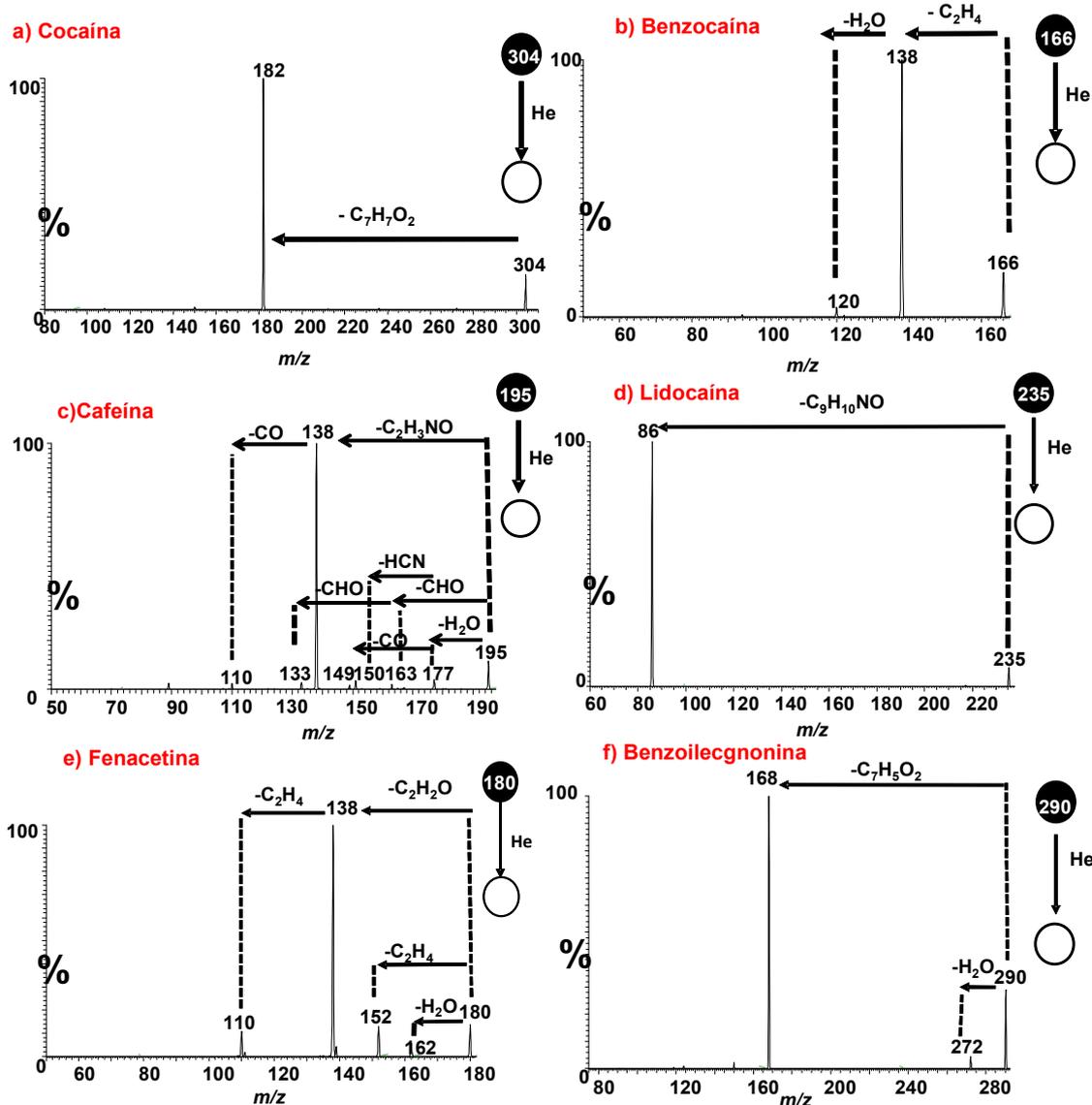


Figura 28. Espectro de PS-MS/MS da cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina e benzoilecgonina.

As fragmentações características da cocaína e da benzoilecgonina ocorrem de maneira similar. Onde acontece a perda de uma molécula de $C_7H_5O_2$ gerando o íon m/z 182. Em estudos anteriores, Wang e Bartlett propôs que para ocorrer

essa fragmentação é necessário a mudança da conformação (de cadeira para barco), para facilitar a migração do hidrogênio. Esse resultado corrobora com o citado Moreda-Piñeiro (Sánchez-González *et al.*, 2015) e pode ser visto na Figura 29 e 30.

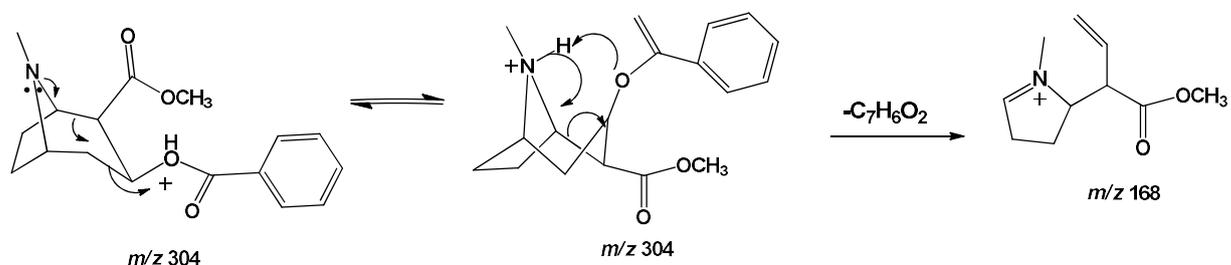


Figura 29. Mecanismo de fragmentação do pico m/z 304 referente a cocaína protonada, $[M + H]^+$ m/z 304.

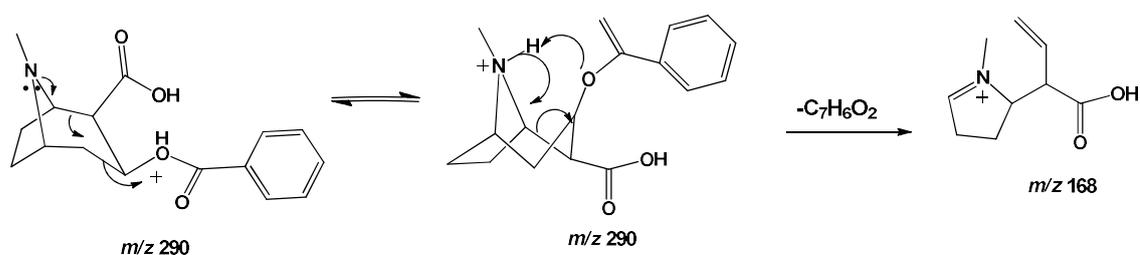


Figura 30: Mecanismo de fragmentação do pico m/z 290 referente a benzoilecgonina protonada, $[M + H]^+$ m/z 290.

A fragmentação da benzocaína ocorre por duas perdas neutras, a primeira perda é de uma molécula de C_2H_4 , para isso ocorre o rearranjo do hidrogênio ligado ao carbono α ao oxigênio, gerando a clivagem da ligação O-C. A segunda é perda de H_2O gerando o íon m/z 120, isso ocorre pelo rearranjo do hidrogênio ligado ao oxigênio da carbonila para o oxigênio da carboxila, seguida pela clivagem da ligação C-O. Esse resultado corrobora com o citado por Gergov e colaboradores (Mueller *et al.*, 2005) e pode ser visto na Figura 31.

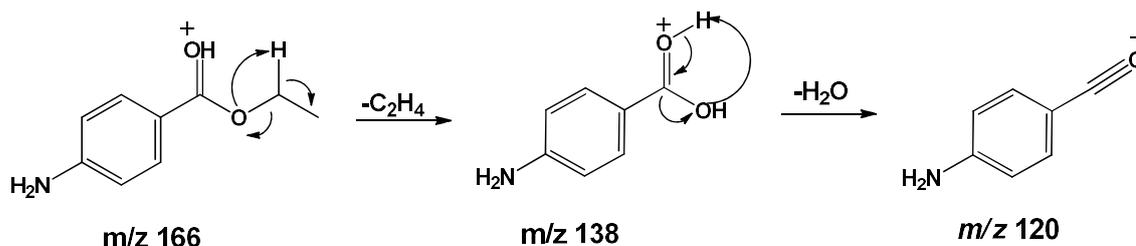


Figura 31. Mecanismo de fragmentação do pico m/z 166 referente a benzocaína protonada, $[M + H]^+$ m/z 166.

A fragmentação da cafeína ocorre pela perda de uma molécula de C_2H_3NO gerando o pico de m/z 138, seguida pela perda de CO gerando o íon m/z 110, esse processo é uma Retro Diels-alder. Esse resultado corrobora com o citado por Herrero e colaboradores (Toro-Uribe *et al.*, 2018) e pode ser visto na Figura 32.

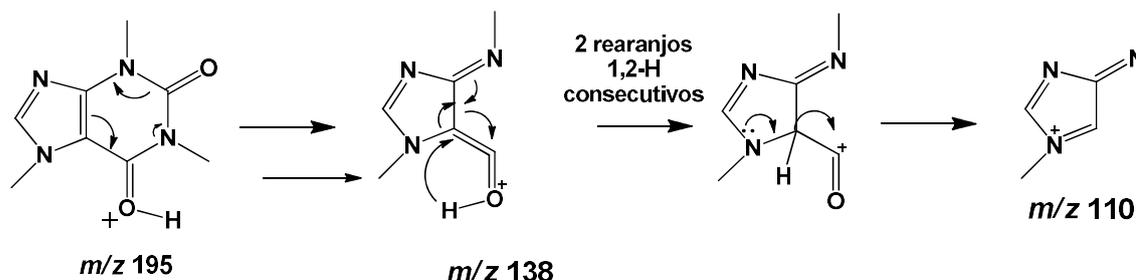


Figura 32: Mecanismo de fragmentação do pico m/z 195 referente a cafeína protonada, $[M + H]^+$ m/z 195

A fragmentação da lidocaína ocorre pela perda de uma molécula de $C_9H_{10}NO$ gerando o pico de m/z 86. Essa é uma fragmentação radicalar comum em aminas. Esse resultado corrobora com o citado por Abdel-Rehim (Ahmadi *et al.*, 2018) e pode ser visto na Figura 33.

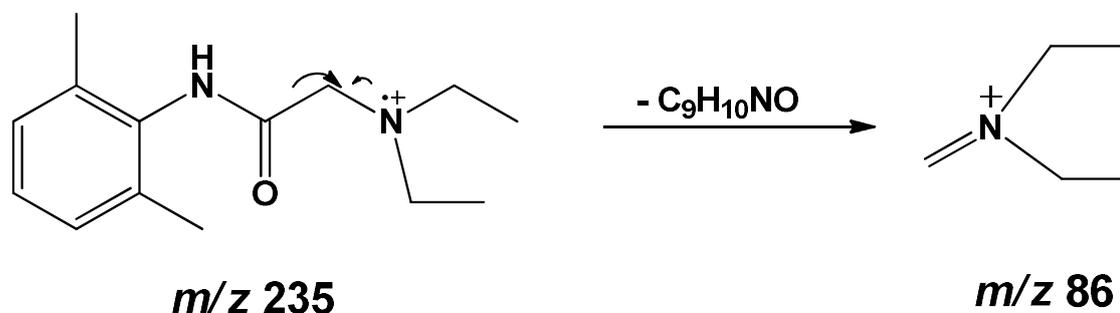


Figura 33: Mecanismo de fragmentação do pico m/z 235 referente a lidocaína protonada, $[M + H]^+$ m/z 235.

A fragmentação característica da fenacetina ocorre devido à quebra da ligação C-N, característica de uma amida, devido a um rearranjo 1-3 do hidrogênio, gerando o fragmento de m/z 138. Esse resultado corrobora com o citado por Harrison e colaboradores (Tu and Harrison, 1998) o que nos possibilita afirmar que o íon de m/z 180 é referente a fenacetina protonada. A Figura 34 demonstra o mecanismo de fragmentação da fenacetina.

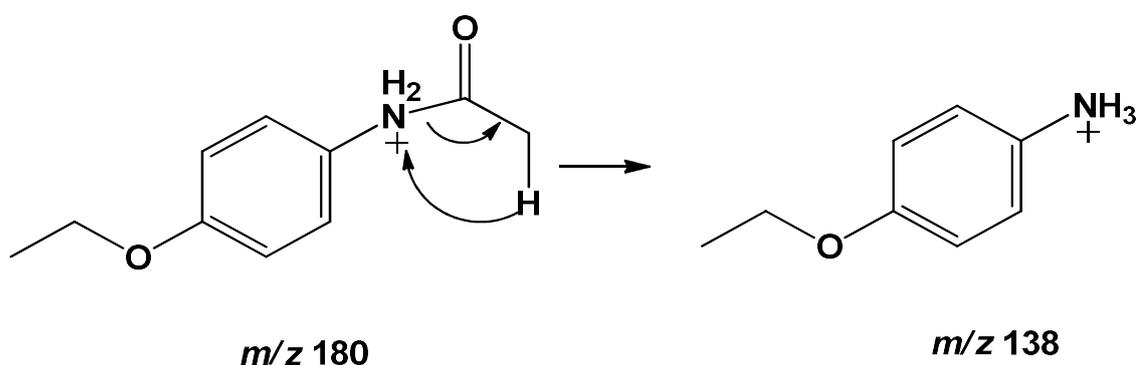


Figura 34: Mecanismo de fragmentação do pico m/z 180 referente a fenacetina protonada, $[M + H]^+$ m/z 180.

A Figura 35 ilustra as curvas analíticas para cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina junto das respectivas equações das retas obtidas pela regressão linear e os limites de detecção e de quantificação. Para sua construção utilizou os sinais referentes aos íons protonados de cada um dos compostos. As curvas apresentaram ótimas linearidades (cocaína ($R^2 = 0,9993$), benzocaína, ($R^2 = 0,9984$), a cafeína ($R^2 = 0,9999$), a fenacetina ($R^2 = 0,9989$), a lidocaína ($R^2 = 0,9998$) e a fenacetina ($R^2 = 0,9989$)), mostrando que o método é confiável para ser usado nas análises de cocaína e adulterantes.

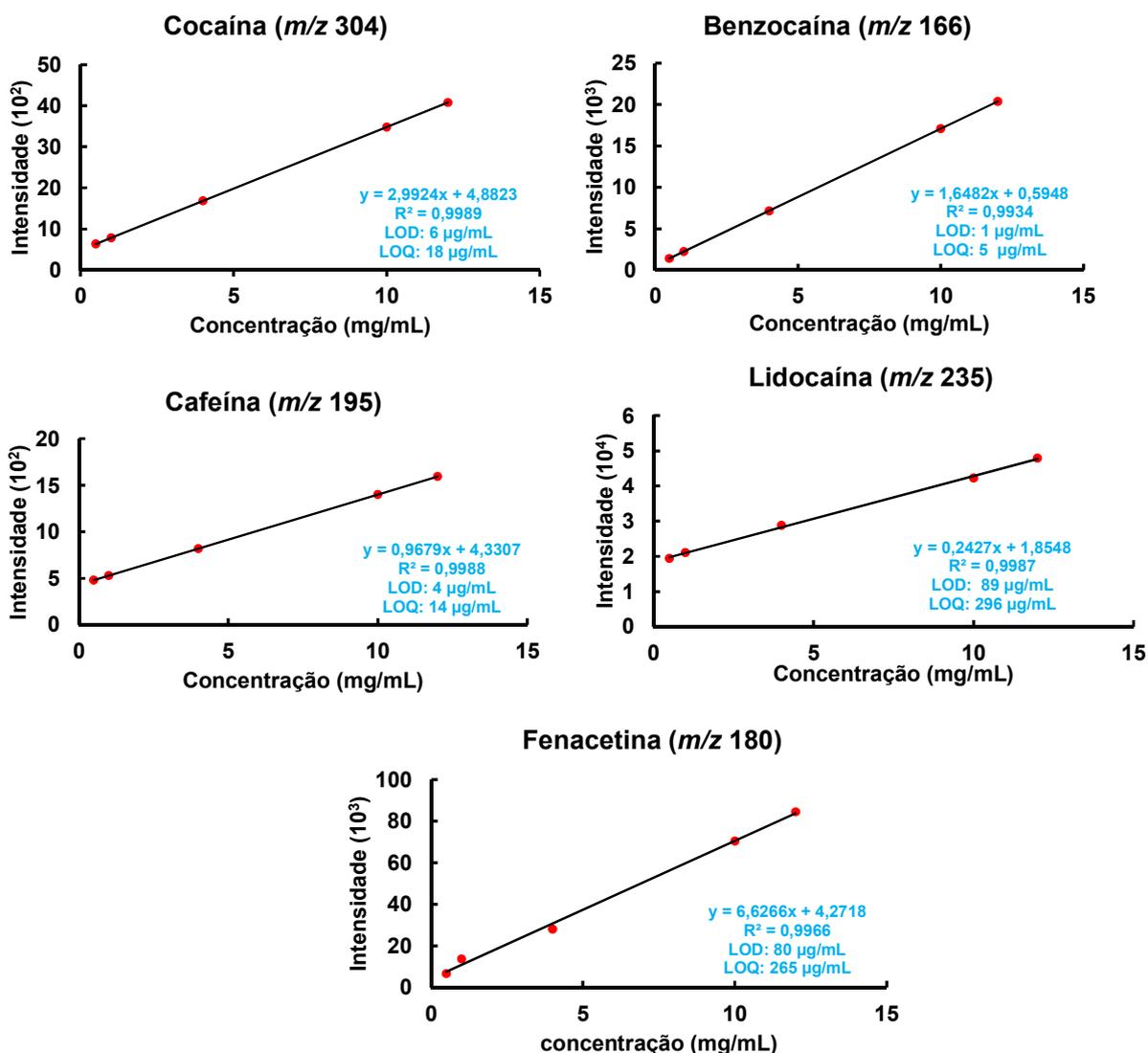


Figura 35: Curvas de calibração para a cocaína, benzocaina, cafeína, lidocaína e fenacetina.

Para mostrar a importância do uso de outras técnicas complementares ao CCD, pode-se comparar os LOD para cada padrão obtido usando apenas a técnica cromatográfica com o obtido pelo PS. A Tabela 6 apresenta esses valores. Analisando as unidades de cada tipo de técnica, onde os LOD estão em mg mL^{-1} para a CCD e para o acoplamento com PS são observados valores em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com essa diferença mostra que o PS é mais sensível do que a CCD, sendo assim o uso de outras técnicas além de confirmar o resultado, consegue detectar a cocaína e os adulterantes em menores concentrações.

Tabela 6: Comparação do LOD obtido apenas para a CCD e do acoplamento da técnica cromatográfica com o PS.

| Padrão | CCD (mg mL ⁻¹) | CCD + PS(+)-MS (µg mL ⁻¹) |
|------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Cocaína | 2.0 | 6.0 |
| Cafeína | 0.5 | 4.0 |
| Fenacetina | 0.5 | 80.0 |
| Benzocaína | 0.5 | 1.0 |
| Lidocaína | 4.0 | 90.0 |

3.3.3. Repetibilidade e reprodutibilidade

De forma a verificar a precisão do método, foi feito o estudo de repetibilidade. Para isso considerou-se a razão das intensidades relativas de cocaína e benzoilecgonina (*m/z* 304/290) detectados em nove análises em 5 dias diferentes (Tabela 7). A Tabela 8 apresenta o teste de ANOVA realizado por Excel. Note que a variância dos 5 dias é insignificante e, assim, a análise de PS-MS mostra ter boa repetibilidade.

Já para a reprodutibilidade, é usado a parte ANOVA da Tabela 8, nesta análise verifica-se a variância entre os dias de análise (Entre os grupos) e a variância entre os dados de cada dia de análise (Dentro de grupos), e depois compara-se estas duas variâncias. Quanto maior for a variância “entre os grupos” em relação à variância “dentro os grupos”, maior é a dispersão ocasionando uma análise com menor significância. Isto é observado na tabela comparando os valores de F-calculado (8,98) com F-crítico (2,6). Observem que o valor F-calculado é maior do que o valor de F-crítico, portanto os resultados dessa análise são significativos, indicando uma boa reprodutibilidade.

Tabela 7. Valores da razão de m/z 304/290 correspondentes a cocaína/benzoilecgonina obtido por PS (+) -MS de nove replicatas em cinco dias diferentes

| DIA/ ANÁLISE | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | 0.09 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.02 | 0.04 | 0.07 | 0.02 | 0.02 |
| 2 | 0.37 | 0.46 | 0.25 | 0.08 | 0.05 | 0.13 | 0.13 | 0.55 | 0.21 |
| 3 | 0.08 | 0.03 | 0.09 | 0.26 | 0.3 | 0.03 | 0.18 | 0.09 | 0.15 |
| 4 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.12 | 0.04 | 0.07 | 0.02 | 0.02 | 0.11 |
| 5 | 0.04 | 0.04 | 0.02 | 0.07 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.07 | 0.03 |

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos em 5 dias por PS (+) -MS da cocaína/benzoilecgonina.

| Dia | N | Soma | Média | Variância | | |
|----------------------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------|------------------|
| 1 | 9 | 0.44 | 0.05 | 0.0006 | | |
| 2 | 9 | 2.24 | 0.25 | 0.0306 | | |
| 3 | 9 | 0.94 | 0.10 | 0.0060 | | |
| 4 | 9 | 0.42 | 0.05 | 0.0018 | | |
| 5 | 9 | 0.34 | 0.04 | 0.0005 | | |
| | | SQ^a | DF^b | MQ^c | F | F crítico |
| Entre Grupos | | 0.28 | 4 | 0.07 | 8.98 | 2.60 |
| Dentre Grupos | | 0.32 | 40 | 0.008 | | |
| Total | | 0.6 | 44 | | | |

^aSQ = soma dos quadrados. ^bDF = grau de liberdade, ^cMQ = raiz do valor quadrático médio .

3.3.4. Identificação de cocaína e adulterantes em amostras apreendidas

Amostras apreendidas de crack e cocaína (10 mg mL⁻¹) foram aplicadas em placas de sílica, realizada a CCD utilizando-se como eluente uma solução

Metanol e hidróxido de amônio (99,5: 0,5V/V). Foi utilizada lâmpada na região UV 254 nm para revelação dos *spots*.

A Figura 36 apresenta as representações das placas de CCD para as amostras de cocaína. Na Figura 37 tem-se as representações das placas de CCD para as amostras de crack. Em todos os *spots* são apresentados os valores dos índices de retenção. Notem que ao compará-los com os valores obtidos nas placas de CCD de padrões anteriormente estudados, apenas em poucos haverá a identificação da cocaína ou de adulterantes. Sendo assim, é necessário o uso de outra técnica para que haja essa identificação. Portanto, foram analisados todos os *spots* por PS.

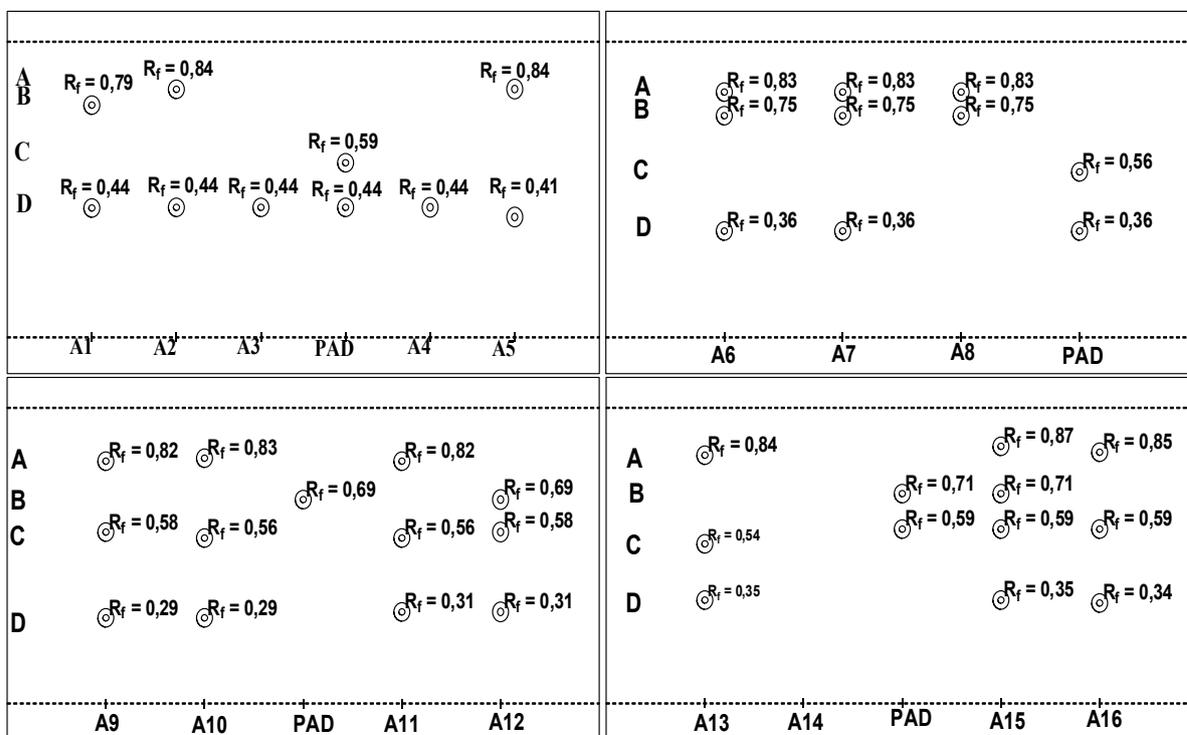


Figura 36. Representação das placas de TLC das amostras apreendidas de cocaína com o método otimizado.

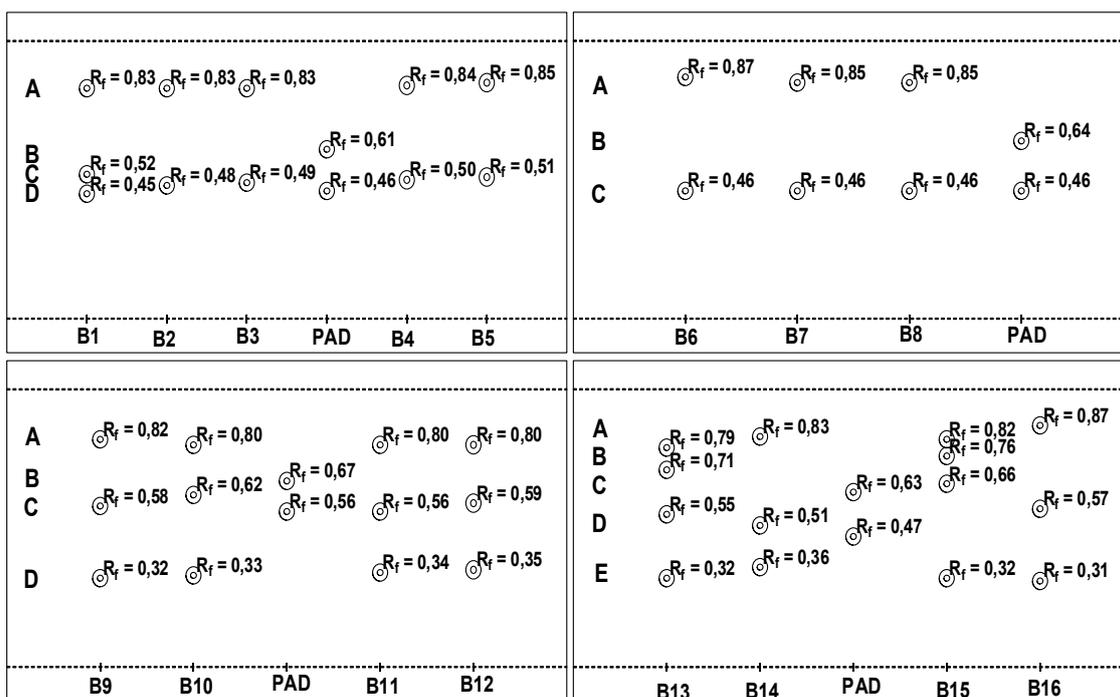


Figura 37. Representação das placas de TLC das amostras apreendidas de crack com o método otimizado.

A Tabela 9 apresenta todos os compostos identificados em cada amostra de cocaína (A) e a Tabela 10 para o crack (B) juntamente com as concentrações encontradas de cada composto detectado. Em nenhuma amostra houve a detecção de benzocaína. Em todas as amostras detectou-se a presença da benzoilecgonina, um metabolito da cocaína. Apenas em quatro amostras não houve a identificação da cocaína (A1, A4, A12 E A16). A fenacetina foi detectada em dez amostras (A5, A10, A15, B1, B4, B5, B6, B7, B12, B14), a cafeína em seis amostras (A1, A9, A11, A12, A15, B1), lidocaína em 5 amostras (A1, A13, A15, B1, B5) e um outro adulterante usado em cocaína, levamisol, também foi detectado em dez amostras (A1, A2, A3, A4, A10, A12, A13, B3, B8, B15).

Tabela 9: Compostos detectados em cada spot da CCD provenientes da análise de cada amostra de cocaína (Ax) apreendida

| X | Benzocaína | Fenacetina | Cafeína | Levamisol | Benzoilecgonina | Lidocaína | Cocaína |
|-----|------------|------------|----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| A1 | | | X (17,2) | X | X | X (0,3) | |
| A2 | | | | X | X | | X (145,5) |
| A3 | | | | X | X | | X (26,1) |
| A4 | | | | X | X | | |
| A5 | | X (1,0) | | | X | | X (25,9) |
| A6 | | | | | X | | X (66,2) |
| A7 | | | | | X | | X (36,0) |
| A8 | | | X (20,4) | | X | | X (24,4) |
| A9 | | | | | X | | X (7,0) |
| A10 | | X (0,6) | | X | X | | X (5,3) |
| A11 | | | X (13,6) | | X | | X (9,0) |
| A12 | | | X (10,4) | X | X | | |
| A13 | | | | X | X | X (0,4) | X (20,7) |
| A14 | | | | | X | | |
| A15 | | X (3,3) | | | X | X (0,4) | X (5,3) |
| A16 | | | X (24,1) | | X | | |

Concentração em mg mL⁻¹

Tabela 10: Compostos detectados em cada spot da CCD provenientes da análise de cada amostra de crack (Bx) apreendida.

| X | Benzocaina | Fenacetina | Cafeína | Levamisol | Benzoilecgonina | Lidocaina | Cocaína |
|-----|------------|------------|----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| B1 | | X (4,2) | X (30,0) | | X | X (0,3) | X (27,8) |
| B2 | | | | | X | | X (39,7) |
| B3 | | | | X | X | | X (43,5) |
| B4 | | X (11,2) | | | X | X (0,4) | X (32,3) |
| B5 | | X (1,8) | | | X | | X (23,9) |
| B6 | | X (2,6) | | | X | | X (23,1) |
| B7 | | X (0,3) | | | X | | X (12,9) |
| B8 | | | | X | X | | X (29,9) |
| B9 | | | | | X | | X (96,7) |
| B10 | | | | | X | | X (124,6) |
| B11 | | | | | X | | X (35,1) |
| B12 | | X (5,1) | | | X | | X (61,6) |
| B13 | | | | | X | | X (92,9) |
| B14 | | X (3,7) | | | X | | X (67,3) |
| B15 | | | | X | X | | X (64,4) |
| B16 | | | | | X | | X (70,5) |

Concentração em mg mL⁻¹

A provável explicação dos compostos identificados por PS-MS não serem detectados por CCD é porque foram identificados mais de um composto em

cada *spot*. Sendo assim, o índice de retenção não terá o mesmo valor do encontrado no padrão e sim uma média dos valores de cada composto.

A quantificação realizada para o crack e para a cocaína foi realizada utilizando as equações das retas obtidas nas curvas analíticas. Na Tabela 11 tem as faixas de concentrações encontrada para a cocaína e adulterantes no pó de cocaína e no crack apreendidos. Note que no pó de cocaína o adulterante encontrado com maior concentração foi a cafeína, isso deve ser devido as propriedades físicas e químicas da substância ser muito semelhante as propriedades da cocaína, porem com menor valor de aquisição e maior facilidade de acesso. Para os demais adulterantes as concentrações encontradas tanto para o crack quanto para a cocaína foram de valores aproximados.

Tabela 11: Faixas de concentrações obtidas nas amostras apreendidas de pó de cocaína e do crack.

| Substância | Pó de cocaína (mg mL⁻¹) | Crack (mg mL⁻¹) |
|-------------------|---|------------------------------------|
| Fenacetina | 0,6 – 3,3 | 0,3 – 11,2 |
| Lidocaína | 0,3 - 0,4 | 0,3 - 0,4 |
| Cocaína | 5,5 - 145,5 | 12,9 – 124,6 |
| Cafeína | 10,4 – 24,1 | 30 |

A quantificação da cocaína é de grande importância e é um desafio para um laboratório de forense. Apesar da existência de metodologias com essa finalidade, a diversidade de adulterantes e diluentes encontrados fazem com que essa quantificação seja dificultada. A grande importância da obtenção da pureza das amostras apreendidas de cocaína e crack, é a possibilidade de obter a origem de produção da droga devido a características semelhantes na produção.

Portanto, a possibilidade de quantificação oferecida pelo acoplamento da TLC ao PS-MS é de grande importância. Por se tratar de um método rápido de análise, com baixo custo e de grande confiabilidade.

3.4. Conclusão

Laboratórios forense tem uma grande demanda de amostras a serem analisadas diariamente, com urgência e com pouca verba para materiais e instrumentos de análises. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas que sejam rápidas, de baixo custo e eficientes para atender essa demanda. O método de TLC por ser rápido e de baixo custo é de grande utilidade para esses laboratórios por conseguir atender essa demanda.

Neste trabalho foi otimizado as condições da TLC a fim de ter a melhor separação da cocaína e adulterantes, nos quais são: volume de amostra: 10 μ L e fase móvel: metanol: hidróxido de amônio (99, 5:0,5 v/v%). Porém, como visto no trabalho sua sensibilidade é baixa e pode gerar resultados duvidosos ou, até mesmo, errados na detecção de cocaína e adulterantes, sendo necessário o uso de outras técnicas para confirmação dos resultados.

O método do PS mostrou ser uma boa alternativa para ser usado como técnica complementar ao TLC, pela simplicidade, baixo custo e rapidez. Consegue detectar a cocaína e os principais adulterantes presentes em cada *spot* da técnica cromatográfica.

Outra vantagem do uso do PS-MS é a possibilidade de quantificação da cocaína e de adulterantes, uma vez que suas curvas analíticas mostraram ser de ótima linearidade e seus limites de quantificação e detecção serem bem inferiores ao encontrados na TLC. Portanto, o uso do PS em laboratório forense é de grande ajuda na obtenção de uma prova judicial correta com rapidez e eficiência.

**Capítulo 4. *Screening* de
benzodiazepínicos em
amostras de sangue por
*Paper Spray Ionization***

4.1. Introdução

Benzodiazepínicos (BZD) são fármacos comumente usados em tratamentos de distúrbios neuropsicológicos, como a ansiedade e depressão, e também no tratamento de dependência química (Soltaninejad *et al.*, 2016). Tornaram-se um dos fármacos de maior número de prescrição. Essa classe é de grande interesse forense, pois é muito comum no uso como “boa noite cinderela”, casos de overdose e de suicídios (EMCDDA, 2018). Exemplos dessa classe são o lorazepam e o diazepam (Figura 38).

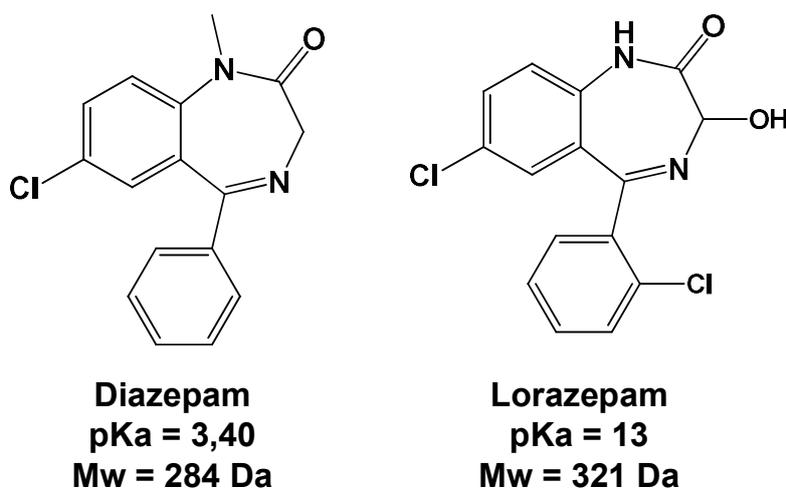


Figura 38. Estruturas Químicas do diazepam e do lorazepam.

Os BZD são fármacos comumente usados em casos de “Boa noite cinderela” e são usadas para dopar as vítimas com intenção de rapto, roubo ou assédio sexual (Lee *et al.*, 2018). Devido sua rápida degradação, a análise toxicológica de amostras coletadas (como sangue, urina, saliva e conteúdo do estômago) de vítimas devem ser feitas em pouco tempo após o uso (LeBeau *et al.*, 1999). Contudo, existem algumas limitações nos laboratórios forenses que dificultam as análises nesse tempo. Por exemplo, esses laboratórios têm poucos equipamentos e recebem grande número de amostras por mês. Atualmente, as técnicas comuns para análise de amostras biológicas em um laboratório de toxicologia são LC (Corona *et al.*, 2018; Moretti *et al.*, 2018) ou GC (Jagtap and Tapadia, 2018; Mercieca *et al.*, 2018) acoplada em diferentes detectores como UV (Chen *et al.*, 2018) e espectrômetro de massas (Corona *et al.*, 2018; Moretti *et al.*, 2018). Essas técnicas precisam de preparo de amostra elaborada e longo tempo de análise (Lee *et al.*, 2011; Negrusz *et al.*, 2000).

Assim sendo, é necessário desenvolver uma técnica analítica rápida e eficiente para essas análises. Um método de triagem rápida para amostras biofluidos poderia dar à polícia um alerta precoce sobre o tipo de droga que foi usado e ajudar os pronto-socorros a estarem preparados para casos de overdose.

Nesse contexto, foram desenvolvidas novas técnicas de ionização e dessorção, conhecidas como espectrometria de massas ambiente, que permite a análise direta de amostras em sua matriz nativa (Alberici *et al.*, 2010). Além do mais, essas técnicas precisam de pouco ou nenhum preparo de amostra. Um dessas técnicas é o *Paper Spray Ionization*, desenvolvido em 2010 por Cooks e colaboradores (Liu, Wang, Manicke, Lin, Cooks, *et al.*, 2010), que consiste na aplicação de alta voltagem no papel umedecido com a amostra (Yang *et al.*, 2012). Após a aplicação da amostra no papel triangular, ele é posicionado na frente do espectrômetro de massas por uma garra de metal e realiza-se a análise (Wang *et al.*, 2010).

Uma limitação do PS-MS é a presença de efeitos de matriz. Sem uma etapa de separação ou extração do analito, a sensibilidade da técnica pode ser diminuída pela recuperação deficiente do analito e pela supressão de íons (Manicke, Bills and Zhang, 2016). Recentemente foram realizados diversos estudos para obter melhor sensibilidade, por exemplo o acoplamento de uma técnica de extração em fase sólida com um cartucho PS-MS (Zhang and Manicke, 2015), a utilização de substrato hidrofóbico realizar a extração do analito (Damon *et al.*, 2016, 2018) e utilizando uma membrana para filtrar o sangue, eliminando a presença das hemácias (Bills and Manicke, 2016).

Outra abordagem envolve a alteração do substrato poroso para otimizar a sensibilidade. Estudos incluíram papel tratado com vários revestimentos (como sílica ou zircônia), comparando diferentes tipos de papel e substratos porosos (Han *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2015, 2016).

Neste estudo, a abordagem usada para aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica, foi de revestir o substrato do PS com um polímero molecularmente impresso (MIP) para criar sítios específicos para detectar analitos de forma rápida e eficiente (Tavares *et al.*, 2018). A membrana de MIP é uma tentativa de recriar locais específicos sintetizados em uma matriz de macromoléculas usando uma molécula modelo, com funcionamento semelhante ao modo de chave-fechadura (Ou *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011).

MIP-PS-MS tem sido usado em outros estudos e apresentou melhores intensidades do que o PS-MS. Tavares e colaboradores, usaram MIP-PS-MS para identificar e quantificar cocaína em fluido oral. A intensidade da cocaína aumentou três vezes quando usaram o MIP-PS-MS em comparação com o PS-MS (Tavares *et al.*, 2018). Pereira e colaboradores aumentaram a intensidade do sinal de agroquímicos em alimentos mais de 3 vezes com o uso de MIP-PS-MS (Pereira *et al.*, 2018). Mendes e colaboradores analisaram os metabólitos dopamina, ácido butírico e sarcosina em urina com o MIP-PS-MS com intensidades pelo menos 4 vezes a mais do que com o uso do PS-MS (Mendes *et al.*, 2017). Entretanto, MIP-PS-MS, não foi usado em análise de BZD em biofluidos de vítima de roubo e assédio sexual. Sendo assim, nós reportamos o uso do MIP-PS-MS para análise toxicológica em sangue de supostas vítimas de BZD.

4.1.1. Validação analítica

A validação de métodos analíticos é feita para averiguar a aptidão do método para o uso pretendido e certificar a confiabilidade dos dados produzidos.

De acordo com o Professor Fernando Lanças “Validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa a diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado” (Lanças, 2004). No Brasil, o órgão público responsável pela regulamentação dos parâmetros essenciais a serem avaliados para bioensaios é a ANVISA. O documento oficial atual com esses parâmetros é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 25 de julho de 2017 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017).

Os parâmetros regulamentados nessa RDC que serão estudados nesse trabalho são: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e recuperação.

4.1.1.1. Linearidade.

Linearidade é a capacidade da metodologia analítica demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na

amostra, dentro de um intervalo específico (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003).

Para obter-se a linearidade é necessário construir-se uma curva analítica com o eixo x sendo a concentração e o eixo y a resposta. Deverá haver no mínimo seis pontos na curva analítica, realizados com, no mínimo, 3 replicatas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003; LEITE, 2008). As concentrações usadas para construir essa curva analítica deverão ser escolhidas de acordo com as concentrações esperadas durante o estudo realizado. Com os resultados em um gráfico, calcula-se a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação (R^2).

A equação da regressão linear é definida pela equação 2, onde “x” é uma variável independente, “y” variável dependente, “a” o coeficiente angular e “b” o coeficiente linear.

$$Y=ax+b$$

Equação 2: Equação da regressão linear.

Com essa equação, é possível calcular o coeficiente de correlação. É esse parâmetro que expressa a linearidade da técnica. Para isso é calculado o coeficiente de correlação de Pearson (R) e elevado ao quadrado (Equação 3). Quanto mais próximo de 1 for o R^2 , mais linear é sua curva analítica. De acordo com a RDC 166, o critério aceitável para esse parâmetro é de $R^2 = 0,99$ (LEITE, 2008).

$$R^2 = \left(\frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{\sqrt{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2} \cdot \sqrt{n \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2}} \right)^2$$

Equação 3: Equação do coeficiente de correlação R^2 .

4.1.1.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LOD) de um método é a concentração mínima que o analito de interesse pode ser detectado, porém, esse limite pode não ser quantificado. E o limite de quantificação (LOQ) de um método é a concentração

mínima que o analito de interesse pode ser quantificado, com exatidão e precisão (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003).

Experimentalmente, determina-se o LOD pela menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança (Lanças, 2004). Para métodos instrumentais, pode-se estimar o LOD com base na relação de 3 vezes a relação sinal/ruído (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). Já o LOQ é estimado por análises com valores decrescentes de concentrações até o menor valor determinável com precisão e exatidão aceitáveis onde se tenha uma relação sinal/ruído superior ou igual a 10. Entretanto, também pode-se utilizar Equação 4 para calcular esses dois parâmetros.

$$\text{LOD ou LOQ} = \frac{DP_a \cdot K}{a}$$

Equação 4. Equação do Limite de detecção, onde “DPa” é o desvio padrão do branco, “K” é um número fatorial escolhido como grau de confiança (aceita-se 3 para LOQ e 10 para LOD) e “a” o coeficiente angular da curva analítica.

4.1.1.3. Precisão

Precisão é avaliar a proximidade dos resultados em diferentes experimentos de uma mesma amostra e é considerada em três níveis (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003). A precisão pode ser expressa como precisão intra dia ou inter dias. A precisão intra dia ou repetibilidade do método é avaliada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). A precisão inter dias ou intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A precisão é calculada de acordo com a Equação 5 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017).

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \cdot 100$$

Equação 5. Equação da precisão do método, onde “DP” é o desvio padrão e “CMD” é a concentração média determinada experimentalmente.

4.1.1.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida pelas proximidades dos resultados em relação ao valor de concentração verdadeira (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003). Geralmente, pode-se calcular de duas formas a exatidão: a) a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado a amostras e b) utilizando a diferença porcentual entre as médias dos resultados e o valor verdadeiro.

Para realizar tal experimento, é necessário, no mínimo, de nove determinações, contemplando três concentrações, uma baixa, uma média e uma alta, com três réplicas cada. A exatidão é calculada pela equação 6, que é expressa pela relação entre a concentração média determinada e a concentração teórica (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003).

$$E (\%) = \frac{CMD - CN}{CN} \cdot 100$$

Equação 6: Equação da exatidão do método, onde CMD é a concentração média experimental e CN a concentração nominal da amostra.

4.1.1.5. Recuperação

A recuperação do método mensura a eficiência do procedimento de extração do método analítico dentro de um limite de variação (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003). Calcula-se esse parâmetro com a adição de soluções de padrão analítico de interesse em concentrações conhecida à matriz de estudo. Após isso, realiza-se procedimentos de recuperação do analito (por exemplo, extração líquido-líquido) e determina-se a concentração do analito extraído. Após isso, utiliza-se a equação 7 para determinação da recuperação (Alshali *et al.*, 2015).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{CE}{CN}$$

Equação 7: Equação para o cálculo da recuperação, onde " CE" é a concentração experimental e CN a concentração nominal.

4.2. Metodologia.

4.2.1. Padrões, reagentes e solventes.

Os seguintes solventes e reagentes foram usados nesse trabalho: metanol, acetonitrila, grau HPLC adquiridos da Tédia (Ohio, USA), benzofenona adquirido por Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro), ácido metacrilato, etileno dimetacrilato e ácido fórmico foram adquiridos por Sigma Aldrich (Germany), acetona P.A. adquirido por Scharlau (Sentmenat, Espanha). Também foram utilizadas membranas de celulose regenerada (diâmetro 47 mm e 0.45 µm de tamanho do poro), adquiridas por Unifil (Carvalhaes, Rio Grande Do Sul, Brasil)

Os padrões analíticos de benzodiazepínicos (diazepam, lorazepam, hidroximidazolam, e 7-aminoclonazepam) e os padrões das drogas de abuso de outras classes (cocaína, LSD e metilenodioximetanfetamina (MDMA)) usados para otimização do método, foram gentilmente fornecidos pela Polícia Técnico Científica do Estado de Goiás, assim como, as amostras de sangue branco e amostras reais de vítimas de BZD.

4.2.2. Preparo da amostra de sangue

Para o preparo da amostra de sangue, foi realizada extração líquido-líquido do analito com acetato de etila. Primeiro, para otimização da metodologia de extração, foi realizado um planejamento fatorial 3³, com quantidade de acetato de etila e amostra, tempo no vortex e tempo na centrifuga como variáveis. Após esse procedimento, foi utilizada a melhor condição para preparo da amostra de sangue, concentração: 30:70 (v/v), um minuto no vortex e centrifugado por 10 minutos (Figura 39). Após isso a amostra foi colocada na membrana e analisada por MIP-PS-MS.



Figura 39: esquema da extração do analito do sangue realizada como preparo de amostra.

4.2.3. MIP-PS-MS e MIP-PS-MS / MS

O espectrômetro de massas usado para os experimentos de MIP-PS-MS foi o LCQ Fleet (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha). Os experimentos foram realizados no modo positivo, com temperatura do capilar de 275 °C, voltagem do spray de 4 KV, voltagem do capilar de 10 V e a voltagem da lente (*Tube lens*) de 50 V. O modo de operação foi MS e MS/MS.

4.2.4. Síntese da membrana de MIP e NIP

As membranas de MIP foram sintetizadas por adaptação do método apresentado por Hande e colaboradores (Figura 40). Membranas de celulose com diâmetros de 47 mm e 0,45 µm de tamanho do poro, foram lavadas por 4 horas em sistema de Soxhlet com 400 mL de metanol. Após a secagem em temperatura ambiente, as membranas foram submergidas por 5 minutos em solução de benzofenona 0,15 mmol/L em acetona. Após esse tempo, novamente secam-se as membranas em temperatura ambiente. Então, as membranas são submergidas em solução aquosa contendo: 50 mmol/L de ácido metacrilato, 150 mmol/L de etileno dimetacrilato e 10 mmol/L de diazepam. Então, as membranas em solução são colocadas em luz UV e deixada por 20 minutos em comprimento de onda 254 nm.

As membranas mais uma vez são deixadas secar em temperatura ambiente. E, finalmente, as membranas são lavadas em sistema de Soxhlet com 400 mL de água deionizada por 4 horas, para remoção do *template* e deixado secar em temperatura ambiente.

As membranas de polímero não impresso (NIP) foram feitas de maneira similar as membranas de MIP, porém não se adicionou diazepam em sua síntese e também, não precisou da última etapa de lavagem.

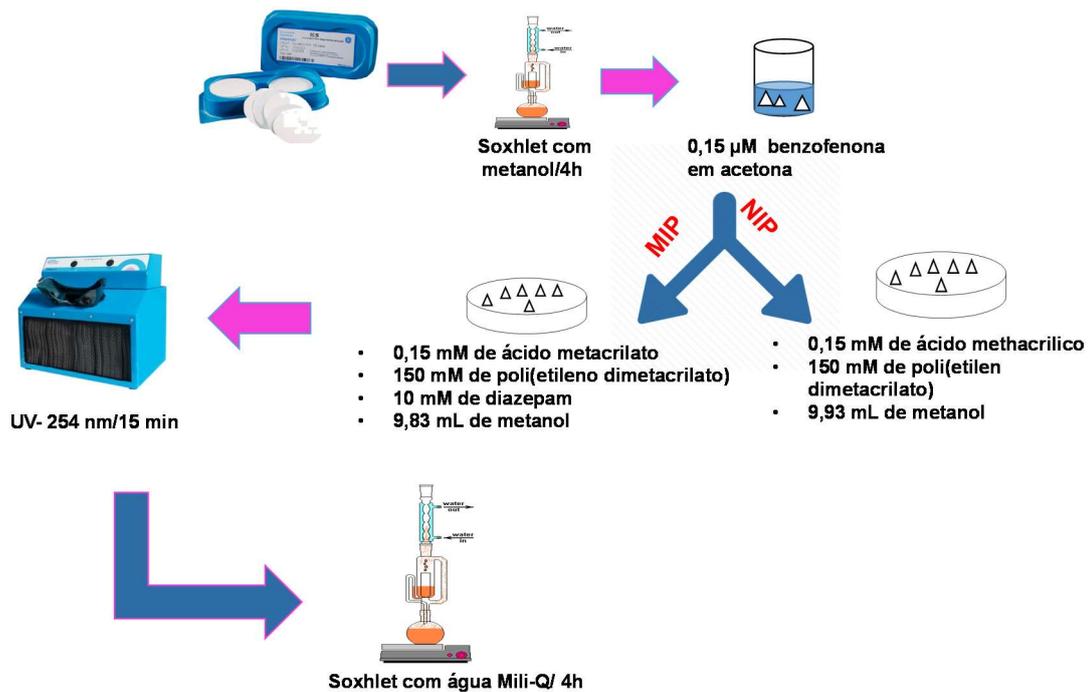


Figura 40: Esquema da síntese da membrana de MIP e do NIP na membrana de celulose. Como primeira etapa tem-se a lavagem da membrana seguida por sua preparação com benzofenona. Após isso é realizado a síntese da membrana MIP e do NIP e a aplicação da radiação para formação do polímero. Por fim é a membrana modificada é lavada para remoção do *template*.

4.2.5. Validação analítica

No presente trabalho a validação analítica dos métodos propostos foi realizada segundo a normativa estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em resolução RDC nº 166 de 25 de julho de 2017 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). Neste sentido foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limite de quantificação e repetitividade.

4.2.5.1. Linearidade

Para o estudo de linearidade foram construídas curvas analíticas do diazepam e do lorazepam utilizando amostra de sangue enriquecidas nas concentrações de 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 ppb, nas quais foram adicionadas 400 ppb de padrão interno (lorazepam para a curva do diazepam e diazepam para a curva do lorazepam). Essa solução foi submetida a uma

extração líquida-líquida com acetonitrila (70:30 v/v). Cada um dos pontos foi avaliado em triplicatas (n=3).

O eixo “x” da curva é dado pela concentração da solução e o eixo “y” é dado pela razão da intensidade do fragmento principal do analito pelo fragmento principal do padrão interno. Ou seja, para a curva analítica do diazepam, utiliza-se a razão da intensidade do pico de m/z 257 pela intensidade do pico de m/z 321. E o contrário para o lorazepam. Após isso, foi realizada a regressão linear para obter a equação da reta e o valor do coeficiente de correlação.

4.2.5.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Para a realização dos cálculos do LOD e do LOQ, foram feitas 10 análises do branco, ou seja, papel, sangue com o padrão interno e ácido fórmico 0,1% em metanol. Os valores da razão Analito/padrão interno provenientes do espectro de MIP-PS (+) -MS do branco são usados na equação 4 descrita na seção introdução desse capítulo.

4.2.5.3. Precisão, exatidão e recuperação

Para o cálculo da exatidão, precisão intra e interdias e recuperação foram utilizadas as Equações 5, 6 e 7 descritas na seção introdução deste capítulo. Para isso determinou como descrito pela ANVISA, pelas curvas analíticas utilizando ensaios em quintuplicata das soluções das amostras a 10; 200 e 1000 ng mL⁻¹(Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Performance do MIP-PS-MS

PS é um método muito utilizado, porem quando aplicado em análise de misturas complexas, pode possuir baixa sensibilidade, seletividade e apresentar efeitos de supressão iônica. Uma estratégia para aumentar a seletividade do PS, é recobrir o papel com um Polímero Molecularmente Impresso. A membrana MIPs são sintetizados na presença de uma molécula *template* e ao ser removido cria sítios seletivos para extração de analitos alvo em matrizes complexas.

Para comprovar a eliminação do *template* durante a limpeza e, assim, não contaminar a amostra com o diazepam usado durante a síntese da membrana de MIP, fez-se a análise do branco apenas com o solvente pulverizante, a acetonitrila. A Figura 41 apresenta o espectro de MIP-PS-MS do branco da membrana. Notem que não apresenta os picos de *m/z* atribuído ao diazepam, íon protonado, $[M + H]^+$ *m/z* 285, íon sodiado, $[M + Na]^+$ *m/z* 307, e íon potássiado, $[M + K]^+$ *m/z* 323.

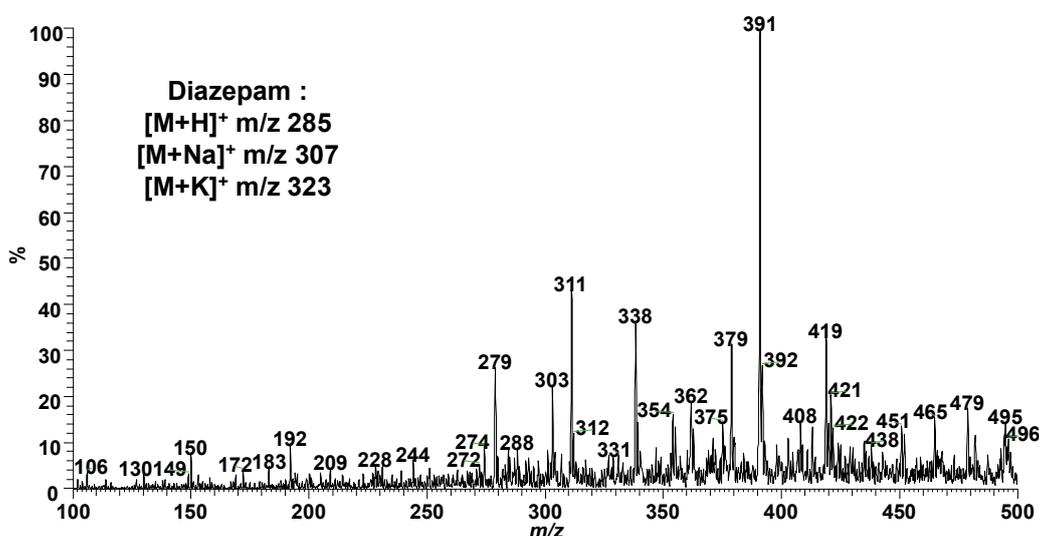


Figura 41. Espectro MIP-PS (+)-MS do branco da membrana com o solvente (acetonitrila), para comprovar a eliminação do *template* durante a limpeza da membrana.

A capacidade extratora da membrana de MIP foi avaliada comparando as intensidades do diazepam analisado com a membrana de MIP e o papel usualmente usando no PS-MS como substratos. A Figura 42-A, apresenta o

espectro de PS-MS da amostra de sangue com diazepam, $[M + H]^+$, m/z 285, e a Figura 42-B o espectro de MIP-PS-MS. Note que o sinal do analito é maior na análise utilizando como substrato a membrana de MIP do que quando se analisa como substrato o papel.

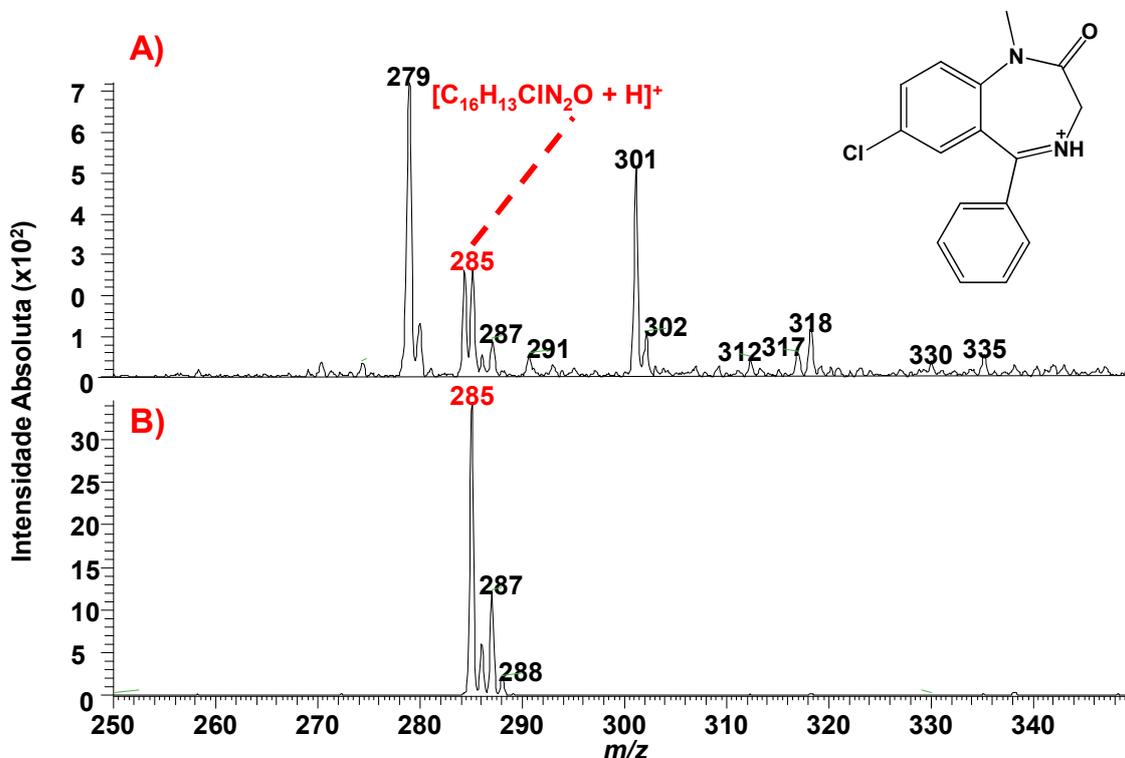


Figura 42. Espectro de PS-(+)MS (a) e MIP-PS-(+)-MS (b) da amostra de sangue dopada com diazepam, $[M + H]^+$, m/z 285.

Para confirmar a atribuição do diazepam ao pico de m/z 285, foi realizada análise de espectrometria de massas tandem (Figura 43). A fragmentação do diazepam é feita em duas partes, a primeira pela perda do CO seguida pela perda do Cl, obtendo os picos m/z 257 e 222, e a segunda pela perda de C_7H_8 gerando o pico m/z 193. Esse resultado corrobora com o citado por De Nucci e colaboradores (Cavedal *et al.*, 2007), sendo assim, é possível atribuir o pico de m/z 285 ao ion protonado do diazepam e pode ser visto na Figura 43.

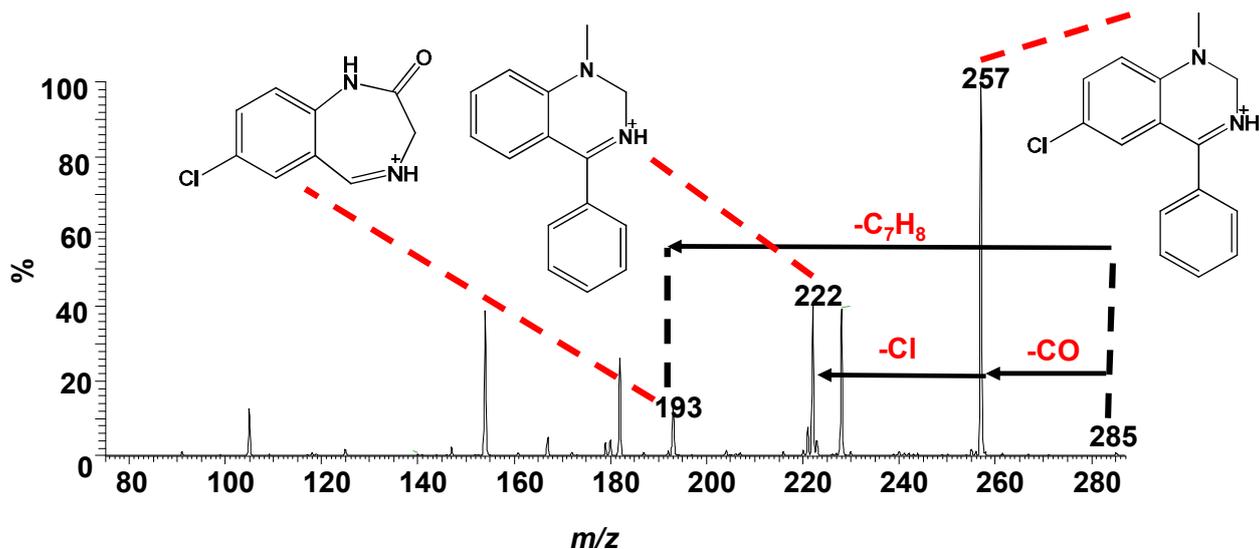


Figura 43. MIP-PS-MS/MS da amostra de sangue com diazepam, $[M + H]^+$, m/z 285.

4.3.2. Seletividade da membrana do MIP

Para avaliar a seletividade da membrana de MIP, foi analisado cocaína, LSD, DOB, MDMA por MIP-PS-MS e NIP-PS-MS, esses compostos são possíveis interferentes em amostras reais de sangue provenientes de vítimas de BZD. Além disso, benzodiazepínicos (diazepam, lorazepam, 7-aminoclonazepam e hidroximidazolam) também foram analisados, para mostrar que qualquer composto dessa classe pode ser eficientemente analisado por MIP-PS-MS.

As amostras foram preparadas na concentração de 1000 ng mL^{-1} em sangue. E para esse experimento, utilizou-se o fragmento de maior intensidade em espectros de massas tandem. Os fragmentos para cada um dos compostos analisados estão apresentados na tabelados abaixo.

Tabela 12 Condição de MS/MS para o LCQ Fleet.

| Compostos | [M+H]⁺ | Fragmento |
|-------------------|--------------------------|------------------|
| Diazepam | 285 | 257 |
| Lorazepam | 321 | 303 |
| 7-aminoclonazepam | 286 | 250 |
| Hidroximidazolam | 342 | 324 |
| Cocaína | 304 | 182 |
| LSD | 324 | 223 |
| MDMA | 194 | 163 |

A Figura 44 apresenta os resultados da seletividade. Notem que para as amostras com cocaína, DOB, LSD e MDMA, as intensidades são muito similares para as membranas de NIP e o MIP. Para as análises dos benzodiazepínicos, as amostras com a membrana de MIP, apresentam respostas superiores do que comparadas com as membranas de NIP. Também, é possível observar que as intensidades dos benzodiazepínicos com as membranas de MIP são muito melhores do que os resultados das outras classes de drogas de abuso. Esse fato mostra que a membrana de MIP é seletiva para a classe de benzodiazepínicos, isto é, em uma amostra complexa, como o sangue, com diferentes tipos de drogas de abuso, apenas as drogas dessa classe serão levadas ao espectrômetro de massas.

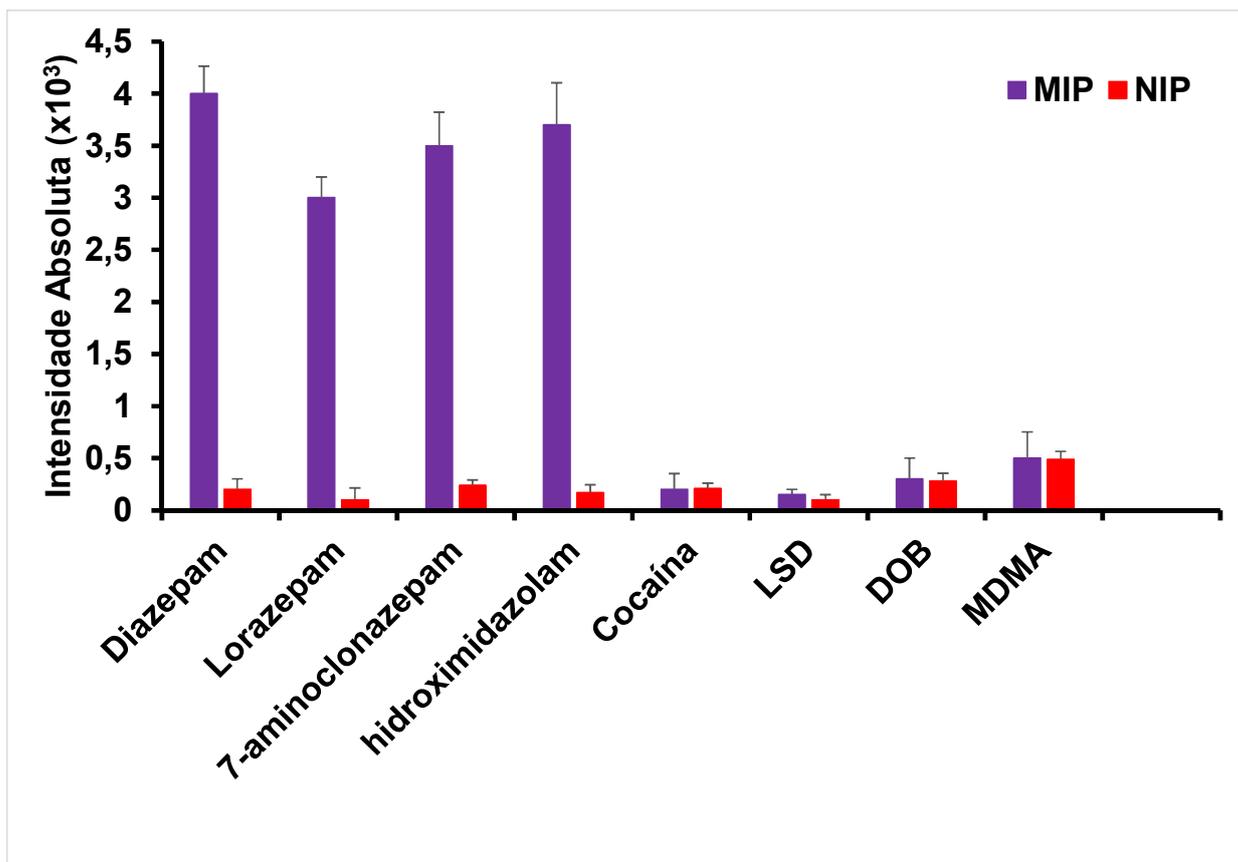


Figura 44: Gráfico de barra dos sinais de intensidades do extrato de sangue (1000 ng mL⁻¹) usando as membranas de MIP e NIP para os benzodiazepínicos (diazepam, lorazepam, 7-aminoclonazepam, hydroximidazolam, cocaína, LSD, DOB e MDMA).

4.3.3. Quantificação do diazepam e do Lorazepam com o MIP-PS-MS

4.3.3.1. Linearidade

A linearidade é a representação de que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em um intervalo específico. Para obter tal figura de mérito, são necessárias a construção de curvas analíticas onde o eixo “x” é a concentração do analito na amostra e o eixo “y” suas respectivos resultados. Após essa etapa, é feita a regressão linear para obter-se a equação da reta que representa os resultados e o coeficiente de correlação. Para verificar a linearidade, é necessário observar o coeficiente de correlação (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). Quanto mais perto for o valor de 1, maior a linearidade do método.

A Figura 45 apresenta as curvas analíticas do diazepam e do lorazepam, com suas respectivas equações provenientes da regressão linear e os coeficientes de correlação. Para as construções dessas curvas analíticas foi utilizado como eixo y a razão entre o fragmento principal do analito e o fragmento principal do padrão interno, sendo que para o diazepam, o lorazepam foi usado como padrão interno, e para o lorazepam, o diazepam que foi o padrão interno. Notem que tanto para o diazepam (0,9968), quanto para o lorazepam (0,9973), os coeficientes de correlação demonstram boa linearidade por estarem próximos ao valor 1, e que estão dentro dos critérios supervisionados pela RDC n°166 da ANVISA, cujo o valor deverá ser maior do que 0,99 (BRASIL, 2017).

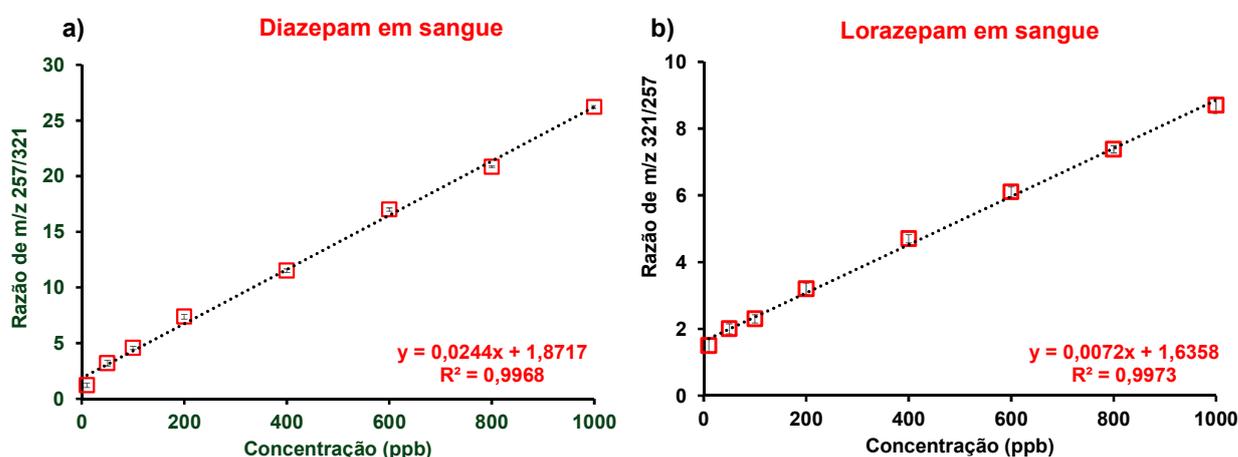


Figura 45: Análise quantitativa do sangue com diazepam e seu padrão interno Lorazepam (400 ng mL^{-1}) (a) e do lorazepam com seu padrão interno diazepam (400 ng mL^{-1}) (b)

4.3.3.2. Limite de detecção e Limite de Quantificação

O LOD é o menor valor que o método pode detectar e o LOQ o menor valor que o método pode quantificar. Esses valores são de grande importância para demonstrar a sensibilidade do método e a possibilidade do método de detectar baixas concentrações do analito em uma matriz complexa. Para o cálculo do LOD e do LOQ utilizou a Equação 4. A Tabela 12 apresenta os valores de LOD e LOQ para o diazepam e para o lorazepam. Note-se que os valores são

de baixa concentrações e, com isso, pode-se dizer que o método é de alta sensibilidade.

Esses valores também estão muito abaixo do encontrado na literatura, por exemplo, Kala e colaboradores, calcularam para o diazepam, o valor de LOD de 300 ng mL⁻¹ e LOQ de 400 ng mL⁻¹ usando LC-MS. Já para o lorazepam, os valores de LOD 5000 ng mL⁻¹ e LOQ de 8000 ng mL⁻¹ (Adamowicz and Kala, 2010). Já Maravelias e colaboradores, usaram o GC-MS para analisar benzodiazepínicos e encontraram LOD de 38,59 ng mL⁻¹ e LOQ 116,90 ng mL⁻¹ para o diazepam e LOD 3,89 ng mL⁻¹ e 11,80 ng mL⁻¹ (Papoutsis *et al.*, 2010) Essa comparação mostra a eficiência do método para amostras com concentrações traços que outros métodos não conseguem detectar.

Tabela 13: Limites de detecção e quantificação para o diazepam e lorazepam

| | Técnica | LOD (ng mL ⁻¹) | LOQ (ng mL ⁻¹) |
|------------------|-----------|----------------------------|----------------------------|
| Diazepam | MIP-PS-MS | 1,02 | 3,40 |
| | LC-MS | 300,00 | 400,00 |
| | EI-GC-MS | 38,59 | 116,90 |
| Lorazepam | MIP-PS-MS | 1,75 | 5,83 |
| | LC-MS | 5000,00 | 8000,00 |
| | EI-GC-MS | 3,89 | 11,80 |

4.3.4. Precisão, exatidão e recuperação

Outras figuras de mérito que podem ser calculadas para validação do método são a precisão, exatidão e a recuperação. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados em diferentes experimentos de uma mesma amostra. A exatidão é a proximidade dos resultados com o valor exato da amostra. E a recuperação mensura a eficiência do procedimento de extração do analito pelo método analítico dentro de um limite de variação.

Essas três figuras de mérito são realizadas em três níveis, ou seja, em três concentrações diferentes, uma baixa, uma média e uma alta. Para o estudo desses parâmetros para o diazepam e lorazepam, foi utilizado 10 ng mL⁻¹ como o nível baixo, 200 ng mL⁻¹ como o nível médio e 1000 ng mL⁻¹ como o nível alto.

E para o cálculo, foi utilizada a equação 5 para precisão, equação 6 para a exatidão e 7 para a recuperação.

A Tabela 13 apresenta os valores de precisão exatidão e recuperação para o diazepam, e a Tabela 14 para o lorazepam. A RDC n° 166 da ANVISA, tem como critério que os valores adequados para exatidão e precisão são abaixo de 15%, e os desejáveis para recuperação são próximos a 100%, porém também são aceitáveis entre 80% e 120% (BRASIL, 2017). Sendo assim, todos os valores calculados para o método estão dentro do desejável pela ANVISA, afirmando que o mesmo é preciso, exato e com alto rendimento de recuperação.

Tabela 14. Exatidão, precisão e recuperação para a análise de MIP-PS-MS do diazepam em sangue

| Concentração (ppb) | Exatidão (%) | Precisão | | Recuperação (%) |
|--------------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|
| | | Intradias (%) | Interdias (%) | |
| 10 | 7,78 | 7,51 | 11,11 | 107,78 |
| 200 | 0,80 | 8,10 | 5,68 | 100,78 |
| 1000 | 1,02 | 2,07 | 1,16 | 101,02 |

Tabela 15: Exatidão, precisão e recuperação para a análise de MIP-PS-MS do lorazepam.

| Concentração (ppb) | Exatidão (%) | Precisão | | Recuperação (%) |
|--------------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|
| | | Intradias (%) | Interdias (%) | |
| 10 | 8,20 | 6,05 | 10,22 | 100,10 |
| 200 | 1,01 | 10,40 | 4,30 | 98,10 |
| 1000 | 1,80 | 1,02 | 2,39 | 99,09 |

4.3.5. Aplicação do método desenvolvido de MIP-PS-MS em amostras reais de vítimas de BZD.

O método desenvolvido foi aplicado em amostras reais de possíveis vítimas de assédio sexual. Esse experimento foi realizado para mostrar que é possível a utilização desse método na rotina de um laboratório de química forense. Foram estudados dois casos que deram positivos para BZD nos experimentos de triagem. Também foi comparado o resultado do MIP-PS-MS com o PS-MS

para demonstrar que o papel modificado com a membrana de MIP tem melhores resultados do que sem a modificação.

A Figura 46 apresenta os espectros de MIP-PS-MS, PS-MS e MIP-PS-MS/MS do primeiro caso estudado. Nesse estudo foi identificado o íon protonado do fármaco midazolam, $[M + H]^+$, m/z 326. Para confirmação dessa atribuição foi feita a espectrometria de massas tandem desse pico (Figura 46-c), Sennbro e colaboradores citam que a fragmentação característica dessa molécula é a perda de Cl, gerando o pico de m/z 291 (Svanström *et al.*, 2012). Notem que o espectro de MIP-PS-MS/MS tem essa perda característica, demonstrando que a atribuição do pico de m/z 326 foi realizada corretamente. Também foi comparada a análise feita por MIP-PS-MS (Figura 46-a) com a feita por PS-MS (Figura 46-b). O midazolam apresenta maior intensidade abundante no método desenvolvido do que no método tradicional, mostrando que a seletividade introduzida por MIP-PS-MS é de grande importância para *screening* de amostras de sangue de possíveis vítimas BZD.

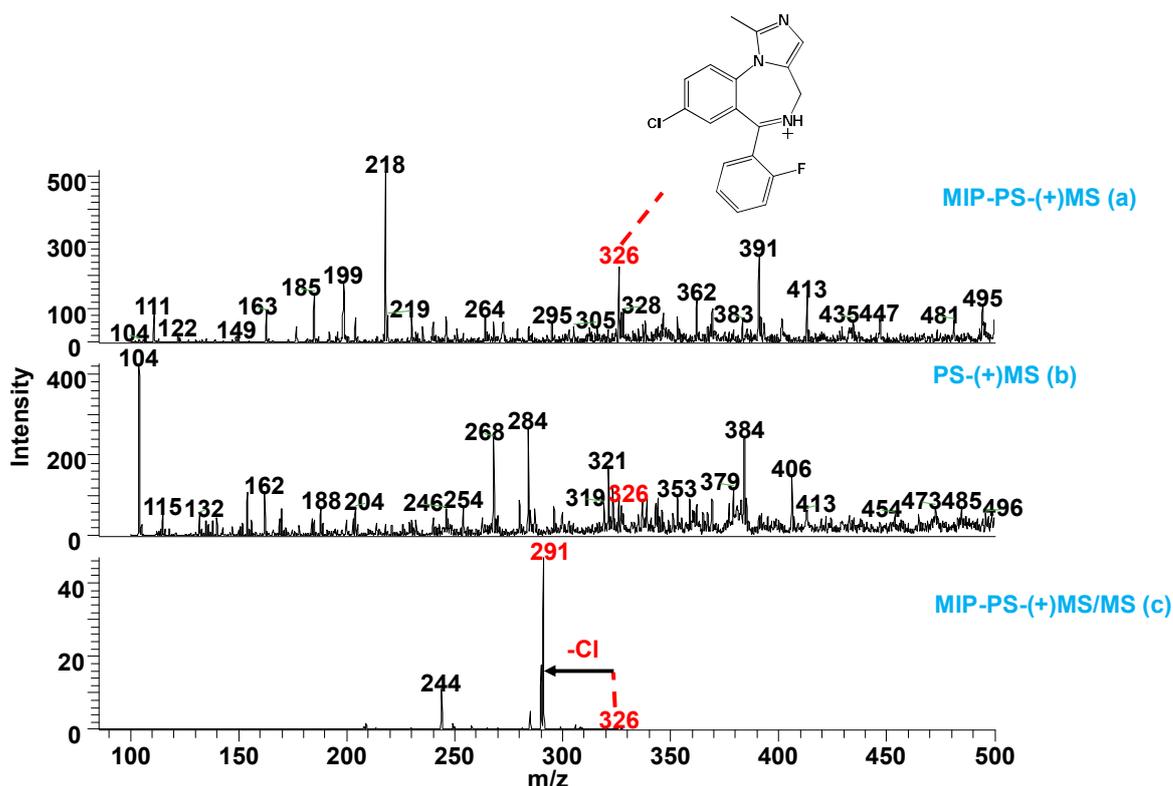


Figura 46. MIP-PS (+) -MS (a), PS (+) -MS (b) e MIP-PS (+) -MS/MS (c) de amostra de sangue de possível vítima de assédio sexual.

A Figura 47 apresenta os espectros de MIP-PS-MS, PS-MS e MIP-PS-MS/MS do segundo caso estudado. Nesse estudo foi identificado o íon protonado do fármaco diazepam, $[M+H]^+$, m/z 285. Para confirmação dessa atribuição foi feita a espectrometria de massas tandem desse pico (Figura 47-c), como já citado anteriormente, De Nucci e seus colaboradores, a fragmentação do diazepam é feita em duas partes, a primeira pela perda do CO seguida pela perda do Cl, obtendo os picos m/z 257 e 222 (Cavedal *et al.*, 2007), e a segunda pela perda de C_7H_8 gerando o pico m/z 193, sendo assim a atribuição nessa amostra também está correta. Também se comparou a análise feita por MIP-PS-MS (Figura 47-a) com a feita por PS-MS (Figura 47-b). O diazepam apresenta maior intensidade abundante no método desenvolvido do que no método tradicional, mostrando que a seletividade introduzida por MIP-PS-MS é de grande importância para *screening* de amostras de sangue de possíveis vítimas BZD.

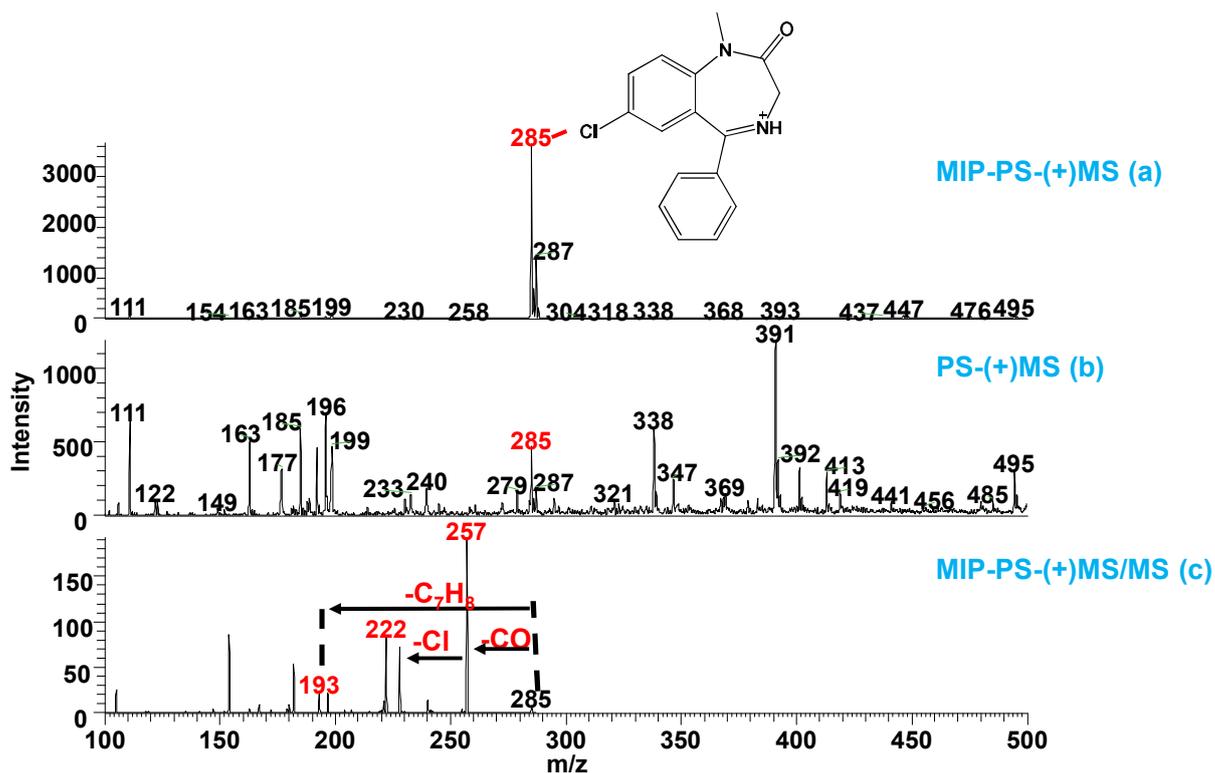


Figura 47 MIP-PS (+) -MS (a), PS (+) -MS (b) e MIP-PS (+) -MS/MS (c) de amostra de sangue de possível vítima de assédio sexual.

Na rotina de um laboratório de perícia é recebido diversas amostras de supostas vítimas de “boa noite cinderela”. Após o recebimento é necessário

analisar as amostras e averiguar se realmente ocorreu o crime, qual substância foi usada e obter um laudo sobre o ocorrido.

Para esses casos, já há análises de triagem e confirmatórias consolidadas, entretanto, essas análises podem gerar falsos positivos ou necessitam de preparo de amostra e tempo de análise. Sendo assim, o PS-MS mostrou ser um método de grande potencial para utilização nesse cenário, tendo grande eficiência, baixo custo e análise rápida.

4.4. Conclusão

A síntese da membrana de MIP na superfície da membrana também foi realizada com sucesso, deixando a análise seletiva para a classe de moléculas benzodiazepínicos. Isso é corroborado na realização de análises utilizando-se a membrana de MIP com outras classes de drogas de abuso e com análises com o NIP, onde, essas análises apresentam valores muito menores do que as analisadas com benzodiazepínicos por MIP-PS-MS.

Segundo os parâmetros da validação analítica, os métodos propostos são adequados, pois seus valores de precisão, exatidão e recuperação estão dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA. Além disso, os métodos apresentam uma ampla faixa de linearidade e valores de R^2 , LOD e LOQ adequados. Além da simplicidade, baixo custo, baixo consumo de solvente, rapidez e eficiência.

O método apresenta excelente aplicabilidade para fins de análise forense, pois esses laboratórios trabalham com amostras complexas que contém muitos compostos que podem suprimir os analitos, principalmente se estes estão em baixas concentrações.

Capítulo 5.

Conclusão Geral

5.1. Conclusão Geral.

Os resultados apresentados neste trabalho contribuíram para obtenção de um método de PS-MS de grande potencialidade para análises na área de química forense, sendo rápido e com baixo custo. Essa técnica mostrou ser apta para suprir parte da grande demanda que um laboratório de química forense tem, com eficiência, sem possibilidade de falsos positivos e com facilidade no manuseio da análise.

No primeiro capítulo, a técnica PS demonstrou ser um método rápido, eficiente e confiável para a detecção de drogas sintéticas em selos de papéis, podendo então, substituir técnicas convencionais que possam gerar falsos positivos, precisem de preparação de amostras, apresentem alto custo e longo tempo de análise. Para isso cortamos o selo com drogas sintéticas em formato triangular e analisamos diretamente com o PS. Para a confirmação da detecção dos compostos identificados foi realizado o experimento de espectrometria de massas tandem. Em todas as drogas sintéticas obteve-se a fragmentação esperada das moléculas corroborando com a literatura e confirmando a identificação dos analitos, mostrando a aptidão da técnica para a análise proposta.

No segundo capítulo, o método do PS mostrou ser boa alternativa na utilização como técnica complementar ao TLC, pela simplicidade, baixo custo e rapidez. Foi possível a detecção da cocaína e dos principais adulterantes (benzococaína, $[M+H]^+$ m/z 166, cafeína, $[M+H]^+$ m/z 195, lidocaína, $[M+H]^+$ m/z 235, fenacetina, $[M+H]^+$ m/z 180 e $[M+Na]^+$ m/z 202 e cocaína, $[M+H]^+$ m/z 304) presentes em cada *spot* da técnica cromatográfica. Outra vantagem do uso do PS-MS é a possibilidade de quantificação da cocaína e de adulterantes, uma vez que suas curvas de calibração mostraram ser de ótima linearidade e seus limites de detecção serem bem inferiores aos encontrados na TLC.

No terceiro capítulo o método MIP-PS-MS mostrou ser eficiente para análises toxicológicas em biofluidos de vítimas de BZD. A membrana coberta com MIP demonstrou aumento na seletividade para a identificação de benzodiazepínicos, como o diazepam, $[M+H]^+$, m/z 285, lorazepam, $[M+H]^+$, m/z 321, e midazolam, $[M+H]^+$, m/z 326, em uma as matrizes mais complexas como é o sangue.

Portanto, o uso do PS em laboratórios de perícia é de grande ajuda na obtenção de provas judiciais corretas, rápidas e eficientes, podendo substituir as técnicas usadas, eliminando os resultados falso-positivos, diminuindo o tempo de análise e aumentando a quantidade de análises feitas por dia, agilizando o processo jurídico dependente dessas análises.

Capítulo 6. Referências bibliográficas.

6.1. Referências Bibliográficas.

ADAMOWICZ, P.; KAŁA, M. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 198, n. 1–3, p. 39–45, 2010.

ADAMOWICZ, P.; TOKARCZYK, B. Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 7, p. 652–667, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. **BRASIL. RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 3 sep. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. **BRASIL. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 3 oct. 2018.

AHMADI, M.; MOEIN, M. M.; MADRAKIAN, T.; AFHAMI, A.; BAHAR, S.; ABDEL-REHIM, M. Reduced graphene oxide as an efficient sorbent in microextraction by packed sorbent: Determination of local anesthetics in human plasma and saliva samples utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1095, n. July, p. 177–182, 2018.

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B.; EBERLIN, M. N. Ambient mass spectrometry: Bringing MS into the “real world.” **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265–294, 2010.

ALSHALI, R. Z.; SALIM, N. A.; SATTERTHWAITTE, J. D.; SILIKASA, N. Long-term sorption and solubility of bulk-fill and conventional resin-composites in water and artificial saliva. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 12, p. 1511–1518, 2015.

ARNAUD, C. Making Diagnostics Affordable: Nonprofits and academics work toward tests that meet the needs of the developing world. **Science & Technology**, v. 87, n. 11, p. 50–53, 2009.

BERKOV, S.; BASTIDA, J.; NIKOLOVA, M.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 5, p. 411–419, 2008.

BILLS, B. J.; MANICKE, N. E. Development of a prototype blood fractionation

cartridge for plasma analysis by paper spray mass spectrometry. **Clinical Mass Spectrometry**, v. 2, p. 18–24, 2016.

BOTELHO, E. D.; CUNHA, R. B.; CAMPOS, A. F. C.; MALDANER, A. O. Chemical profiling of cocaine seized by Brazilian federal police in 2009-2012: Major components. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 4, p. 611–618, 2014.

BULCÃO, R.; GARCIA, S. C.; LIMBERGER, R. P.; BAIERLE, M.; ARBO, M. D.; CHASIN, A. A.; THIESEN, F. V.; TAVARES, R. Designer drugs: Aspectos analíticos e biológicos. **Quimica Nova**, v. 35, n. 1, p. 149–158, 2012.

CAVEDAL, L.E.; MENDES, F.D.; DOMINGUES, C.C.; PATNI, A.K.; MONIF, T.; REYAR, S.; PEREIRA, A.S.; MENDES, G.D.; NUCCI, G. Clonazepam quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 1, p. 81–88, Jan. 2007.

CHEN, J.; LI, L.; ZHOU, X.; LI, B.; ZHANG, X.; HUI, R. Structural characterization and α -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides extracted from Chinese traditional medicine Huidouba. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 815–819, 2018.

CODY, R. B.; LARAMÉE, J. A.; DURST, H. D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2297–2302, 2005.

COLLETES, T.C.; GARCIA, P.T.; CAMPANHA, R.B.; ABDELNUR, P.V.; ROMÃO, W.; COLTRO, W.K.T.; VAZ, B.G. A new insert sample approach to paper spray mass spectrometry: A paper substrate with paraffin barriers. **Analyst**, v. 141, n. 5, p. 1707–1713, 2016.

CONCEIÇÃO, V. N.; SOUZA, L. M.; MERLO, B. B.; FILGUEIRAS, P. R.; POPPI, R. J.; ROMÃO, W. Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: Um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. **Quimica Nova**, v. 37, n. 9, p. 1538–1544, 2014.

CORONA, G.; GUSELLA, M.; GASPARDI, A.; MIOLO, G.; BERTOLASO, L.; PEZZOLO, E.; PASINI, F.; STEFFAN, A.; STEFFAN, A. Rapid LC-MS/MS method for quantification of vinorelbine and 4-O-deacetylvinorelbine in human whole blood suitable to monitoring oral metronomic anticancer therapy. **Biomedical Chromatography**, n. April, p. 1–10, 2018.

CORREA, D. N.; SANTOS, J. M.; EBERLIN, L. S.; EBERLIN, M. N.; TEUNISSEN, S. F. Forensic Chemistry and Ambient Mass Spectrometry: A Perfect Couple Destined for a Happy Marriage? **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 5, p. 2515–2526, 2016.

DA COSTA, J. L.; WANG, A. Y.; MICKE, G. A.; MALDANER, A. O.; ROMANO, R. L.; MARTINS-JÚNIOR, H. A.; NEGRINI NETO, O.; TAVARES, M. F. Chemical identification of 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB). **Forensic Science International**, v. 173, n. 2–3, p. 130–136, 2007.

DAMON, D. E.; YIN, M.; ALLEN, D. M.; MAHER, Y. S.; TANNY, C. J.; OYOLA-REYNOSO, S.; SMITH, B. L.; MAHER, S.; THUO, M. M.; BADU-TAWIAH, A. K. Direct Biofluid Analysis Using Hydrophobic Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 1878–1884, 2016.

DAMON, D. E.; YIN, M.; ALLEN, D. M.; MAHER, Y. S.; TANNY, C. J.; OYOLA-REYNOSO, S.; SMITH, B. L.; MAHER, S.; THUO, M. M.; BADU-TAWIAH, A. K. Dried Blood Spheroids for Dry-State Room Temperature Stabilization of Microliter Blood Samples. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 15, p. 9353–9358, 2018.

DOMIN, M.; CODY, R. **Ambient Ionization Mass Spectrometry**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry 2015, 2015.

DOUGLAS, D. J.; FRANK, A. J.; MAO, D. Linear ion traps in mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–29, 2005.

DUFFAU, B.; CAMARGO, C.; KOGAN, M.; FUENTES, E.; CASSELS, B.K.; Analysis of 25 C NBOMe in Seized Blotters by HPTLC and GC-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 7, p. 1153–1158, 2016.

EMCDDA. **European Drug Report 2018: Trends and Developments**. [s.l.: s.n.].

EVRARD, I.; LEGLEYE, S.; CADET-TAÏROU, A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. **International Journal of Drug Policy**, v. 21, n. 5, p. 399–406, 2010.

FENN, J. B. Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 13, n. 3, p. 101–118, 2002.

GUERREIRO, D.F.; CARMO, A.L.; DA SILVA, J.A.; NAVARRO, R.; GÓIS, C. Um novo perfil de abuso de substâncias em adolescentes e jovens adultos. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 5, p. 739–756, 2011.

GUO, Q.; GAO, L.; ZHAI, Y.; XU, W. Recent developments of miniature ion

trap mass spectrometers. **Chinese Chemical Letters**, n. 2017, 2018.

HADDOUB, R.; FERRY, D.; MARSAL, P.; SIRI, O. Cobalt thiocyanate reagent revisited for cocaine identification on TLC. **New Journal of Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1351–1354, 2011.

HAN, F.; YANG, Y.; OUYANG, J.; NA, N.; Direct analysis of in-gel proteins by carbon nanotubes-modified paper spray ambient mass spectrometry. **Analyst**, v. 140, n. 3, p. 710–715, 2015.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. [s.l.: s.n.].

HOFMAN, A. **LSD — My Problem Child**. [s.l.] McGraw-Hill, 1980.

HUN, F.L.; CHEN, C.H.; YUAN, C.H.; SHIEA, J. Interfaces to connect thin-layer chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 10, p. 2493–2498, 2003.

ILBEIGI, V.; TABRIZCHI, M. Thin layer chromatography-ion mobility spectrometry (TLC-IMS). **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 464–469, 2015.

JAGTAP, P. K.; TAPADIA, K. Pharmacokinetic determination and analysis of nortriptyline based on GC-MS coupled with hollow-fiber drop-to-drop solvent microextraction technique. **Bioanalysis**, v. 10, n. 3, p. 143–152, 2018.

JETT, R.; SKAGGS, C.; MANICKE, N. E. Drug screening method development for paper spray coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. **Analytical Methods**, v. 9, n. 34, p. 5037–5043, 2017.

JUFER, R.A.; WSTADIK, A.; WALSH, S.L.; LEVINE, B.S.; CONE, E.J. Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 7, p. 467–477, 2000.

JUKOFSKY, D.; VEREREY, K.; MULL, S. J. Qualitative differentiation between cocaine, lidocaine and cocaine-lidocaine mixtures (“rock-cocaine”) using thin-layer chromatography. v. 198, p. 534–535, 1980.

LANÇAS, F. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LEBEAU, M.; ANDOLLO, W.; HEARN, W.L.; BASELT, R.; CONE, E.J.; FINKLE, B.; FRASER, D.; JENKINS, A.; MAYER, J.; NEGRUSZ, A.; POLKIS, A.; WALLS, H.C.; RAYMON, L.; ROBERTSON, M.; SAADY, J. Recommendations for Toxicological Investigations of Drug facilitated Sexual Assaults.pdf. **Journal**

of Forensic Sciences, v. 44, p. 227–230, 1999.

LEE, H. H.; CHEN, S. C.; LEE, J. F.; LIN, H. Y.; CHEN, B. H. Simultaneous drug identification in urine of sexual assault victims by using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 282, p. 35–40, 2018.

LEE, S.; HAN, E.; IN, S.; CHOI, H.; CHUNG, H.; CHUNG, K.H. Determination of illegally abused sedative-hypnotics in hair samples from drug offenders. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 312–315, 2011.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LIAN, B.; XIA, J.; YANG, X.; ZHOU, C.; GONG, X.; GUI, S.; MAO, Q.; WANG, L.; LI, P.; HUANG, C.; QI, X.; XIE, P. Mechanisms of ketamine on mice hippocampi shown by gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic analysis. **NeuroReport**, v. 29, n. 9, p. 704–711, 2018.

LILLSUNDE, P.; KORTE, T. Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 71–81, 1991.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J. M.; COOKS, R. G.; OUYANG Z. Development , Characterization , and Application of Paper Spray Ionization. **Anal. Chem.**, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 2010.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J. M.; COOKS, R. G.; OUYANG Z.. Application of Paper Spray Ionization Development , Characterization , and Application of Paper Spray Ionization. **Anal. Chem.**, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 2010.

MAGALHÃES, E. J.; NASCENTES, C. C.; PEREIRA, L. S.; GUEDES, M. L.; LORDEIRO, R. A.; AULER, L. M.; AUGUSTI, R.; de QUEIROZ, M. E. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. **Science and Justice**, v. 53, n. 4, p. 425–432, 2013.

MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1156–1162, 2000.

MALDANER, A. O.; BOTELHO, E. D.; ZACCA, J. J.; CAMARGO, M. A.; BRAGA, J. W.; GROBÉRIIO, T. S. Brazilian federal district cocaine chemical profiling - Mass balance approach and new adulterant routinely quantified (Aminopyrine). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1227–

1231, 2015.

MANICKE, N E.; YANG, Q; WANG, H; ORADU, S; OUYANG, Z; COOKS, R G. Assessment of paper spray ionization for quantitation of pharmaceuticals in blood spots. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 300, n. 2–3, p. 123–129, 2011.

MANICKE, N. E.; BILLS, B. J.; ZHANG, C. Analysis of biofluids by paper spray MS: Advances and challenges. **Bioanalysis**, v. 8, n. 6, p. 589–606, 2016.

MARSHALL, A G.; HENDRICKSON, C. L.; JACKSON, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. **Mass spectrometry reviews**, v. 17, p. 1–35, 1998.

MENDES, T. P.P.; PEREIRA, I.; FERREIRA, M. R.; CHAVES, A. R.; VAZ, B. G. Molecularly imprinted polymer-coated paper as a substrate for highly sensitive analysis using paper spray mass spectrometry: Quantification of metabolites in urine. **Analytical Methods**, v. 9, n. 43, p. 6117–6123, 2017.

MERCIECA, G.; ODOARDI, S.; CASSAR, M.; ROSSI, S. S. Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 494–501, 2018.

MICHELY, J. A.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Paper Spray Ionization Coupled to High Resolution Tandem Mass Spectrometry for Comprehensive Urine Drug Testing in Comparison to Liquid Chromatography-Coupled Techniques after Urine Precipitation or Dried Urine Spot Workup. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 21, p. 11779–11786, 2017.

MORETTI, M; VISONÀ, S. D.; FRENI, F.; TOMACIELLO, I.; VIGNALI, C.; GROPPI, A.; TAJANA, L.; OSCULATI, A. M.M.; MORINI, L. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of cocaine and metabolites in blood and in dried blood spots collected from postmortem samples and evaluation of the stability over a 3-month period. **Drug Testing and Analysis**, n. April, p. 1–8, 2018.

MUELLER, C. A.; WEINMANN, W.; DRESEN, S.; SCHREIBER, A.; GERGOV, M. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 10, p. 1332–1338, 2005.

NASCIMENTO, I. R.; COSTA, H. B.; SOUZA, L. M.; SOPRANI, L. C.; MERLO, B. B.; ROMÃO, W. Chemical identification of cannabinoids in street marijuana samples using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 4, p. 1415–1424, 2015.

NEGRUSZ, A.; MOORE, C. M.; KERN, J. L.; JANICAL, P. G.; STRONG, M. J.; LEVY, N. A. Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 7, p. 614–620, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

NICHOLS, D. E.; SASSANO, M. F.; HALBERSTAND, A. L.; KLEIN, L. M.; BRANDT, S. D.; ELLIOTT, S. P.; FIEDLER, W. J. N -Benzyl-5-methoxytryptamines as Potent Serotonin 5-HT₂ Receptor Family Agonists and Comparison with a Series of Phenethylamine Analogues. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 1165–1175, 2015.

NIEDDU, M.; TRIGANO, C.; BURRAI, L.; PIRISI, M. A.; BOATTO, G. Cross-reactivities of 41 new amphetamine designer drugs to EMIT®immunoassays. **Forensic Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 133–137, 2013.

NIEDDU, M.; TRIGANO, C.; BURRAI, L.; PIRISI, M. A.; BOATTO, G.. Evaluation of commercial multi-drug oral fluid devices to identify 39 new amphetamine-designer drugs. **Legal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 106–109, 2014.

NINNEMANN, A.; STUART, G. L. The NBOMe Series: A Novel, Dangerous Group of Hallucinogenic Drugs. **Journal of Studies on Alcohol and Drugs**, v. 74, n. 6, p. 977–978, 2013.

OU, J.; LI, X.; FENG, S.; DONG, J.; DONG, X.; KONG, L.; YE, M., ZOU, H. Preparation and evaluation of a molecularly imprinted polymer derivatized silica monolithic column for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 639–646, 2007.

PAPOUTSIS, I.I.; ATHANASELIS, S.A.; NIKOLAOU, P.D.; PISTOS, C.M.; SPILIOPOULOU, C.A.; MARAVELIAS, C.P. Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 4, p. 609–614, 2010.

PAUL, V. W.; STEINWEDEL, H. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 8a, p. 469–496, 1953.

PEREIRA, I.; RODRIGUES, M.F.; CHAVEZ, A.R.; VAZ, B.G. Molecularly imprinted polymer (MIP) membrane assisted direct spray ionization mass spectrometry for agrochemicals screening in foodstuffs. **Talanta**, v. 178, n. June 2017, p. 507–514, 2018.

PRIETO-CONAWAY, M. C.; MANICKE, N. E.; KOZAK, M. Direct Analysis using Paper-Spray Mass Spectrometry: Method Development for the Rapid Screening of Drugs of Abuse for Forensic Toxicology. **Thermo Scientific**, p. 1–7, 2014.

ROMÃO, W.; SABINO, B. D.; BUENO, M. I.; VAZ, B. G.; JUNIOR, A. C.; MALDANER, A. O.; DE CASTRO, E. V.; LORDEIRO, R. A.; NASCENTES, C. C.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. LSD and 9,10-dihydro-LSD Analyses in Street Drug Blotter Samples via Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (EASI-MS). **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 5, p. 1307–1312, 2012.

SABINO, B. D.; ROMÃO, W.; SODRÉ, M. L.; CORREA, D. N.; PINTO, D. B.R.; ALONSO, F. O.M.; EBERLIN, M. N. Analysis of Cocaine and Crack Cocaine via Thin Layer Chromatography Coupled to Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 02, n. 06, p. 658–664, 2011.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, J.; TABERNEIRO, M. J.; BERMEJO, A. M.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Porous membrane-protected molecularly imprinted polymer micro-solid-phase extraction for analysis of urinary cocaine and its metabolites using liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 898, p. 50–59, 2015.

SCHWARTZ, J. C.; SENKO, M. W.; SYKA, J. E. P. A Two-Dimensional Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 6, p. 659–669, 2002.

SHULGIN, A.; SHULGIN, A. **Phenethylamines I Have Known And Loved (PiHKAL): A Chemical Love Story**. [s.l.] Transform Press, 1991.

SHULGIN, A. T.; SARGENT, T.; NARANJO, C. 4-Bromo-2,5-Diethoxyphenylisopropylamine, a New Centrally Active Amphetamine Analog. **Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 103–107, 1971.

SIMÕES, C. M. .; MARIOT, A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2003.

SKLEROV, J. H.; KALASINSKY, K. S.; EHORN, C. A. Detection of lysergic acid diethylamide (LSD) in urine by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 23, n. 6, p. 474–478, 1999.

SOLTANINEJADA, K.; KARIMIB, M.; NATEGHIC, A.; DARAEIB, B. Simultaneous determination of six benzodiazepines in spiked soft drinks by high performance liquid chromatography with ultra violet detection (HPLC-UV). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 2, p. 457–463, 2016.

DE SOUZA, L.M.; RODRIGUES, R.R.T.; SANTOS, H.; COSTA, H.B.; MERLO, B.B.; FILGUEIRAS, P.R.; POPPI, R.J.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. A survey of adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC-MS allied to chemometric tools. **Science and Justice**, v. 56, n. 2, p. 73–79, 2016.

SU, Y; WANG, H; LIU, J; WEI, P; COOKS, R G; OUYANG, Z Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse. **The Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4443, 2013.

SUNDSTRÖM, M.; PELANDER, A.; ANGERER, V.; HUTTER, M.; KNEISEL, S.; OJANPERÄ, I. Development and validation of a method using supported liquid extraction for the simultaneous determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 58, n. 1, p. 71–77, 2012.

TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 471–473, 2004.

TAVARES, S.L.; CARVALHO, T.C.; ROMÃO, W.; VAZ, B.G.; CHAVEZ, A.R. Paper Spray Tandem Mass Spectrometry Based on Molecularly Imprinted Polymer Substrate for Cocaine Analysis in Oral Fluid. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 3, p. 566–572, 2018.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. LTQ XL Hardware Manual. n. June, 2006.

TORO-URIBE, S.; MONTERO, L.; LÓPEZ-GIRALDO, L.; IBÁÑEZ, E.; HERRERO, M. Characterization of secondary metabolites from green cocoa beans using focusing-modulated comprehensive two-dimensional liquid

chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2018.

TSUMURA, Y.; MITOME, T.; KIMOTO, S. False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision. **Forensic Science International**, v. 155, n. 2–3, p. 158–164, 2005.

TU, Y. P.; HARRISON, A. G. Fragmentation of protonated amides through intermediate ion-neutral complexes: Neighboring group participation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, n. 5, p. 454–462, 1998.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World drug report 2011**. [s.l: s.n.].

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drugs Report 2013**. [s.l: s.n.].

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2017**. [s.l: s.n.].

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2018**. [s.l: s.n.].

WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie**, v. 122, n. 5, p. 889–892, 2010.

WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Direct Quantitative Analysis of Nicotine Alkaloids from Bio fl uid Samples using Paper Spray Mass Spectrometry. 2013.

WANG, Q.; ZHENG, Y.; ZHANG, X.; HAN, X.; WANG, T.; ZHANG, Z. A silica coated paper substrate: Development and its application in paper spray mass spectrometry for rapid analysis of pesticides in milk. **Analyst**, v. 140, n. 23, p. 8048–8056, 2015.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Application and Strategies for Data Interpretation**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd., 2009.

WEICKHARDT, C.; MORITZ, F.; GROTEMEYER, J. Time-of-Flight Mass Spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and Molecular Science. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 15, p. 139–162, 1996.

WOOD, D.M.; SEDEFOV, R.; CUNNINGHAM, A.; DARGAN, P.I. Prevalence of use and acute toxicity associated with the use of NBOMe drugs. **Clinical**

Toxicology, v. 53, n. 2, p. 85–92, 2015.

YANG, Q; WANG, H; MAAS, J D; CHAPPELL, W J; MANICKE, N E; COOKS, R G; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 312, p. 201–207, 2012.

YANG, Y.; LIU, X.; GUO, M.; LI, S.; LIU, W.; XU, B. Molecularly imprinted polymer on carbon microsphere surfaces for adsorbing dibenzothiophene. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 377, n. 1–3, p. 379–385, 2011.

ZHANG, C.; MANICKE, N. E. Development of a Paper Spray Mass Spectrometry Cartridge with Integrated Solid Phase Extraction for Bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 12, p. 6212–6219, 2015.

ZHANG, Z.; XU, W.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Silica Coated Paper Substrate for Paper-Spray Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 931–938, 2012.

ZHENG, Y.; ZHANG, X.; YANG, H.; LIU, X.; ZHANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, Z. Facile preparation of paper substrates coated with different materials and their applications in paper spray mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 13, p. 5381–5386, 2015.

ZHENG, Y.; ZHANG, X.; YANG, H.; LIU, X.; ZHANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, Z. Development and Application of Zirconia Coated Paper Substrate for High Sensitivity Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 14, p. 7005–7013, 2016.

Capítulo 7. Curriculum Vitae

7. Curriculum Vitae

1. Informações Pessoais

Nome Completo: Thays Colletes de Carvalho

Endereço eletrônico: thayscolletesc@gmail.com

Naturalidade: São Paulo-SP

Data de Nascimento: 02/02/1990

Filiação: Maria Cristina de Carvalho

Paulo Roberto de Carvalho

2. Formação acadêmica

| | | | |
|--|-----------|---|-----------|
| Doutorado em Química | em | Instituto de Química Universidade Federal de Goiás | 2015-2018 |
| Mestrado em Química | | Instituto de Química Universidade Federal de Goiás | 2013-2015 |
| Bacharelado em Química Habilitação Industrial | em com | Instituto de Química Universidade Federal de Goiás | 2009-2012 |

3. Participação em Congressos

- 1- 66 ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topcs- San Diego –CA- EUA, 2018.
- 2- 2º Workshop da Pós-Graduação em Química da UFG –Goiânia- Go, 2017.
- 3- 9º Workshop em Avanços Recentes no Preparo de Amostras – Goiânia-Go, 2017.
- 4- 6º Brmass- Conference on Mass Spectrometry- Rio De Janeiro-RJ- 2016.
- 5- 12º Congresso de pesquisa, ensino e extensão- Conpeex- Goiânia- Go, 2015.
- 6- 23º Congresso Nacional de Criminalística- Buzios-RJ, 2015.
- 7- 1º Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia- Brasília-DF, 2014.

- 8- 37º Congresso da Sociedade Brasileira de Química- Natal- RN, 2014.
- 9- 11º Congresso de pesquisa, ensino e extensão- Conpeex- Goiânia- GO, 2014.
- 10- 9º Congresso de pesquisa, ensino e extensão- Conpeex- Goiânia- GO, 2012.
- 11- 63º Reunião Anual da SBPC- Goiânia- GO, 2011.
- 12- 2ª Jornada de Inverno de Química- JOINQUI- Belo Horizonte- MG- 2010.
- 13- 7º Congresso de pesquisa, ensino e extensão- Conpeex- Goiânia- GO, 2010.
- 14- 6º Congresso de pesquisa, ensino e extensão- Conpeex- Goiânia- GO, 2009.

4. Artigos Publicados

- 1- TAVARES, L.S.; **CARVALHO, T.C.**; ROMÃO, W.; VAZ, B.G.; CHAVES, A.R. Paper Spray Tandem Mass Spectrometry Based on Molecularly Imprinted Polymer Substrate for Cocaine Analysis in Oral Fluid. **Journal of the American Society For Mass Spectrometry**, v. 29, p. 566-572, 2018
- 2-DOMINGOS, E.; **CARVALHO, T.C.**; PEREIRA, I.; VASCONCELOS, G.A.; THOMPSON, C.J.; AUGUSTI, R.; RODRIGUES, R.R.T.; TOSE, L.V.; SANTOS, H.; ARAUJO, J.R.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry - drugs of abuse, inks and questioned documents. **Analytical Methods**. V. 9, p. 4400-4409, 2017.
- 3- FARIA, M.J.M.; BRAGA, C.A.S.B.; PAULA, J.R.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; VAZ, B.G.; **CARVALHO, T.C.**; ROMÃO, W.; COSTA, H.B.; CONCEIÇÃO, E.C. Antimicrobial activity of *Copaifera spp.* Against bactéria isolated from milk of cows with mastitis. *Ciência Animal Brasileira*, v. 18, p. 39068, 2017.
- 4- DUARTE, L.C.; **CARVALHO, T.C.**; LOBO-JÚNIOR, E.O.A.; ABDELNUR, P.V.; VAZ, B.G.; COLTRO, W.K.T. 3D printing of microfluidic devices for paper-assisted direct spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods** (Print), v. 8, p. 496-503, 2016.
- 5- **CARVALHO, THAYS C.**; OLIVEIRA, I.F.; TOSE, L.V.; VANINI, G.; KILL, J.B.; NETO, A.C.; MACHADO, L.F.; AMBROSIO, J.C.L.; LACERDA, V.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray

ionisation mass spectrometry (PSI-MS). **Analytical Methods** (Print), v.8, p. 614-620, 2016.

6- COLLETES, T. C.; GARCIA, P. T.; CAMPANHA, R. B.; ABDELNUR, P. V.; ROMÃO, W.; COLTRO, W. K. T.; VAZ, B. G. A new insert sample approach to paper spray mass spectrometry: a paper substrate with paraffin barriers. **Analyst** (London. 1877. Print), v. 141, p. 1707-1713, 2016.

7- CARVALHO, T.C.; TOSATO, F.; SOUZA, L.M.; SANTOS, H.; MERLO, B. B.; ORTIZ, R.S.; RODRIGUES, R.R.T.; FILGUEIRAS, P.R.; FRANÇA, H.S.; AUGUSTI, R.; ROMÃO, W.; VAZ, B.G. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. **Forensic Science International**, v. 262, p. 56-65, 2016.

8- PEREIRA, I.; RODRIGUES, S.R.M.; CARVALHO, T.C.; CARVALHO, V.V.; LOBÓN, G.S.; BASSANE, J.F.P.; DOMINGOS, E.; ROMÃO, W.; AUGUSTI, R.; VAZ, B.G. Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate?. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6023-6029, 2016.

9- FERREIRA, F.P.S.; MORAIS, S.R.; BARA, M.T.F.; CONCEIÇÃO, E.C.; PAULA, J.R.; CARVALHO, T.C.; VAZ, B.G.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; REZENDE, M.H.. Eugenia calycina Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** (Print), v. 99, p. 89-96, 2014.

10- VILELA, E.C.; CARVALHO, T.C.; DUARTE, A.R.; NAVES, R.R.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H. Spatial structure of Eugenia dysenterica based on essential oil chemovariations and implications for conservation and management of the genetic diversity of its populations. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso), v. 23, p. 1776-1782, 2012.

Capítulo 8. Artigos Publicados

1- CARVALHO, Thays Colletes; OLIVEIRA, Izabela Feres; TOSE, Lilian Valadares; VANINI, Gabriela; KILL, Jade Barbosa; NETO, Álvaro Cunha; MACHADO, Leandro F; AMBROSIO, João C.L.; LACERDA, Valdemar; VAZ, Boniek Gontijo; ROMÃO, Wanderson. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray ionisation mass spectrometry (PSI-MS). *Analytical Methods*, v.8, p. 614-620, 2016. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ay/c5ay01265a#!divAbstract>

2- CARVALHO, Thays Colletes; TOSATO, Flávia; SOUZA, Lindamara Maria; SANTOS, Heloa; MERLO, Bianca B.; ORTIZ, Rafael Sarcosatto; RODRIGUES, Rayza Rosa Tavares.; FILGUEIRAS, Paulo Roberto; FRANÇA, Hildegardo Seibert; AUGUSTI, Rodinei; ROMÃO, Wanderson; VAZ, Boniek Gontijo. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. *Forensic Science International*, v. 262, p. 56-65, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073816300615?via%3Dihub>