

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Camila Cristina Almeida de Paula

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO
PAPER SPRAY EM ANÁLISES DE CUNHO FOSENSE E NO
MONITORAMENTO E ACELERAÇÃO DE REAÇÕES QUÍMICAS**

Belo Horizonte
2018

UFMG/ICEx/DQ. 1286^a

T. 582^a

Camila Cristina Almeida de Paula

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO
PAPER SPRAY EM ANÁLISES DE CUNHO FOSENSE E NO
MONITORAMENTO E ACELERAÇÃO DE REAÇÕES QUÍMICAS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2018

P323a Paula, Camila Cristina Almeida de
2018 Aplicação de espectrometria de massa com ionização
T paper spray em análises de cunho forense e no
monitoramento e aceleração de reações químicas
[manuscrito] /. 2018.
XVII, 114 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.
Coorientador: Evandro Piccin

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Espectrometria de
massas - Teses 3. Toxicologia forense - teses I.
Augusti, Rodinei Orientador . II. Piccin, Evandro.
III. Título

CDU 043



"Aplicação de Espectrometria de Massas com Ionização *Paper Spray* em Análises de Cunho Forense e no Monitoramento e Aceleração de Reações Químicas"

Camila Cristina Almeida de Paula

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG

Prof. Evandro Piccin - Coorientador
UFMG

Profa. Rosana Maria Alberici Oliveira
UNICAMP

Prof. Patterson Patricio de Souza
CEFET-MG

Profa. Clésia Cristina Nascentes
UFMG

Prof. Adão Aparecido Sabino
UFMG

Belo Horizonte, 17 de julho de 2018.

"Vida, louca vida. Vida breve. Já que eu não posso te levar, quero que você me leve."
Cazuza

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao Professor Rochel Montero Lago pela oportunidade de trabalhar com o tema “contaminantes emergentes” durante minha iniciação científica na graduação, tema este que despertou em mim o interesse pela área de química analítica.

Agradeço também a Professora Clésia Cristina Nascentes, pela orientação e amizade que desenvolvemos durante o período de mestrado, que contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço aos colegas dos laboratórios 163 e 167 do Departamento de Química da UFMG Júlia, Susana, Lucas, Carlos, Vitória, Hebert e Binatti pela convivência e ajuda durante a elaboração desse trabalho.

Em especial, agradeço imensamente a minha parceira de trabalho e grande amiga Marina Jurisch por toda a ajuda, compreensão e enorme troca de conhecimento que tivemos durante esse período. Sem você, não teria sido possível chegar até aqui.

Com enorme satisfação, agradeço também ao Professor Rodinei Augusti pela amizade e compreensão durante esses quatro anos de convivência. Além de todo o conhecimento que adquiri com do Senhor, que não tenho palavras para mensurar, o maior ensinamento que levarei comigo é o de que quando desempenhamos nossa função, seja ela qual for, com ética e comprometimento quem mais sai engrandecido somos nós mesmos.

Agradeço também ao meu amado, amigo e companheiro de todas as horas Mateus Xavier pela imensa contribuição e parceria ao longo da vida e durante a elaboração desse trabalho. Sua presença sempre me engrandece e me ilumina.

Agradeço aos meus amados pais Clélia e Ivan e aos meus queridos irmãos Hugo e Raphael pelo apoio durante toda essa trajetória acadêmica. Foram muitas ausências ao longo dessa caminhada, mas meu objetivo sempre foi enchê-los de orgulho.

Agradeço, por fim, a Capes pelo fomento ao Projeto Pró-Forenses.

RESUMO

O presente trabalho emprega a técnica analítica *Paper Spray Mass Spectrometry* (PS-MS) em dois temas distintos de grande relevância atual: análises de cunho forense e monitoramento e aceleração de reações químicas.

Em forense, a técnica PS-MS foi aplicada com sucesso na identificação e quantificação de cocaína em amostras de drogas de rua contendo na identificação do golpe "Boa noite, Cinderela" a partir de bebidas dopadas. Para as análises de cocaína, amostras foram preparadas em laboratório utilizando-se diferentes matrizes (farinha de trigo, ácido bórico e bicarbonato de sódio) com o intuito de simular a composição química dos materiais apreendidos. Os resultados obtidos (identificação de cocaína em amostras contendo de 0,01% a 5 % de cocaína) foram tão conclusivos quanto os obtidos através da metodologia normalmente empregada (teste colorimétrico de Scott associadas a análises cromatográficas) e demandaram menos tempo e insumos. Para comprovação do golpe "Boa noite, Cinderela", diferentes bebidas (cerveja, vodka, refrigerante e suco) foram dopadas com benzodiazepínicos, que puderam ser identificados e quantificados (quantificação Diazepam em cerveja utilizando Cloxazolam como padrão interno) de modo confiável, rápido e econômico através de um simples preparo de amostra (extração líquido-líquido com particionamento a baixa temperatura) associado à técnica PS-MS.

Para o monitoramento de reações químicas, a técnica PS-MS foi empregada durante o acompanhamento de um sistema reversível modelo sob condições que alteram seu equilíbrio químico dinâmico, o sistema redox do azul de metileno, estabelecido quando um agente redutor (zinco metálico) é colocado em contato com uma solução ácida desse corante. A técnica PS-MS também foi utilizada para monitorar e acelerar reações químicas entre anidrido ftálico e diaminas para formação de derivados de ftalimida, compostos de grande interesse farmacológico, cuja síntese em escala de bancada pode demandar horas. Ambos os trabalhos obtiveram resultados *in situ* que proporcionaram a inferência de possíveis produtos e intermediários de reação, bem como de suas respectivas vias reacionais. Além disso, esses dois últimos trabalhos possuem outra nobre vertente de aplicação: o desenvolvimento de conteúdo didático para elaboração de aulas práticas para estudantes de graduação.

Palavras-chave: Espectrometria de Massas, Fonte de Ionização *Paper Spray*, Análises Forenses, Monitoramento e Aceleração de Reações Químicas.

ABSTRACT

The present work employed the analytical technique denominated Paper Spray Mass Spectrometry (PS-MS) in two distinct themes of high current relevance: forensic analyses and monitoring and acceleration of chemical reactions.

In forensics, the PS-MS technique was successfully applied in the identification and quantification of cocaine in drug street samples in the identification of the scam known in Brazil as "Boa noite, Cinderela" from analyses of spiked drinks. For the cocaine analyses, samples were prepared in the laboratory using different matrices (wheat flour, boric acid and sodium bicarbonate) in order to simulate the chemical composition of the seized materials. The results obtained (identification of cocaine in samples containing 0.01% to 5% of cocaine) were as conclusive as those obtained through the methodology normally employed in forensic laboratories (Scott colorimetric test associated with chromatographic analysis) requiring less time and inputs. To confirm the scam "Boa noite, Cinderela", different beverages (beer, vodka, soda and juice) were spiked with benzodiazepines, which could be identified and quantified (quantification of Diazepam only in beer) reliably, quickly and economically through of a simple sample pre-treatment (liquid-liquid extraction with low temperature partitioning) associated with PS-MS technique.

For the monitoring of chemical reactions, the PS-MS technique was employed to monitor a model reversible system under conditions that alter its dynamic chemical equilibrium, the methylene blue redox system, established when a reducing agent (metallic zinc) is put into contact with an acid solution of this dye. The PS-MS technique was also used to monitor and accelerate chemical reactions between phthalic anhydrite and diamines for the formation of phthalimide derivatives, compounds of remarkable pharmacological interest, whose synthesis on a bench scale may take hours. Both works obtained *in situ* results that provided structural information of possible products and reaction intermediates, as well as their respective reactional pathways. In addition, these last two works have another noble application: the development of didactic content to elaborate practical classes for undergraduate students.

Keywords: Paper Spray Mass Spectrometry, Forensic Analysis, Monitoring and Acceleration of Chemical Reactions.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema simplificado dos componentes de um Espectrômetro de Massas.	19
Figura 2 - Esquema da formação do <i>spray</i> na fonte de ionização <i>Electrospray</i> . Adaptado de: http://www.waters.com/waters/pt_BR/CommonIonization . Acessado em 04/06/2016.	23
Figura 3 - Esquema do processo de dessolvatação dos íons durante a ionização <i>Electrospray</i> . Adaptado de: http://www.chromacademy.com/Massas-Ionization . Acessado em 04/06/2016.	24
Figura 4 - Esquema do sistema de bombeamento em três estágios utilizado em fontes de ionização à pressão atmosférica. Adaptada de <i>Mass Spectrometry - Principles and Applications, West Sussex, 2007</i>	24
Figura 5 - Esquema do processo de ionização PS-MS.	26
Figura 6 - Formação do <i>spray</i> : modo 1 - sistema rico em solvente produz gotas de diversos tamanhos através de múltiplos cones de Taylor; modo 2 - gotas menores são produzidas devido à secagem do solvente (descarga corona). Adaptada de Cooks <i>et. al.</i> , 2012. ²⁹	27
Figura 7 - A- posicionamentos do papel avaliados em uma área de 24 cm ² . B- intensidade do sinal referente à cocaína em função do posicionamento do papel. Adaptada de Cooks <i>et.al.</i> , 2010. ²⁸	28
Figura 8 - a) Diferentes ângulos do papel durante a geração do <i>spray</i> -papeis cortados em forma circular para garantir que o <i>spray</i> seria formado apenas na extremidade. b) Amplitude do <i>spray</i> para diferentes ângulos - a formação de <i>spray</i> não foi observada em 150°. c) intensidade do sinal analítico e da corrente do <i>spray</i> em função da voltagem do <i>spray</i> e a variação do campo elétrico em função do ângulo do papel. Adaptada de Ouyang <i>et. al.</i> , 2010. ³¹ ..	29
Figura 9 - Dispositivos a) Nib-assisted PS, b) Droplet monitoring e C) high-throughput PS. Imagens adaptadas das referências [31], [32] e [33], respectivamente.	31
Figura 10 - Representação gráfica das técnicas de ionização ambiente (a) Leaf Spray (b) Tissue Spray (c) Wooden Tip Spray e (d) Glass Spray. Imagens adaptadas das referências [47], [55], [65] e [66], respectivamente. ..	35

Figura 11 - Ilustração da metodologia proposta para identificação de cocaína em amostras de droga de rua utilizando a técnica PS-MS.....	44
Figura 12 - Estruturas químicas protonadas dos analitos (a) cocaína, (b) cafeína e (c) lidocaína adicionados e suas respectivas razões massa/carga (m/z)	45
Figura 13 - Espectros médios das amostras contendo a) 0; b) 0,1; c) 0,5; d) 1,0; e) 3,0; f) 5,0 % m/m de cocaína, preparadas com a base A.	46
Figura 14 - Espectros médios das amostras contendo a) 0; b) 0,1; c) 0,5; d) 1,0; e) 3,0; f) 5,0 % m/m de cocaína, preparadas com a base B.	47
Figura 15 - Estruturas químicas da cocaína protonada e seus fragmentos observados no espectro de fragmentação da amostra contendo 0,1% m/m de cocaína, preparada com a base A.....	49
Figura 16 - Espectro de massas PS-(+)-MS <i>full scan</i> referentes à porção diluída das bases A (bicarbonato de sódio/ ácido bórico na proporção 1:1 (m/m)) e base B (farinha de trigo /ácido bórico na proporção 1:1 (m/m)) obtidos via PS-MS.....	50
Figura 17 - Curva analítica obtida para as amostras referentes à base B dopadas com cocaína, preparadas em triplicata.	51
Figura 18 - Estrutura molecular geral das 1,4 benzodiazepinas (à esquerda) e do Diazepam (benzodiazepínico, à direita).....	55
Figura 19 - Esquema representativo da metodologia PS-MS/ LLE-LTP para determinação e quantificação de benzodiazepínicos em bebidas alcoólicas dopadas.	61
Figura 20 - Estruturas moleculares, espectros em <i>full scan</i> e perfil de fragmentação dos compostos benzodiazepínicos protonados: Diazepam (m/z 285), Alprazolam (m/z 309), Clonazepam (m/z 316), Bromazepam (m/z 316) e Cloxazolam (m/z 349).	62
Figura 21 - Espectros PS(+)-MS obtidos para os drinques: (A) cerveja, (B) Coca-Cola® e vodka, (C) energético e vodka e (D) suco de pêssigo <i>light</i> e vodka, dopados com: Alprazolam (m/z 309 e 311), Clonazepam (m/z 316 e 318), Bromazepam (m/z 316 e 318) e Cloxazolam (m/z 349 e 351) a esquerda. Espectros PS(+)-MS das bebidas não dopadas: (a) cerveja, (b) Coca-Cola®, (c) energético, (d) suco de pêssigo <i>light</i> e (e) vodka, a direita.	64

Figura 22 - Espectros PS(+)-MS obtidos após aplicação do método de preparo de amostra LLE-LTP nas bebidas (cerveja, Coca-Cola® e vodca, energético e vodca e suco de pêssigo <i>light</i> e vodca - Tabela 2) dopados com Diazepam (<i>m/z</i> 285 e 287), Alprazolam (<i>m/z</i> 309 e 311), Clonazepam (<i>m/z</i> 316 e 318), Bromazepam (<i>m/z</i> 316 e 318) e Cloxazolam (<i>m/z</i> 349 e 351).....	65
Figura 23 - Espectros PS(+)-MS das bebidas não dopadas cerveja, Coca-Cola®, energético, suco de pêssigo <i>light</i> e vodca obtidos após a aplicação do pré-tratamento de amostra LLE-LTP.	67
Figura 24 - Espectros PS(+)-MS obtidos para aliquotas do drinque composto por energético e vodca dopado com Diazepam (<i>m/z</i> 285 e 287), Alprazolam (<i>m/z</i> 309 e 311), Clonazepam (<i>m/z</i> 316 e 318), Bromazepam (<i>m/z</i> 316 e 318) e Cloxazolam (<i>m/z</i> 349 e 351), coletados em diferentes tempos de exposição sob condições ambiente (0, 4, 8 e 48 h).....	69
Figura 25 - Curvas analíticas obtidas para quantificação de Diazepam em cerveja (matriz modelo), utilizando Cloxazolam como padrão interno: (a) Curva obtida a partir de regressão linear; (b) Curva obtida a partir de regressão polinomial de segunda; onde. I_{diazepam} e $I_{\text{Cloxazolam}}$ se referem às intensidades absolutas dos íons <i>m/z</i> 285 (Diazepam protonado) e 349 (Cloxazolam protonado) obtidas dos dados PS(+)-MS de amostras submetidas ao método LLE-LTP	70
Figura 26 - Estruturas químicas das formas oxidada (azul) e reduzida (incolor) do corante azul de metileno.	75
Figura 27 - Espectros PS(+)-MS das alíquotas coletadas em diferentes condições experimentais: (a) alíquota 1: solução inicial (pH = 6.08); (b) alíquota 2: coletada após a adição de zinco metálico e solução ácida (pH = 5.85); (c) alíquota 3: retirada após o sistema sob agitação retornar ao aspecto inicial (pH = 6.07). As imagens correspondem à solução nos instantes em que as alíquotas foram retiradas; (d) Papel fixado no clipe metálico no início da análise PS-MS da alíquota 2; (e) Papel fixado no clipe metálico no final da análise PS-MS da alíquota 2: intensificação da cor azul no papel ao redor do clipe metálico.	80
Figura 28 - Espécies propostas derivadas do processo redox do azul de metileno em equilíbrio dinâmico.....	81

Figura 29 - Espectros de fragmentação dos seguintes íons precursores: (a) [AM] ⁺ de m/z 284; (b) [AM + e + H] ^{+•} de m/z 285; (c) [leuco-AM + H] ⁺ de m/z 286 obtidos durante a análise PS-(+)-MS da alíquota 2 .	83
Figura 30 - Reação entre anidrido ftálico e amônia para formação da ftalimida.	88
Figura 31 - Estruturas moleculares, fórmulas químicas e razões massa/carga (m/z) das formas protonadas dos reagentes utilizados para as sínteses dos derivados de ftalimida.	90
Figura 32 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico (AF) e etilenodiamina (ED).	91
Figura 33 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 209, produto inicial da reação entre anidrido ftálico e etilenodiamina.	92
Figura 34 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 417, produto inicial da reação entre duas moléculas de anidrido ftálico (AF) e duas moléculas de etilenodiamina (ED).	93
Figura 35 - para formação dos derivados de ftalimida de m/z 191 e 174 a partir da amida de m/z 209.	93
Figura 36 - Mecanismo proposto para formação dos íons m/z 399 e 357 a partir do íon de m/z 417.	94
Figura 37 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico (AF) e propilenodiamina (PD).	95
Figura 38 - Espectro de fragmentação do íon de m/z 181, produto da reação entre molécula de anidrido ftálico e metanol.	95
Figura 39 - Mecanismo proposto para formação dos íons m/z 163 e 149 a partir do íon de m/z 181.	96
Figura 40 - Espectro de fragmentação do íon de m/z 205, derivado de ftalimida oriundo da reação entre anidrido ftálico e propilenodiamina.	96
Figura 41 - Mecanismo proposto para formação do íon m/z 188 a partir do íon de m/z 205.	97
Figura 42 - Espectro de fragmentação do íon de m/z 279, oriundo da reação entre uma molécula de anidrido ftálico e duas moléculas de propilenodiamina.	97
Figura 43 - Mecanismo proposto para formação do íon m/z 205 a partir do íon de m/z 279.	98

Figura 44 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico (AF) e <i>p</i> -fenilenodiamina (pFD).	99
Figura 45 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de <i>m/z</i> 257, produto inicial da reação entre anidrido ftálico e <i>p</i> -fenilenodiamina.....	100
Figura 46 - Mecanismos propostos para formação do derivado de ftalimida de <i>m/z</i> 239 e para a dissociação do íon de <i>m/z</i> 257.	101
Figura 47 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico e <i>o</i> -fenilenodiamina.	102
Figura 48 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de <i>m/z</i> 257, produto da reação entre anidrido ftálico e <i>o</i> -fenilenodiamina.	102
Figura 49 - Mecanismo proposto para formação do derivado de ftalimida de <i>m/z</i> 239 oriundo da reação entre anidrido ftálico e <i>o</i> -fenilenodiamina.	103

Lista de tabelas

Tabela 1: Desempenho analítico da técnica PS- MS para as amostras referentes à base B dopadas com cocaína.	52
Tabela 2 - Composição dos drinques dopados e não dopados com comprimidos de benzodiazepínicos.	58
Tabela 3 - Figuras de Merito obtidas para o método LLE-LTP/ PS- MS para quantificação de Diazepam em cerveja, utilizando-se Cloxazolam como padrão interno.....	71
Tabela 4 - Condições experimentais do sistema instantes antes da análise por PS-MS.	77

Lista de abreviaturas

- AM — Azul de Metileno
- APCI — Atmospheric Pressure Chemical Ionization
- APPI — Atmospheric Pressure Photoionization
- BZ — Benzodiazepínicos
- CI — Chemical Ionization
- CID — Colision Induced Dissociation
- DART — Direct Analysis in Real Time
- DEP — Direct Electrospray Probe
- DESI — Desorption Electrospray Ionization
- DF — Derivados de Ftalimida
- DFSA — Drug Facilitated Sexual Assault
- EASI — Easy Ambient Sonic Spray Ionization
- EC — European Commission
- ED — Etilenodiamina
- EI — Electron Ionization
- ESI — Electrospray Ionization
- GC — Gas Chromatography
- GS-MS — Glass Spray Mass Spectrometry
- HPLC — High Performance / Pressure Liquide Chromatography
- IV — Espectroscopia na região do Infravermelho
- kDa — quilo-Dalton
- LLE — Liquid-liquid Extraction
- LLE-LTP — Liquid-liquid Extraction with Low Temperature Partitioning
- m/z* — razão massa/carga
- MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
- m*-FD — *m*-fenilenodiamina
- MS — Mass Spectrometry;
- o*-FD — *o*-fenilenodiamina
- PCBs — *Polychlorinated Biphenyls*
- PD — Propilenodiamina
- PESI — Probe Electrospray Ionization
- p*-FD — *p*-fenilenodiamina

PS — Paper Spray Ionization
PVDF — Polyvinylidene Fluoride
RMN — Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
SNC — Sistema nervoso central
SPE — Solid-phase Extraction
SPME — Solid-phase Micro-extraction
UHPLC — Ultra-high Performance Liquid Chromatography
UNODC — United Nations Office on Drugs and Crime

Sumário

Capítulo 1 - Introdução Geral e Objetivos	18
1.1 Espectrometria de Massas	19
1.1.1. Fontes de Ionização Ambiente.....	21
1.1.2. Fonte de Ionização <i>Electrospray</i> (ESI).....	22
1.1.3. Fonte de Ionização <i>Paper Spray</i> (PS-MS)	25
1.1.4 Modificações da técnica PS-MS	30
1.1.5 Técnicas similares à PS-MS	32
1.2. Objetivos	36
Capítulo 2 - Análises de Cunho Forense.....	38
2.1 Determinação de cocaína em amostras de drogas de rua simuladas em laboratório através da espectrometria de massas com ionização <i>Paper Spray</i>	39
2.1.1 Introdução.....	39
2.1.2 Parte Experimental	41
2.1.3 Resultados e discussão	44
2.1.4 Conclusões.....	52
2.2 Determinação de benzodiazepínicos em bebidas dopadas. Identificando o golpe "Boa-noite, cinderela" por meio da espectrometria de massas com ionização <i>Paper Spray</i>	54
2.2.1 Introdução.....	54
2.2.2 Parte Experimental	57
2.2.3 Resultados e discussão	61
2.2.4 Conclusões.....	72
Capítulo 3 - Monitoramento e Aceleração de Reações Químicas	73
3.1 Espectrometria de Massas com Ionização <i>Paper Spray</i> Aplicada no Monitoramento de um Sistema Químico em Equilíbrio Químico Dinâmico: o Processo Redox do Azul de Metileno	74

3.1.1 Introdução.....	74
3.1.2 Parte Experimental	76
3.1.3 Resultados e discussão	78
3.1.4 Conclusões.....	84
3.2 Espectrometria de Massas com Ionização <i>Paper Spray</i> Aplicada à Aceleração da Síntese de Derivados de Ftalimida	86
3.2.1 Introdução.....	86
3.2.2 Parte Experimental	88
3.2.3 Resultados e discussão	89
3.2.4 Conclusões.....	103
Capítulo 4 - Considerações Finais	105
Capítulo 5 - Referências bibliográficas.....	108

***Capitulo 1 - Introdução Geral e
Objetivos***

1.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica poderosa, que permite a identificação e quantificação de espécies químicas através da elucidação de suas propriedades químicas e estruturais. Para tal, moléculas do composto de interesse devem ser ionizadas para que seus íons em fase gasosa sejam separados eletromagneticamente por meio de suas diferentes razões massa/carga (m/z).¹

Todo espectrômetro de massas possui, basicamente, os mesmos componentes: uma entrada para introdução da amostra — como um cromatógrafo gasoso (ou líquido) ou uma sonda de injeção direta; — uma fonte de ionização para produção dos íons do(s) analito(s) presente(s) na amostra, que pode estar sob alto vácuo ou à pressão atmosférica; um (ou mais) analisador(es) de massa capaz(es) de separar, selecionar e fragmentar os íons para que estes sejam identificados independentemente; um detector para "contagem" dos íons já separados em função de suas razões massa/carga ; e, por fim, um sistema de processamento de dados capaz de interpretar os sinais elétricos produzidos pelo detector para elaboração de espectros de massas, que apresentam de forma gráfica a relação entre as intensidades dos íons identificados e suas respectivas (m/z) (Figura 1).²

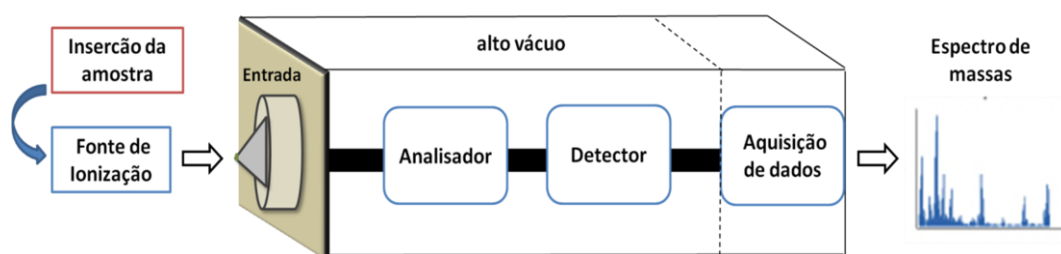


Figura 1 - Esquema simplificado dos componentes de um Espectrômetro de Massas.

Diversas técnicas de ionização são capazes de ionizar os analitos presentes na amostra de interesse. A intensidade da energia transferida para a molécula durante o processo de ionização, bem como as propriedades físico-químicas do analito a ser ionizado, são os fatores mais importantes a serem considerados para a escolha da fonte de ionização.²

Algumas técnicas de ionização são muito energéticas e podem causar a fragmentação parcial ou total dos analitos, não favorecendo a detecção de íons característicos das espécies moleculares. Dentre essas técnicas podemos citar a ionização por elétrons (EI - *Electron Ionization*)^{3,4} e a ionização química (CI - *Chemical Ionization*).⁵ Os processos de ionização EI e CI acontecem em fase gasosa, sendo indicados apenas para analitos voláteis e termicamente estáveis. Desse modo, a cromatografia gasosa é o modo de inserção de amostra mais indicado para essas fontes de ionização.

Técnicas de ionização mais brandas produzem, praticamente, apenas íons das espécies moleculares, pois transferem menos energia para o analito, minimizando possíveis fragmentações na fonte. Fontes de ionização que funcionam dessa maneira são indicadas para espécies termicamente instáveis, que possuem baixa pressão de vapor, pois os analitos de interesse são extraídos diretamente da fase condensada (líquida ou sólida) para a fase gasosa.²

Em fontes de ionização brada nas quais o analito de interesse está em uma matriz não volatilizável, como um sólido, a matriz é geralmente irradiada por um feixe de partículas energizadas (ou fótons) que transferem carga para o analito, desorvendo-o da superfície da amostra. Os íons desorvidos são, então, direcionados para a entrada do espectrômetro de massas por meio de um campo elétrico. Dentre as fontes de ionização para amostras não volatilizáveis, podemos destacar a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)⁶, a ionização eletrospray por dessorção (*DESI - Desorption Electrospray Ionization*)⁷ e a análise direta em tempo real (*DART - Direct Analysis in Real Time*).⁸

Em fontes de ionização brada nas quais o analito de interesse está em solução, a inserção da amostra pode ser feita por cromatografia líquida ou através de injeção direta. Durante a ionização, a solução percorre um capilar metálico com o auxílio de um gás de arraste. Na extremidade desse capilar é gerado um *spray* contendo íons da amostra de interesse que adentram o espectrômetro de massas sob pressão atmosférica. Dentre as fontes em fase líquida podemos citar a fonte de ionização *electrospray* (ESI - *Electrospray Ionization*)⁹, a ionização química à pressão atmosférica (APCI - *Atmospheric*

Pressure Chemical Ionization)¹⁰ e a fotoionização à pressão atmosférica (APPI -*Atmospheric Pressure Photoionization*).¹¹

1.1.1. Fontes de Ionização Ambiente

Algumas técnicas de ionização branda que ocorrem à pressão atmosférica também são denominadas como técnicas de ionização ambiente, uma vez que permitem a rápida e eficiente análise de amostras em seu estado nativo, como matrizes biológicas, em condições ambiente de temperatura e pressão, empregando mínima ou nenhuma etapa de preparo de amostra.¹² Dentre essas técnicas, podemos destacar DART-MS e DESI-MS como as mais difundidas na literatura devido ao seu bom desempenho, principalmente, na análise de tecidos¹³ e fluídos biológicos¹⁴. Ambas as técnicas foram aprimoradas e refinadas ao longo da última década, dando origem a métodos de ionização ambiente ainda mais eficientes e simples.

As fontes de ionização ambiente DESI, DART, EASI (*Easy Ambient Sonic Spray Ionization*)¹⁵, PESI (*Probe Electrospray Ionization*)¹⁶, e PS (*Paper Spray Ionization*)¹⁷ utilizam técnicas de introdução direta de amostra que dispensam o uso de separação cromatográfica. Além disso, análises qualitativas e quantitativas de diversos tipos de amostra podem ser feitas de modo ágil, utilizando pouca(s), ou até mesmo nenhuma, etapa(s) de preparo de amostra.

O universo de aplicações dessas técnicas mais recentes também foi ampliado ao longo desse período, de modo que trabalhos relacionados à análise de alimentos (segurança alimentar)¹⁸; à detecção de fármacos e drogas de abuso¹⁵; à detecção de explosivos para fins forenses¹⁹; à caracterização de compostos biológicos, como peptídeos e proteínas²⁰; à análise de imagem molecular²¹; e ao monitoramento de reações químicas e bioquímicas²² estão em destaque na literatura atual.

Assim, o presente trabalho baseia-se na utilização da técnica de ionização ambiente *Paper Spray Ionization Mass Spectrometry* (PS-MS), cujo mecanismo de ionização é semelhante à fonte ESI. Desse modo, o mecanismo de ionização da fonte ESI será descrito a seguir para uma melhor compreensão da técnica PS-MS.

1.1.2. Fonte de Ionização *Electrospray* (ESI)

Malcolm Dole foi o primeiro idealizador da técnica de ionização *electrospray* na década de 1960. Nesse período, Dole estava interessado em determinar a massa molecular de polímeros sintéticos, como o poliestireno, através da espectrometria de massas. Porém, Dole possuía dois impasses: transferir o polímero (um sólido não volátil) para a fase gasosa e ionizá-lo. Como muitos outros gênios na história da ciência, Dole encontrou a "solução" de seus problemas por acidente, durante uma visita a uma fábrica de automóveis, onde os carros eram pintados por um *spray* de tinta. Nesse processo, pequenas gotículas carregadas, produzidas devido à diferença de pressão existente na extremidade de saída do recipiente que continha a tinta, eram atraídas pela superfície metálica do carro. Assim, a partir de um procedimento semelhante, Dole e colaboradores desenvolveram aparelhos que produziam moléculas de poliestireno carregadas em fase gasosa com massa molecular na faixa de quilo-Dalton (kDa), a partir de uma solução desse polímero.²³ Entretanto, os resultados encontrados por Dole e seus colaboradores não foram conclusivos e apresentaram ambiguidades.

Em meados da década de 1980, John Fenn aplicou a técnica de ionização *electrospray* a soluções de sais e de pequenos íons em metanol, usando um espectrômetro de massas quadrupolar. A partir desse estudo, Fenn conseguiu demonstrar que a técnica ESI realmente poderia produzir íons positivos e negativos em fase gasosa.²⁴ Assim, em trabalhos posteriores, Fenn e colaboradores²⁵ conseguiram, enfim, demonstrar claramente que a espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS) poderia ser utilizada para análises de macromoléculas, como peptídeos e proteínas, que possuem massa molecular também na faixa de quilo-Dalton (kDa). O trabalho também demonstrou que a detecção de compostos de elevada massa molecular poderia ser feita utilizando espectrômetros de massas de faixa massa/carga (m/z) estreita, pois essas macromoléculas adquiriam múltiplas cargas "z" no processo de ionização.

A ionização por *electrospray* é uma técnica de ionização à pressão atmosférica, na qual uma solução da amostra de interesse é impulsionada através de um capilar metálico por uma alta diferença de potencial elétrico

submetida sob esse capilar. À medida que a solução percorre o capilar, a interface líquido/ar se torna cada vez mais convexa devido ao aumento gradual da intensidade do campo elétrico. Ao alcançar a extremidade do capilar, a interface líquido/ar assume um formato cônico, denominado cone de Taylor²⁶, que por sua vez gera um *spray* contendo gotículas carregadas (íons do analito já existem em solução devido ao equilíbrio químico estabelecido entre o analito e solventes capazes de doar e receber prótons - ácidos e bases de *Brønsted-Lowry*). Essas gotículas caminham em direção à entrada do espectrômetro de massas, ainda sob o efeito do campo elétrico, e nesse trajeto reduzem de tamanho devido à evaporação do solvente. Conseqüentemente, há um aumento de densidade de carga nas gotas, que explodem sucessivamente gerando uma espécie de "aerossol" com gotículas cada vez menores (explosões coulômbicas)²⁷. Por fim, íons já em fase gasosa são produzidos e adentram o espectrômetro de massas (Figura 2 e 3).

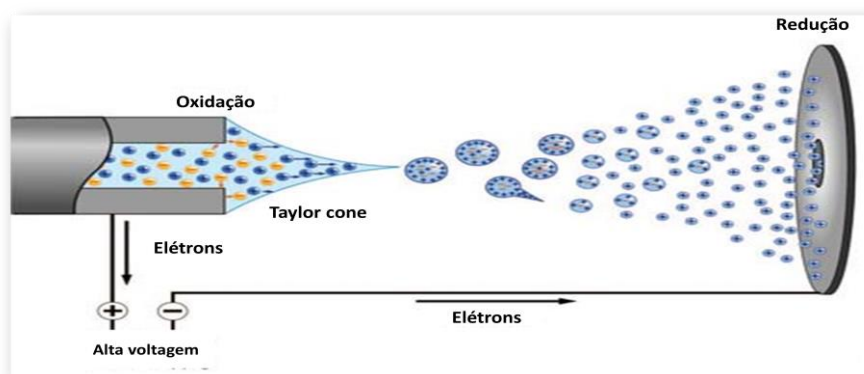


Figura 2 - Esquema da formação do *spray* na fonte de ionização *Electrospray*.

Adaptado de: http://www.waters.com/waters/pt_BR/CommonIonization. Acessado em 04/06/2016.

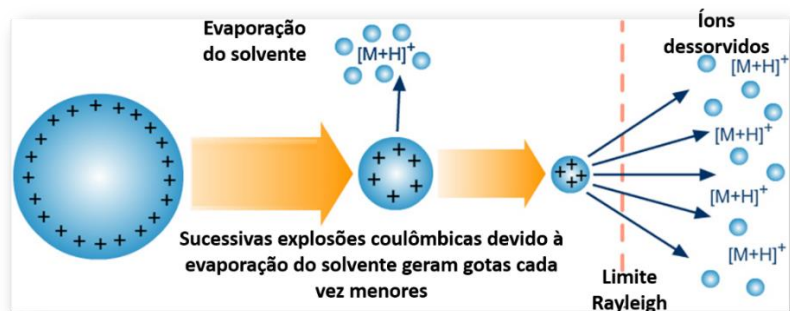


Figura 3 - Esquema do processo de dessolvatação dos íons durante a ionização *Electrospray*. Adaptado de: <http://www.chromacademy.com/Massas-Ionization>. Acessado em 04/06/2016.

Após a passagem dos íons para a fase gasosa, estes devem ser direcionados ao analisador de massas. Porém, como acoplar um compartimento sob pressão atmosférica a um compartimento que deve ser mantido sob alto vácuo (analisador de massas)? Esse impasse foi resolvido através da adaptação de um sistema de bombeamento, que consiste em dois compartimentos de vácuo intermediários, localizados entre a fonte de ionização e o analisador de massas (Figura 4). Esses compartimentos estão conectados por meio de pequenos orifícios (*skimmers* ou cones), cujo diâmetro deve ser apropriado para a passagem dos íons. A diminuição da pressão no interior desses compartimentos é feita de modo gradual através de bombas à vácuo. Assim, apenas os íons são direcionados para o analisador de massas através de um campo elétrico aplicado nesse percurso.²

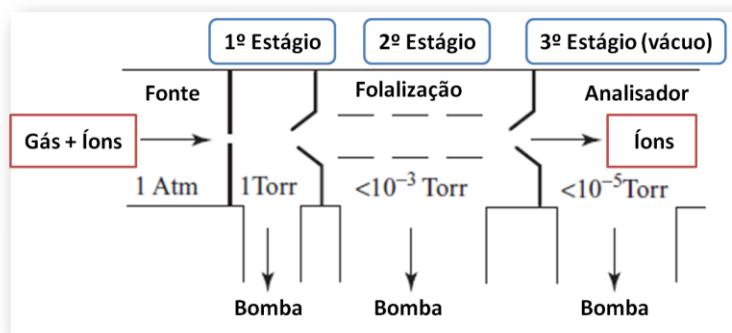


Figura 4 - Esquema do sistema de bombeamento em três estágios utilizado em fontes de ionização à pressão atmosférica. Adaptada de *Mass Spectrometry - Principles and Applications*, West Sussex, 2007.

Outro impasse estava associado ao resfriamento causado pela expansão adiabática que a solução sofre ao ser pulverizada. Esse resfriamento pode prejudicar a dessolvatação dos íons, favorecendo o surgimento de *clusters*. Assim, um tubo de transferência aquecido (cerca de 200°C) foi introduzido entre a entrada do espectrômetro e a região de pressão intermediária, descrita anteriormente, para otimizar a dessolvatação.²

Tendo em vista o mecanismo de ionização *electrospray*, bem como as adaptações necessárias para adequar uma fonte de ionização ambiente ao alto vácuo existente no analisador de massas, é possível compreender o mecanismo de ionização *paper spray* (PS), descrito a seguir.

1.1.3. Fonte de Ionização *Paper Spray* (PS-MS)

A técnica de ionização *paper spray* acoplada a espectrometria de massas (PS-MS) foi proposta inicialmente por Wang et al.¹⁷ em 2010, como uma técnica de ionização ambiente prática, simples e barata que permite a análise de matrizes complexas com o mínimo tratamento de amostra. Durante seu desenvolvimento, a primeira fonte de ionização *paper spray* foi manufaturada pelos próprios pesquisadores, sendo a maior parte dos trabalhos publicados até então também oriundos de fontes de fabricação caseira. Entretanto, um modelo comercial da fonte *paper spray*, denominado Prosolia Velox 360™ PaperSpray™ System, produzido pela empresa Thermo Fisher Scientific®, já pode ser encontrado no mercado.

A técnica de ionização *paper spray* consiste na adição de um pequeno volume de amostra (cerca de 5 a 10 µL) sob um pedaço de papel cortado em forma triangular, posicionado em frente à entrada do espectrômetro de massas, que em seguida é umedecido com uma mistura de solventes capazes de receber e doar prótons – ácidos e bases de *Brønsted-Lowry* (comumente metanol/água ou acetonitrila/água). Esses solventes favorecem o processo de ionização, uma vez que estabelecem equilíbrios químicos com os analitos, gerando espécies ionizadas no papel umedecido. Por fim, a dessolvatação dos íons ocorre de modo semelhante ao ESI, na qual a aplicação de uma alta diferença de potencial (~5 kV) à base do papel promove a formação de um *spray* contendo íons do analito, que são "expulsos" da ponta do papel e adentram o espectrômetro (Figura 5).²⁸ Ao contrário da ESI, a PS-MS não

necessita de gases inertes, tais como nitrogênio, para auxiliar o processo de secagem das gotas durante o processo de ionização.

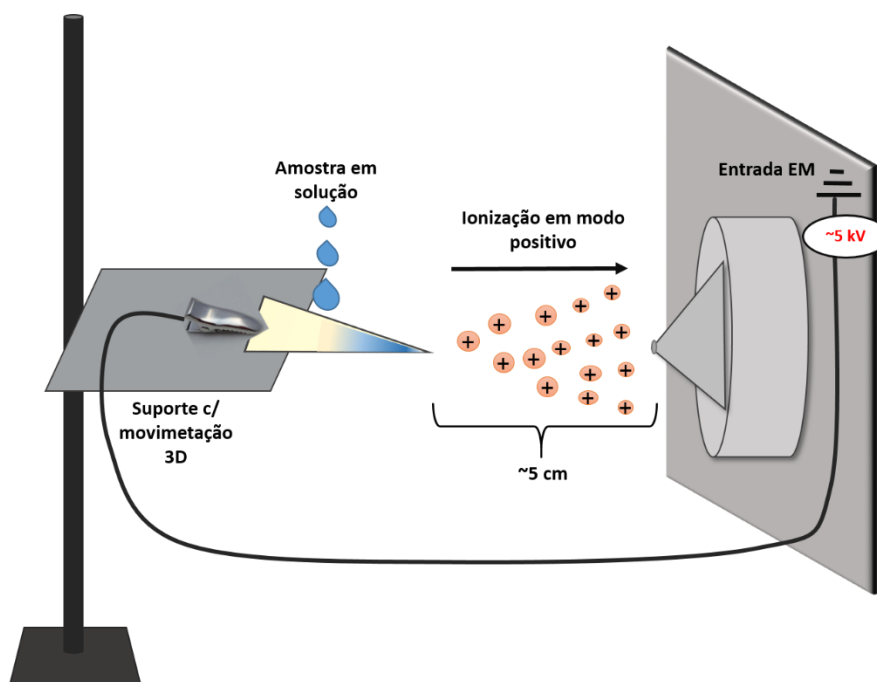


Figura 5 - Esquema do processo de ionização PS-MS.

O mecanismo de ionização PS ainda não é totalmente compreendido, porém, existem trabalhos publicados que relatam com mais detalhes o mecanismo de formação do *spray*, bem como a influência de variáveis, *i.e.* tipo de papel e seu posicionamento em frente ao espectrômetro; a angulação da ponta do papel; o tipo de solvente mais adequado para formação das gotas; e o volume e concentração da amostra adicionada ao papel.

O processo PS, basicamente, pode ser dividido em dois eventos distintos quanto à formação do *spray*²⁹ (Figura 6). O primeiro evento ocorre no início do processo, com o sistema ainda "rico" em solvente, no qual múltiplos cones de Taylor são formados após a aplicação de uma alta voltagem ao papel, gerando gotas de diferentes tamanhos. O segundo evento ocorre quando o papel já está quase seco devido à evaporação do solvente, no qual íons do analito são expulsos da ponta do papel praticamente dessolvatados, gerando uma alta corrente (~1A), denominada descarga corona³⁰. Apesar da diminuição gradual do tamanho das gotas durante o processo PS, em ambos os modos as gotículas geradas têm a mesma velocidade, cerca de 6 m.s⁻¹, velocidade essa suficiente para que os íons sejam transferidos da ponta do

papel à entrada do espectrômetro de massas em condições ambiente. O primeiro modo gera sinais analíticos mais estáveis e duradouros do que os observados durante o segundo modo, uma vez que não há mais *spray* após a descarga corona, perdendo-se, assim, o sinal analítico. Entretanto, apesar de sua curta duração, o segundo modo favorece a formação de espécies radicalares, sendo muito útil para a análise de substâncias de difícil ionização.²⁹

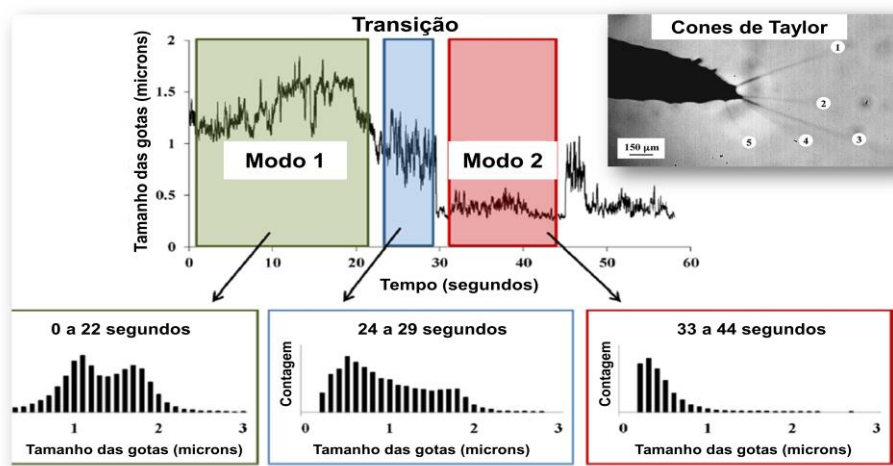


Figura 6 - Formação do spray: modo 1 - sistema rico em solvente produz gotas de diversos tamanhos através de múltiplos cones de Taylor; modo 2 - gotas menores são produzidas devido à secagem do solvente (descarga corona). Adaptada de Cooks *et. al.*, 2012.²⁹

Com relação ao tipo de papel, Cooks e colaboradores²⁸ investigaram quatro tipos de papéis de filtro com diferentes diâmetros de poro (3, 4-7, 8 e 11 μm), um papel de fibra de vidro e um papel cromatográfico de 0,18 mm de espessura, utilizando 10 μL de uma solução de cocaína em metanol/água (200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) como solução modelo. Os resultados indicaram que o melhor desempenho (obtenção de espectros de alta qualidade com a maior relação sinal/ruído) foi alcançado quando papel cromatográfico foi utilizado. Uma explicação plausível é o fato de o papel cromatográfico possuir fibras ordenadamente espaçadas, o que facilita a percolação do solvente pelo papel, originando cones de Taylor mais bem orientados em direção à entrada do espectrômetro. Esse mesmo estudo avaliou a influência do posicionamento do papel em relação à intensidade do sinal analítico referente à cocaína. Para tal,

foi feita uma varredura de possíveis posicionamentos do papel dentro de uma área de 24 cm² em frente à entrada do espectrômetro de massas. Os dados foram colhidos a cada incremento de 2 mm na posição do papel em cada uma das duas direções (como ilustrado na Figura 7). Os resultados revelaram que o posicionamento da ponta do papel em frente ao espectrômetro de massas dentro de uma área de cerca de 5 × 10 mm (plano x-y) proporcionou as maiores intensidades do sinal referente à cocaína (Figura 7).

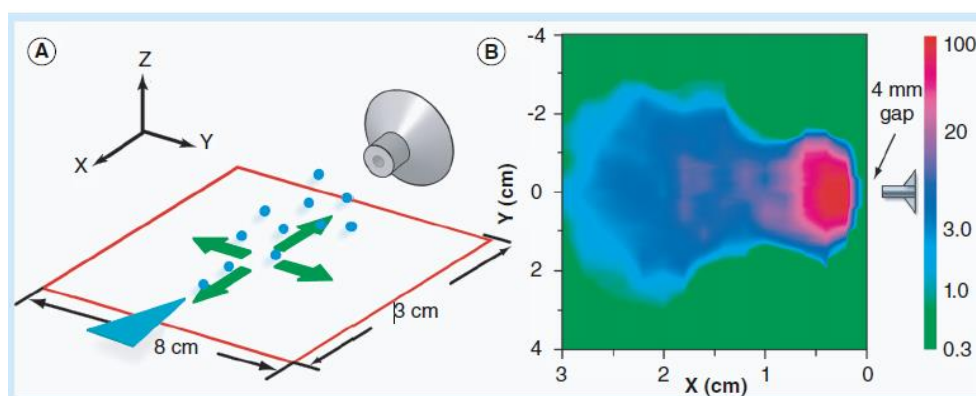


Figura 7 - A- posicionamentos do papel avaliados em uma área de 24 cm². B- intensidade do sinal referente à cocaína em função do posicionamento do papel. Adaptada de Cooks *et.al.*, 2010.²⁸

O ângulo da ponta do papel é um outro fator que pode influenciar na intensidade do sinal analítico em uma análise PS-MS. A intensidade do sinal analítico está diretamente associada à corrente elétrica do *spray*, à amplitude do *spray* e ao campo elétrico existente entre a ponta do papel e a entrada do espectrômetro, variáveis essas que dependem da angulação do papel. Ouyang e colaboradores³¹ avaliaram essas variáveis, relacionando a intensidade do sinal referente a uma solução de cocaína de 1 µg.mL⁻¹ em metanol/água (1:1) a papéis com diferentes angulações (30, 60, 90, 120, 150°). A partir dos resultados (Figura 8), os pesquisadores concluíram que o diâmetro do *spray*, em geral, diminui com o aumento do ângulo do papel. Conseqüentemente, um número reduzido de gotículas consegue adentrar o espectrômetro, o que diminui a intensidade do sinal analítico. A variação da intensidade do sinal analítico em relação à angulação não é monotônica, uma vez que um aumento foi observado até 90° e uma diminuição até 150°. Para voltagens acima de 3

kV, maiores correntes elétricas foram observadas para os menores ângulos da ponta do papel. A mesma tendência foi observada para campo elétrico, que aumentou à medida que o ângulo do papel diminuiu. Assim, o trabalho concluiu que menores ângulos são capazes de gerar *sprays* mais estáveis, e conseqüentemente, sinais analíticos mais intensos.

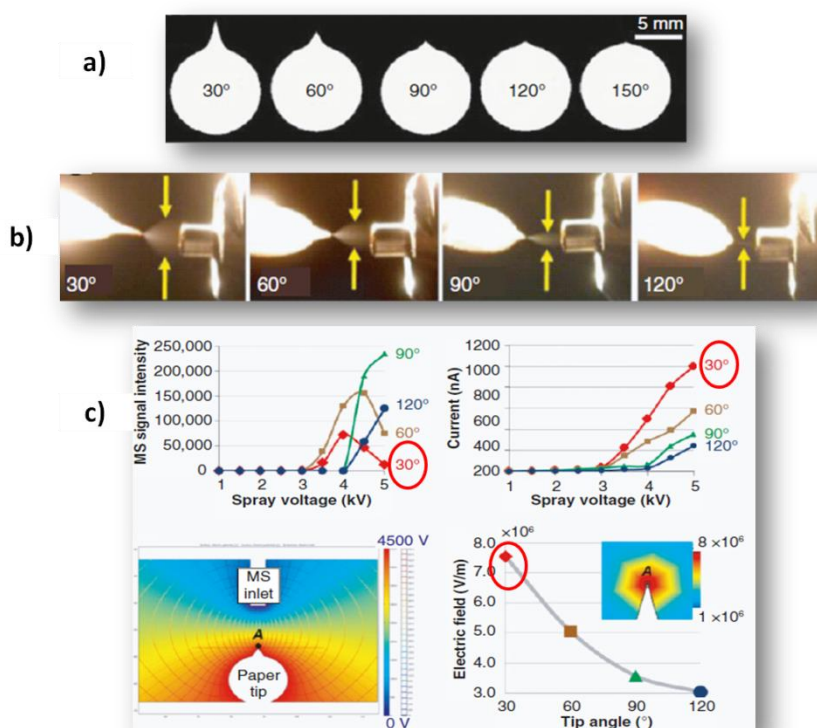


Figura 8 - a) Diferentes ângulos do papel durante a geração do *spray*- papéis cortados em forma circular para garantir que o *spray* seria formado apenas na extremidade. b) Amplitude do *spray* para diferentes ângulos - a formação de *spray* não foi observada em 150°. c) intensidade do sinal analítico e da corrente do *spray* em função da voltagem do *spray* e a variação do campo elétrico em função do ângulo do papel. Adaptada de Ouyang *et. al.*,2010.³¹

Os solventes utilizados em PS-MS são os mesmos indicados para ESI-MS (misturas de água/metanol e água/acetonitrila), ou seja, ácidos e bases de *Brönsted-Lowry* que estabelecem equilíbrios químicos com os analitos do meio, doando e recebendo prótons para formar espécies carregadas em solução. Entretanto, o volume e a concentração da amostra adicionada ao papel podem interferir na durabilidade do *spray* e, conseqüentemente, na intensidade do sinal analítico durante o processo de ionização. Segundo Ouyang e

colaboradores²⁸, quanto maior o volume de amostra e a concentração do analito, maior será a durabilidade do *spray* e a intensidade do sinal analítico.

1.1.4 Modificações da técnica PS-MS

A simplicidade da ionização PS e sua versatilidade quanto ao estado físico da amostra analisada abriu um leque de possibilidades para modificações que pudessem difundir ainda mais o uso dessa técnica de ionização ambiente. Essas modificações variam entre o desenvolvimento de dispositivos que aperfeiçoam o processo de ionização PS até modificações na superfície do papel para otimizar ainda mais a análise compostos de diferentes polaridades.

Dispositivos

Dentre essas modificações que foram desenvolvidas para otimizar o processo de ionização PS, podemos citar a *Nib-assisted PS*³², a *Droplet monitoring*³³ e a *high-throughput PS*³⁴ como as mais relevantes até então (Figura 9). A *Nib-assisted PS*³² consiste em um dispositivo que introduz solvente de maneira contínua ao papel, mantendo-o constantemente úmido durante a análise (Figura 9a). Tal modificação evita variações no fluxo do *spray*, facilitando a obtenção de sinais analíticos mais estáveis e reprodutivos. Outra modificação que também tem o intuito de evitar variações no fluxo do *spray* é a *Droplet monitoring*³³ (Figura 9b), na qual gotículas da amostra são geradas em um tubo capilar – posicionado perpendicularmente ao papel – através de força gravitacional e atração eletrostática. Assim, o volume e o fluxo das gotículas podem ser controlados, o que permite o monitoramento de sistemas em fluxo, já que espectros podem ser adquiridos para cada gotícula gerada. Já o *high-throughput PS*³⁴ (Figura 9c), é um dispositivo que visa acelerar o processo de análise como um todo, uma vez que consiste em uma plataforma móvel que possui vários papéis triangulares posicionados lado a lado, permitindo a análise sequencial de várias amostras e dispensando a presença de um analista durante a realização de cada análise.

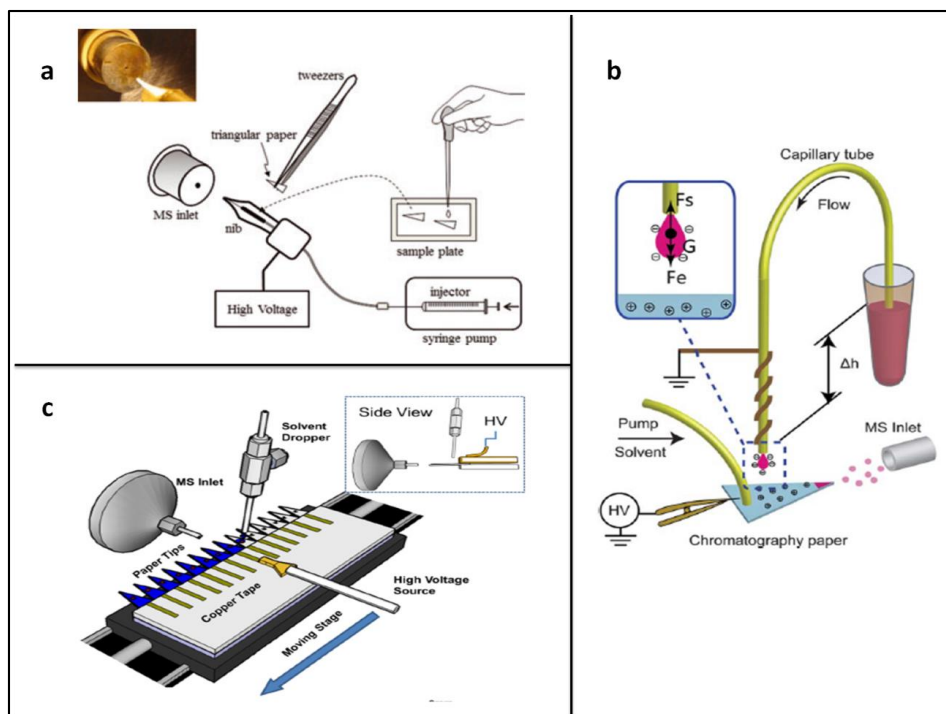


Figura 9 - Dispositivos a) Nib-assisted PS, b) Droplet monitoring e c) high-throughput PS. Imagens adaptadas das referências [31], [32] e [33], respectivamente

Modificações no papel

Muitas das vantagens atribuídas à técnica PS, *e.g.* minimização de efeitos de matriz, estão diretamente relacionadas às propriedades físico-químicas do papel utilizado como suporte amostral. Porém, as fortes interações químicas – ligação hidrogênio, dipolo-dipolo e dipolo induzido-dipolo induzido – estabelecidas entre o papel e analitos contendo grupos funcionais polares (fármacos, drogas de abuso, pesticidas, peptídeos, proteínas, etc.) podem dificultar a eluição e, conseqüentemente, o processo de ionização.³⁵ Assim, as modificações na superfície do papel visam alterar a afinidade existente entre o papel e o analito para minimizar efeitos de retenção, otimizando a sensibilidade e reprodutibilidade da técnica PS.

As modificações na superfície do papel podem ser feitas através da deposição física e/ou química de compostos de diferentes polaridades no papel. A deposição física pode ser feita por meio de simples processos de filtração à vácuo e imersão³⁶, onde uma suspensão do material depositado é colocada em contato com o papel. Já a deposição química ocorre através de

reações químicas que promovem a alteração dos grupos funcionais expostos na superfície do papel.³⁷

Trabalhos já publicados utilizando a deposição física de sílica³⁸ e óxidos metálicos (ZrO₂)³⁵, e a deposição química de ureia³⁷ ao papel, obtiveram menores limites de detecção e quantificação durante a análise de diferentes matrizes quando comparados aos resultados obtidos utilizando papeis não tratados. Outros estudos, que utilizaram nanotubos de carbono suportados no papel obtiveram espectros característicos de aminoácidos, antibióticos e pesticidas em baixas concentrações aplicando-se baixas voltagens, inferiores a 3 kV, evitando fragmentações na fonte sem perda de sensibilidade.³⁹ Parafina também já foi utilizada para criar canais na superfície do papel e evitar a dispersão da amostra, o que também favorece a estabilização do sinal analítico obtido durante a aquisição de espectros.^{40,41}

1.1.5 Técnicas similares à PS-MS

Outros materiais, além do papel, deram origem a outras técnicas de ionização semelhantes que vêm sendo utilizadas para promover análises qualitativas de diversas matrizes cujo objetivo é a obtenção de "*fingerprints*", ou seja, a obtenção de um conjunto de íons que caracterizam uma dada amostra.

Leaf Spray

A técnica *Leaf Spray*^{42,43} (Figura 10a) utiliza folhas vegetais cortadas em forma triangular para gerar o perfil bioquímico de plantas vivas, no qual informações em tempo real a respeito de seus metabólitos (açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídios e alcalóides, etc.) podem ser obtidas. A ionização ocorre de modo prático por meio da aplicação de uma alta diferença de potencial à base da folha triangular, previamente umedecida com solvente e posicionada em frente ao espectrômetro de massas.

A técnica é empregada geralmente sem fins de quantificação e já foi usada na diferenciação de espécies de plantas pertencentes à mesma família para identificação da espécie com poder medicinal.⁴⁴⁻⁴⁸ Outra aplicação é a determinação de pesticidas em folhas de frutos e vegetais para controle de

qualidade de alimentos.^{49,50} Além disso, a técnica já foi empregada na diferenciação de plantas infectadas e não infectadas por pragas⁵¹ e na diferenciação de espécies tóxicas e não tóxicas de plantas utilizadas na produção de biodiesel, cujo subproduto é utilizado na fabricação de ração animal.⁵²

Tissue Spray

A técnica de ionização *Tissue Spray*^{53,54} (Figura 10b) é mais uma técnica que busca a obtenção de "*fingerprints*" de diversas matrizes. A técnica consiste na análise direta de tecidos vegetais (flores, talos, raízes, fruto e sementes) e animais, na qual uma grande diferença de potencial é aplicada a um pedaço do tecido cortado em forma triangular (previamente umedecido com solvente) para obtenção de perfis químicos característicos das amostras. Alguns trabalhos utilizam a terminologia *Touch Spray* para se referir a essa técnica, uma alusão ao fato de que apenas um "toque" na amostra com o auxílio de um clipe metálico se faz necessário para promover a ionização dos analitos.

Considerando tecidos vegetais, a técnica já foi empregada na identificação de falsificações em matrizes alimentares, na qual o perfil fitoquímico de *ginsengs* e cafés cultivados em diferentes localidades puderam ser distinguidos.^{54,55} Além disso, espécies de ginkgo (uma poderosa planta medicinal de origem chinesa) e estágios de maturação de frutas também já foram estudados através da *Tissue Spray*.⁵⁶ Já para os tecidos animais, a técnica vem sendo empregada em exames de biópsia para o diagnóstico de diversos tipos de câncer (câncer de pulmão, rins, endométrio e tumores cerebrais)⁵⁷⁻⁶⁰, uma vez que tecidos tumorais apresentam perfis químicos distintos dos de tecidos saudáveis.

A própria seringa utilizada para retirada da amostra tecidual pode ser utilizada durante a análise. Basta posicionar a seringa em frente ao espectrômetro de massas e aplicar a diferença de potencial ao corpo metálico da seringa.⁶¹

Wooden Tip Spray

A utilização de um palito de dente no lugar do papel deu origem à técnica *Wooden tip spray*⁶² (Figura 10c). Nessa abordagem a amostra é aderida ao palito através de sua simples imersão na amostra de interesse. A ionização ocorre de modo semelhante aos já descritos anteriormente, na qual uma intensa diferença de potencial aplicada na extremidade do palito, previamente umedecido com solvente, propicia a expulsão dos analitos ionizados. A técnica é aplicável a diversos tipos de amostra (soluções homogêneas, suspensões, suspensões secas, sólidos pulverizados, etc.) e possui a vantagem de permitir a amostragem *in situ* em locais remotos, como cantos e pequenos orifícios. A natureza porosa e as propriedades hidrofílicas da madeira favorecem o acúmulo da amostra no palito, proporcionando a obtenção de sinais analíticos mais estáveis e duradouros do que no papel durante o processo de ionização.

Com relação à natureza química dos analitos, trabalhos já publicados demonstraram sua capacidade quanto a análise de compostos orgânicos, organometálicos, peptídeos e proteínas, o que evidencia o potencial dessa técnica quanto à análise de matrizes alimentares e ambientais.⁶²⁻⁶⁵

Além disso, a superfície do palito também pode ser funcionalizada, através de reações químicas como sulfonação ou silanização, para aumentar o poder de retenção do palito quando imerso em soluções muito diluídas, como por exemplo, águas superficiais contaminadas por fármacos.⁶⁶

Glass Spray

Lâminas de vidro para microscópio também já foram utilizadas como suporte amostral para análises por espectrometria de massas com ionização ambiente e deram origem a técnica denominada *Glass Spray Mass Spectrometry* (GS-MS) (Figura 10d).⁶⁷ A técnica consiste no posicionamento de uma das quinas de uma lâmina de vidro (carregada com a amostra) em frente à entrada do espectrômetro de massas. A aplicação de uma diferença de potencial em uma das extremidades da lâmina propicia a ionização e a ejeção de íons da amostra por meio do *spray* formado na quina da lâmina.

As lâminas de vidro também podem ser previamente cortadas em forma triangular para facilitar seu posicionamento durante as análises e, ao contrário do papel, podem ser reutilizadas entre as análises, já que podem ser higienizadas sem nenhum dano estrutural. Além disso, o vidro é uma superfície mais "limpa" e inerte do que o papel, o que propicia a obtenção de espectros mais característicos das amostras.⁶⁷

Essa técnica ainda não foi muito explorada na literatura, apesar de seu grande potencial. Assim, seu uso até então se resumiu a duas possíveis aplicações: no monitoramento de reações químicas envolvendo polimerização⁶⁷, onde o progresso da reação pode ser acompanhado em tempo real; e em ensaios para testes de absorção de fármacos utilizando cultura de células, nos quais avaliações qualitativas e quantitativas a respeito da eficiência desses medicamentos puderam ser facilmente efetuadas e reproduzidas.⁶⁸

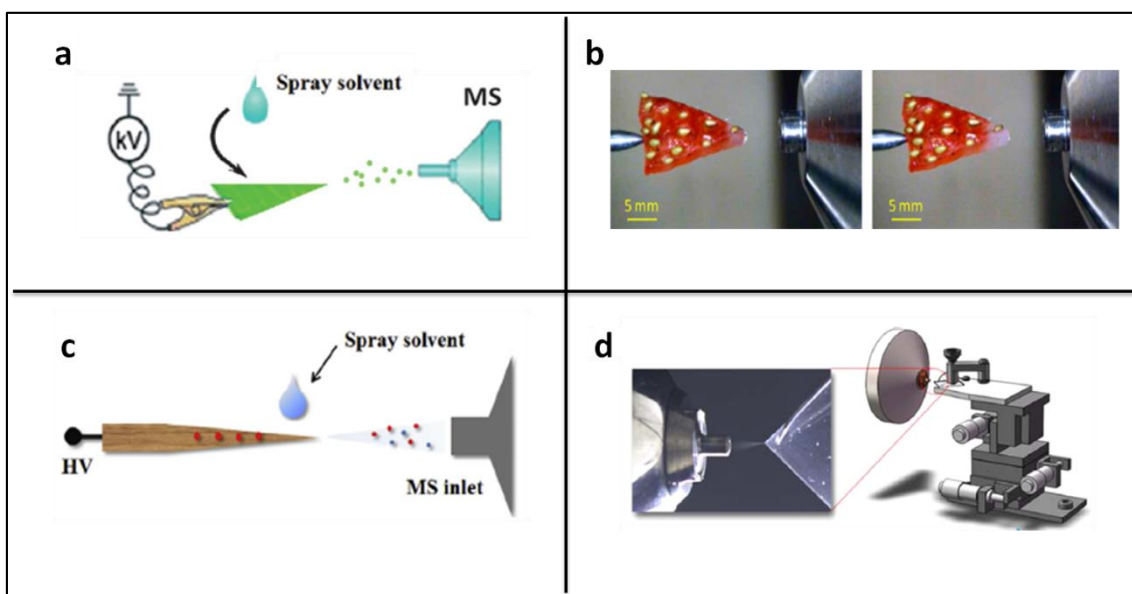


Figura 10 - Representação gráfica das técnicas de ionização ambiente (a) Leaf Spray (b) Tissue Spray (c) Wooden Tip Spray e (d) Glass Spray. Imagens adaptadas das referências [47], [55], [65] e [66], respectivamente.

Assim, por meio do emprego dessas modificações e técnicas similares, vários trabalhos que utilizam os princípios da PS-MS já foram publicados. Dentre essas publicações destacam-se o estudo de tecidos biológicos para

determinação de fármacos em sangue e urina^{69,70}, a determinação de aditivos e contaminantes em gêneros alimentícios^{38,71}, a discriminação de cafés por meio de suas origens⁵⁵ e a diferenciação de medicamentos fitoterápicos⁷². Em ciências forenses, a técnica PS-MS vem se mostrando muito promissora e já foi aplicada na análise direta de drogas de abuso e de seus metabólitos presentes em sangue e urina⁷³, na detecção de resíduos de cocaína em superfícies compostas por diferentes materiais⁷⁴ e na análise de documentos por meio da discriminação de corantes de canetas esferográficas.⁷⁵

Mais recentemente, a PS-MS também vem sendo empregada no monitoramento de reações químicas que envolvem a derivatização de analitos de difícil ionização⁷⁶ e na aceleração de sínteses orgânicas⁷⁷.

1.2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral empregar a técnica analítica *Paper Spray Mass Spectrometry* (PS-MS) em dois temas distintos de grande relevância atual: análises de cunho forense e monitoramento e aceleração de reações químicas.

Em forense, a técnica PS-MS foi aplicada na identificação e quantificação de amostras de drogas de rua contendo cocaína, que foram simuladas em laboratório utilizando diferentes matrizes (farinha de trigo, ácido bórico e bicarbonato de sódio), com o intuito de obter resultados mais conclusivos do que os obtidos através das técnicas colorimétricas normalmente empregadas. A técnica também foi utilizada na identificação e quantificação de benzodiazepínicos em diferentes bebidas (cerveja, vodka, refrigerante e suco) dopadas com esses medicamentos, com a intenção de comprovar a ocorrência do golpe "Boa noite, Cinderela" de modo mais rápido e econômico do que os alcançados através das técnicas instrumentais comumente empregadas.

Para o monitoramento de reações químicas, a técnica PS-MS foi empregada para monitorar reações que ocorrem em equilíbrio químico dinâmico, como o sistema reversível estabelecido entre zinco metálico (agente redutor) e o azul de metileno em solução ácida, onde fatores que interferem nesse equilíbrio foram avaliados *in situ*. A técnica também foi utilizada para

acelerar reações normalmente lentas quando realizadas em escala de bancada, como a reação entre o anidrido ftálico e compostos nitrogenados para formação de derivados de ftalimidas, onde possíveis produtos e intermediários da reação foram identificados em tempo real.

Capitulo 2 - Análises de Cunho
Forense

2.1 Determinação de cocaína em amostras de drogas de rua simuladas em laboratório através da espectrometria de massas com ionização *Paper Spray*

2.1.1 Introdução

Segundo a *United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)* em seu relatório oficial *World Drug Report 2017*, cerca de 250 milhões de pessoas no mundo são usuárias de drogas, sendo que 7% desse valor – aproximadamente 17 milhões de pessoas – se refere a usuários de cocaína. Dados atuais sobre produção, tráfico e uso de drogas apontam para uma expansão global do mercado de cocaína. Após um período de declínio, o cultivo de coca aumentou cerca de 30% entre os anos de 2013 a 2015, principalmente como resultado do cultivo na Colômbia. A fabricação global de cloridrato de cocaína pura atingiu 1,125 toneladas em 2015, porém as quantidades de cocaína apreendidas também aumentaram, alcançando um nível recorde de 864 toneladas em 2015.⁷⁸

Os maiores consumos e tráficos deste entorpecente estão localizados nas Américas, principalmente América do Norte, Europa e Oceania. Entretanto, sua disponibilidade no mercado tem caído nessa região nos últimos dois anos, devido ao aumento das apreensões realizadas por autoridades locais. Na América do Sul, o consumo e o tráfico tem se elevado, principalmente no Brasil, devido a fatores como localização geográfica, já que o país faz fronteira com os principais países produtores (Bolívia, Colômbia e Peru). Além disso, o aumento de população urbana brasileira e a falta de investimento na área de segurança pública dificultam a ação das autoridades locais no controle e combate ao tráfico. Segundo dados da Polícia Federal Brasileira, cerca de 45 toneladas de cocaína foram apreendidas no Brasil em 2017 – a maior apreensão anual já feita pela Polícia Federal.⁷⁹ Entretanto, ainda segundo o *World Drug Report 2017*, o número de usuários de cocaína no Brasil ainda cresce, sendo que cerca de 1,75 % da população adulta brasileira já consumiu ou consome essa substância ilícita.^{78,80} Assim, tendo em vista o crescente número de apreensões de cocaína no mundo e no Brasil, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de métodos de análise rápidos e baratos

que confirmem, de modo irrefutável, a presença de cocaína nas amostras apreendidas e que satisfaçam essa grande demanda.

Rotineiramente, a detecção preliminar de cocaína é feita através de testes de triagem, para uma pré-seleção das amostras que passarão por análises instrumentais. O teste colorimétrico de Scott modificado é um dos testes mais empregados e é caracterizado pela formação de um complexo azul na presença de cocaína. Esse teste é empregado em três etapas, sendo a primeira a adição de uma solução de tiocianato de cobalto em ácido acético e glicerina, a segunda a adição de ácido clorídrico concentrado e a terceira a adição de clorofórmio à amostra de interesse. A primeira etapa não é exclusiva para cocaína, havendo aparecimento de coloração azul também na presença de outras substâncias, como benzocaína e lidocaína. Porém, a execução das três etapas é específica para cocaína, indicando um resultado positivo para o teste colorimétrico de Scott modificado quando observado o aparecimento de um complexo de coloração azul após a adição de clorofórmio.^{81,82} As amostras tidas como positivas passam, posteriormente, por análises cromatográficas como *High Performance / Pressure Liquide Chromatography* (HPLC) e *Gas Chromatography* (GC) acopladas a Espectrometria de Massas para confirmação dos resultados.^{83,84}

Assim, a função do teste colorimétrico é reduzir o número de amostras que passarão por análises cromatográficas, que normalmente são delongadas e utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos com alto grau de pureza, como metanol e acetonitrila, que são de custo elevado. Entretanto, o teste colorimétrico de Scott modificado está sujeito a erros, devido a diversos fatores que podem gerar resultados falso-positivos (detecção de cocaína em amostras que não possuem esse analito) e resultados falso-negativos (não detecção de cocaína em amostras que possuem esse analito). Dentre esses fatores podemos citar: a massa de amostra utilizada durante o teste, a quantidade de cocaína e de outros interferentes presentes na amostra e a proporção correta entre os reagentes utilizados para execução do teste.^{81,82,85}

As amostras de droga de rua apreendidas como cocaína, normalmente, apresentam coloração branca à amarelada e são consideradas matrizes complexas devido a sua composição química extremamente diversificada. Em geral, os traficantes adicionam substâncias com o aspecto físico semelhante ao

da cocaína – compostos pulverizados de coloração branca, como gesso, vidro moído, farinha de trigo, ácido bórico, bicarbonato de sódio, amido de milho, entre outros – no intuito de diluir a porção da droga mais concentrada e obter um volume final maior para a venda de porções. Para mascarar essa diluição, os criminosos também adicionam substâncias estimulantes que simulam alguns efeitos psicoativos da cocaína, tais como cafeína⁸⁶ – um estimulante natural –, lidocaína e benzocaína⁸⁷ – anestésicos de ação local. Isso mostra que as amostras de cocaína apreendidas nas ruas possuem composição química muito variável, que limitam e dificultam a aplicação do teste colorimétrico de Scott, que por sua vez, perde a finalidade de reduzir de modo confiável o número de amostras que devem passar por análises cromatográficas.

Nesse contexto, esse trabalho propõe um método alternativo para a determinação de cocaína em amostras de drogas de rua em laboratório, capaz de fornecer resultados confiáveis em pouco tempo, dispensando análises cromatográficas. Para tal, um simples preparo de amostras foi utilizado, no qual as amostras foram apenas solubilizadas em metanol e filtradas para posterior análise direta no Espectrômetro de Massas, utilizando a técnica de ionização *Paper Spray*. As amostras de droga utilizadas para o desenvolvimento dessa metodologia foram preparadas em laboratório na tentativa de simular formulações que podem gerar resultados errôneos quando aplicado o método colorimétrico descrito. Deste modo, foram escolhidas três substâncias diluentes (farinha de trigo, ácido bórico e bicarbonato de sódio) e dois adulterantes (cafeína e lidocaína) para o preparo das amostras, compostos estes rotineiramente utilizados pelos traficantes por serem de baixo custo e de fácil aquisição em lojas locais e farmácias.

2.1.2 Parte Experimental

Materiais e Instrumentação

Para o preparo das amostras foram utilizados os seguintes reagentes e materiais: metanol grau HPLC, adquirido da J.T. Baker Chemicals (Center Valley, PA, EUA); padrões de cafeína e lidocaína, adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI); cocaína, purificada e cedida pela Seção Técnica de Química e Física do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de

Minas Gerais; farinha de trigo e bicarbonato de sódio; adquiridos em lojas locais; ácido bórico, adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI); papel cromatográfico, adquirido da empresa Whatman International Ltd (Maidstone, Inglaterra); filtros de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 33 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro, fabricados pela empresa Millex; balança analítica (Shimadzu Corporation, modelo AUX 220); agitador de tubos (Phoenix, modelo AP 56) e centrífuga (Centribio, modelo 80-2b).

Todos os experimentos PS-MS foram realizados utilizando um espectrômetro de massas Thermo LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) no modo positivo de leitura de íons. As condições instrumentais utilizadas foram: voltagem aplicada ao papel, de 3,5 à 5,0 kV; temperatura capilar, 275 ° C; voltagem do capilar, 35 V; voltagem na lente do tubo, 65 V. Os espectros de massas *full scan* foram adquiridos ao longo de um intervalo de 80-450 *m/z*.

Preparo das amostras

As amostras de droga simuladas foram preparadas inicialmente a partir de duas composições distintas, denominadas como Base A e Base B, às quais se adicionou, posteriormente, quantidades crescentes de cocaína. A Base A foi composta por ácido bórico / bicarbonato de sódio / lidocaína / cafeína, enquanto a Base B foi preparada com ácido bórico / farinha de trigo / lidocaína / cafeína. A proporção de cada substância citada acima foi 40, 40, 10, e 10% m/m em cada base, respectivamente. Essa proporção foi definida mediante a composição química das amostras rotineiramente analisadas pela Seção Técnica de Química e Física do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais. Para assegurar a homogeneidade, as bases foram preparadas em sacos plásticos, que foram manualmente e vigorosamente agitados durante três minutos. As amostras simuladas foram então preparadas em triplicata utilizando as bases, através da adição de cocaína a cada base nas seguintes proporções: 0 / 0,1 / 0,5 / 1,0 / 3,0 e 5,0 % m/m, sendo a massa final de cada amostra 1,0 g. As misturas finais foram novamente agitadas durante três minutos. As proporções de cocaína acima foram escolhidas afim de se demonstrar a eficiência do método proposto mesmo quando aplicado em amostras com baixo teor desse analito, uma vez que amostras de droga de rua

comumente apreendidas pela polícia apresentam concentração acima de 5 % m/m. Para as análises PS-MS, as amostras foram colocadas em tubos para centrifugação de 15,0 mL, aos quais foram acrescentados 10,0 mL de metanol. As suspensões foram agitadas em um agitador de tubos, centrifugadas e filtradas. Por fim, 10 µL dos extratos finais foram analisadas por PS-MS.

Análises quantitativas

Curvas analíticas para ambas as bases foram construídas utilizando as amostras, cujo preparo foi descrito acima. Para tal, a razão entre as intensidades totais dos sinais referentes à cocaína protonada (m/z 304) e à lidocaína protonada (m/z 235, utilizada como padrão interno) foram plotadas em função das concentrações de cocaína nas amostras. O desvio padrão relativo foi calculado através da análise de 13 replicatas de amostras contendo 1% m/m de cocaína. O limite de detecção (LD) foi obtido pela média e desvio padrão das razões entre as intensidades totais dos sinais de m/z 304 e m/z 235 de sete amostras brancas independentes que continham apenas as bases (sem adição de cocaína).

Análises PS-MS

Para as análises PS-MS, uma alíquota de 10 µL de cada extrato foi adicionada a um triângulo de papel – com dimensões de 10 mm de altura e 5 mm de largura na base – posicionado a 5 mm de distância da entrada do espectrômetro de massas, aproximadamente. Em seguida, uma alta voltagem (de 3,5 a 5,0 kV) foi aplicada ao papel por meio de um clipe metálico, fixado em uma plataforma com movimentação tridimensional. Para evitar efeitos de memória, foi utilizado um papel triangular para cada amostra analisada. Cada espectro foi colhido em cerca de 40 s.

Para comprovação dos resultados foram obtidos os espectros de fragmentação do padrão de cocaína utilizado, bem como das amostras que continham as menores porcentagens de cocaína (0,1% m/m), utilizando uma energia de colisão de 12 % (unidade do fabricante).

A Figura 11 resume a metodologia proposta, desde a chegada de uma amostra suspeita ao laboratório até a obtenção do espectro que comprova a presença de cocaína na amostra.

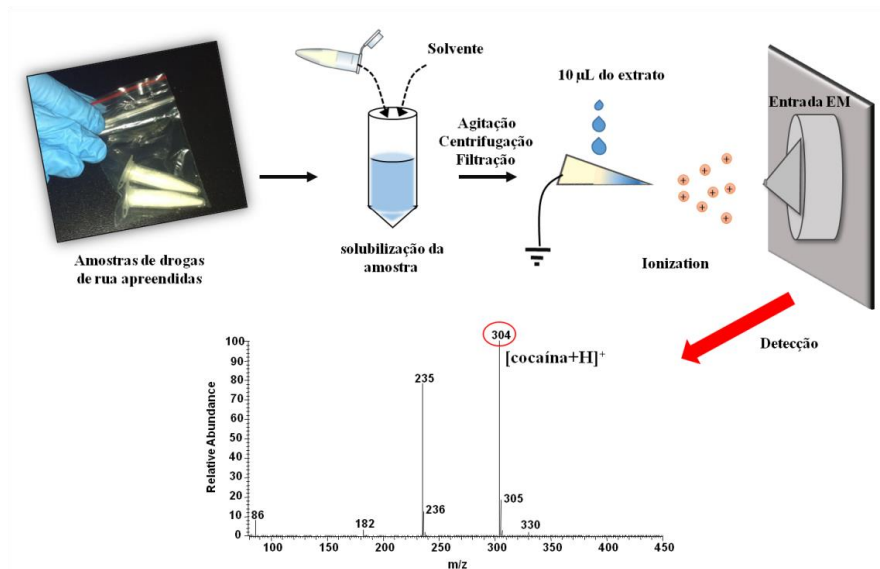


Figura 11 - Ilustração da metodologia proposta para identificação de cocaína em amostras de droga de rua utilizando a técnica PS-MS.

2.1.3 Resultados e discussão

Todas as análises realizadas por PS-MS foram feitas no modo positivo de leitura de íons, uma vez que as estruturas moleculares dos analitos (Figura 12) possuem sítios básicos (bases de *Brønsted-Lowry*) propícios para protonação.

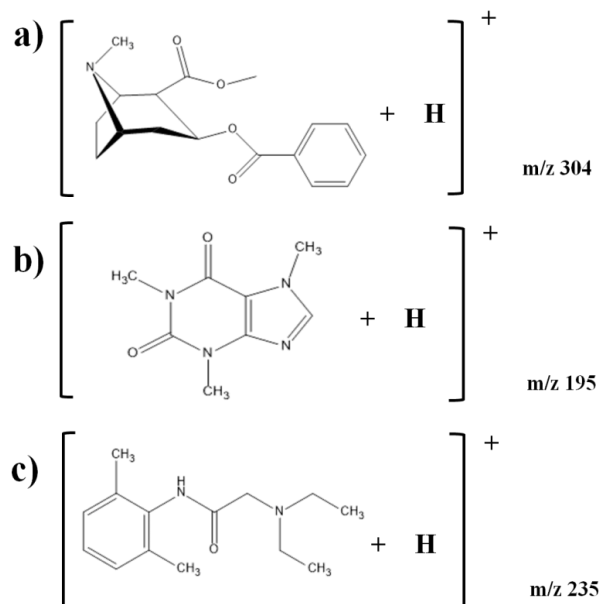


Figura 12 - Estruturas químicas protonadas dos analitos (a) cocaína, (b) cafeína e (c) lidocaína adicionados e suas respectivas razões massa/carga (m/z)

As Figuras 13 e 14 se referem aos espectros obtidos durante as análises PS-MS das amostras de droga preparadas com a base A (composta por ácido bórico, bicarbonato de sódio, lidocaína e cafeína) e a Base B (composta por ácido bórico, farinha de trigo, lidocaína e cafeína), respectivamente.

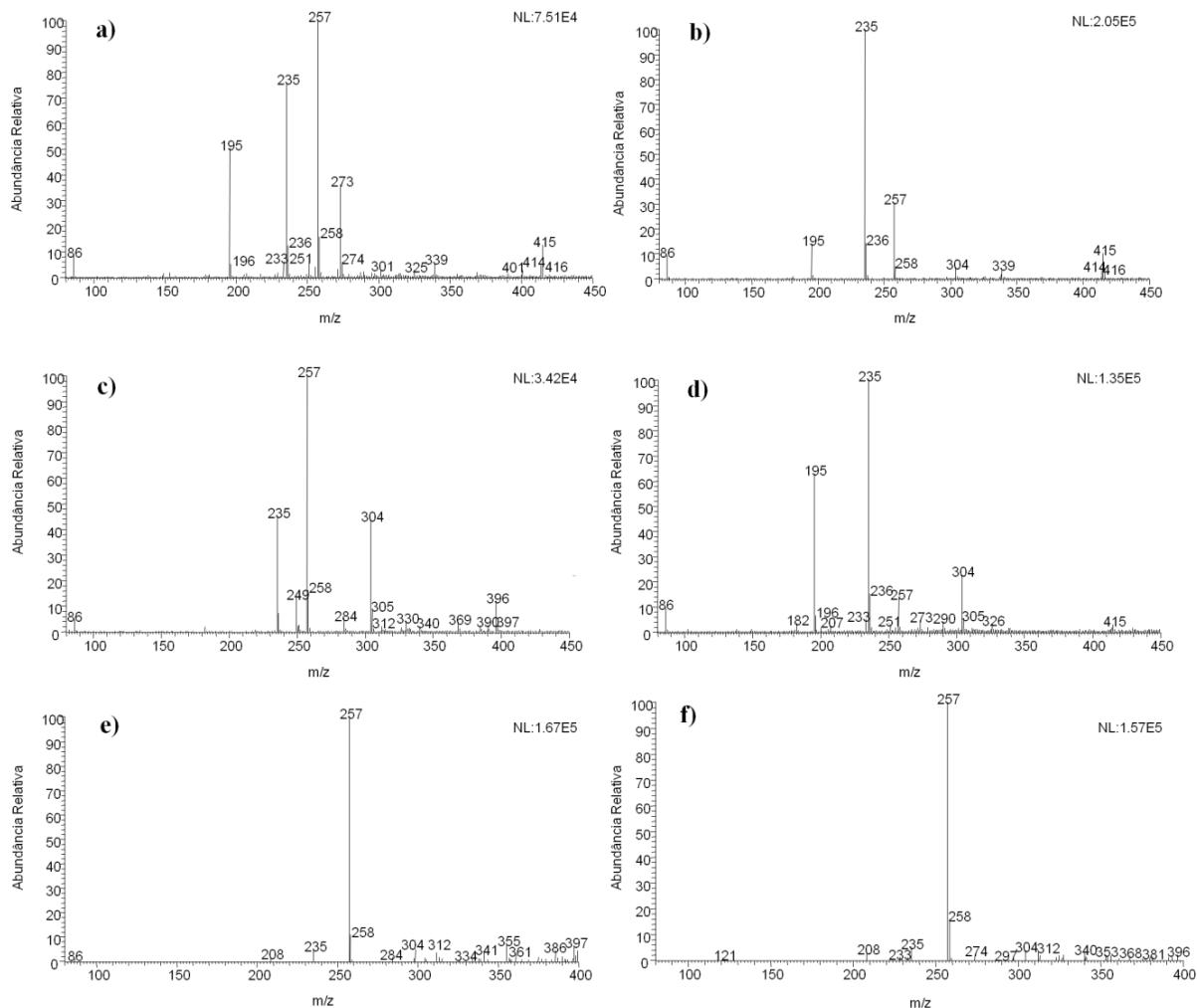


Figura 13 - Espectros médios das amostras contendo a) 0; b) 0,1; c) 0,5; d) 1,0; e) 3,0; f) 5,0 % m/m de cocaína, preparadas com a base A.

Em todos os espectros de ambas as bases foi possível identificar o sinal $[M+H]^+$ característico da molécula de cocaína protonada (m/z 304), inclusive nas amostras com 0,1% (m/m) de cocaína. Embora fosse esperado que as amostras de ambas as bases apresentassem um aumento gradual na intensidade relativa ao íon característico da cocaína protonada (m/z 304) – já que esse analito foi adicionado em quantidades crescentes em ambas as bases – apenas as amostras referentes à base B (Figura 14) apresentaram esse aumento gradual em comparação com o sinal referente a lidocaína protonada (m/z 235). Uma explicação plausível para a oscilação do sinal da cocaína protonada (m/z 304) nas amostras da base A (Figura 13) seria a grande quantidade de íons sódio (Na^+) provenientes do bicarbonato de sódio utilizado no preparo da base A. Essa grande quantidade de íons pode causar

variações na corrente elétrica estabelecida na fonte de ionização, gerando sinais analíticos instáveis e efeitos de supressão iônica. ⁸⁸

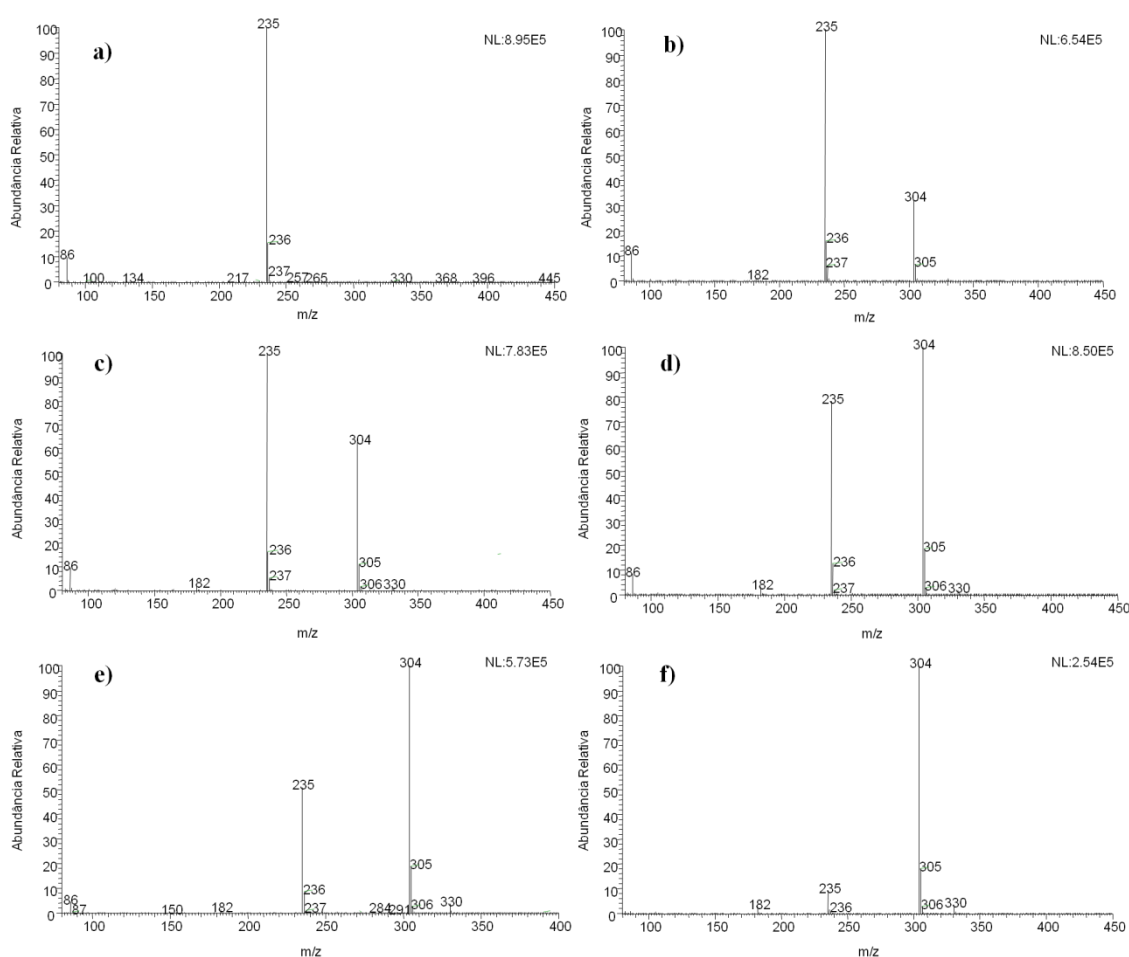


Figura 14 - Espectros médios das amostras contendo a) 0; b) 0,1; c) 0,5; d) 1,0; e) 3,0; f) 5,0 % m/m de cocaína, preparadas com a base B.

Quanto aos adulterantes utilizados, foi possível identificar a presença de lidocaína (m/z 235) em todas as amostras analisadas e de seu aduto sodiado (m/z 257) nas amostras preparadas com a base A. Já a cafeína (m/z 195), somente foi observada em algumas amostras referentes à base A (Figura 13a, 13b e 13d). Nota-se também que, nos espectros nos quais foi observado o sinal referente à cafeína protonada (Figura 13a, 13b e 13d), a lidocaína protonada aparece com intensidade muito mais elevada do que a cafeína protonada, apesar da quantidade de ambos os adulterantes nas amostras ser exatamente a mesma (10% m/m). Uma possível explicação para essas observações seria também a supressão iônica causada pela grande

quantidade de íons provenientes do bicarbonato de sódio, no caso da base A, e a maior afinidade protônica da cocaína e da lidocaína frente à cafeína. Observando as estruturas moleculares dos três analitos (Figura 12), podemos notar que os possíveis sítios capazes de receber prótons (átomos de nitrogênio e oxigênio) na molécula de cafeína estão mais envolvidos em sistemas de ressonância eletrônica do que nos demais analitos, devido à hibridização sp^2 dos carbonos formadores de sua estrutura cíclica propiciarem simetria apropriada entre os orbitais ligantes para deslocalização da carga eletrônica. Já as moléculas de cocaína e lidocaína, possuem sítios básicos ligados a carbonos com hibridização sp^3 , o que não possibilitaria simetria apropriada entre os orbitais ligantes para deslocalização de carga, justificando assim a maior afinidade protônica desses dois analitos frente à cafeína.

Para confirmação dos resultados, os espectros de massas MS^2 das amostras contendo 0,1% (m/m) de cocaína e do padrão de cocaína foram obtidos utilizando-se uma energia de colisão de 12 % (unidade do fabricante). Os espectros de fragmentação para as amostras de ambas as bases e do padrão foram indistinguíveis e apresentaram os íons filhos característicos da cocaína (m/z 150 e m/z 182) e, por essa razão, apenas o espectro referente à base A é apresentado de maneira representativa na Figura 15.

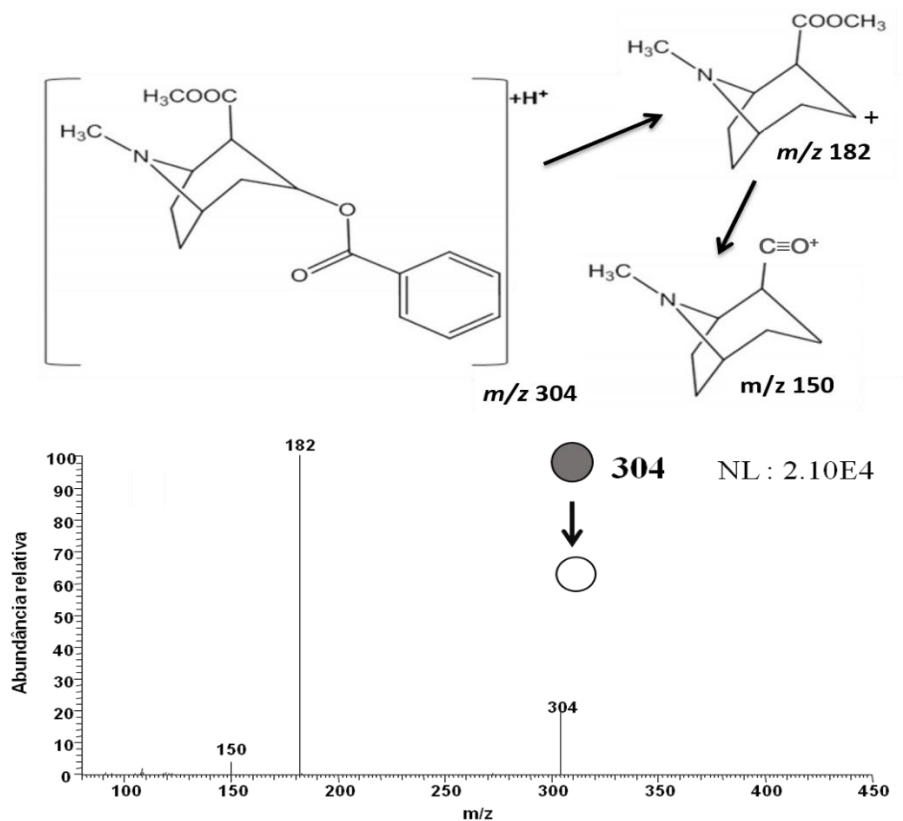


Figura 15 - Estruturas químicas da cocaína protonada e seus fragmentos observados no espectro de fragmentação da amostra contendo 0,1% m/m de cocaína, preparada com a base A.

No intuito de comprovar que os sinais analíticos dos íons de interesse – cocaína protonada (m/z 304), lidocaína protonada (m/z 235) e cafeína protonada (m/z 195) – observados nos espectros de massas das amostras de droga apresentados nas Figuras 13 e 14 eram provenientes apenas das adições dos padrões durante o preparo das amostras, analisou-se também via PS-MS apenas a porção diluente das bases A e B (bicarbonato de sódio/ ácido bórico na proporção 1:1 (m/m) e farinha de trigo /ácido bórico na proporção 1:1 (m/m), respectivamente). Nos espectros de massas obtidos (Figura 16 a e 16b) foram observados poucos sinais, apesar da complexidade de ambas as matrizes. Não foram observados sinais correspondentes aos analitos protonados, evidenciando que estes eram oriundos apenas da adição posterior dos padrões.

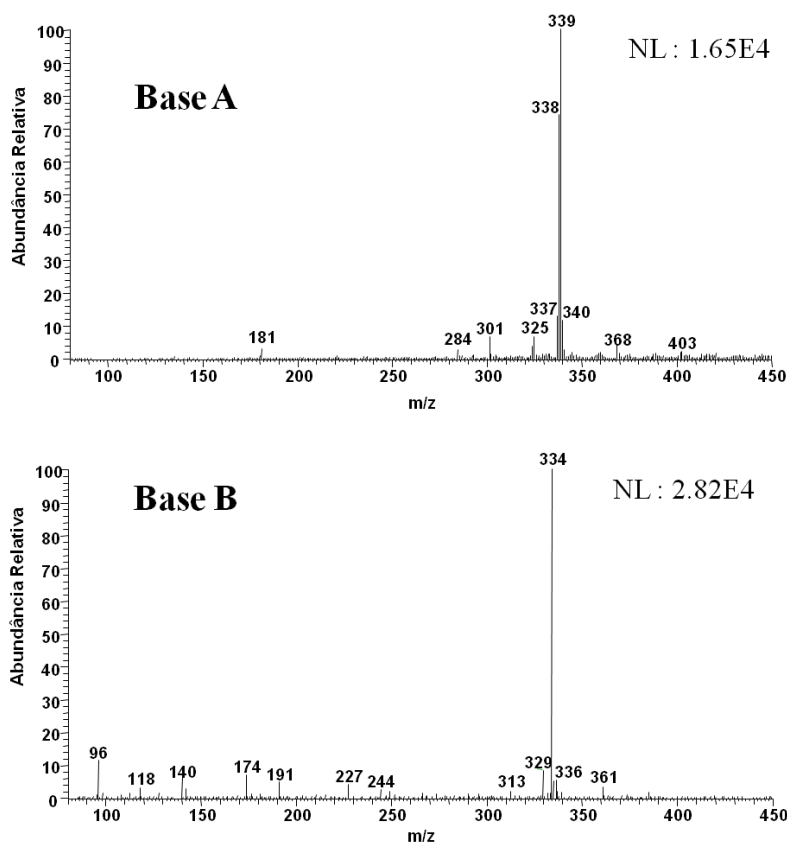


Figura 16 - Espectro de massas PS-(+)-MS *full scan* referentes à porção diluente das bases A (bicarbonato de sódio/ ácido bórico na proporção 1:1 (m/m)) e base B (farinha de trigo /ácido bórico na proporção 1:1 (m/m)) obtidos via PS-MS.

Além disso, notou-se que os sinais mais intensos e característicos de cada porção diluente (m/z 339 para a base A e m/z 334 para a base B), além de serem distintos, foram totalmente ou parcialmente suprimidos nos espectros de massas das amostras apresentados nas Figuras 13 e 14. Tentativas de fragmentação desses íons (m/z 339 e m/z 334) não geraram fragmentos que possibilitassem a elucidação e identificação de suas respectivas estruturas químicas. Ademais, buscas na literatura também não contribuíram para identificação dessas estruturas, uma vez que esses sinais (m/z 339 e m/z 334) não correspondem a nenhuma substância comumente encontrada na composição química dos constituintes das bases (ácido bórico, bicarbonato de sódio e farinha e trigo). Desse modo, podemos associar os sinais m/z 339 e m/z 334 a impurezas presentes nesses constituintes, já que estes se tratam de produtos obtidos em lojas comerciais que muitas vezes não são produzidos com rigor analítico.

Apesar das variáveis que podem afetar diretamente a qualidade e a reprodutibilidade dos dados PS-MS, *i.e.* dimensões do papel triangular, distância entre a entrada do espectrômetro de massas e a ponta de papel, e volume de amostra adicionada ao papel, o método utilizado para a identificação de cocaína nas amostras simuladas também foi aplicado para a análise quantitativa desta droga nas matrizes simuladas. Para demonstrar a linearidade do método, uma curva de calibração foi construída utilizando a razão entre as intensidades totais dos sinais referentes à cocaína (m/z 304) e à lidocaína (m/z 235, utilizada como padrão interno) para as amostras contendo 0, 0,1, 0,5, 1,0, 3,0 e 5,0% m/m de cocaína, pertencentes a ambas as bases.

Para a base B, obteve-se um intervalo linear de 0,1 a 5,0% m/m, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,996 (Figura 17). O desvio padrão relativo foi de 8,03%, obtido a partir da média e do desvio padrão calculados para amostras com 1% m/m de cocaína ($n = 13$). O limite de detecção (LD) foi calculado através da média e do desvio padrão referentes a sete brancos independentes que continham apenas base B (sem adição de cocaína), considerando um t de *student* para 6 graus de liberdade (2.447) com 95% de confiança. O valor encontrado para LD foi de 0,05% m/m de cocaína, o que equivale a uma relação sinal/ruído igual a 2. As figuras de mérito calculadas para avaliar a performance da técnica PS-MS aplicada à quantificação de cocaína nas amostras simuladas utilizando a base B estão listadas na Tabela 1.

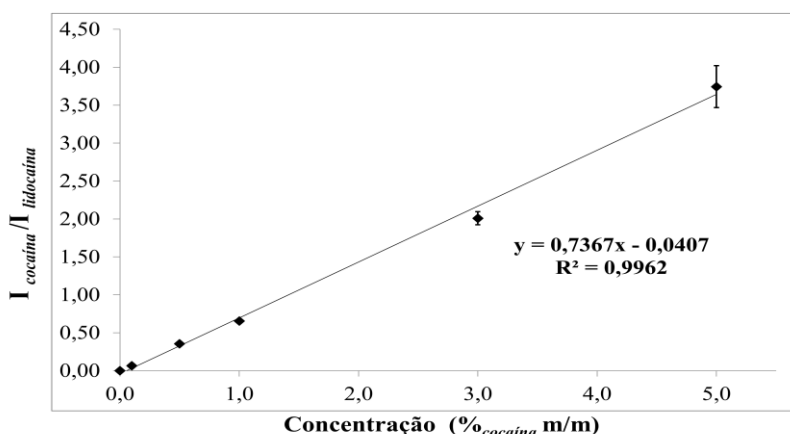


Figura 17 - Curva analítica obtida para as amostras referentes à base B dopadas com cocaína, preparadas em triplicata.

Tabela 1: Desempenho analítico da técnica PS- MS para as amostras referentes à base B dopadas com cocaína.

Figuras de Mérito	Resultados
Limite de detecção (LD)	0,05 % m/m
Faixa linear	0,1–5.0 % m/m
Coefficiente de correlação (R^2)	0,996
Desvio padrão relativo	8,03 % (para 1.0 % m/m , n =13)

Para a base A, a mesma análise quantitativa não gerou resultados coerentes e reprodutivos o suficiente para passar por um tratamento estatístico adequado. Esse fato pode ser associado ao forte efeito de matriz já mencionado para essa base, devido à presença de bicarbonato de sódio. Esses resultados demonstram que a análise quantitativa de cocaína em amostras apreendidas nas ruas pode ser dificultada pelo tipo de material (matriz) utilizado para a diluição da droga. Entretanto, a matriz que compunha a base A não impediu a aplicação da presente metodologia na detecção de cocaína.

2.1.4 Conclusões

O presente estudo demonstrou que a técnica *Paper Spray Mass Spectrometry* (PS-MS) pode ser uma alternativa eficaz para a detecção de cocaína em amostras de droga apreendidas nas ruas, apesar da composição química diversa dessas amostras. Por meio do método desenvolvido, que envolveu uma simples preparo de amostra (solubilização em metanol, agitação, centrifugação e filtração) e posterior análise direta de alíquotas via PS-MS, foi possível identificar a presença de cocaína em amostras preparadas em laboratório com 5,0% até 0,1% m/m desse analito, independentemente da presença de diluentes (ácido bórico, bicarbonato de sódio e farinha) e adulterantes (cafeína e lidocaína), comumente adicionados nessas amostras pelos criminosos. Além disso, os adulterantes cafeína e lidocaína, adicionados durante o preparo das amostras, também foram identificados nas análises PS-MS.

Esses resultados qualitativos demonstram a equiparação do método proposto, em termos de confiabilidade e sensibilidade, frente à metodologia normalmente empregada em laboratórios forenses (Teste de Scott Modificado como teste de triagem para posterior análise via HPLC-MS das amostras tidas como positivas quanto à presença de cocaína). Além disso, o método desenvolvido nesse trabalho se mostrou mais econômico e rápido do que a metodologia tradicionalmente empregada descrita acima, uma vez que aplicou etapas de preparo de amostra de baixo custo que envolveram poucos insumos e uma técnica analítica que dispensa separação cromatográfica e gera resultados em menos de um minuto (tempo necessário para aquisição de cada espectro).

O método proposto também se mostrou promissor quanto a sua aplicabilidade quantitativa, uma vez que parâmetros quantitativos de qualidade estatística (curva de calibração, faixa linear de trabalho, desvio padrão relativo e limite de detecção) foram obtidos para o conjunto de amostras preparadas com a base B. Entretanto, notou-se que fortes efeitos de matriz, devido à composição química variada dessas amostras, podem impedir a obtenção de dados coerentes que possibilitem a obtenção desses parâmetros analíticos, como no caso da base A que continha bicarbonato de sódio em sua formulação.

Por fim, podemos concluir que a técnica PS-MS pode ser facilmente adaptada a um laboratório forense onde um espectrômetro de massas esteja disponível, de modo que outros métodos de potencial interesse forense possam, portanto, ser desenvolvidos e utilizados em procedimentos de rotina.

2.2 Determinação de benzodiazepínicos em bebidas dopadas. Identificando o golpe "Boa-noite, cinderela" por meio da espectrometria de massas com ionização *Paper Spray*

2.2.1 Introdução

A agressão sexual é uma grande preocupação na sociedade moderna, mas as estatísticas que cercam essa prática ilícita são divergentes e enganosas, porque um número significativo de vítimas não a denuncia à polícia. No Brasil, o crime relacionado à dopagem da vítima de modo involuntário também é popularmente chamado de golpe "Boa noite, Cinderela", uma alusão ao fato da vítima (geralmente mulheres) permanecer parcial ou totalmente desacordada.⁸⁹

Os crimes facilitados pelo uso de drogas consistem no uso de substâncias psicoativas para incapacitar a vítima e, geralmente, resultam em roubo e/ ou em atos sexuais não consensuais.^{90,91} Em ambas as situações a combinação de álcool, medicamentos e/ ou outras drogas ilícitas pode causar sonolência, perda de memória (amnésia) e falta geral de consciência, prejudicando a capacidade de tomada de decisão da vítima, tornando-a um alvo fácil para potenciais criminosos.⁹⁰⁻⁹³ Nas agressões sexuais facilitadas por drogas (DFSA - *Drug Facilitated Sexual Assault*), os criminosos costumam dopar a bebida da vítima sem seu conhecimento ou aproveitar o uso de drogas recreativas em ambientes de festa e bares.

Os benzodiazepínicos (BZ) são medicamentos normalmente utilizados pelos criminosos para aplicação do golpe "Boa noite, Cinderela". Tais medicamentos são depressores do sistema nervoso central (SNC) frequentemente prescritas para o tratamento de insônia, ansiedade e epilepsia, por possuírem propriedades sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes.⁹⁴ Estas drogas agem nos receptores GABA_A do sistema límbico, causando relaxamento muscular e queda de pressão arterial, de maneira semelhante ao etanol.⁹⁴ Assim, muitos criminosos costumam potencializar os efeitos dos benzodiazepínicos adicionando-os preferencialmente em bebidas alcoólicas para dopar suas vítimas.

Estruturalmente, as 1,4-benzodiazepinas (Figura 18) consistem em um anel insaturado de sete membros contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4, ligado a um anel aromático através das posições 6 e 7. Nas benzodiazepinas farmacologicamente relevantes, a posição 7 da estrutura bicíclica resultante é geralmente substituída por haletos (Cl e Br) ou pelo grupo nitro (NO₂), enquanto que a posição 5 é geralmente substituída por grupo fenil, que também pode estar substituído (mais frequentemente em sua posição 2).⁹⁵

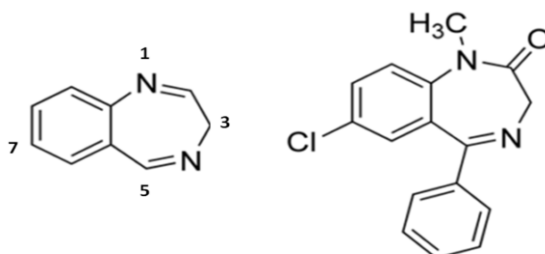


Figura 18 - Estrutura molecular geral das 1,4 benzodiazepinas (à esquerda) e do Diazepam (benzodiazepínico, à direita).

A ocorrência de crimes facilitados por drogas é geralmente confirmada analisando-se fluidos biológicos (sangue e urina), mas outras evidências também podem ser coletadas da cena do crime, e.g. preservativos, frascos de remédios, restos de bebidas supostamente dopadas entre outros, para posterior análise. Por possuírem sensibilidade e seletividade adequadas, as principais técnicas analíticas utilizadas para a detecção de benzodiazepínicos em matrizes complexas são cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* - GC) e cromatografia líquida de ultra-alta performance (*Ultra-high Performance Liquid Chromatography* - UHPLC) acoplada à espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*- MS).⁹⁶⁻¹⁰¹ Contudo, estas técnicas envolvem etapas laboriosas e de alto custo: utilizam grande quantidade de solvente de alto grau de pureza em corridas cromatográficas longas frequentemente associadas à pré-tratamento de amostras, *i.e.* extração líquido-líquido (*Liquid-liquid Extraction* - LLE), extração em fase sólida (*Solid-phase Extraction* - SPE) ou micro-extração em fase sólida (*Solid-phase Micro-extraction* - SPME).¹⁰²⁻¹⁰⁶

Recentemente, um método de extração simples e eficiente denominado extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (*Liquid-liquid*

Extraction with Low Temperature Partitioning - LLE-LTP) tem sido aplicado como pré-tratamento de amostra pra *clean-up* de diversas matrizes complexas (lodo de esgoto, leite e bebidas) para determinação de bifenilas de policarbonato (PCBs)¹⁰⁷, cloranfenicol¹⁰⁸ e carbamatos¹⁰⁹. Esse procedimento de preparo da amostra consiste na adição de um pequeno volume de um solvente orgânico pouco miscível em água, *i.e.* acetonitrila, à amostra de interesse em solução aquosa, seguido por agitação manual e subsequente arrefecimento da amostra, a fim de congelar a fase aquosa. A extração também pode ser otimizada através da adição de sais (NaCl, (NH₄)₂SO₄, etc), que promovem o efeito *salting-out*, e pela mistura de solventes orgânicos em diferentes proporções, *e.g.* acetonitrila, acetato de etila, isobutanol e butanol, para melhorar a afinidade entre os analitos de interesse e a fase extrativa, bem como a separação de fases.¹¹⁰⁻¹¹² Durante o congelamento, os analitos com menor afinidade pela fase aquosa migram para a fase orgânica do sobrenadante, que é posteriormente isolado e analisado.^{109,113} Além de ser um método de baixo custo que elimina o uso de cartuchos de separação e grandes volumes de solvente, LLE-LTP pode ser acelerado através da imersão da mistura amostra/ solvente em nitrogênio líquido para o congelamento da fase aquosa.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo associar o método de preparo de amostra LLE-LTP à técnica analítica PS-MS para detectar cinco diferentes benzodiazepínicos (Diazepam, Alprazolam, Clonazepam, Bromazepam e Cloxazolam) em bebidas comumente consumidas em festas, bares e casas noturnas, no intuito de simular a análise de bebidas como vestígio de um crime facilitado por drogas. O potencial de quantificação da metodologia LLE-LTP / PS-MS também foi demonstrado. Para tal, amostras de cerveja enriquecidas com Diazepam, foram submetidas ao método desenvolvido e algumas figuras de mérito, *i.e.* linearidade da curva analítica, limite de detecção, faixa linear e desvio padrão relativo, foram determinadas.

2.2.2 Parte Experimental

Materiais e instrumentação

O metanol e a acetonitrila grau HPLC foram adquiridos da empresa J.T. Baker Chemicals (Center Valley, PA, EUA). Os comprimidos referentes aos medicamentos Alprazolam (0,5 mg) e Clonazepam (0,5 mg) pertencem ao laboratório Medley. Os comprimidos de Bromazepam (3,0 mg) pertencem ao laboratório Germed, os comprimidos de Cloxazolam (1,0 mg) ao laboratório Novartis e os comprimidos de Diazepam ao laboratório Roche. O padrão analítico Diazepam foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). As bebidas testadas (cerveja, vodka, energético, refrigerante e suco de pêsego *light*) foram adquiridas em um supermercado local. O papel cromatográfico (grau I) foi adquirido da empresa Whatman International Ltd (Maidstone, Inglaterra). Os filtros de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 33 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro foram fabricados pela empresa Millex. A balança analítica utilizada foi a Shimadzu Corporation (modelo AUX 220). O agitador de tubos utilizada foi o Phoenix (modelo AP 56) e centrifuga utilizada a CentriBio (modelo 80-2b).

Todos os experimentos PS-MS foram realizados utilizando um espectrômetro de massas LCQ Thermo-Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) no modo positivo de leitura de íons. As condições instrumentais foram: voltagem aplicada ao papel, aproximadamente 4,2 kV; temperatura do capilar, 275 °C; tensão no capilar, 35 V; tensão na lente do tubo, 65 V.

Bebidas

Foram selecionadas quatro bebidas diferentes para compor os drinques dopados e não dopados (Tabela 2). Cada drink (300 mL) foi dopado com um comprimido de cada um dos seguintes benzodiazepínicos: Diazepam (10 mg/comprimido), Alprazolam (0,5 mg/comprimido), Clonazepam (0,5 mg/comprimido), Bromazepam (3 mg/comprimido) e Cloxazolam (1 mg/comprimido). Todas as bebidas foram armazenadas na geladeira até o preparo

das amostras. Pacientes com uso prescrito desses benzodiazepínicos gentilmente doaram os comprimidos usados neste estudo.

Tabela 2 - Composição dos drinques dopados e não dopados com comprimidos de benzodiazepínicos.

Drinques	Composição
1	Cerveja (300 mL)
2	Coca-Cola® (200 mL) + vodka (100 mL)
3	Energético (200 mL) + vodka (100 mL)
4	Suco de pêsego <i>Light</i> (200 mL) + vodka (100 mL)

Perfis de fragmentação

Devido à impossibilidade de adquirir os padrões dos compostos benzodiazepínicos (exceto o Diazepam), o procedimento a seguir foi adotado. Comprimidos dos medicamentos Alprazolam, Clonazepam, Bromazepam e Cloxazolam foram tratados com 10,0 mL de metanol grau HPLC e as suspensões resultantes foram centrifugadas e filtradas para remover todos os excipientes. Alíquotas de 10 µL de cada extrato foram, então, analisadas via PS-MS. Os analitos protonados foram selecionados e seus perfis de fragmentação foram obtidos por dissociação induzida por colisão (CID)

Preparo de amostra

Estudos preliminares foram realizados sem tratamento de amostras, nos quais volumes iguais (10 µL) dos drinques dopados e não dopados (Tabela 1) e metanol foram adicionados diretamente no papel e analisados via PS-MS. No entanto, um pronunciado efeito de matriz foi observado nos espectros adquiridos. Assim, os drinques dopados e não dopados foram submetidos ao método de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (LLE-LTP), antes da análise por PS-MS, com o propósito de eliminar os efeitos de matriz observados. O método LLE-LTP foi realizado misturando-se volumes iguais (5 mL) dos drinques dopados e não dopados e acetonitrila (solvente de

extração) em um tubo de polipropileno de fundo cônico do tipo Falcon®. Após agitação manual (30 a 40 s), o tubo foi imerso em nitrogênio líquido para arrefecimento da fase aquosa (5 a 10 s). Após o congelamento, uma alíquota da fase orgânica sobrenadante (10 µL) foi analisada via PS-MS.

Avaliação da estabilidade

Para avaliar a estabilidade dos analitos, análises PS-MS dos drinques dopados - expostos sob condições ambientes (pressão atmosférica; temperatura de aproximadamente 25 °C) - foram realizadas imediatamente após a dopagem e após 4, 8 e 48 horas, respectivamente. Todas as amostras foram submetidas ao tratamento de amostra LLE-LTP, conforme descrito acima. A estabilidade de cada benzodiazepínico foi avaliada qualitativamente por meio de uma simples avaliação visual dos respectivos espectros de massas.

Curva de calibração

Uma curva de calibração foi construída utilizando cerveja como matriz e Diazepam e Cloxazolam (padrão interno, extraído de comprimidos com conforme já mencionado) como padrões analíticos. Para tal, soluções estoque de Diazepam (158 mg.L⁻¹) e Cloxazolam (160 mg.L⁻¹) foram preparadas em acetonitrila grau HPLC. Cada nível de concentração de Diazepam (0,0; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 20; 30; 40 mg.L⁻¹) foi preparado em triplicata a partir de diluições apropriadas da solução estoque em frascos volumétricos de 10,0 mL. A concentração de Cloxazolam foi de 20 mg.L⁻¹ em cada frasco. Os frascos tiveram seu volume ajustado com uma solução de acetonitrila e cerveja 1: 1 (v/v). Cada solução foi então submetida ao método de preparo de amostra LLE-LTP para posterior análise via PS-MS. O desvio padrão relativo foi calculado através da análise de onze replicatas do nível 10 mg.L⁻¹. O limite de detecção (LD) foi obtido pela média e desvio padrão de sete amostras brancas independentes, preparadas com cerveja e acetonitrila na proporção 1:1 (v/v) dopadas com Cloxazolam até a concentração final de 20 mg.L⁻¹. O estudo de recuperação foi realizado em três níveis, em triplicata, nos quais frascos

volumétricos de 10,0 mL contendo cerveja e acetonitrila na proporção 1:1 (v/v) foram fortificados com Diazepam até as concentrações finais de 1,0, 5,0 e 10 mg.L⁻¹ e com o padrão interno Cloxazolam na final concentração de 20 mg.L⁻¹. A fase de acetonitrila foi recuperada pelo método de preparo de amostra LLE-LTP.

Análises PS-MS

Para as análises PS-MS, uma alíquota de 10 µL da fase orgânica de cada amostra foi adicionada a um triângulo de papel – com dimensões de 10 mm de altura e 5 mm de largura na base – posicionado a 5 mm de distância da entrada do espectrômetro de massas, aproximadamente. Em seguida, uma alta voltagem (aproximadamente 4,2 kV) foi aplicada ao papel por meio de um clipe metálico, fixado a uma plataforma com movimentação tridimensional. Para evitar efeitos de memória, um papel triangular diferente foi utilizado para cada amostra analisada. Além disso, o clipe metálico foi limpo com papel toalha umedecido com metanol entre as análises.

Os espectros em *full scan* foram obtidos na faixa de massa entre 100 a 500 *m/z*. Espectros de fragmentação também foram adquiridos para todos os analitos observados em cada análise qualitativa, aplicando-se uma energia de colisão de aproximadamente 40 %.

A Figura 19 resume a metodologia proposta, desde a chegada de uma amostra suspeita ao laboratório até a obtenção do espectro que comprova a presença de benzodiazepínicos na amostra.

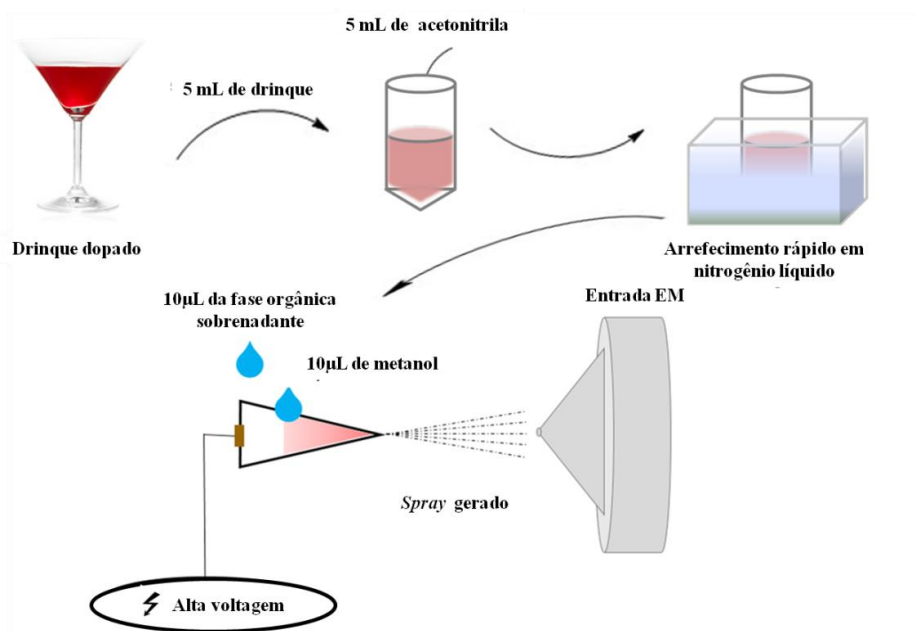


Figura 19 - Esquema representativo da metodologia PS-MS/ LLE-LTP para determinação e quantificação de benzodiazepínicos em bebidas alcoólicas dopadas.

2.2.3 Resultados e discussão

As análises PS-MS foram realizadas no modo positivo de leitura de íons (PS-(+)-MS), uma vez que os benzodiazepínicos analisados (Diazepam, Alprazolam, Clonazepam, Bromazepam, Cloxazolam) possuem sítios básicos propícios para ocorrência de protonação em suas estruturas (bases de *Brønsted-Lowry*). As estruturas moleculares dos analitos protonados, seus espectros em *full scan* e seus respectivos espectros de fragmentação são apresentados na Figura 20 e foram obtidos através da análise de aliquotas de extratos de comprimidos desses medicamentos (exceto Diazepam), devido a impossibilidade de aquisição de padrões analíticos, como mencionado na parte experimental. É notável que os analitos Clonazepam e Bromazepam protonados (ambos com m/z 316), apesar de serem isóbaros, podem ser facilmente distinguidos por seus padrões de fragmentação.

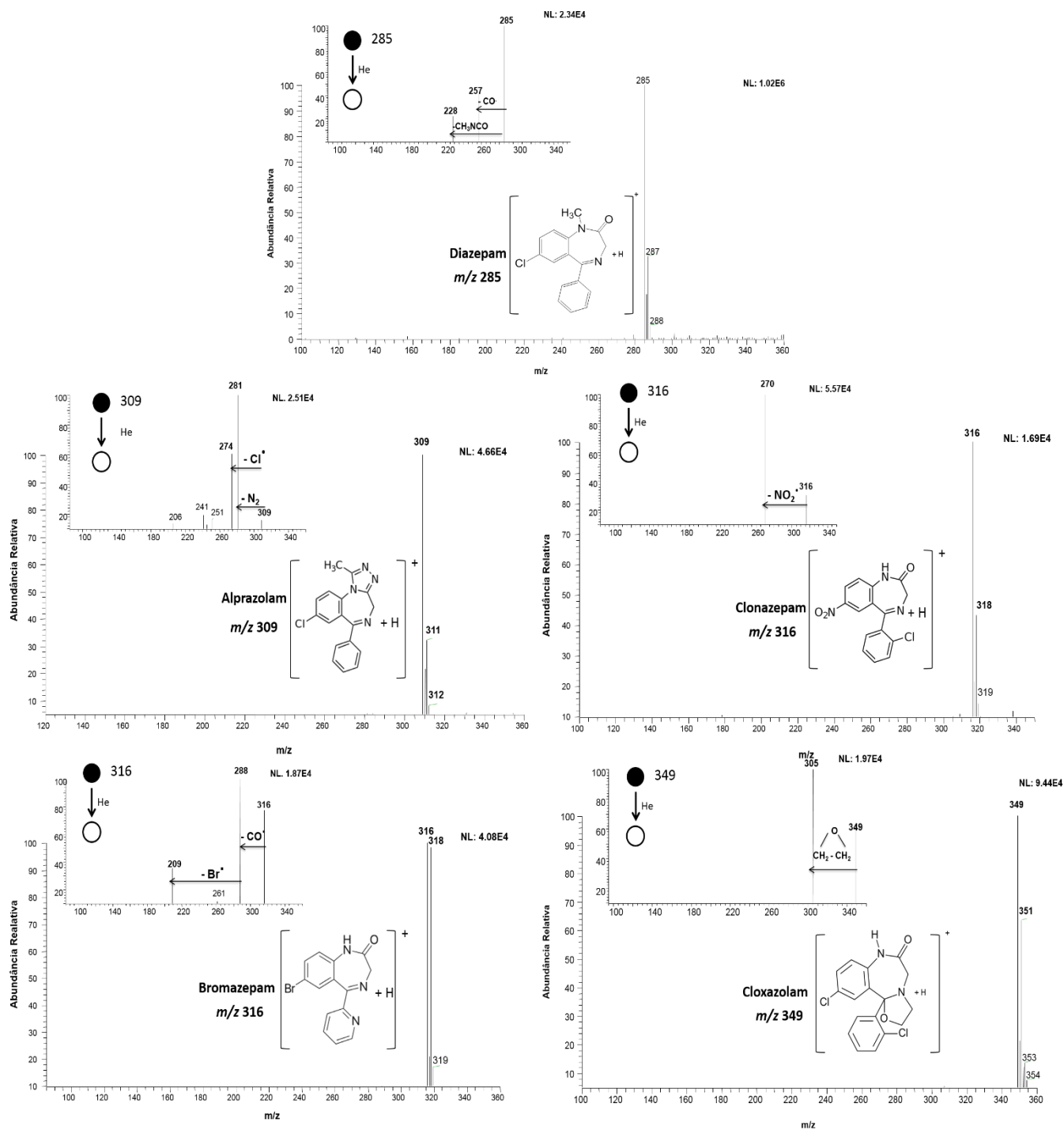


Figura 20 - Estruturas moleculares, espectros em *full scan* e perfil de fragmentação dos compostos benzodiazepínicos protonados: Diazepam (m/z 285), Alprazolam (m/z 309), Clonazepam (m/z 316), Bromazepam (m/z 316) e Cloxazolam (m/z 349).

A Figura 21 contém os resultados preliminares obtidos durante as análises PS-MS dos drinques dopados e não dopados, sem a aplicação do método de preparo de amostra LLE-LTP. Como esperado, os drinques dopados e não dopados foram prontamente diferenciados por uma simples

inspeção visual de seus espectros de massa. De modo geral, os espectros de massas dos drinques não dopados apresentaram um número menor de íons do que os espectros dos drinques dopados. Os íons característicos de todas as substâncias dopantes, bem como seus respectivos isotopólogos, foram claramente visualizados em todos os espectros de massa dos drinques dopados.

Entretanto, as proporções experimentais dos isotopólogos (Alprazolam: m/z 309/311, proporção teórica: 3: 1, devido a presença de cloro; Clonazepam e Bromazepam: m/z 316/318, proporção teórica: 3: 1 e 1: 1, devido a presença de cloro e bromo, respectivamente; Cloxazolam: m/z 349/351, proporção teórica: 3: 2, devido a presença de dois cloros) não coincidiram com os valores teóricos, o que pode ser associado à existência de um efeito de matriz significativo.

O íon de m/z 285 (correspondente ao Diazepam protonado) não é observado nos espectros de massas da Figura 21 porque não fazia parte do conjunto de benzodiazepínicos avaliados nas fases iniciais da presente investigação. A análise dos espectros de massa dos drinques dopados (Figura 21) também indicou que algumas fragmentações ocorreram durante o processo de ionização PS, uma vez que os íons de m/z 281 e 288, não detectados nos espectros de massas dos drinques não dopados (Figura 21), podem ser associados a fragmentos dos analitos Alprazolam e Bromazepam protonados, respectivamente (Figura 20).

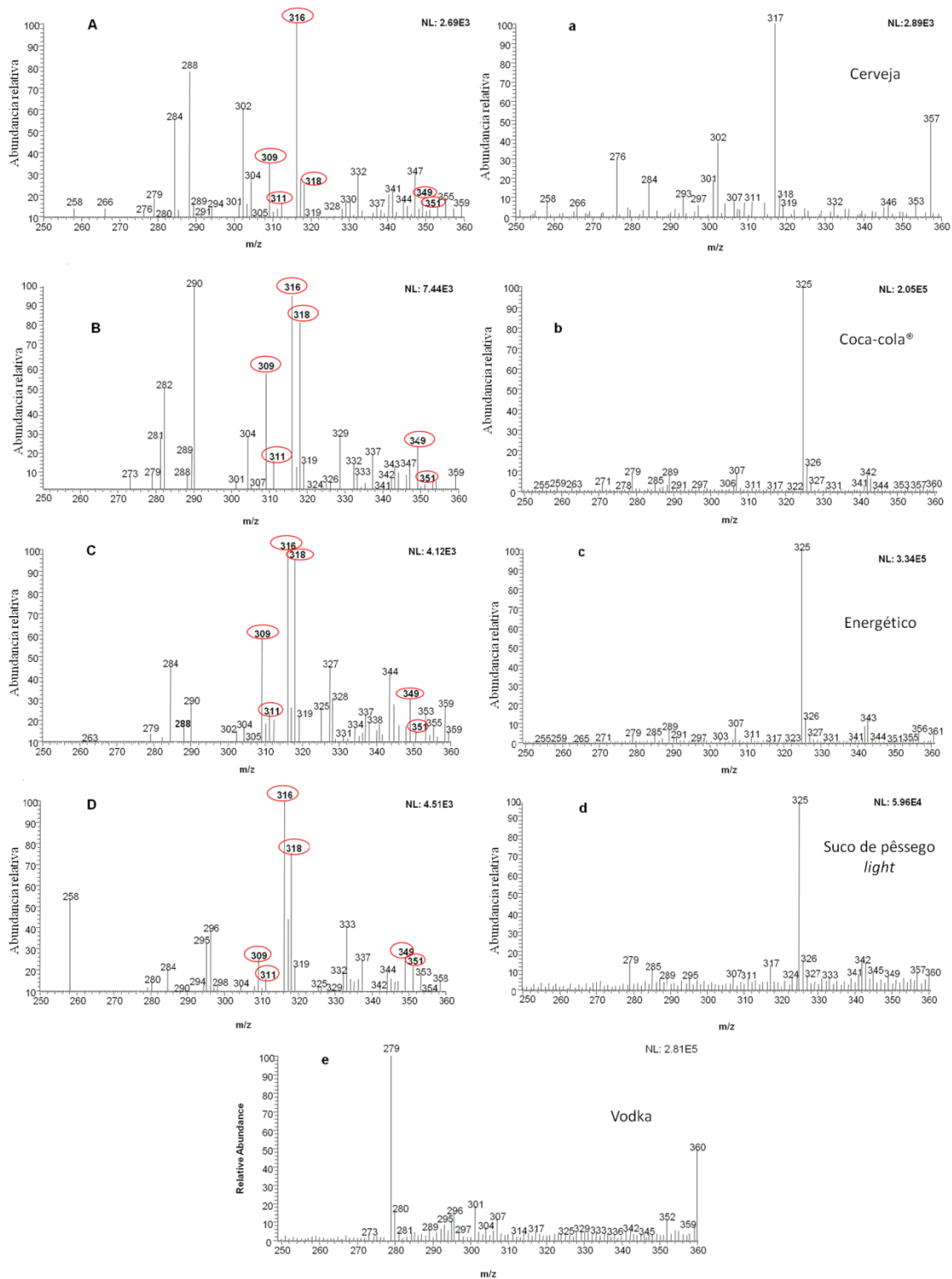


Figura 21 - Espectros PS(+)-MS obtidos para os drinques: (A) cerveja, (B) Coca-Cola® e vodka, (C) energético e vodka e (D) suco de pêsego *light* e vodka, dopados com: Alprazolam (m/z 309 e 311), Clonazepam (m/z 316 e 318), Bromazepam (m/z 316 e 318) e Cloxazolam (m/z 349 e 351) a esquerda. Espectros PS(+)-MS das bebidas não dopadas: (a) cerveja, (b) Coca-Cola®, (c) energético, (d) suco de pêsego *light* e (e) vodka, a direita.

As Figuras 22 e 23 apresentam os espectros PS(+)-MS dos drinques dopados e não dopados, respectivamente, após aplicação do pré-tratamento de amostra LLE-LTP. A primeira observação é que, novamente, os perfis químicos (*fingerprint*) observados nos espectros PS(+)-MS permitem uma distinção fácil e rápida entre os dois tipos de amostras (dopadas e não dopadas). Como discutido anteriormente, íons oriundos da fragmentação dos analito Alprazolam protonado (m/z 281) e Bromazepam protonado (m/z 288) na fonte de ionização são notáveis em alguns dos espectros de massas dos drinques dopados (Figura 22). Comparando as Figuras 22 e 23, é evidente que o procedimento LLE-LTP foi eficaz na extração dos benzodiazepínicos dos drinques dopados, uma vez que os espectros de massa das amostras dopadas mostram basicamente os íons referentes a esses analitos em suas respectivas formas protonadas (Alprazolam: m/z 309/311; Clonazepam e Bromazepam: m/z 316/318; Cloxazolam: m/z 349/351 e Diazepam: m/z 285/287).

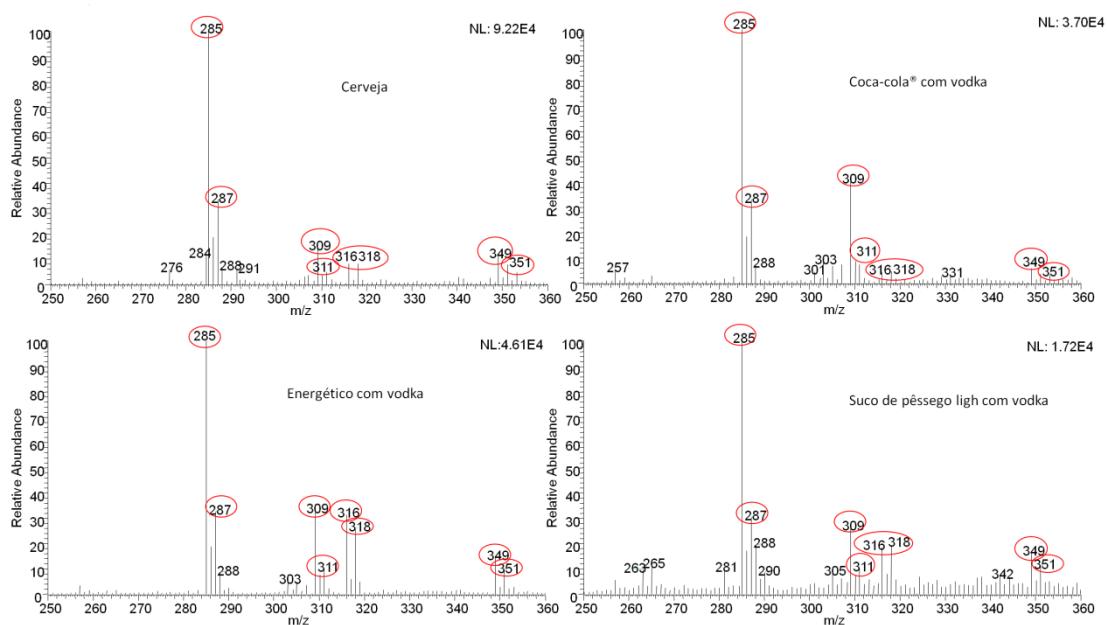


Figura 22 - Espectros PS(+)-MS obtidos após aplicação do método de preparo de amostra LLE-LTP nas bebidas (cerveja, Coca-Cola® e vodka, energético e vodka e suco de pêssego *light* e vodka - Tabela 2) dopados com Diazepam (m/z 285 e 287), Alprazolam (m/z 309 e 311), Clonazepam (m/z 316 e 318), Bromazepam (m/z 316 e 318) e Cloxazolam (m/z 349 e 351).

Todos os espectros de massa dos drinques dopados apresentaram os íons m/z 285 e 287 (Diazepam protonado e seu respectivo isotopólogo) como os mais intensos. Essa maior intensidade se deve à maior dosagem dos comprimidos de Diazepam (10 mg/comprimido) quando comparados aos outros compostos benzodiazepínicos utilizados para dopar as amostras (Alprazolam: 0,5 mg/ comprimido; Clonazepam: 0,5 mg/ comprimido; Bromazepam: 3 mg/ comprimido e Cloxazolam: 1 mg/ comprimido). Entretanto, as diferentes dosagens das substâncias ativas nos comprimidos não comprometeu a detecção dos analitos, uma vez que todos foram detectados em intensidades relativamente altas, como observado nos espectros PS(+)-MS exibidos na Figura 22. Além disso, as proporções dos isotopólogos de cada analito corresponderam as proporções teóricas esperadas.

Através dos espectros PS(+)-MS obtidos para as bebidas utilizadas para compor os drinques (Figura 23) foi possível também identificar a presença de alguns íons característicos dessas matrizes, o que forneceu informações adicionais sobre a formulação dos drinques. Por exemplo, o íon de m/z 195 pode ser atribuído à cafeína protonada, uma substância que está presente na formulação de refrigerantes de cola, como a Coca-Cola® e bebidas energéticas (aparentemente esse íon foi suprimido no espectro de massa da Coca-Cola®). O íon de m/z 317 pode ser atribuído ao aduto de sódio da molécula de aspartame $[M+Na]^+$, um adoçante artificial geralmente adicionado em refrigerantes e sucos tidos como “*light*”. Outro íon relevante é o de m/z 365, que pode ser atribuído ao aduto de sódio da maltose, um açúcar comumente encontrado em diversas bebidas. O íon intenso de m/z 279 pode ser atribuído à forma protonada do éster dibutílico do ácido benzenodicarboxílico (DBP), substância comumente usado em embalagens plásticas e garrafas.^{114,115} Já o íon de m/z 325 pode ser atribuído a um dímero de próton da anidrohexose, cuja presença em bebidas alcoólicas já foi relatada na literatura.¹¹⁶

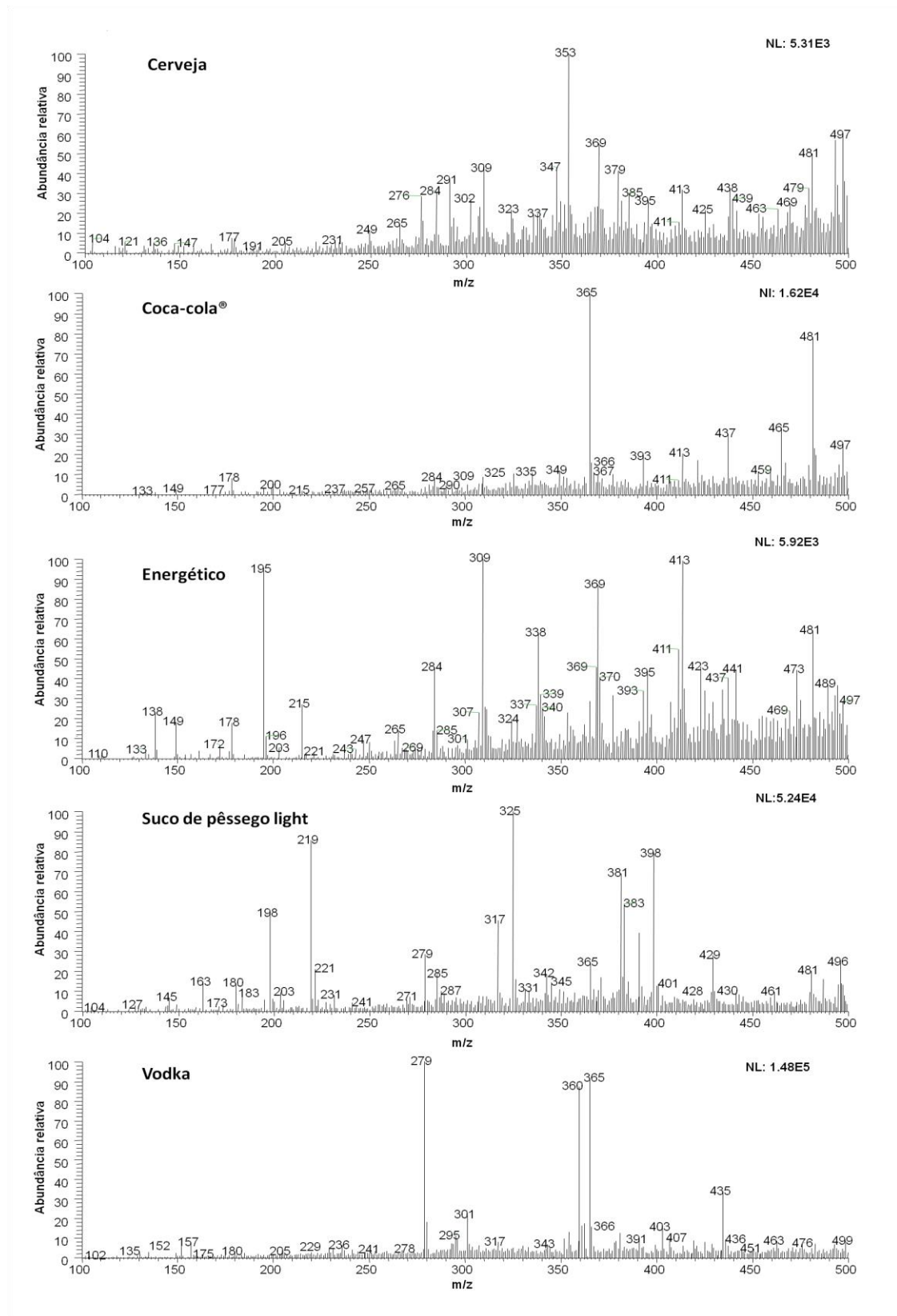


Figura 23 - Espectros PS(+)-MS das bebidas não dopadas cerveja, Coca-Cola®, energético, suco de pêssgo light e vodka obtidos após a aplicação do pré-tratamento de amostra LLE-LTP.

Uma explicação plausível para a fácil identificação dos compostos benzodiazepínicos nos espectros PS(+)-MS obtidos após a aplicação do método LLE-LTP – claramente verificável comparando-se os espectros mostrados nas Figuras 21 e 22 – seria o fato do preparo de amostra adotado permitir a extração dos analitos a partir das bebidas e concentrá-los na fase orgânica (acetonitrila) não congelada. Desse modo, podemos inferir que o extrato de acetonitrila reteve preferencialmente os analitos e não componentes da matriz responsáveis por supressão iônica. É importante ressaltar que o teor alcoólico dos drinques deve ser considerado para a aplicação da extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (LLE-LTP), uma vez que a miscibilidade entre os solventes acetonitrila e água cresce proporcionalmente com o aumento do teor alcoólico do meio, mesmo em baixas temperaturas.^{113,117} No entanto, todas as amostras que passaram pelo método de extração proposto apresentaram separação de fases após o congelamento da fase aquosa, apesar da presença de etanol. O teor alcoólico dos drinques contendo vodka foi de 12,5% (drinques preparados com volume total de 300 mL, utilizando 100 mL de vodka com 37,5% de teor alcoólico), enquanto que o teor alcoólico da cerveja foi de 4,8%. Considerando a diluição feita durante a extração, em que foram adicionados 5 mL dos drinques dopados e 5 mL de acetonitrila, o teor de álcool reduziu-se pela metade (6,25% para bebidas com vodka e 2,4% para cerveja). Assim, podemos propor que a quantidade de etanol presente nas amostras não foi suficientemente grande para tornar o sistema ternário água + etanol + acetonitrila miscível a baixas temperaturas.

Para avaliar a estabilidade dos analitos de interesse, aliquotas do drink composto por energético e vodka dopado foram coletadas em diferentes tempos de exposição às condições ambiente e posteriormente analisadas. Nenhum dos espectros PS(+)-MS obtidos apresentou alterações substanciais mesmo após 48 h de exposição. A semelhança notável entre os espectros de massas indica claramente que os compostos benzodiazepínicos permaneceram estáveis sob estas condições (Figura 24). Este é um resultado de grande valia para investigações forenses, já que os analitos que comprovariam a ocorrência do golpe "Boa noite, Cinderela" (benzodiazepínicos neste caso) poderiam ser identificados pela metodologia PS-MS/ LLE-LTP mesmo em bebidas deixadas no local do crime por um longo período de tempo.

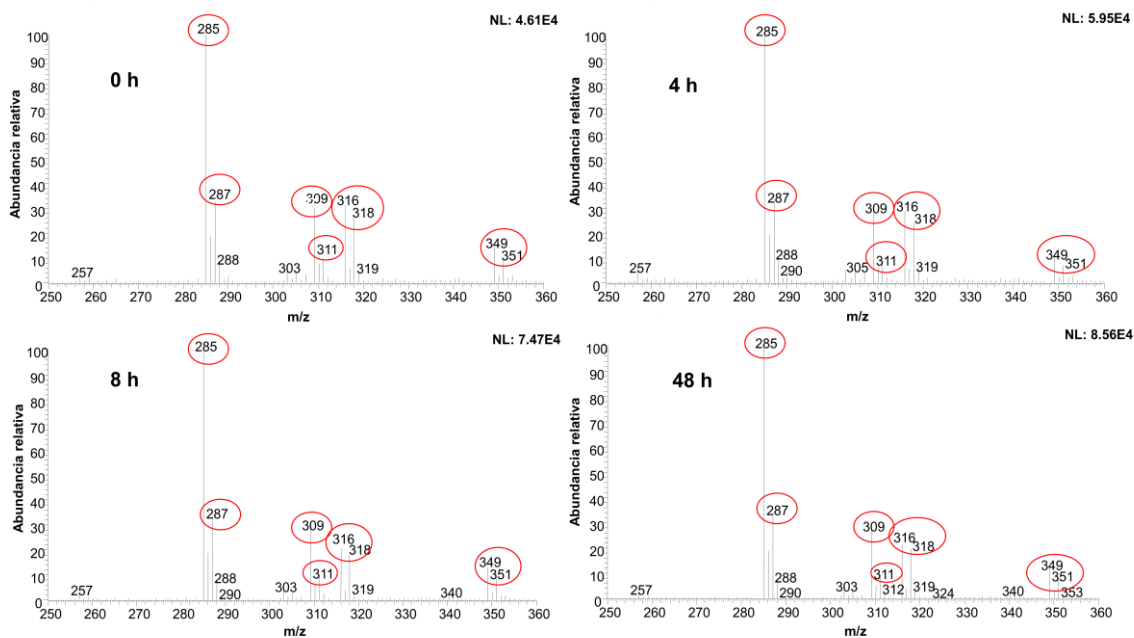


Figura 24 - Espectros PS(+)-MS obtidos para aliquotas do drinque composto por energético e vodka dopado com Diazepam (m/z 285 e 287), Alprazolam (m/z 309 e 311), Clonazepam (m/z 316 e 318), Bromazepam (m/z 316 e 318) e Cloxazolam (m/z 349 e 351), coletados em diferentes tempos de exposição sob condições ambiente (0, 4, 8 e 48 h).

Como muitas variáveis afetam a qualidade dos espectros de massas obtidos via ionização PS, e.g. dimensões do papel triangular e distância entre a entrada do espectrômetro de massas e a ponta do papel, foi importante verificar se o a metodologia PS-MS/ LLE-LTP poderia ser aplicada para quantificar compostos benzodiazepínicos em bebidas. Para este propósito, Diazepam (o único padrão de grau analítico disponível em nosso laboratório) e Cloxazolam (obtido através de extração em comprimidos desse medicamento) foram selecionados como composto alvo conveniente para quantificação e padrão interno, respectivamente. A cerveja foi utilizada como matriz modelo, pois seu espectro de massas apresentou a maior complexidade dentre todas as outras bebidas avaliadas (Figura 23).

Assim, uma curva de calibração (Figura 25) foi construída através da razão entre as intensidades totais de Diazepam protonado (m/z 285) e Cloxazolam protonado (m/z 349), obtidas nos dados PS(+)-MS de amostras submetidas ao procedimento LLE-LTP. Os seguintes níveis de concentração foram avaliados: 0,0; 0,50; 1,0; 5,0; 10; 20; 30 e 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O modelo

matemático de regressão linear, obtido pelo método dos mínimos quadrados, não se ajustou aos dados experimentais quando todos os níveis de concentração (até 40 mg L⁻¹) foram levados em consideração, mas forneceu um excelente coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9991$) quando ajustado até o nível de concentração de 10 mg.L⁻¹ (Figura 25a). Outros modelos de regressão foram testados e um polinômio de segunda ordem foi o que se ajustou melhor a todos os níveis de concentração estudados ($R^2 = 0,9959$), como mostra a Figura 25b. Este resultado parece, portanto, indicar que a resposta do método permanece aproximadamente constante para níveis superiores a 10 mg.L⁻¹. Assim, o intervalo linear foi determinado como sendo do limite de detecção até a concentração de 10 mg.L⁻¹ para o Diazepam.

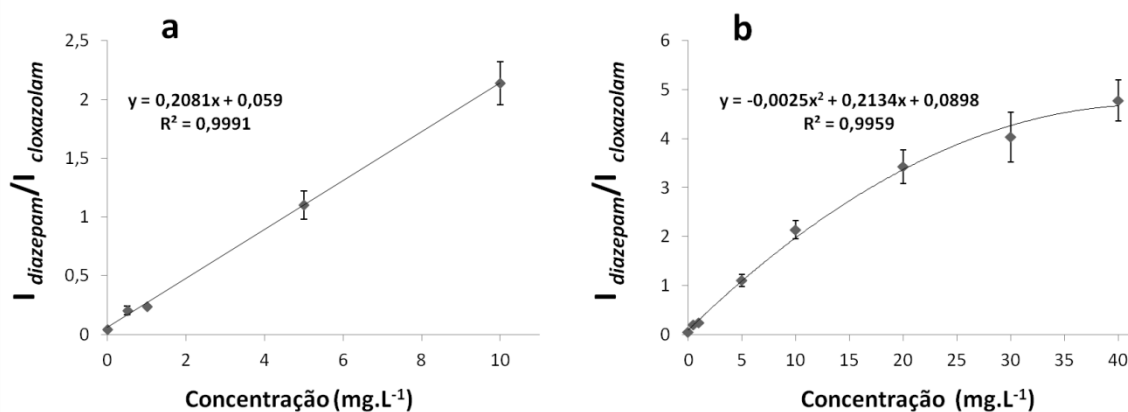


Figura 25 - Curvas analíticas obtidas para quantificação de Diazepam em cerveja (matriz modelo), utilizando Cloxazolam como padrão interno: (a) Curva obtida a partir de regressão linear; (b) Curva obtida a partir de regressão polinomial de segunda; onde. I_{diazepam} e $I_{\text{Cloxazolam}}$ se referem às intensidades absolutas dos íons m/z 285 (Diazepam protonado) e 349 (Cloxazolam protonado) obtidas dos dados PS(+)-MS de amostras submetidas ao método LLE-LTP .

O limite de detecção obtido para o método PS-MS/LLE-LTP foi 0,050 mg.L⁻¹ de Diazepam (S/ N = 10), calculado através da média e do desvio padrão de sete amostras brancas independentes (uma mistura de cerveja e acetonitrila na proporção de 1:1 (v/ v) com adição de solução estoque de Cloxazolam até a concentração final de 20 mg.L⁻¹). O desvio padrão relativo encontrado foi 19,9%., calculado para o nível de concentração 10 mg.L⁻¹, utilizando-se 11 repetições independentes. O valor obtido para o desvio padrão

relativo, apesar de elevado, está de acordo com outros resultados relatados na literatura e certamente pode ser atribuído às muitas variáveis que afetam a repetibilidade dos dados adquiridos pela técnica de PS, como já mencionado.^{37,118} De acordo com os critérios de aceitação definidos pela Comissão Européia (EC)¹¹⁹, que estabelecem recuperações entre 80% e 110% para níveis de concentração acima de 10 µg.L⁻¹, as recuperações obtidas para os três níveis estudados estão dentro do intervalo estabelecido (90,100 e 97% para os níveis 1,0, 5,0 e 10 mg.L⁻¹ de Diazepam, respectivamente). Um resumo dessas figuras de mérito é apresentado na Tabela 3

Tabela 3 - Figuras de Merito obtidas para o método LLE-LTP/ PS- MS para quantificação de Diazepam em cerveja, utilizando-se Cloxazolam como padrão interno

Figuras de Merito	Resultados
Limite de detecção	0,05 mg.L ⁻¹
Faixa linear de trabalho	0,05 – 10 mg.L ⁻¹
Coeficiente de determinação (R ²)	0,9991
Desvio padrão relativo	19,9 % (para 10 mg.L ⁻¹ , n =10)
Recuperação	90,100 e 97% (níveis 1,0, 5,0 e 10 mg.L ⁻¹ de Diazepam, respectivamente)

Em uma situação real de crime facilitado por drogas, a concentração final de Diazepam em um drinque de 300 mL dopado com um comprimido de 5,0 ou 10 mg de Diazepam (concentrações comumente encontras desse medicamento em farmácias) estaria na faixa de concentração entre 10 a 40 mg.L⁻¹. Assim, para que a concentração de Diazepam de uma amostra como a descrita acima esteja dentro da faixa linear da curva de calibração construída através do método quantitativo PS-MS/ LLE-LTP (0,050 a 10 mg.L⁻¹), essa amostra deveria ser diluída de 2 a 4 vezes.

2.2.4 Conclusões

Através da metodologia PS-MS/ LLE-LTP desenvolvida neste trabalho, que envolveu um simples método de extração (LLE-LTP) associado a uma técnica analítica de fácil aquisição de dados (PS-MS), foi possível identificar com sucesso cinco compostos benzodiazepínicos (Diazepam, Alprazolam, Clonazepam, Bromazepam e Cloxazolam) em diferentes bebidas alcoólicas, tidas como matrizes complexas devido sua composição química variada. Toda a metodologia pode certamente ser empregada para fornecer evidências irrefutáveis para a comprovação da ocorrência de crimes facilitados por drogas, como o golpe popularmente conhecido como "Boa noite, Cinderela". A nova metodologia PS-MS/ LLE-LTP também se mostrou promissora para fins de quantificação, apesar das variáveis que afetam a aquisição de dados PS-MS.

Assim, é razoável imaginar que a metodologia aqui descrita poderia ser aplicação também em uma cena de crime, onde possa ter ocorrido uma situação real de crime facilitado por drogas. Para tal, um espectrômetro de massas portátil adaptado com uma fonte de ionização PS ¹²⁰, já existente no mercado, e um recipiente térmico para transporte de nitrogênio líquido poderiam ser usados por especialistas da polícia para fornecer um resultado *in situ*. Também se pode especular que o presente estudo tem grande potencial para aplicação em laboratórios forenses, onde métodos analíticos rápidos e simples devem ser rotineiramente empregados em virtude da grande demanda diária de análises.

Entretanto, é importante afirmar que, embora o potencial da metodologia PS-MS/ LLE-LTP tenha sido demonstrado, são necessários mais estudos para sua plena implementação como uma prática de rotina dedicada a investigar a ocorrência de crimes facilitados por drogas.

***Capítulo 3 - Monitoramento e
Aceleração de Reações Químicas***

3.1 Espectrometria de Massas com Ionização *Paper Spray* Aplicada no Monitoramento de um Sistema Químico em Equilíbrio Químico Dinâmico: o Processo Redox do Azul de Metileno

3.1.1 Introdução

Monitorar e compreender reações químicas que ocorrem em equilíbrio químico dinâmico não é uma tarefa fácil devido à alta velocidade com que essas reações retornam às condições de estabilidade após sofrerem alterações. Avaliar como e quais perturbações podem interferir na concentração de seus produtos e reagentes, bem como identificar possíveis espécies intermediárias, exige o uso de técnicas analíticas de rápida aquisição de dados, que necessitem de um mínimo ou nenhum preparo de amostra, para que o resultado da análise corresponda de fato ao estágio reacional avaliado.

A técnica de ionização ambiente *paper spray* acoplada à espectrometria de massas possui as características citadas acima e possui grande potencial para ser aplicada para a caracterização e interpretação da dinâmica existente em reações que ocorrem sob condições reversíveis, uma vez que os fatores que influenciam esses sistemas poderiam ser avaliados logo que alterado (*in situ*). Entretanto, é importante ressaltar que sistemas em equilíbrio químico que envolvessem apenas espécies enantioméricas não poderiam ser avaliados por essa metodologia, uma vez que não seria possível diferenciar compostos que possuem as mesmas razões massa/carga e os mesmos perfis de fragmentação.²

O azul de metileno (AM) é um composto aromático heterocíclico catiônico amplamente utilizado como corante bacteriológico para diferenciação de bactérias e como indicador redox em reações que envolvem transferência de elétrons.^{121,122} Na sua forma oxidada, o AM apresenta uma cor azulada devido ao seu sistema π conjugado. O grande número de ligações duplas alternadas na molécula proporciona a diminuição da energia necessária para a promoção de elétrons dos orbitais ligantes de maior energia ocupados (HOMO) para orbitais antiligantes de menor energia desocupados (LUMO) – transições

do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$.¹²³ As energias associadas a essas transições eletrônicas em sistemas π conjugados podem chegar à faixa de radiação da luz visível, de modo que compostos com essas características podem apresentar cor quando exposto a luz. Em um ambiente redutor, no entanto, o leuco-AM (incolor) se torna predominante (Figura 26) devido à entrada de um próton na estrutura molecular do AM, o que diminui a quantidade de duplas ligações conjugadas na molécula e aumenta o *gap* energético das transições HOMO-LUMO. Conseqüentemente, a energia do fóton envolvido nesse processo passa a estar acima da faixa de radiação visível.¹²³ Assim, rápidas mudanças de cor podem ser observadas em sistemas contendo essas espécies (AM e Leuco-AM), quando condições que favorecem preferencialmente a formação de uma delas são estabelecidas.

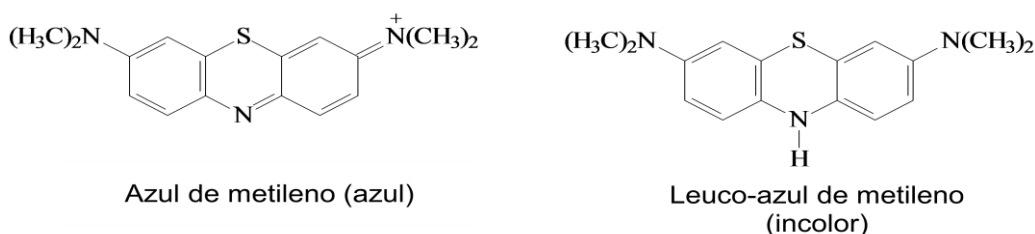


Figura 26 - Estruturas químicas das formas oxidada (azul) e reduzida (incolor) do corante azul de metileno.

Nesse contexto, o presente trabalho descreve uma aplicação sem precedentes da técnica PS-MS, na qual um sistema reversível modelo – o processo redox do azul de metileno – foi monitorado sob condições de perturbação. Para elaboração do sistema redox, um agente redutor (zinco metálico) foi adicionado a uma solução aquosa ácida de azul de metileno.^{124,125}

Além disso, os estudos realizados nessa abordagem tiveram como inspiração o desenvolvimento de conteúdo didático para aulas de caráter prático em cursos de graduação, na qual o tema equilíbrio químico poderia ser discutido de modo interativo através de avaliações experimentais visuais e instrumentais simultaneamente.

O ensino tradicional apenas focado em aulas expositivas muitas vezes não é suficiente para desenvolver de forma satisfatória uma habilidade de compreensão por parte dos alunos, pois não permite a avaliação da aprendizagem por parte do professor. Assim, aulas práticas que possibilitem o diálogo entre professor e alunos durante a elaboração de experimentos são de grande valia, pois além de permitirem uma abordagem mais realista do tema estudado, podem também favorecer o processo de ensino e aprendizagem através das discussões que surgem durante a aquisição dos resultados.

3.1.2 Parte Experimental

Materiais e instrumentação

Metanol grau HPLC foi adquirido através da J.T. Baker Chemicals (Center Valley, PA, EUA). Os padrões de azul de metileno, de zinco metálico em pó (98,0%) e de ácido sulfúrico (95,0% - 98,0%) foram adquiridos através da Synth (Diadema, SP, Brasil). O papel cromatográfico (grau I) foi adquirido através da Whatman International Ltd (Maidstone, Inglaterra). As medições de pH foram realizadas utilizando um medidor de pH da marca Hanna (Woonsocket, EUA).

Todos os experimentos PS-MS foram realizados utilizando um espectrômetro de massas LCQ Thermo-Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) no modo positivo de leitura de íons. As condições instrumentais foram as seguintes: voltagem aplicada ao papel, 4 kV; temperatura do capilar, 275 °C; tensão no capilar, 35 V; tensão na lente do tubo, 65 V. Os espectros de massas *full scan* foram adquiridos ao longo da faixa de massas de 100-350 *m/z*.

Preparo do sistema monitorado

Para a identificação das espécies em equilíbrio, 50,0 mL de uma solução de AM (70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), preparada em metanol/água 1: 1 v/v, e 1,0 g de zinco metálico em pó foram adicionados a um béquer de vidro de 50 mL. O sistema foi mantido sob agitação e o pH da solução foi monitorado antes e após a adição de zinco metálico. Para avaliar os efeitos da variação de pH, gotas de uma solução aquosa de ácido sulfúrico (0,01 mol.L^{-1}) foram adicionadas ao

sistema entre as análises PS-MS. Esse sistema foi construído e avaliado em triplicata.

Análises PS-MS

Para realização das análises PS-MS, pequenos pedaços de papel cromatográfico foram cortados em forma triangular (altura de 10 mm e uma largura na base 5 mm). O triângulo de papel foi posicionado aproximadamente a 5 mm da entrada do espectrômetros de massas, usando um clipe metálico fixado a uma plataforma com movimento tridimensional. A alta tensão aplicada ao papel através do clipe metálico foi de aproximadamente 4,0 kV. Para evitar efeitos de memória, um novo papel foi usado em cada aquisição PS-MS. Espectros de massas de fragmentação foram obtidos para comprovação das estruturas químicas propostas, utilizando-se uma energia de colisão de 30 % (unidade do fabricante).

Três alíquotas (5,0 µL cada) foram recolhidas do sistema de reação em momentos diferentes e, imediatamente, analisadas por PS-MS. Todas as análises duraram em torno de 30 segundos – desde a amostragem até a completa aquisição dos espectros. Uma descrição sobre as condições experimentais do sistema no momento em que cada alíquota foi recolhida é apresentada na Tabela 3.

Tabela 4 - Condições experimentais do sistema instantes antes da análise por PS-MS.

Alíquotas	pH	Descrição	Tempo	Coloração da solução
1	6.08	Sistema inicial (solução colorida)	Tempo inicial	Azul intenso
2	5,85	Após adição de zinco metálico e solução ácida	5 minutos após as adições	Azul claro (quase incolor)
3	6.07	Retorno ao sistema inicial	10 minutos após adições	Azul intenso

3.1.3 Resultados e discussão

As análises por PS-MS foram realizadas em modo positivo, devido às estruturas catiônicas das formas oxidadas e reduzidas derivadas do corante azul de metileno. Os espectros PS-MS obtidos para cada alíquota recolhida nas condições experimentais especificadas (Tabela 4) são apresentados na Figura 27. O pH do meio foi monitorado durante todo o período de coleta das alíquotas.

O espectro PS-(+)-MS referente à alíquota 1 corresponde à solução de azul de metileno inicial (pH 6,08) antes das adições de zinco metálico e solução ácida, no qual os íons de m/z 284, 285 e 286 foram observados. O íon com maior intensidade relativa (m/z 284) corresponde ao azul de metileno em sua forma catiônica, *i. e.* $[C_{16}H_{18}N_3S]^+$ ou simplesmente $[AM]^+$, sendo este o íon responsável pela intensa coloração azul da solução (Figuras 27a e 27b), devido seu extenso sistema π conjugado. Os demais íons (m/z 285 e 286) observados no espectro de massas referente à alíquota 1 correspondem aos isotopólogos mais pesados do $[AM]^+$, $[^{13}C^{12}C_{15}H_{18}N_3S]^+$ e $[C_{16}H_{18}N_3^{34}S]^+$, respectivamente. A distribuição teórica calculada para os isotopólogos do íon $[AM]^+$ (m/z 284 / m/z 285 / m/z 286 = 100 / 19,4 / 6,3) corresponde aproximadamente à observada experimentalmente (m/z 284 / m/z 285 / m/z 286 = 100 / 21,6 / 7,9), como mostra a Figura 27a, o que reforça a ideia de que no instante inicial ainda não há uma quantidade significativa da espécie $[leuco-AM + H]^+$ de m/z 286.

A alíquota 2 foi coletada e analisada assim que se observou a descoloração da solução após a adição de zinco metálico (1,0 g) e gotas da solução de ácido sulfúrico (0,01 mol.L⁻¹). Durante a coleta dessa alíquota, o pH do meio estava em 5,85 (Figura 27b e Tabela 4). Como esperado, além das mudanças visuais observadas, alterações notáveis também foram verificadas no espectro PS-(+)-MS da alíquota 2 (Figura 27b). As intensidades relativas dos íons de m/z 285 e 286 aumentaram significativamente enquanto que a intensidade relativa do íon $[AM]^+$ (m/z 284) decresceu.

Após a descoloração da solução e coleta da alíquota 2, o sistema foi agitado vigorosamente por 5 minutos. Durante esse período, observou-se a formação de bolhas de H₂ (resultante da redução de H⁺ pelo Zn) e o retorno gradual da coloração azul à solução. A alíquota 3 foi coletada assim que a

solução retornou ao aspecto inicial, sendo seu pH neste momento 6,07 – pH este semelhante ao da solução no instante inicial ($\text{pH}_{\text{inicial}} = 6.08$). Também como esperado, o espectro PS-(+)-MS registrado para a alíquota 3 (Figura 27c) apresentou um perfil quase idêntico ao observado para a solução inicial (Figura 27a).

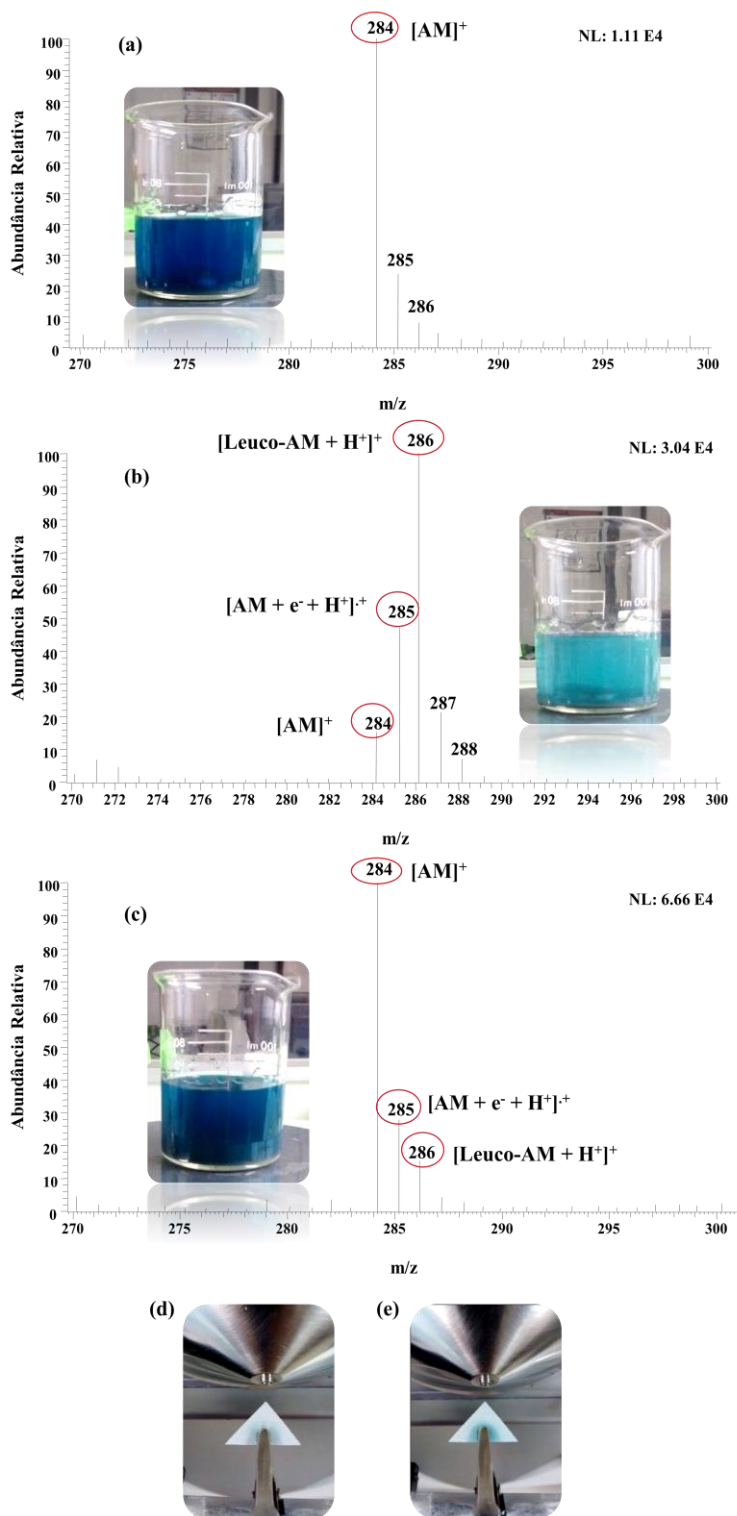


Figura 27 - Espectros PS-(+)-MS das alíquotas coletadas em diferentes condições experimentais: (a) alíquota 1: solução inicial (pH = 6.08); (b) alíquota 2: coletada após a adição de zinco metálico e solução ácida (pH = 5.85); (c) alíquota 3: retirada após o sistema sob agitação retornar ao aspecto inicial (pH = 6.07). As imagens correspondem à solução nos instantes em que as alíquotas foram retiradas; (d) Papel fixado no clipe metálico no início da análise PS-MS da alíquota 2; (e) Papel fixado no clipe metálico no final da análise PS-MS da alíquota 2: intensificação da cor azul no papel ao redor do clipe metálico.

Uma proposta das reações químicas que racionalizam as observações experimentais visuais e instrumentais obtidas para o sistema redox do azul de metileno é apresentada na Figura 28. Na presença de zinco metálico e após a adição de ácido sulfúrico, o corante catiônico $[AM]^+$ de m/z 284 incorpora um elétron para fornecer uma espécie reduzida, que foi detectada no espectro PS-(+)-MS da alíquota 2, em sua forma protonada, *i. e.* $[AM + e + H]^{\bullet}$ de m/z 285 (Figura 27b). Sob estas condições, este intermediário radicalar pode sofrer uma redução adicional e produzir o chamado leuco-AM – composto incolor que já foi observado indiretamente em outros experimentos eletroquímicos.^{126,127} A formação da espécie mais reduzida leuco-AM é também suportada pelo espectro PS-(+)-MS obtido para alíquota 2 (Figura 27b), no qual o sinal intenso em m/z 286, pode ser atribuído à forma leuco protonada de AM, *i. e.* $[Leuco-AM + H]^+$ ou $[AM + 2e + 2H]^+$. No entanto, a espécie intermediária de m/z 285 também pode ter outra origem; o processo de ionização *paper spray* em modo positivo de leitura de íons é basicamente um processo de oxidação, de modo que a espécie intermediária pode ser também um produto da oxidação do leuco-AM. Esta possibilidade pode ser confirmada pelo aparecimento da cor azul no papel, ao redor do clipe metálico, durante a análise PS-MS da alíquota 2 (Figura 27d e 27e), indicando que há oxidação da forma leuco-AM e, conseqüentemente, formação da espécie mais oxidada colorida $[AM]^+$. A redução contínua de $[AM]^+$ para produzir a forma leuco-AM explica, por sua vez, a descoloração da solução. Essas observações evidenciam, portanto, que a espécie intermediária de m/z 285 pode ser gerada através da redução do íon $[AM]^+$ de m/z 284 (azul) e da oxidação do íon $[Leuco-AM + H]^+$ de m/z 286 (incolor).

A introdução contínua de O₂ atmosférico (um agente oxidante) ao sistema durante a agitação, que promove a oxidação do zinco metálico a óxido de zinco (ZnO) e dificulta a transferência de elétrons, e a redução contínua das espécies H⁺ a H₂ pelo zinco metálico são condições que favorecem a oxidação total da espécie leuco-AM e, conseqüentemente, a formação da espécie mais reduzida [AM]⁺. Por essas razões, observou-se o retorno da cor original azul intensa da solução entre o período após a coleta da alíquota 2 até a coleta da alíquota 3. O espectro PS-(+)-MS obtido para a alíquota 3 (Figura 25c) confirma essas especulações, uma vez que o íon [AM]⁺ de *m/z* 284 tornou-se predominante e o perfil do espectral bastante semelhante ao da solução original caracterizada através da alíquota 1 (Figura 27a). Este ciclo de oxidação/redução foi repetido por três vezes (apenas acrescentando-se quantidades adicionais de ácido) e resultados idênticos aos descritos acima foram observados em cada ciclo.

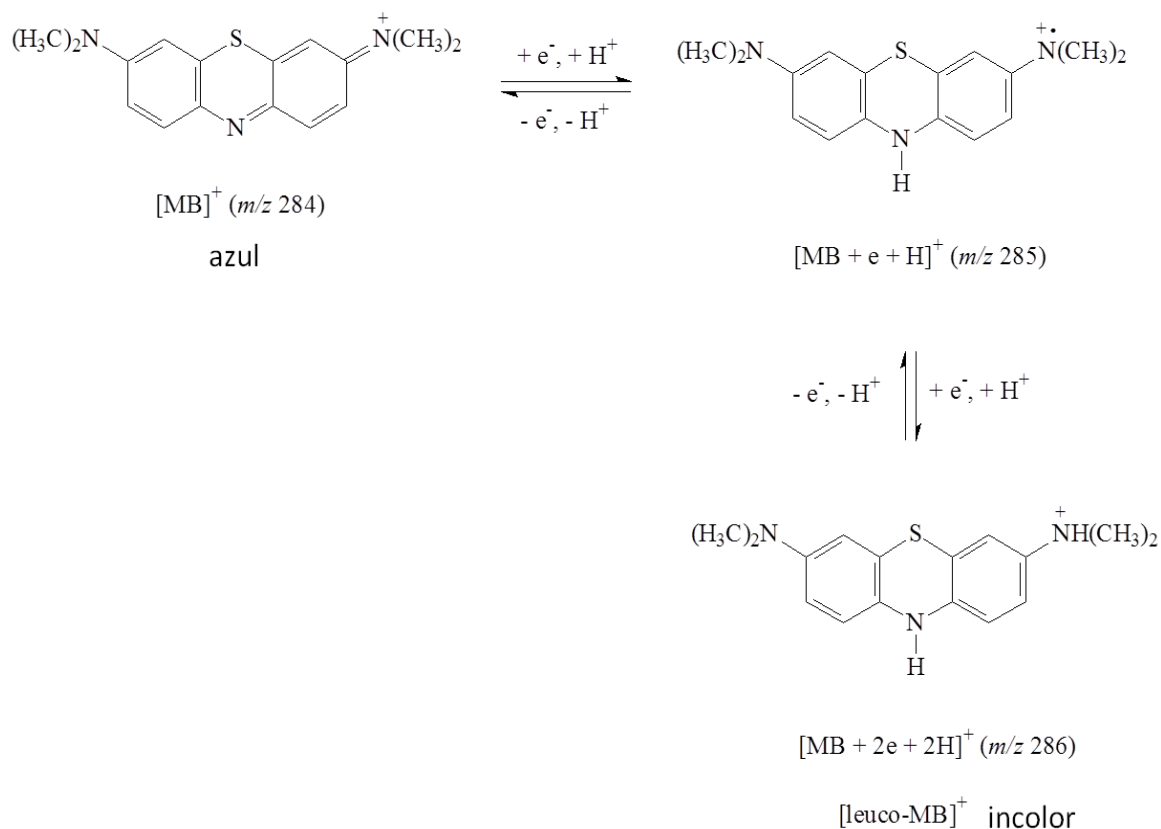


Figura 28 - Espécies propostas derivadas do processo redox do azul de metileno em equilíbrio dinâmico.

A adição de ácido é, portanto, uma condição necessária para o avanço do processo redox do azul de metileno, pois além de deslocar o equilíbrio químico estabelecido entre as espécies no sentido de formação das espécies reduzidas (principalmente leuco-AM, Figura 28), também auxilia na retirada do óxido produzido na superfície do metal, melhorando o processo de transferência de elétrons a partir do zinco metálico para o corante catiônico [AM]⁺.

Para certificar que as estruturas propostas para cada espécie na Figura 28 são mais do que uma mera especulação, os íons de m/z 284 ([AM]⁺), m/z 285 ([AM + e + H]^{+•}) e m/z 286 ([leuco-AM + H]⁺) foram selecionados e fragmentados mediante dissociação induzida por colisão (CID) sob a mesma energia de colisão durante a análise da aliquota 2. Os resultados, apresentados na Figura 29, indicam que os íons precursores se dissociam, principalmente, através da perda de um grupo metila, o que condiz com as estruturas químicas atribuídas para as duas espécies derivadas das reduções sucessivas de [AM]⁺ (Figura 28). Outros íons filhos também são observados no espectro de fragmentação de [AM]⁺ (Figura 29a) (m/z 268 = [AM]⁺ - CH₄; m/z 241 = [AM]⁺ - CH₃-N=CH₂; m/z 240 = [AM]⁺ - (CH₃)₂N[•]) e [AM⁺ + e + H]^{+•} (Figura 29b) (m/z 241 = [AM + e + H]^{+•} - (CH₃)₂N[•]). Ao contrário do que foi observado para a fragmentação dos íons precursores [AM]⁺ e [AM + e + H]^{+•}, a espécie [leuco-AM + H]⁺ de m/z 286 dissocia-se apenas através da perda de um grupo metila (Figura 29c). As razões para essa dissociação diferenciada do íon precursor [leuco-AM + H]⁺ são desconhecidas, mas provavelmente estão relacionadas a características estruturais distintas dessa espécie.

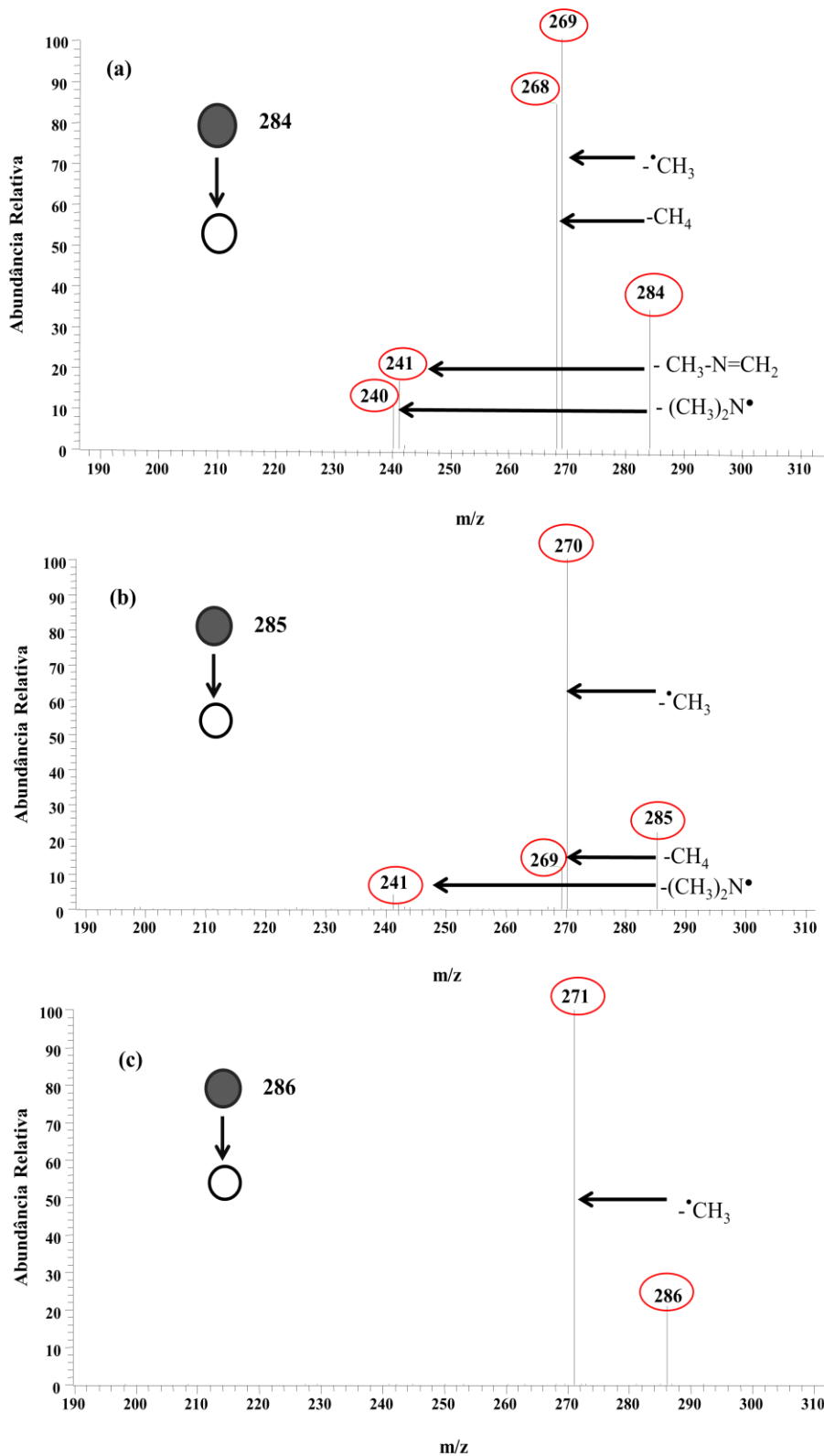


Figura 29 - Espectros de fragmentação dos seguintes íons precursores: (a) [AM]⁺ de m/z 284; (b) [AM + e + H]⁺ de m/z 285; (c) [leuco-AM + H]⁺ de m/z 286 obtidos durante a análise PS-(+)-MS da alíquota 2 .

As tentativas para monitorar este sistema reacional usando espectrometria de massas com ionização ESI não foram bem sucedidas, provavelmente devido à elevada força iônica das alíquotas testadas. Os valores de força iônica das alíquotas em diferentes valores de pH foram calculados e variaram entre 0,60 e 0,30 mol/L, considerando que a maior contribuição foi do íon Zn^{2+} , a espécie iônica de maior concentração no meio reacional dentre os demais íons presentes em solução. Uma possível explicação para a falha do ESI é o fato de que, quando uma solução altamente condutora é injetada no equipamento, a ponta do capilar não é capaz de manter a elevada diferença de potencial gerada entre sua extremidade e a entrada do espectrômetro, dando origem a sinais instáveis ou até mesmo à supressão de sinais.⁸⁸ As tentativas de diminuir a tensão da ESI para minimizar a supressão de sinais também falhou porque a intensidade dos sinais associados aos íons relacionados às espécies de azul de metileno também diminuiu, impossibilitando a identificação desses íons. A supressão de sinais analíticos pela ionização PS, provavelmente, foi minimizada devido ao fato do papel utilizado como suporte amostral ser capaz de interagir e fixar o excesso de íons Zn^{2+} da solução através de interações intermoleculares como, por exemplo, interações do tipo íon-dipolo, diminuindo a quantidade de íons que adentram no espectrômetro de massas.

3.1.4 Conclusões

A técnica de ionização ambiente PS-MS mostrou ser uma excelente alternativa para o monitoramento em tempo real de sistemas que estão sob condições de equilíbrio químico dinâmico, uma vez que proporcionou uma aquisição de dados rápida, sem requerer etapas de preparo da amostra. A análise PS-MS em tempo real do sistema composto por $[AM]^+$ (azul de metileno catiônico) em equilíbrio com as suas formas reduzidas ($[AM + e + H]^+$ e $[leuco-AM + H]^+$) permitiu a verificação quase instantânea da predominância de cada espécie sob condições de reação diferentes (presença de um agente redutor associado com o pH da solução).

Além disso, as formas estruturais de cada espécie também puderam ser confirmadas pelos padrões de fragmentação obtidos de modo sequencial durante a aquisição de dados PS-MS.

Desse modo, podemos inferir que este é um excelente exemplo de sistema reacional reversível que poderia ser explorado em aulas práticas destinadas a estudantes de graduação para abordar temas como equilíbrio químico dinâmico de modo superficial (através de observações visuais) e de modo mais minucioso (através da aplicação de técnicas analíticas modernas como a PS-MS).

3.2 Espectrometria de Massas com Ionização *Paper Spray* Aplicada à Aceleração da Síntese de Derivados de Ftalimida

3.2.1 Introdução

Dentre as tarefas complicadas que muitos químicos enfrentam diariamente no laboratório, podemos destacar o desenvolvimento, monitoramento e otimização de reações em escala de bancada como sendo as mais laboriosas. Muitas reações de interesses diversos – farmacêutico, industrial, ambiental – fazem uso de reagentes de alto custo, possuem diversas variáveis que devem ser consideradas e controladas durante o processo – proporções estequiométricas de reagentes, pH, temperatura, viscosidade, densidade, pressão, etc. – e as vezes, muitas etapas que demandam uma grande quantidade de tempo. E, apesar de todo o esforço envolvido, não há nenhuma garantia de sucesso.

Dadas essas dificuldades, estudos envolvendo reações realizadas em "micro-reatores" vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, nos quais reações químicas são promovidas em pequena escala, mais especificamente, no interior de gotículas contendo volumes na ordem de nanolitros a microlitros de solução.¹²⁸ O crescente interesse em sistemas reacionais em escala micro se deve em parte ao melhor domínio das condições reacionais que estes sistemas proporcionam quando comparados a sistemas em escala de bancada. Além disso, o aumento considerável da área superficial das gotículas e as rápidas trocas de massa e energia que ocorrem nesses microambientes reacionais podem favorecer a cinética da reação, já que um número maior de colisões efetivas entre as moléculas reagentes pode ocorrer em pouco tempo, acelerando o processo reacional como um todo.^{22,128}

Na literatura atual, muitos trabalhos já demonstraram como reações químicas podem ser desencadeadas em microgotas. Dentre esses trabalhos podemos destacar reações orgânicas e inorgânicas promovidas em gotículas geradas de diferentes formas: por meio de canais microfluídicos,¹²⁹⁻¹³¹ na superfície de filmes finos,¹³²⁻¹³⁴ e através do *spray* formado em fontes de ionização de espectrômetros de massas^{22,128,135,136}.

Técnicas de ionização ambiente, como a ionização *electrospray*, já foram empregadas com sucesso em reações de derivatização de analitos de difícil ionização (aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, alcanos e alcenos) em tempo real.¹³⁷ Essas reações acontecem rapidamente graças às gotículas geradas durante a formação do *spray*. As gotas formadas reduzem de tamanho à medida que caminham em direção à entrada do espectrômetro devido à evaporação do solvente, o que provoca um aumento da concentração das moléculas reagentes. Assim, a ocorrência de choques efetivos entre as espécies reagentes se torna cada vez mais provável, ocasionando a aceleração da reação.²⁹ A ionização PS, por possuir as mesmas características descritas acima com relação à formação do *spray*, também já foi aplicada na derivatização de aldeídos,⁷⁶ de quinonas¹³⁸ e na aceleração de sínteses orgânicas (reação do halofórmio)⁷⁷.

A ftalimida é uma imida derivada da reação entre anidrido ftálico e amônia, constituída por duas carbonilas ligadas ao mesmo nitrogênio. Durante a síntese, a amônia pode ser substituída por outros compostos nitrogenados, tais como aminas, diaminas e amidas, obtendo-se novos derivados de ftalimida (DF).¹³⁹ Atualmente, estes derivados têm sido o foco de diversas pesquisas, devido a suas atividades biológicas já relatadas na literatura. Alguns destes trabalhos relatam propriedades anti-tumorais¹⁴⁰, anti-oxidantes¹⁴¹, anti-inflamatórias^{142,143}, anti-microbianas¹⁴⁴ e anti-fúngicas¹⁴⁵ desses derivados. Desse modo, é evidente que essas substâncias possuem um grande potencial farmacêutico, embora mais estudos sejam necessários para maiores comprovações. Entretanto, tais estudos dependem de várias etapas como síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica, que exigem tempo e insumos. Por exemplo, algumas sínteses de derivados de ftalimida, relatadas por Grus e colaboradores¹⁴⁶, demandam cerca de 10 horas sob refluxo, além de passar por etapas de filtragem, lavagem, secagem e recristalização até a sua conclusão. Além disso, as técnicas de caracterização tradicionais, tais como Espectroscopia Infravermelho (IV) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), normalmente empregadas na caracterização de compostos orgânicos, exigem etapas de preparo de amostra que também são morosas e trabalhosas.

Portanto, considerando as limitações mencionadas acima com relação à síntese e caracterização de derivados de ftalimida, o presente trabalho propõe uma metodologia alternativa para gerar e caracterizar esses compostos simultaneamente. Para tal, a técnica PS-MS foi aplicada com o intuito de acelerar reações de síntese de derivados da ftalimida, identificando possíveis produtos e intermediários da reação em tempo real.

Além disso, a reatividade de diaminas alifáticas e diaminas aromáticas, usadas como reagentes, também pode ser avaliada neste estudo. Isso demonstra, mais uma vez, o potencial didático da técnica PS-MS que poderia, por exemplo, ser aplicada em aulas práticas de química orgânica. Nessas aulas, conceitos relacionados à isomeria e interações inter e intra-moleculares poderiam ser discutidos de maneira prática e objetiva através de espectros PS-MS.

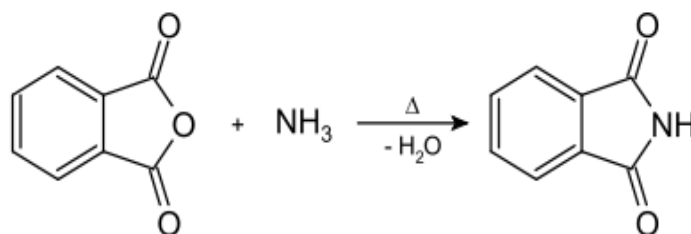


Figura 30 - Reação entre anidrido ftálico e amônia para formação da ftalimida.

3.2.2 Parte Experimental

Materiais e Instrumentação

O solvente metanol grau HPLC foi adquirido através da J.T. Baker Chemicals (Center Valley, PA, EUA). Os padrões analíticos das diaminas alifáticas, diaminas aromáticas, aminas aromáticas substituídas e do anidrido ftálico (98,0 %) foram adquiridos através da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). O papel cromatográfico (grau I) foi adquirido a partir da Whatman International Ltd (Maidstone, Inglaterra).

Todos os experimentos PS-MS foram realizados utilizando um espectrômetro de massas LCQ Thermo-Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) em modo positivo de leitura de íons. As condições instrumentais foram as seguintes: voltagem aplicada ao papel, 3,5 kV; temperatura do capilar, 275 °C; tensão do capilar, 35 V; tensão da lente do tubo, 65 V. Os espectros de massas

full scan para todas as reações foram obtidos em uma faixa de massas de 50-1000 *m/z*.

Preparo das soluções de trabalho

As soluções dos padrões de anidrido ftálico das diferentes aminas (etilenodiamina, propilenodiamina, *o*-fenilenodiamina, *m*-fenilenodiamina e *p*-fenilenodiamina) utilizadas como reagentes foram preparadas em metanol, utilizando balões volumétricos de 10,0 mL, sendo a concentração final de cada solução 0,01 mol.L⁻¹.

Análises PS-MS

Para as experiências PS-MS, pequenos pedaços de papel cromatográfico foram cortados em forma triangular (altura de 1 cm e largura da base 1 cm). As reações *in situ* foram realizadas adicionando-se ao papel, primeiramente, 2,0 µL de anidrido ftálico (0,01 mol.mL⁻¹) seguido de 2,0 µL da amina em questão (0,01 mol.mL⁻¹). Após as adições, o papel foi seco ao ar durante aproximadamente 1 minuto. Após a secagem, o papel foi posicionado aproximadamente a 3 mm de distância da entrada do espectrômetro, utilizando um clipe metálico fixo a uma plataforma com movimento tridimensional. Uma alta tensão de aproximadamente 3,5 kV foi aplicada ao papel através do clipe metálico depois da adição de 10,0 µL de metanol ao papel para formação do *spray*. Para evitar efeitos de memória, cada reação foi realizada em um novo papel. Os espectros de fragmentação, utilizados para comprovar a estruturas dos produtos e intermediários de reação, foram obtidos a partir de uma energia de colisão de 30% (unidade do fabricante).

3.2.3 Resultados e discussão

As reações entre o anidrido ftálico (PA) e as aminas selecionadas foram conduzidas sob as condições reacionais descritas na parte experimento sobre as análises PS-MS. Todos os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira, as reações foram monitoradas em modo positivo de leitura de íons, dando origem a espectros *full scan*. Na segunda, os íons considerados possíveis produtos e intermediários de reação foram selecionados e

fragmentados para fornecer informações sobre suas respectivas estruturas moleculares e vias reacionais.

As estruturas moleculares, bem como as fórmulas químicas e as razões massa/carga (m/z) das formas protonadas dos reagentes utilizados nas sínteses de derivados de ftalimida são mostradas na Figura 31.

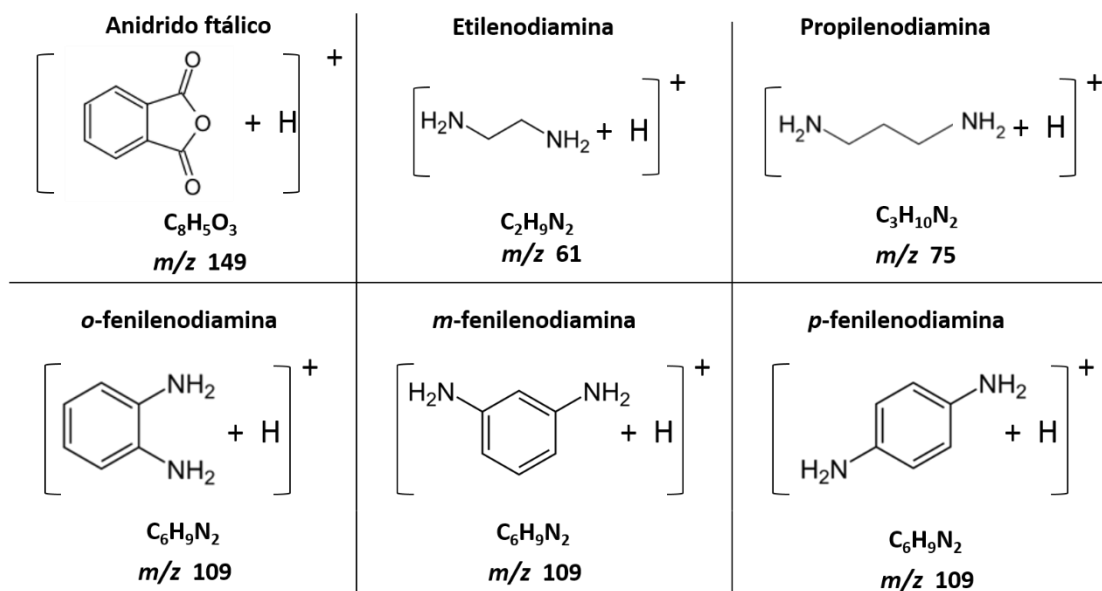


Figura 31 - Estruturas moleculares, fórmulas químicas e razões massa/carga (m/z) das formas protonadas dos reagentes utilizados para as sínteses dos derivados de ftalimida.

O tempo de análise da primeira etapa – desde a aplicação da alta tensão ao papel contendo os reagentes até a aquisição do espectro característico em *full scan* – foi de aproximadamente 40 segundos, o que inferimos ser também o tempo de reação. Essa rápida conversão de reagentes em produtos evidencia a aceleração da reação nas gotículas formadas durante a ionização PS, uma vez que esse tipo de reação demanda horas quando processada em larga escala.¹⁴⁶

Reações entre anidrido ftálico e diaminas alifáticas

O espectro de massas PS-(+)-MS proveniente da reação entre anidrido ftálico e etilenodiamina é apresentado na Figura 32. Os sinais referentes aos reagentes (anidrido ftálico - m/z 149 e etilenodiamina - m/z 61) não foram observados, o que aparentemente indica que ambos foram totalmente

consumidos durante a reação. O sinal mais intenso de m/z 209 ($[M + H]^+$) pode ser associado a uma amida, produto inicial da reação entre anidrido ftálico e etilenodiamina. Os íons de m/z 191 e 174, portanto, poderiam corresponder aos derivados de ftalimida, formados após a perda neutra de uma molécula de água (m/z 191) a partir do íon de m/z 209, que posteriormente sofre outra perda neutra de uma molécula de amônia (m/z 174). Já o íon de m/z 417 poderia ter duas origens: ser um dímero de próton do íon de m/z 209 ($[2M + H]^+$) ou uma espécie única formada pela reação entre duas moléculas de anidridos ftálicos e duas moléculas de etilenodiamina ($[M' + H]^+$), onde nesse caso M' seria a soma das massas dessas espécies ($M' = 2AF + 2ED$).

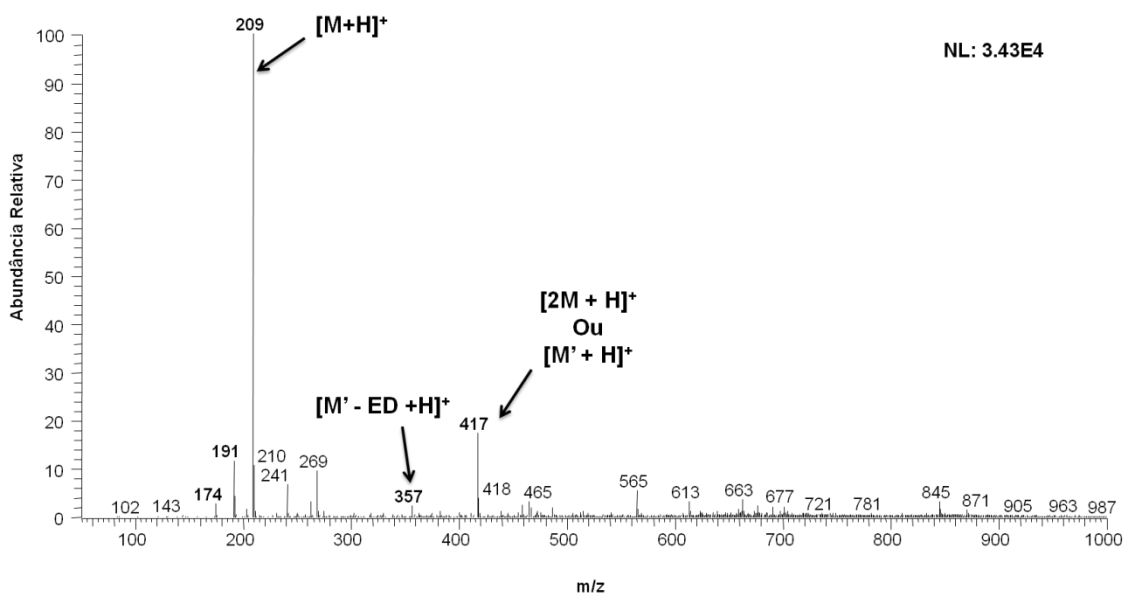


Figura 32 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico (AF) e etilenodiamina (ED).

As suposições feitas acima foram confirmadas através dos perfis de fragmentação obtidos para os íons de m/z 209 e 417, apresentados nas Figuras 33 e 34, respectivamente. Através do espectro de fragmentação do íon de m/z 209 (Figura 33) podemos confirmar a origem dos íons de m/z 191 e 174, uma vez que as mesmas perdas neutras de água e amônia foram observadas. A possibilidade do íon de m/z 209 se tratar apenas de um aduto formado entre o anidrido ftálico e a etilenodiamina também pode ser descartada através do espectro de massas de fragmentação, pois os sinais

referentes à dissociação deste possível aduto (anidrido ftálico - m/z 149 e etilenodiamina - m/z 61) não foram observados.

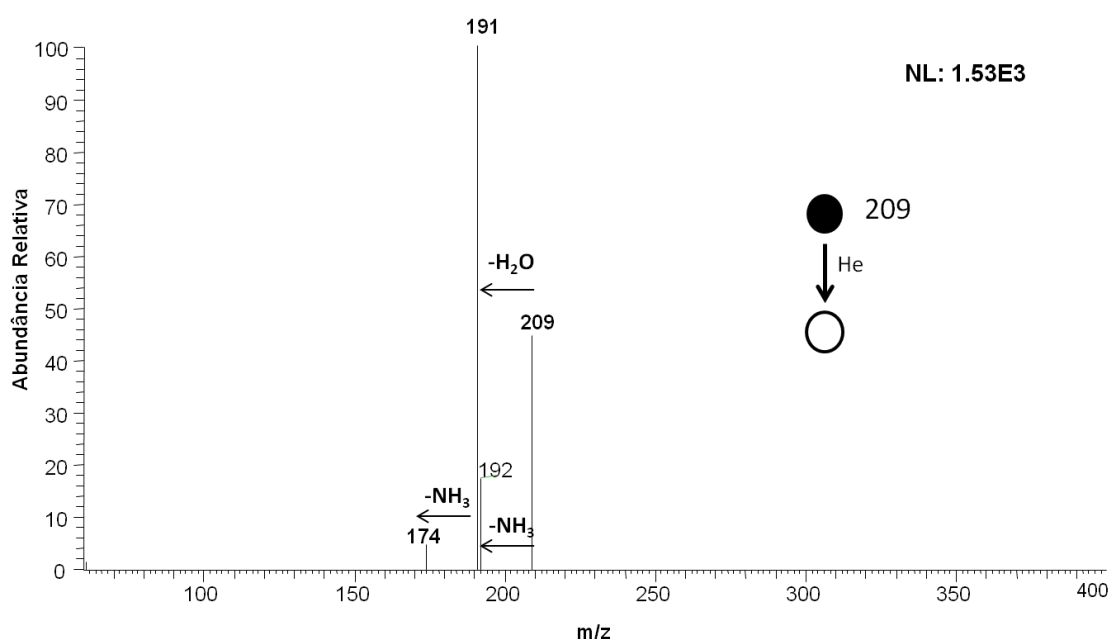


Figura 33 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 209, produto inicial da reação entre anidrido ftálico e etilenodiamina

Através do espectro de fragmentação do íon de m/z 417 (Figura 34), as duas origens propostas para esse íon puderam ser confirmadas. O íon de m/z 209 aparece no espectro de fragmentação em grande intensidade, indicando que o íon de m/z 417 pode ser atribuído a um dímero de próton do íon de m/z 209, que por sua vez apresentou as mesmas perdas observadas na Figura 33. A outra hipótese, relacionada ao produto formado entre duas moléculas de anidrido ftálico e duas moléculas de etilenodiamina, pode ser confirmada pelo aparecimento do íon de m/z 399, oriundo à perda neutra de uma molécula de água a partir do íon de m/z 417. O íon de m/z 357 pode ser associado à perda neutra de uma molécula de etilenodiamina a partir do íon de m/z 417 e também foi observado no espectro *full scan* da reação entre anidrido ftálico e etilenodiamina (Figura 32).

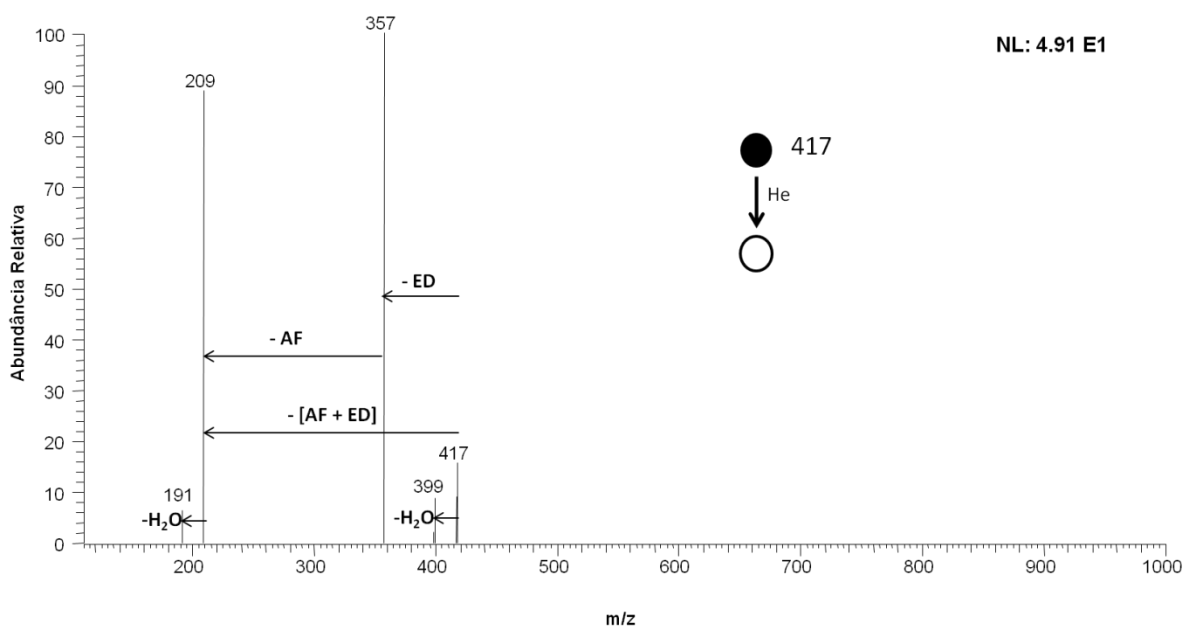


Figura 34 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 417, produto inicial da reação entre duas moléculas de anidrido ftálico (AF) e duas moléculas de etilendiamina (ED).

As Figuras 35 e 36 apresentam os mecanismos de reação propostos através dos espectros de fragmentação dos íons de m/z 209 (Figuras 33) m/z 417 (figura 34), respectivamente.

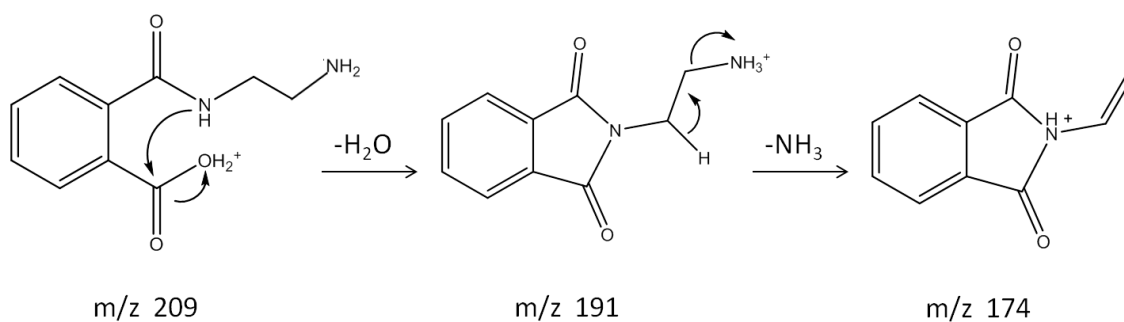


Figura 35 - para formação dos derivados de ftalimida de m/z 191 e 174 a partir da amida de m/z 209.

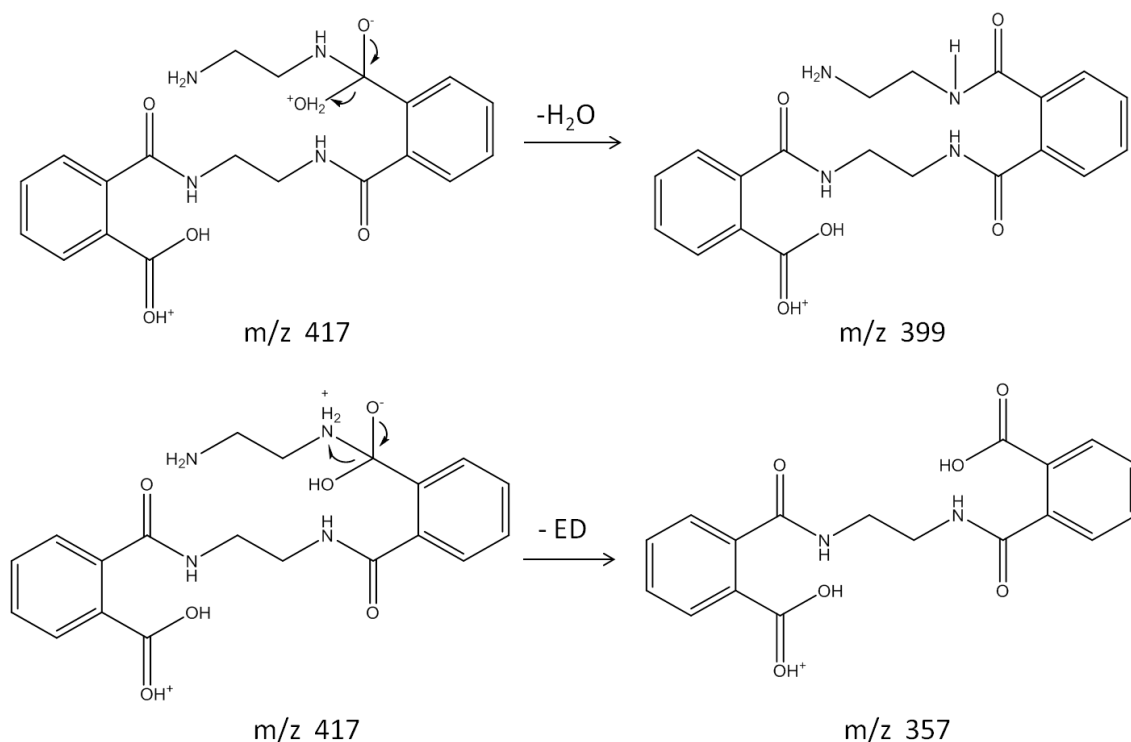


Figura 36 - Mecanismo proposto para formação dos íons m/z 399 e 357 a partir do íon de m/z 417.

O espectro PS-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico e propilendiamina (PD) é mostrado na Figura 37. O íon de m/z 223 ($[M + H]^+$), referente ao produto inicial da reação entre uma molécula de anidrido ftálico, e uma molécula de propilendiamina não foi observado nesse caso. Porém, o íon de m/z 205 ($[M - H_2O + H]^+$) atribuído ao derivado de ftalimida formado após a perda de uma molécula de água, pode ser observado com intensidade relativa de aproximadamente 30%. No espectro de massas, também foram observados sinais que podem ser atribuídos a outras reações, como o íon de m/z 181, possível produto inicial da reação entre anidrido ftálico e metanol ($[AF + MeOH + H]^+$); que após a perda neutra de uma molécula de água poderia dar origem ao íon de m/z 163 ($[AF + MeOH - H_2O + H]^+$). O íon de m/z 279 pode ser associado a uma espécie formada por uma molécula de anidrido ftálico e duas moléculas de propilendiamina ($[AF + 2PD + H]^+$). O íon de m/z 149, além de estar associado à molécula de anidrido ftálico protonada ($[AF + H]^+$), pode ser atribuído ao dímero de próton da molécula de propilendiamina ($[2PD + H]^+$).

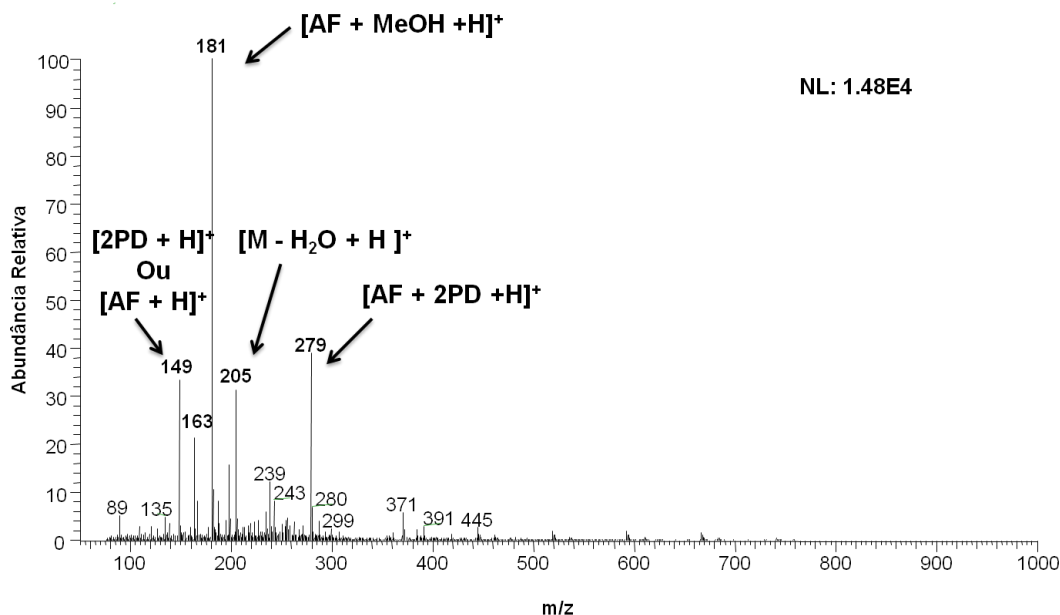


Figura 37 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico (AF) e propilendiamina (PD).

Para confirmar as suposições acima, espectros de fragmentação para os íons de m/z 181, 205 e 279 (Figuras 38, 40 e 40) foram obtidos. O íon de m/z 181 apresentou a perda neutra de uma molécula de água (Figura 39), dando origem ao íon de m/z 163, indicando que a reação entre anidrido ftálico e metanol ocorreu de modo preferencial quando comparada à formação do derivado de ftalimida (m/z 205), já que o íon de m/z 181 aparece como o mais intenso no espectro da Figura 37.

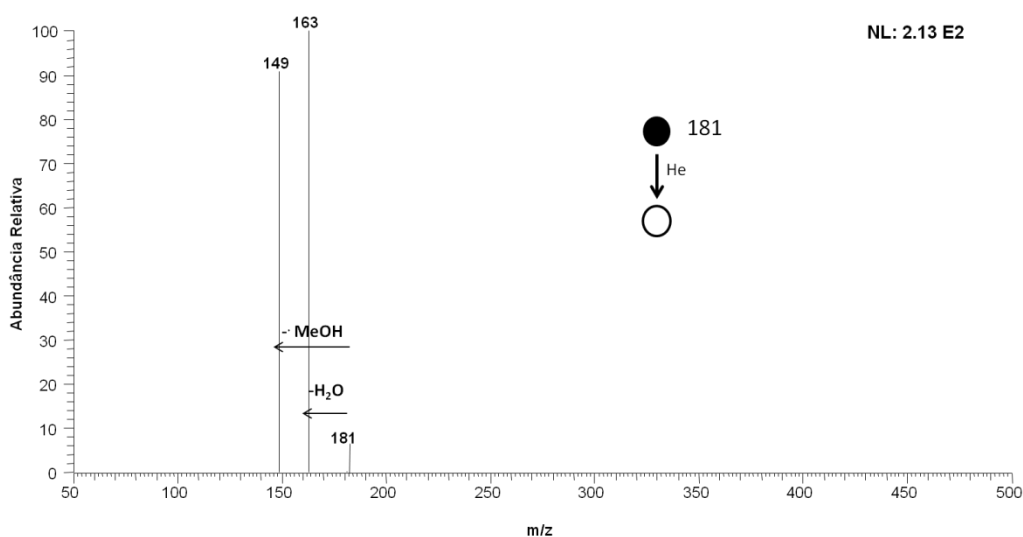


Figura 38 - Espectro de fragmentação do íon de m/z 181, produto da reação entre molécula de anidrido ftálico e metanol.

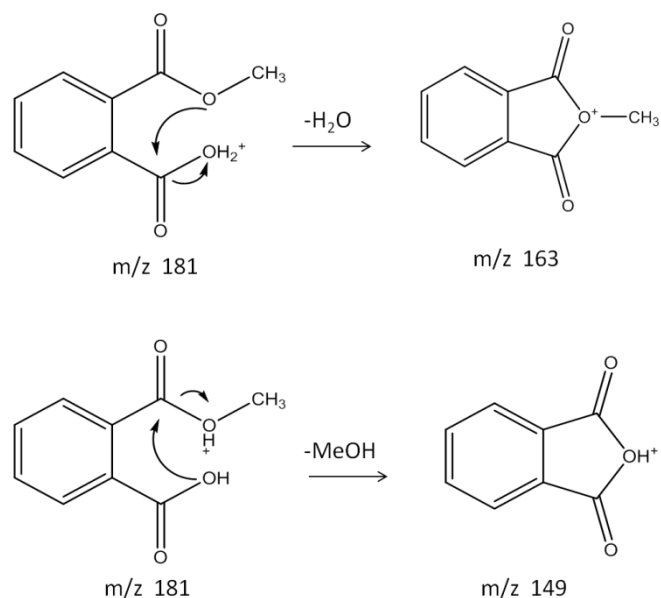


Figura 39 - Mecanismo proposto para formação dos íons m/z 163 e 149 a partir do íon de m/z 181.

O espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 205 (Figura 40) apresentou a perda neutra de uma molécula de amônia, indicando que essa espécie não se trata de um aduto, mas sim de um derivado de ftalimida, oriundo da reação entre anidrido ftálico e propilendiamina após a perda de uma molécula de água (figura 41).

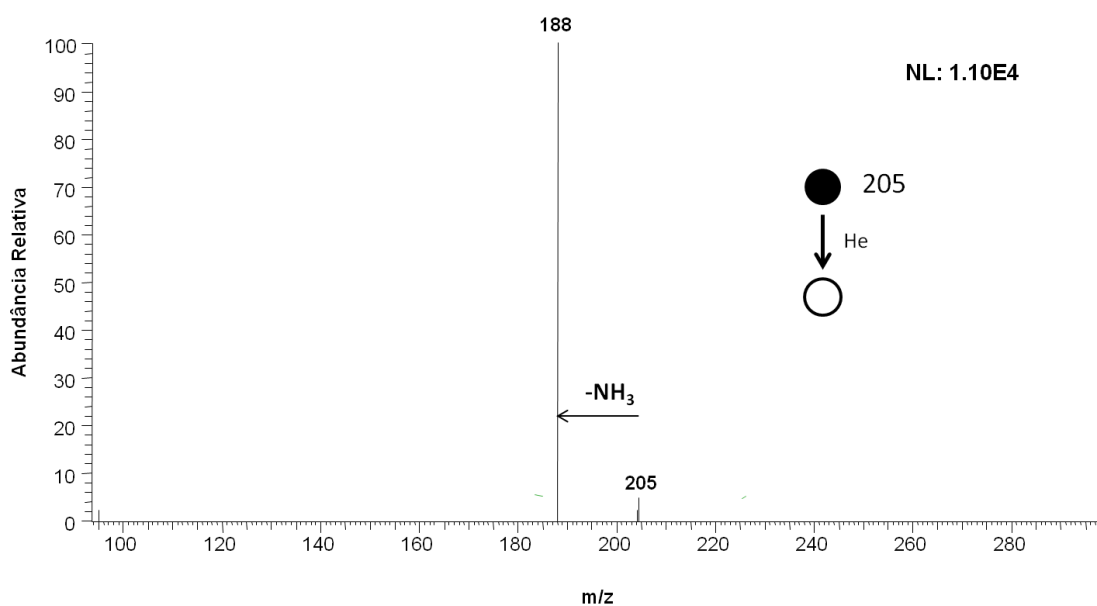


Figura 40 - Espectro de fragmentação do íon de m/z 205, derivado de ftalimida oriundo da reação entre anidrido ftálico e propilendiamina.

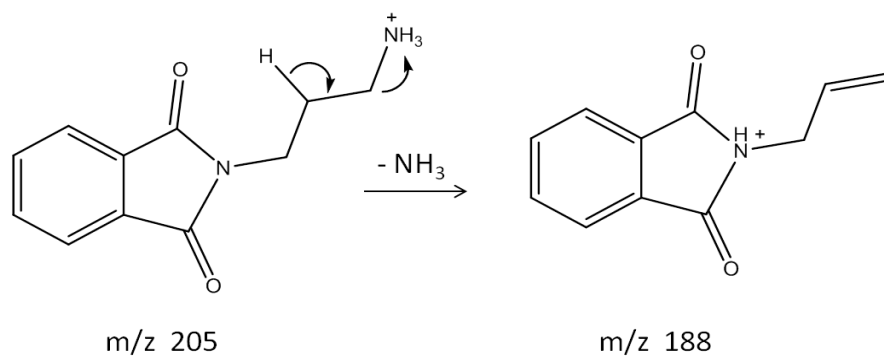


Figura 41 - Mecanismo proposto para formação do íon m/z 188 a partir do íon de m/z 205.

Já o espectro de fragmentação do íon de m/z 279 (Figura 42), apresentou a perda neutra de uma molécula de propilendiamina, dando origem ao íon de m/z 205, já discutido e elucidado acima. Isso indica que a espécie de m/z 279 não se trata de um aduto, já que não foram observados sinais referentes às moléculas reagentes anidrido ftálico (m/z 149) e propilendiamina (m/z 74) protonadas no espectro de fragmentação. Portanto, o íon de m/z 279 pode ser associado a um produto da reação entre esses reagentes nas proporções 1:2, respectivamente.

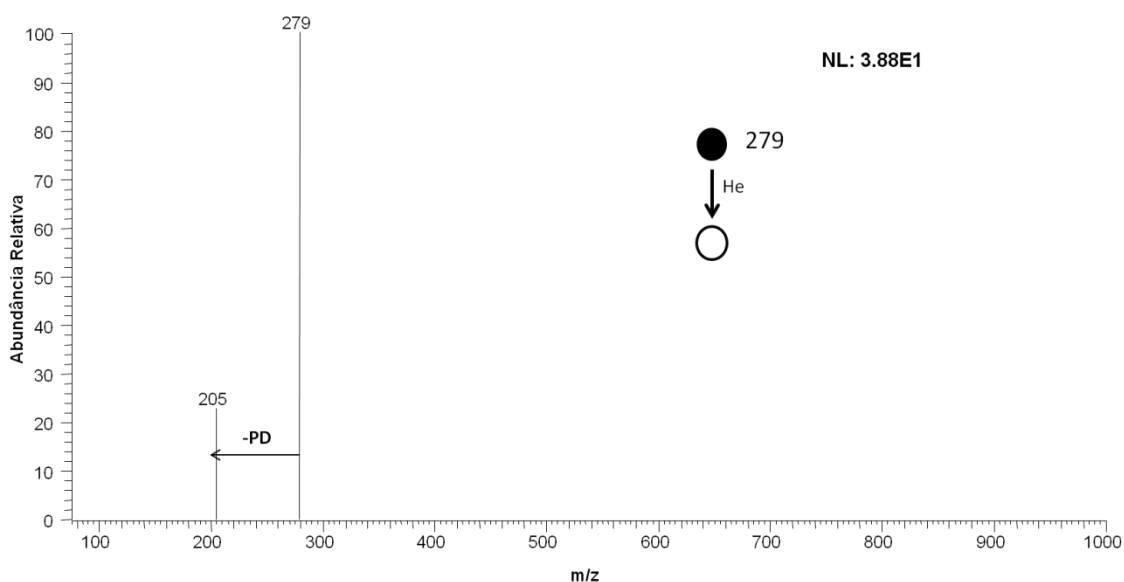


Figura 42 - Espectro de fragmentação do íon de m/z 279, oriundo da reação entre uma molécula de anidrido ftálico e duas moléculas de propilendiamina.

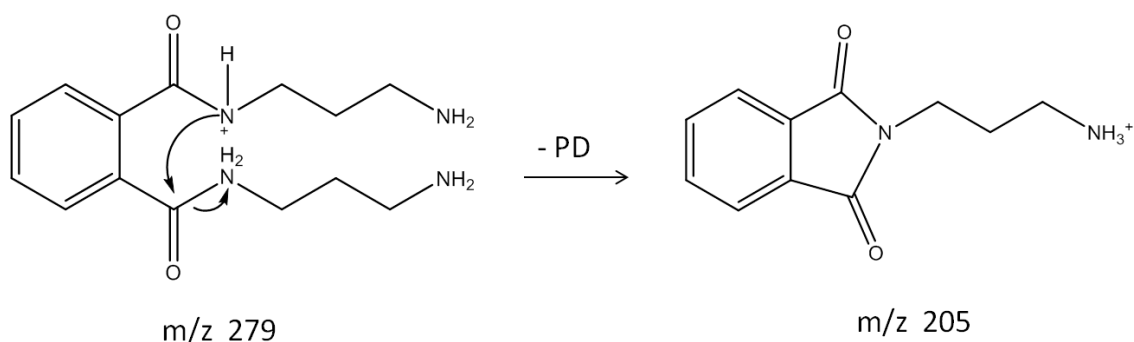


Figura 43 - Mecanismo proposto para formação do íon m/z 205 a partir do íon de m/z 279.

Por fim, observando os espectros PS-(+)-MS obtidos para as reações com as duas diaminas alifáticas (Figuras 32 e 37), podemos notar claramente que a reação entre propilenodiamina e anidrido ftálico não ocorreu de modo preferencial, já que outra reação – reação entre metanol e anidrido ftálico – aconteceu em maior extensão (íon de m/z 181 foi o mais intenso). Entretanto, a reação entre etilenodiamina e anidrido ftálico ocorreu de modo predominante e demonstrou a tendência de polimerização, já que espécies contendo até quatro moléculas reagentes (m/z 417) foram observadas.

Reações entre anidrido ftálico e diaminas aromáticas

Os resultados a seguir se referem às fenilenodiaminas utilizadas como reagente para formação de derivados de ftalimida. A Figura 44 se refere ao espectro obtido para a reação entre *p*-fenilenodiamina (pFD) e anidrido ftálico. O íon de m/z 257 ($[M + H]^+$) pode ser associado ao produto inicial da reação entre esses reagentes, pois corresponde a soma de suas massas acrescida de uma unidade (Figura 39). O íon de m/z 109 se refere a *p*-fenilenodiamina protonada ($[pFD + H]^+$). No espectro PS-(+)-MS, também foram observados sinais que podem ser atribuídos a adutos, como o íon de m/z 289, possível aduto formado entre o produto inicial da reação (m/z 257) e uma molécula de metanol ($[M + MeOH + H]^+$); o íon de m/z 365, possível aduto formado entre o produto inicial da reação (m/z 257) e uma molécula de *p*-fenilenodiamina ($[M + pFD + H]^+$); o íon de m/z 513, associado ao dímero de próton ($[2M + H]^+$) do produto inicial da reação (íon de m/z 257); o íon de m/z 535, associado ao

aduto formado entre o dímero de próton anterior e uma molécula de metanol ($[2M + \text{MeOH} + \text{H}]^+$) e o íon de m/z 661, também atribuído ao dímero de próton mencionado e uma molécula de anidrido ftálico ($[2M + \text{AF} + \text{H}]^+$).

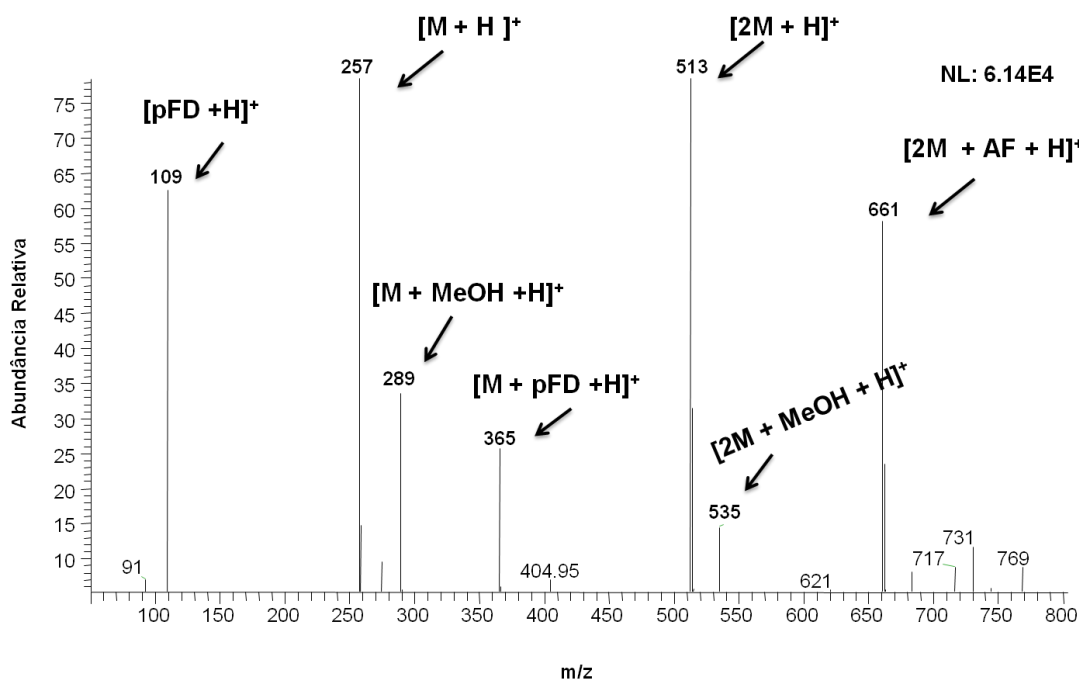


Figura 44 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico (AF) e *p*-fenilenodiamina (pFD).

O espectro de fragmentação do íon de m/z 257 (Figura 45) foi obtido para verificar se essa espécie se tratava de um produto da reação ou apenas de um aduto das moléculas reagentes. Assim, foi possível inferir que a formação do derivado de ftalimida ocorreu por meio da perda de uma molécula de água. Entretanto, o intenso sinal atribuído a *p*-fenilenodiamida (m/z 109) no espectro de fragmentação indica que a dissociação da *p*-fenilenodiamina, inicialmente ligada ao anidrido ftálico, foi mais pronunciada do que a formação do derivado de ftalimida de m/z 239 (Figura 46).

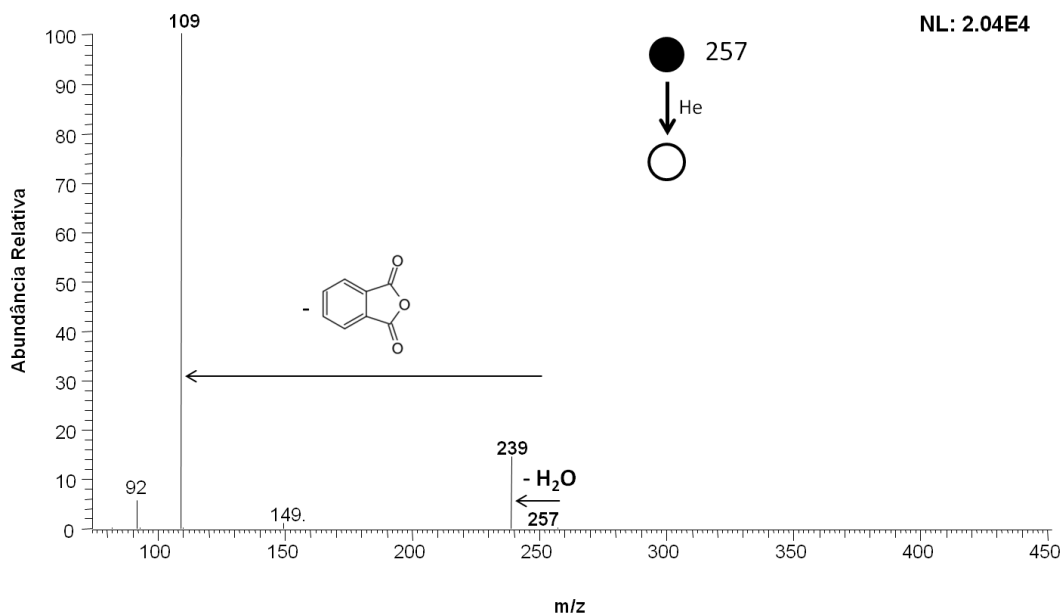


Figura 45 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 257, produto inicial da reação entre anidrido ftálico e p-fenilenodiamina.

O espectro PS-(+)-MS em *full scan* obtido para a reação entre anidrido ftálico e *m*-fenilenodiamina apresentou os mesmos sinais descritos para a reação que envolveu seu respectivo isômero em *para* (Figura 44), porém intensidades relativas ligeiramente diferentes foram observadas. Além disso, o espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 257 (também produto inicial da reação entre anidrido ftálico e *m*-fenilenodiamina) apresentou o mesmo perfil de fragmentação observado na Figura 45. Assim, por não acrescentar novas informações a presente discussão, os respectivos espectros em *full scan* e de fragmentação (íon de m/z 257) referentes à reação entre anidrido ftálico e *m*-fenilenodiamina não serão apresentados aqui.

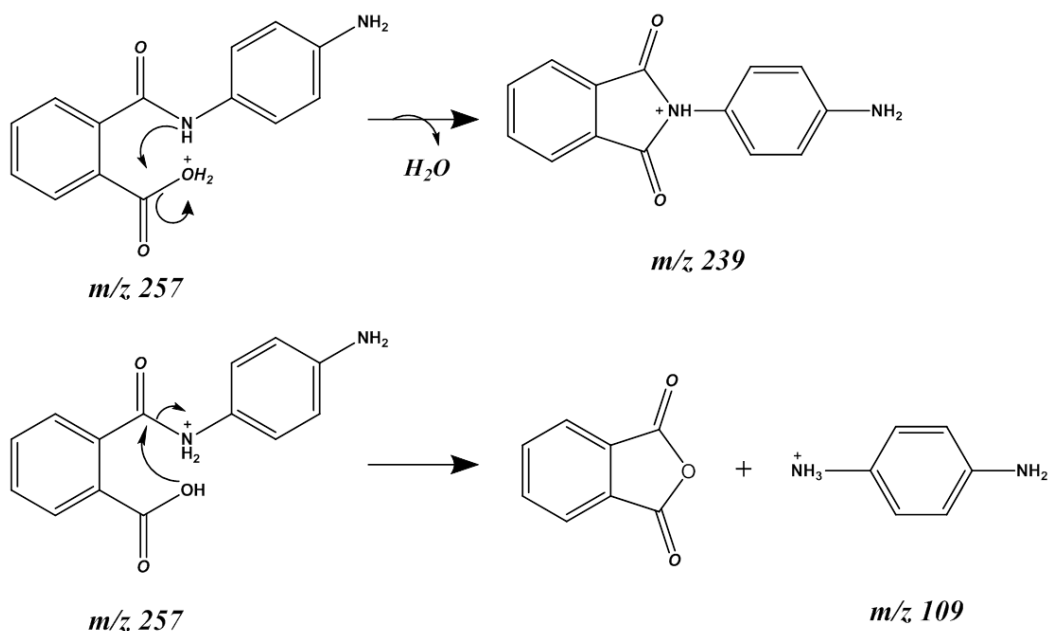


Figura 46 - Mecanismos propostos para formação do derivado de ftalimida de m/z 239 e para a dissociação do íon de m/z 257.

A Figura 47 se refere à reação entre anidrido ftálico e *o*-fenilenodiamina (oFD). Novamente, o mesmo íon de m/z 257 ($[M + H]^+$), atribuído ao produto inicial da reação, foi observado nesse espectro, já que as fenilenodiaminas utilizadas são isômeros de posição. Entretanto, quando comparamos os espectros das Figuras 44 e 47, nota-se que mais sinais atribuídos a adutos foram observados para a reação com *p*-fenilenodiamina e *m*-fenilenodiamina do que para a reação com *o*-fenilenodiamina. Além disso, no espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 257 da Figura 48 podemos observar que a intensidade do sinal atribuído ao derivado de ftalimida formado (m/z 239) foi maior do que o sinal referente ao íon de m/z 109, atribuído a *o*-fenilenodiamina oriunda da dissociação do íon de m/z 257 (observar o mecanismo da Figura 46).

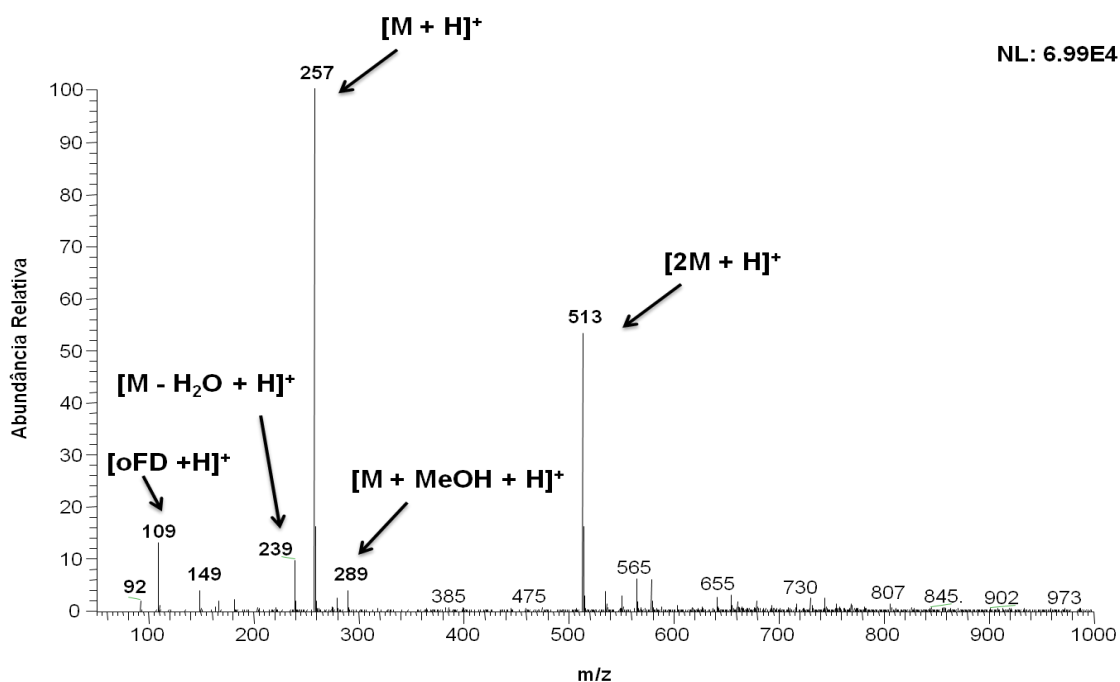


Figura 47 - Espectro de massas PS-(+)-MS obtido para a reação entre anidrido ftálico e o-fenilenodiamina.

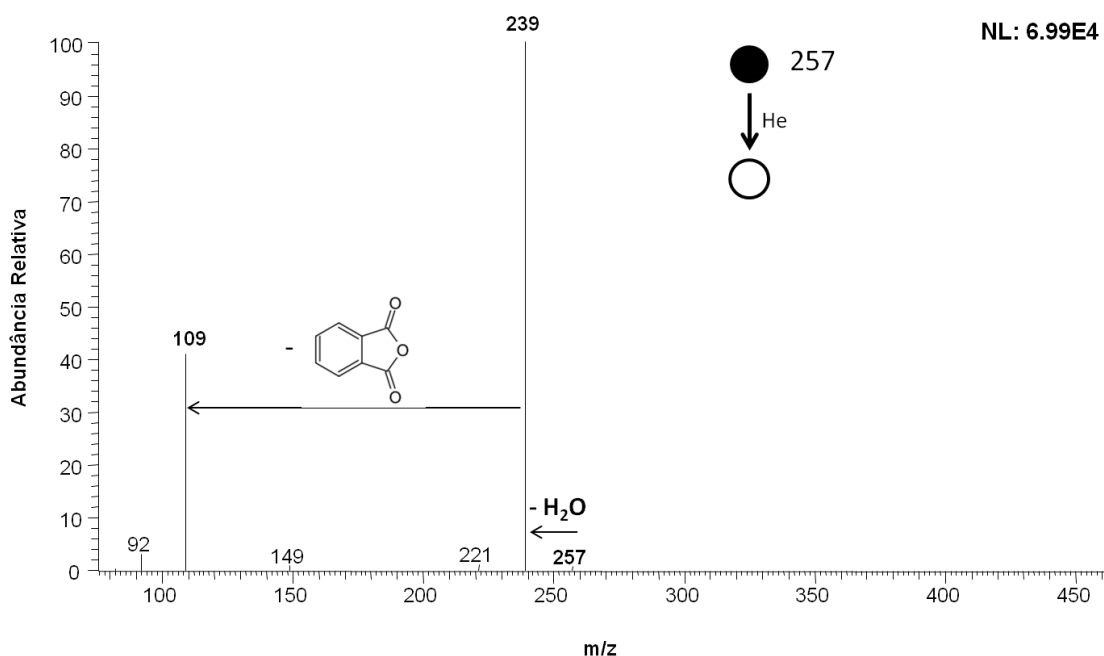


Figura 48 - Espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 257, produto da reação entre anidrido ftálico e o-fenilenodiamina.

Uma possível explicação para essas diferenças seria o fato da molécula de o-fenilenodiamina possuir seus dois grupos amino em posição *orto*. Esse

posicionamento, por impedimento estérico, pode dificultar a aproximação de outras moléculas para a formação de adutos e, por sua vez, pode propiciar a formação de um derivado de ftalimida mais estável (ligação de hidrogênio intramolecular mostrada na Figura 49). Já a *p*-fenilenodiamina e a *m*-fenilenodiamina possuem seus dois grupos amino em posição *para* e *meta*, respectivamente, facilitando a aproximação de outras moléculas do meio para formação de adutos.

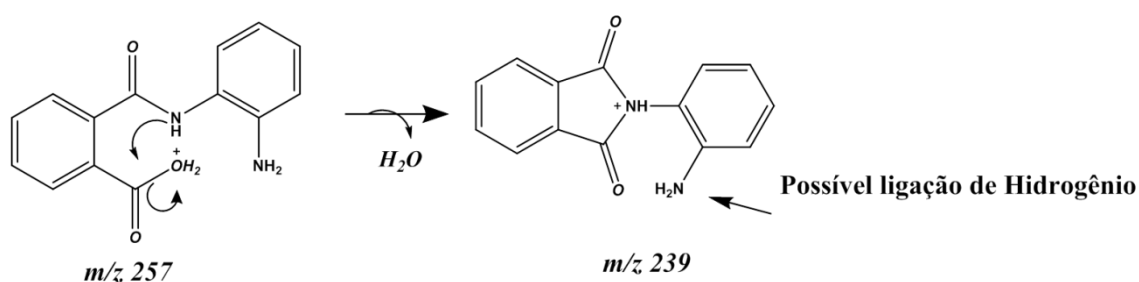


Figura 49 - Mecanismo proposto para formação do derivado de ftalimida de m/z 239 oriundo da reação entre anidrido ftálico e *o*-fenilenodiamina.

3.2.4 Conclusões

A técnica de ionização ambiente PS-MS se mostrou uma ótima alternativa para o monitoramento e aceleração de reações químicas. Esta última possibilidade envolveu a síntese de derivados de ftalimida que, para serem caracterizados e compreendidos em termos estruturais, normalmente são sintetizados através de reações químicas que podem demandar horas em escala de bancada.¹⁴⁶

Nessa abordagem, espectros de massa característicos das reações envolvendo anidrido ftálico e diferentes diaminas (etilenodiamina, propilenodiamina, *o*-fenilenodiamina, *m*-fenilenodiamina e *p*-fenilenodiamina), bem como espectros de fragmentação de íons tidos como supostos produtos, foram obtidos em menos de um minuto. Inferências sobre as estruturas moleculares de possíveis produtos e intermediários de reação e de suas respectivas vias reacionais puderam ser feitas *in situ*, mediante observação dos espectros obtidos. Além disso, considerações a respeito da reatividade de diaminas alifáticas e dos isômeros de posição *orto*, *meta* e *para* da

fenilenodiamina puderam ser feitas através do perfil espectral obtido para cada reação e dos espectros de fragmentação dos íons atribuídos a produtos das reações.

É importante ressaltar que os produtos e intermediários das reações descritas nesse trabalho são dependentes das condições operacionais utilizadas no espectrômetro de massa (voltagem aplicada ao papel, 3,5 kV; temperatura do capilar, 275 °C; tensão do capilar, 35 V; tensão da lente do tubo, 65 V). A taxa de evaporação do solvente nas gotas do *spray* e, conseqüentemente, o aumento da concentração de moléculas reagentes e de choques efetivos entre elas são dependentes da voltagem aplicada ao papel. Já a temperatura do capilar pode favorecer ou minimizar a formação de adutos (*clusters*). Além disso, a tensão do capilar e das lentes do tubo pode interferir na trajetória dos íons, influenciando assim os íons preferencialmente detectados. Por estas razões esses parâmetros foram mantidos fixos durante as análises para que as diferenças observadas entre as reações dependessem única e exclusivamente da natureza de seus reagentes.

Por fim, a partir dos resultados obtidos, pode-se demonstrar que a técnica PS-MS possui grande potencial para ser utilizada em aulas práticas ministradas a estudantes de graduação, uma vez que conceitos relacionados à reatividade de compostos orgânicos, interações intermoleculares e isomeria poderiam ser abordados e discutidos de maneira prática e visual por meio dos espectros obtidos.

Capítulo 4 - Considerações Finais

A espectrometria de massas com ionização *paper spray* (PS-MS) é hoje reconhecida como uma técnica de ionização ambiente rápida, simples e econômica devido a vários atributos. Sua rápida aquisição de dados associada a sua fácil execução, sem a necessidade de despender muitos insumos, faz dessa técnica única quando comparada a outras técnicas de ionização ambientes já existentes (DART, DESI e EASI). Vários trabalhos já publicados (e citados no presente trabalho) atestam também a versatilidade e confiabilidade da técnica PS-MS em diversos campos de atuação. Dentre essas publicações podemos encontrar aplicações na área médica: análise de fármacos e de seus metabolitos em amostras de sangue e urina, diagnósticos de doenças e exames de biopsia; na área forense: análise de drogas e de fluidos biológicos de usuários, determinação de fraudes em documento e identificação de bebidas e perfumes falsificados; e na área de monitoramento e aceleração de reações químicas: derivatização de compostos de difícil ionização *in situ* e a síntese de halofórmio.

Todas as vantagens atribuídas à PS-MS estão, direta ou indiretamente, relacionadas à capacidade que a técnica possui de minimizar efeitos de matriz. E essa grande vantagem se deve, principalmente, ao seu simples suporte amostral: um pedaço de papel! O papel, devido sua natureza anfifílica e fibrosa, pode reter interferentes presentes na matriz e assim simplificar a etapa de preparo de amostra, diminuindo seus estágios e gastos com insumos. Por essa razão, matrizes complexas – fluidos biológicos (sangue, urina e saliva) e alimentos – já foram analisadas para detectar e quantificar diversos tipos de analitos, dentre eles, medicamentos, inseticidas, corantes, etc.

Entretanto, toda técnica possui suas limitações e para saná-las aperfeiçoamentos são necessários. Desse modo, modificações de sucesso já foram propostas para otimizar o processo de ionização PS. Dentre essas alterações, podemos dar destaque as modificações na superfície do papel, que visam alterar sua afinidade química por interferentes e analitos através da deposição de matérias de diferentes polaridades sob o papel. Além disso, o próprio papel pode ser substituído por outros materiais, como por exemplo, tecidos vegetais e animais para geração de espectros de “*fingerprints*” de seus metabolitos, palitos de dente para uma ágil amostragem de amostras líquidas e sólidas *in situ* e lamínulas de vidro para análise de cultura de células.

Considerando esse leque de possibilidades de aplicação, o presente trabalho avaliou, com sucesso, a aplicabilidade da técnica PS-MS em análises de cunho forense, que envolveram a detecção e quantificação de cocaína em amostras de droga de rua simuladas em laboratório; e a identificação e quantificação de benzodiazepínicos em bebidas dopadas para confirmação do Golpe "Boa noite, Cinderela". Já no quesito monitoramento de reações químicas, através da técnica PS-MS, foi possível monitorar o processo redox do azul de metileno sob diferentes condições que interferem em seu equilíbrio químico dinâmico; e monitorar e acelerar reações que envolvem a síntese de derivados de ftalimida, que em escala de bancada demandam muito tempo.

Os resultados apresentados para as abordagens acima foram obtidos facilmente devido à praticidade da técnica PS-MS e comprovam a eficiência e confiabilidade desta recente técnica analítica para fins qualitativos, principalmente. Já sua finalidade quantitativa possui ainda algumas limitações, oriundas das várias variáveis que podem interferir na aquisição de dados PS – distância entre o papel e a entrada do espectrômetro de massa, volume da amostra depositado sob o papel, dimensões e composição química do papel, etc. Entretanto, essas limitações poderiam ser sanadas através da utilização de uma fonte de ionização PS comercial, que propiciasse o controle e manutenção desses parâmetros, garantindo a reprodutibilidade dos dados adquiridos. Entretanto, no presente trabalho foi empregada uma fonte de ionização caseira, sendo que todos os parâmetros citados foram controlados manualmente. Além disso, a comercialização de papéis específicos para análises PS-MS, já cortados em dimensões apropriadas, poderia também facilitar a obtenção de dados mais reprodutivos. Porém, os papéis cromatográficos encontrados no mercado possuem grandes dimensões, tendo assim que ser cortados à mão para emprego como suporte amostral.

***Capítulo 5 - Referências
bibliográficas***

- (1) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*; 7th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, 2005.
- (2) Hoffmann, E. D.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry - Principles and Applications* West Sussex, 2007.
- (3) Bleakney, W. *Physical Review* **1929**, *34*, 157.
- (4) Nier, A. O. *Review of Scientific Instruments* **1947**, *18*, 415.
- (5) Harrison, A. G. *Chemical Ionization Mass Spectrometry* Boca Raton, FL, 1983.
- (6) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Ingeldoh, A.; Stahl, B. *Biological Mass Spectrometry* **1990**, *49*.
- (7) Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. *Science* **2004**, *3*, 471.
- (8) Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Dupont Durst, H. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 2297.
- (9) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64.
- (10) Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N.; al., e. *Analytical Chemistry* **1975**, *47*, 2369.
- (11) Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3653.
- (12) Huang, M. Z.; Cheng, S. C.; Cho, Y. T.; Shiea, J. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *702*, 1.
- (13) Pasilis, S. P.; Kertesz, V.; Van Berkel, G. J.; Schulz, M.; Schorcht, S. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *391*, 317.
- (14) Suni, N. M.; Lindfors, P.; Laine, O.; Östman, P.; Ojanperä, I.; Kotiaho, T.; Kauppila, T. J.; Kostianen, R. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *699*, 73.
- (15) Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 898.
- (16) Yoshimura, K.; Chen, L. C.; Johno, H.; Nakajima, M.; Hiraoka, K.; Takeda, S. *Mass Spectrometry* **2014**, *3*, S0048.
- (17) Wang, H.; Liu, J.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 877.
- (18) Li, A.; Wei, P.; Hsu, H.-C.; Cooks, R. G. *Analyst* **2013**, *138*, 4624.
- (19) Evans-Nguyen, K. M.; Quinto, A.; Hargraves, T.; Brown, H.; Speer, J.; Glatter, D. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 11826–11834.
- (20) Kuo, C.-P.; Shiea, J. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 4413.
- (21) Esquenazi, E.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, W. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 7269.
- (22) Girod, M.; Moyano, E.; Campbell, D. I.; Cooks, R. G. *Chemical Science* **2011**, *2*, 501.
- (23) M., D.; L.L., M.; R.L., H.; R.C., M.; L.D., F.; M.B., A. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*, 2240.
- (24) M., Y.; J.B., F. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, *88*, 4451.
- (25) C.M., W.; R.N., D.; M., Y.; J.B., F. *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 675.
- (26) Taylor, G. *Proceedings of the Royal Society A* **1964**, *208*, 1382.
- (27) Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. *Química Nova* **2006**, *29*, 287.

- (28) Liu, J.; Wang, H.; Manicke, N. E.; Lin, J.-M.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 2463.
- (29) Espy, R. D.; Muliadi, A. R.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *International Journal of Mass Spectrometry* **2012**, 325-327, 167.
- (30) Chang, J. S.; Lawless, P. A.; Yamamoto, T. *IEEE Transactions on Plasma Science* **1991**, *19*, 1152.
- (31) Yanga, Q.; Wang, H.; Maasb, J. D.; Chappellb, W. J.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *International Journal of Mass Spectrometry* **2012**, 312-320, 201.
- (32) Lee, H.; Jhang, C. S.; Liu, J. T.; Lin, C. H. *Journal Of Separation Science* **2012**, *35*, 2822.
- (33) Lin, J. M.; Liu, W.; Mao, S.; Wu, J. *Analyst* **2013**, *138*, 2163.
- (34) Shen, L.; Zhang, J.; Yang, Q.; Manicke, N. E.; Ouyang, Z. *Clinica Chimica Acta* **2013**, *420*, 28.
- (35) Zheng, Y.; Wang, Q.; Wang, X.; Chen, Y.; Wang, X.; Zhang, X.; Bai, Z.; Han, X.; Zhang, Z. *Analytical Chemistry* **2016**, *88*, 7005-7013.
- (36) Zheng, Y.; Zhang, X.; Yang, H.; Liu, X.; Zhang, X.; Wang, Q.; Zhang, Z. *Analytical Methods* **2015**, *7*, 5381.
- (37) Liu, J.; He, Y.; Chen, S.; Ma, M.; Yao, S.; Chen, B. *talanta* **2017**, *166*, 306.
- (38) Wang, Q.; Zheng, Y.; Zhang, X.; Han, X.; Wang, T.; Zhang, Z. *Analyst* **2015**, *140*, 8048.
- (39) Narayanan, R.; Sarkar, D.; Cooks, R. G.; Pradeep, T. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, n/a.
- (40) Murray, I.; Walker, G.; Bereman, M. S. *Analyst* **2016**, *141*, 4065.
- (41) Colletes, T. C.; Garcia, P. T.; Campanha, R. B.; Abdelnur, P. V.; W. Romão; Coltro, W. K. T.; Vaz, B. G. *Analyst* **2016**, *141*, 1707.
- (42) Liu, J.; Wang, H.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 7608.
- (43) D., S.; A., S.; T., P. *Analyst* **2012**, *137*, 4559.
- (44) Müller, T.; Cooks, R. G. *Bull. Korean Chem. Soc* **2014**, *35*, 919.
- (45) Liu, J.; Gu, Z.; Yao, S.; Zhang, Z.; Chen, B. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, 124-133, 93.
- (46) Sarkar, D.; Srimany, A.; Pradeep, T. *Analyst* **2012**, *137*, 4559.
- (47) Zhang, N.; Li, Y.; Zhou, Y.; Hou, J.; He, Q.; Hu, X.-G.; Jia, Y.-M.; Yu, C.-Y.; Nie, Z. *Analytical Methods* **2015**, *5*, 2455.
- (48) Zhang, J. I.; Li, X.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2012**, *137*, 3091.
- (49) Malaj, N.; Ouyang, Z.; Sindona, G.; Cooks, R. G. *Analytical Methods* **2012**, *4*, 1913.
- (50) Pereira, I.; Rodrigues, S. R. M.; de Carvalho, T. C.; Carvalho, V. V.; Lobon, G. S.; Bassane, J. F. P.; Domingos, E.; Romao, W.; Augusti, R.; Vaz, B. G. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 6023.
- (51) Falcone, C. E.; Cooks, R. G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, *30*, 1304.
- (52) Pereira, I.; Carvalho, T. C. d.; Romão, W.; Filgueiras, P. R.; Laviola, B. G.; Rodrigues, C. M.; Abdelnur, P. V.; Vaz, B. G. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2017**, *28*, 1461.
- (53) Hu, B.; Lai, Y. H.; So, P. K.; al., e. *Analyst* **2012**, *137*, 3613.

- (54) Chan, S. L. F.; Wong, M. Y. M.; Tang, H. W.; Che, C. M.; K.M., N. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25*, 2837.
- (55) Garrett, R.; Rezende, C. M.; Ifa, D. R. *Analytical Methods* **2013**, *5*, 5944.
- (56) Zhang, H.; Zhu, L.; Luo, L.; Wang, N.; Chingin, K.; Guo, X.; Chen, H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 10691–10698.
- (57) Wei, Y.; Chen, L.; Zhou, W.; Chingin, K.; Ouyang, Y.; Zhu, T.; Wen, H.; Ding, J.; Xu, J.; Chen, H. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 1.
- (58) Alfaro, C. M.; Jarmusch, A. K.; Pirro, V.; Kerian, K. S.; Masterson, T. A.; Cheng, L.; Cooks, R. G. *Anal Bioanal Chem* **2016**, *407*, 7797.
- (59) Chagovets, V. V.; Wang, Z.; Kononikhin, A. S.; Starodubtseva, N. L.; Borisova, A.; Salimova, D.; Popov, I. A.; Kozachenko, A. V.; Chingin, K.; Chen, H.; Frankevich, V. E.; Adamyan, L. V.; Sukhikh, G. T. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 1.
- (60) Kononikhin, A.; Zhvansky, E.; Shurkhay, V.; Popov, I.; Bormotov, D.; Kostyukevich, Y.; Karchugina, S.; Indeykina, M.; Bugrova, A.; Starodubtseva, N.; Potapov, A.; Nikolaev, E. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407*, 7797.
- (61) Liu, J.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 9221.
- (62) Hu, B.; So, P. K.; Chen, H.; Yao, Z. P. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 8201.
- (63) Wong, M. Y.-M.; Tang, H.-W.; Man, S.-H.; Lam, C.-W.; Che, C.-M.; Ng, K.-M. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *27*, 713.
- (64) Yang, Y.; Deng, J.; Yao, Z.-P. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *887*, 127.
- (65) Yang, Y.; Deng, J.; Yao, Z.-P. *Journal of American Society Mass Spectrometry* **2014**, *25*, 37.
- (66) Deng, J.; Yu, T.; Yao, Y.; Peng, Q.; Luo, L.; Chen, B.; Wang, X.; Yang, Y.; Luan, T. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *954*, 52.
- (67) Jiang, J.; Zhang, H.; Li, M.; Dulay, M. T.; Ingram, A. J.; Li, N.; You, H.; Zare, R. N. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 8057–8062.
- (68) Wu, J.; Wang, S.; Chen, Q.; Jiang, H.; Liang, S.; Lin, J.-M. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *892*, 132.
- (69) Shi, R.-Z.; El Gierari, E. T. M.; Manicke, N. E.; Faix, J. D. *Clinica Chimica Acta* **2015**, *441*, 99.
- (70) Ren, Y.; Chiang, S.; Zhang, W.; Wang, X.; Lin, Z.; Ouyang, Z. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 1385.
- (71) Zhang, Z.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Analyst* **2012**, *137*, 2556.
- (72) Deng, J.; Yang, Y. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *785*, 82.
- (73) Su, Y.; Wang, H.; Liu, J.; Wei, P.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Analyst* **2013**, *138*, 4443.
- (74) Almeida de Paula, C. C.; Lordeiro, R. A.; Piccin, E.; Augusti, R. *Analytical Methods* **2015**.
- (75) da Silva Ferreira, P.; Fernandes de Abreu e Silva, D.; Augusti, R.; Piccin, E. *Analyst* **2015**, *140*, 811.
- (76) Bag, S.; Hendricks, P. I.; Reynolds, J. C.; Cooks, R. G. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *860*, 37.

- (77) Bain, R. M.; Pulliam, C. J.; Raab, S. A.; Cooks, R. G. *Journal of Chemical Education* **2015**, 93, 340.
- (78) Crime, U. N. O. o. D. a.; United Nations publication: 2017.
- (79) Andreolla, A. P. In *TV Globo Brasília* 2017.
- (80) (United Nations publication Sales No. E.15.XI.6).
- (81) Crimes, U. N. O. o. D. e. "Recommended methods for the identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials," 2012.
- (82) Oguri, K.; Wada, S.; Eto, S.; Yamada, H. *Specificity and Mechanism of the Color Reaction of Cocaine with Cobaltous Thiocyanate*, 1995; Vol. 41.
- (83) (United Nations publication, ST/NAR/7/REV.1).
- (84) (United Nation publication, ST/NAR/13/REV.1).
- (85) Passagli, M. *Toxicologia Forense*; Millennium: Campinas, 2009.
- (86) Rogers, P. J.; Dernoncourt, C. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1998**, 59 1039.
- (87) Patel, N.; Sadoughi, A. *Pharmacology of Local Anesthetics* **2015**, 179.
- (88) Tang, L.; Kebarle, P. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 3654.
- (89) Martinez, S. T.; Almeida, M. R.; Pinto, A. C. *Química Nova* **2009**, 32, 2501.
- (90) Juhascik, M. P.; Negrusz, A.; Faugno, D.; Ledray, L.; Greene, P.; Lindner, A.; Haner, B.; Gaensslen, R. E. *Journal of Forensic Sciences* **2007**, 52, 1396.
- (91) LeBeau, M. A.; Mozayani, A. *Drug-facilitated Sexual Assault: A Forensic Handbook*; Academic Press: San Diego, 2001.
- (92) Juhascik, M.; Le, N. L.; Tomlinson, K.; Moore, C.; Gaensslen, R. E.; Negrusz, A. *Journal of Analytical Toxicology* **2004**, 28, 400.
- (93) Negrusz, A.; Gaensslen, R. E. *Anal Bioanal Chem* **2003**, 376, 1192.
- (94) Chapouthier, G.; Venault, P. *Medicinal Chemistry Reviews - Online* **2004**, 1, 91.
- (95) Treu, A.; Rittner, M.; Kemken, D.; Schiebel, H. M.; Spitteller, P.; Dülcks, T. *Journal of Mass Spectrometry* **2015**, 50, 978.
- (96) Adamowicz, P.; Kala, M. *Forensic Science International* **2010**, 198, 39.
- (97) de Bairros, A. V.; de Almeida, R. M.; Pantaleao, L.; Barcellos, T.; e Silva, S. M.; Yonamine, M. *Journal of Chromatography B* **2015**, 975, 24.
- (98) Jinno, K.; Taniguchi, M.; Hayashida, M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1998**, 17, 1081.
- (99) Magrini, L.; Cappiello, A.; Famiglini, G.; Palma, P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, 125, 48.
- (100) Sauve, E. N.; Langodegard, M.; Ekeberg, D.; Oiestad, A. M. *Journal of Chromatography B* **2012**, 883-884, 177.
- (101) Yoshida, M.; Akane, A. *Analytical Chemistry* **1999**, 71, 1918.
- (102) Famiglini, G.; Termopoli, V.; Palma, P.; Cappiello, A. *Electrophoresis* **2016**, 37, 1048.
- (103) Madea, B.; Musshoff, F. *Deutsches Arzteblatt International* **2009**, 106, 341.
- (104) Persona, K.; Madej, K.; Knihnicki, P.; Piekoszewski, W. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, 113, 239.

- (105) Remane, D.; Wetzel, D.; Peters, F. T. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 4411.
- (106) Xu, N.; Bai, J.; Peng, Y.; Qie, Z.; Liu, Z.; Tang, H.; Liu, C.; Gao, Z.; Ning, B. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *241*, 504.
- (107) Maia, M. R.; Arcanjo, A. L. P.; Pinho, G. P.; Silvério, F. O. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2017**, *28*, 179.
- (108) Rego, E. C. P. d.; Guimaraes, E. d. F.; Santos, A. L. M. d.; Mothe, E. d. S. M.; Rodrigues, J. M.; Netto, A. D. P. *Analytical Methods* **2015**, *7*, 4699.
- (109) Goulart, S. M.; Alves, R. D.; Paula, W. X. d.; Queiroz, J. H. d.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. d. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23*, 1154.
- (110) Podolina, E. A.; Rudakov, O. B.; Thin, F. V.; Rudakova, L. V. *Journal of Analytical Chemistry* **2010**, *65*, 117.
- (111) Pinho, G. P. d.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. d.; Silvério, F. O. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 251.
- (112) Goulart, S. M.; de Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; de Queiroz, J. H. *Talanta* **2008**, *75*, 1320.
- (113) Rudakov, O. B.; Khorokhordina, E. A.; Preobrazhenskii, M. A.; Rudakova, L. V. *Russian Journal of Physical Chemistry* **2016**, *90*, 1665.
- (114) Russo, M. V.; Notardonato, I.; Avino, P.; Cenelli, G. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 7030.
- (115) Hu, B.; Peng, X.; Yang, S.; Gu, H.; Chen, H.; Huan, Y.; Zhang, T.; Qiaoc, X. *Journal of American Society Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 290.
- (116) Araujo, A. S.; Rocha, L. L. d.; Tomazela, D. M.; Sawaya, A. C. H. F.; Almeida, R. R.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. *Analyst* **2005**, *130*, 884.
- (117) Editors, V.; Sazonov, V. P.; Shaw, D. G.; Evaluators, W. t. a. o.; Sazonov, N. V.; Skrzecz, A.; Compilers; Lisov, N. I. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **2002**, *31*, 989.
- (118) Fang, L.; Deng, J.; Yu, Y.; Yang, Y.; Wang, X.; Liu, H.; Luan, T. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 6651.
- (119) Commission, E. In *Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002*; Communities, O. J. o. t. E., Ed.; Official Journal of the European Communities: 2002; Vol. L 221/8.
- (120) Jjunju, F. P. M.; Li, A.; Badu-Tawiah, A.; Wei, P.; Li, L.; Ouyang, Z.; Roqan, I. S.; Cooks, R. G. *Analyst* **2013**, *138*, 3740.
- (121) Farjami, E.; Clima, L.; Gothelf, K. V.; Ferapontova, E. E. *Analyst* **2010**, *135*, 1443.
- (122) Taylor, S. N.; DiCarlo, R. P.; Martin, D. H. *Sexually Transmitted Diseases* **2011**, *38*, 995.
- (123) Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de análise instrumental*; Bookman: Porto Alegre (RS), 2009.
- (124) Xu, J.-Z.; Dai, L.; Wu, B.; Ding, T.; Zhu, J.-J.; Lin, H.; Chen, H.-L.; Shen, C.-Y.; Jiang, Y. *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 4193.
- (125) Wang, W.; Ye, M.; He, L.; Yin, Y. *Nano Letters* **2014**, *14*, 1681.
- (126) Tabbara, M. A.; El Jamal, M. M. *Journal of the University of Chemical Technology & Metallurgy* **2012**, *47*, 275.
- (127) Nicolai, S. I. H. d. A.; Rodrigues, P. R. P.; Agostinho, S. M. L.; Rubim, J. C. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2002**, *527*, 103.
- (128) Yan, X.; Bain, R. M.; Cooks, R. G. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*.

- (129) Song, H.; Chen, D. L.; Ismagilov, R. F. *Angewandte Chemie - International Edition* **2006**, *45*, 7336.
- (130) Song, H.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. *Angewandte Chemie - International Edition* **2003**, *42*, 768.
- (131) Abou-Hassan, A.; Sandre, O.; Cabuil, V. *Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49*, 6268.
- (132) Badu-Tawiah, A. K.; Campbell, D. I.; Cooks, R. G. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23*, 1461.
- (133) Ahmed-Omer, B.; Brandta, J. C.; Wirth, T. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *5*, 733.
- (134) Li, Y.; Yan, X.; Cooks, R. G. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 3433
- (135) Müller, T.; Badu-Tawiah, A.; Cooks, R. G. *Angewandte Chemie - International Edition* **2012**, *51*, 11832.
- (136) Badu-Tawiah, A. K.; Campbell, D. I.; Cooks, R. G. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23*, 1077.
- (137) Espy, R. D.; Wleklinski, M.; Yan, X.; Cooks, R. G. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *57*, 135.
- (138) Zhou, X.; Pei, J.; Huang, G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, *29*, 100.
- (139) Lorz, P. M.; Towae, F. K.; Enke, W.; Jäckh, R.; Bhargava, N.; Hillesheim, W. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2000.
- (140) Kamal, A.; Bolla, N. R.; Srikanth, P. S.; Srivastava, A. K. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2013**, *23*, 299.
- (141) Rajasekaran, S.; Rao, G. K.; Sanjay, P. P. N.; Ranjan, A. *International Journal of ChemTech Research* **2011**, *3*, 555.
- (142) Machado, A. L.; Lima, L. d. M.; Araújo-Jr, J. X.; Fraga, C. A. M.; Gonçalves Koatz, V. L.; Barreiro, E. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 1169.
- (143) Lima, L. M.; Castro, P.; Machado, A. L.; Fraga, C. A. M.; Lugnier, C.; De Moraes, V. L. G. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2002**, *10*, 3067.
- (144) Amin, K. M.; El-masry, A. H.; Mohamed, N. A.; Awad, G. E. A.; Habib, B. S. *Der Pharma Chemica* **2013**, *5*, 97.
- (145) Anthony, P.; Bashir, N.; Parveen, R. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* **2014**, *4*, 9.
- (146) Lamie, P.; Phillopes, J.; El-Gendy, A.; Rarova, L.; Gruz, J. *Molecules* **2015**, *20*, 16620.