

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Marina Jurisch

Espectrometria de Massas com Ionização *Paper Spray*: Uma nova
abordagem na solução de problemas forenses

BELO HORIZONTE

2019

UFMG/ ICEx/ DQ.1.328
D.724

Marina Jurisch

Espectrometria de Massas com Ionização *Paper Spray*: Uma nova
abordagem na solução de problemas forenses

Dissertação 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 Mestre em
Química – Química Analítica.

BELO HORIZONTE

2019

Ficha Catalográfica

J959e Jurisch, Marina
2019 Espectrometria de massas com ionização paper spray
D [manuscrito] : uma nova abordagem na solução de
problemas forenses / Marina Jurisch. 2019.
[xiii], 125 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

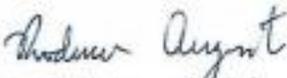
1. Química analítica - Teses 2. Química legal -
Teses 3. Espectrometria de massa - Teses 4.
Toxicologia forense - Teses 5. Alimentos - Adulteração
e inspeção - Teses 6. Falsificação de documentos -
Teses I. Augusti, Rodinei, Orientador II. Título.

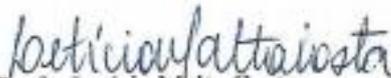
CDU 043

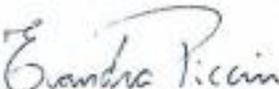
**"Espectrometria de Massas com Ionização Paper Spray: Uma Nova Abordagem
na Solução de Problemas Forenses"**

Marina Jurisch Purri Miranda

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG


Profa. Leticia Malta Costa
UFMG


Prof. Evandro Piccin
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2019.

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que enfrentam a realidade como ela é, sem esperar nada a mais ou a menos da própria capacidade e que nunca perdem o horizonte de vista, sabendo que o caminho a trilhar é longo, mas sem se esquecer do quão longe já foi.

AGRADECIMENTOS

Primeira e imensamente, agradeço de coração ao Professor Doutor Rodinei Augusti por sua dedicação, atenção, paciência, maestria, compreensão e ensinamentos que vão muito além das quatro paredes do laboratório. Nossas conversas contribuíram muito tanto para minha formação profissional quanto humana.

Aos colegas de trabalho e peritos, assim como à Seção Técnica de Química e Física do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais, agradeço à atenção, oportunidades, confiança, assim como pelas conversas, discussões e troca de conhecimentos essenciais para a execução do projeto proposto.

À minha mãe, Yara Jurisch, e irmã, Suzanne, agradeço eternamente à paciência e amor. A caminhada nunca é fácil e ninguém consegue trilhar o caminho da vida sozinho. Sem o apoio, incentivo e fé de vocês não seria possível chegar aqui. Ohana.

Aos meus amigos agradeço pelas conversas, questionamentos, incentivos e momentos de descontração. Em vocês encontrei o melhor Grupo de Apoio e juntos vamos em Rumo a Nárnia. Ainda bem que a gente se encontrou.

Finalmente, agradeço à vida e minha trajetória, "porque se isso tudo não estivesse acontecido eu não estaria aqui, agora com vocês, e estar agora aqui com vocês é muito importante, porque a nossa vida inteira está aqui onde estamos. Ela não está no antes nem no depois, mas o antes e o depois constroem este momento presente..."

“Pass on what you have learned. Strength, mastery. But weakness, folly, failure also.

Yes, failure most of all. The greatest teacher, failure is”

Master Yoda; Star Wars Episode VII: The Last Jedi

RESUMO

A espectrometria de massas é uma poderosa ferramenta analítica consolidada em análises das mais diversas áreas de pesquisa e aplicação. A introdução de fontes de ionização ambiente disseminou ainda mais o uso da técnica, possibilitando análises rápidas e simples de analitos presentes em matrizes complexas, minimizando efeitos de matriz e etapas de pré tratamento de amostra. Neste contexto, o potencial da técnica de ionização por *paper spray* como alternativa aos métodos tradicionalmente empregados para análises forenses foi demonstrado na literatura desde sua introdução. Contudo, atualmente, a implementação de métodos que utilizam esta técnica na rotina de laboratórios é dificultada, pois apenas a fabricante Thermo Scientific produz e comercializa fontes PS-MS, limitando o uso aos seus equipamentos. Assim, neste trabalho, a PS-MS foi aplicada, com sucesso, em três situações de interesse forense, *i.e.* análises documentoscópicas, investigação de suplementos esportivos e identificação de drogas. Utilizando um procedimento analítico simples, as amostras foram solubilizadas ou diretamente analisadas gerando espectros com baixo ruído além de sinais intensos e estáveis, mostrando seu potencial como alternativa para as técnicas tradicionalmente empregadas na rotina de laboratórios de investigação forense.

Amostras de BCAA e produtos de ação termogênica foram analisados para verificar a conformidade entre rótulo e produto. Em todos os suplementos de BCAA foram detectados sinais correspondentes aos amino ácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), enquanto nos termogênicos verificou-se a presença de cafeína em todas as amostras, sendo que duas amostras não estavam em acordo com os ingredientes listados em seus rótulos. A investigação documentoscópica possibilitou a detecção de fraudes em documentos escritos utilizando canetas apagáveis e não apagáveis utilizando técnicas de ionização ambiente, *i.e.* EASI-MS, PS-MS e DESI-MSI. Cada uma das canetas analisadas apresenta um perfil químico diferente, sendo possível distingui-las por inspeção visual dos resultados e, em todos os casos analisados, a fraude é facilmente comprovada de forma irrefutável. Por fim, a técnica PS-MS foi implementada no laboratório de análises química da Polícia Civil de Minas Gerais construindo uma fonte PS-MS compatível com o equipamento de espectrometria de massas disponível tendo sua eficácia comprovada em análises de amostras de cocaína apreendidas em operações policiais nas quais foram detectados os sinais referentes à cocaína protonada (m/z 304) bem como dos adulterantes cafeína (m/z 195), fenacetina (m/z 180), levamisol (m/z 205) e lidocaína (m/z 235), demonstrando o potencial da técnica em solucionar alguns problemas de interesse forense.

Palavras-Chave: Espectrometria de massas, *paper spray mass spectrometry*, Análises Forenses, Investigação química

ABSTRACT

Mass spectrometry is a powerful analytical tool consolidated in analyzes of the most diverse areas of research and application. The introduction of ambient ionization sources further disseminated the use of the technique, enabling rapid and simple analyzes of analytes present in complex matrices, minimizing matrix effects and sample pretreatment steps. In this context, the potential of the paper spray ionization technique as an alternative to the methods traditionally employed for forensic analysis has been demonstrated in the literature since its introduction. However, nowadays, the implementation of methods that use this technique in the routine of laboratories is difficult, for only the manufacturer Thermo Scientific produces and commercializes PS-MS sources, limiting its use to their equipment. Thus, in this study, PS-MS was successfully applied in three situations of forensic interest, i.e. document analysis, investigation of sports supplements and identification of drugs. Using a simple analytical procedure, the samples were solubilized or directly analyzed generating low noise spectra besides intense and stable signals, showing its potential as an alternative to the techniques traditionally employed in the routine of forensic investigation laboratories.

BCAA samples and thermogenic action products were analyzed for compliance between label and product. Signals corresponding to the branched-chain amino acids (leucine, isoleucine and valine) were detected in all BCAA supplements, while in thermogenics caffeine was present in all samples, two of which were not in agreement with the ingredients listed on their labels. The documentary investigation enabled the detection of fraud in written documents with erasable and non-erasable pens using ambient ionization techniques, *i.e.* EASI-MS, PS-MS and DESI-MSI. Each pen presented a different chemical profile, making it possible to distinguish them by visual inspection of the mass spectra. In all analyzed situations, the fraud is easily detected irrefutably. Finally, the PS-MS technique was implemented in the laboratory of chemical analysis of the Civil Police of Minas Gerais, constructing a source PS-MS compatible with the available mass spectrometry equipment having its effectiveness proven with analyzes of cocaine samples seized in police operations detecting the protonated form of cocaine (m/z 304), as well as caffeine (m/z 195), phenacetin (m/z 180), levamisole (m/z 205) and lidocaine (m/z 235), demonstrating the potential of the technique in solving some problems of forensic interest.

Key-words: mass spectrometry, paper spray mass spectrometry, forensic analysis, chemical investigation

LISTA DE FIGURAS

Todos os espectros estão disponibilizados em tamanho maior para melhor visualização no Capítulo 7: Apêndices.

Figura 1 - Diagrama simplificado de um espectrômetro de massas.....	17
Figura 2- Diagrama da formação de um electrospray. FONTE: modificado de: https://goo.gl/u1Z3Cb Acessado em: 30/12/2018 11h10	22
Figura 3- Diagrama da formação de íons dessorvidos via ionização electrospray. FONTE: Autora.....	22
Figura 4- Diagrama de uma interface baixo/alto vácuo em dois estágios. FONTE: Adaptada de <i>Mass Spectrometry - Principles and Applications, West Sussex, 2007</i> . ³	23
Figura 5- Diagrama simplificado de uma fonte de ionização PS-MS. FONTE: Autora.	24
Figura 6- (A) Múltiplos cones de Taylor observados no modo 1. (B) Modos de ionização e dispersão do tamanho das gotas do <i>spray</i> formado por PS-MS. FONTE: Adaptada de Espy <i>et al.</i> 2012. ⁵¹	26
Figura 7- Influência da geometria do papel na formação do <i>spray</i> . (a) Formação do <i>spray</i> apenas em pontas angulares (vermelho); (b) Diferentes ângulos testados; (c) <i>spray</i> formado para cada ângulo testado; (d) Gráfico da intensidade do sinal lido pelo analisador <i>versus</i> voltagem do <i>spray</i> para todos os ângulos testados. FONTE: Adaptado de Yang <i>et al.</i> 2012. ⁵⁴	27
Figura 8- Representação esquemática das técnicas de ionização ambiente (a) <i>leaf spray</i> ; (b) <i>tissue spray</i> ; (c) <i>wooden tip spray</i> ; (d) <i>glass spray</i> ; (e) <i>probe electrospray</i> . FONTE: Adaptados de Liu <i>et al.</i> 2011, ⁴⁰ Hu <i>et al.</i> 2012, ⁷² Hu <i>et al.</i> 2011, ⁴¹ Jiang <i>et al.</i> 2015, ³⁹ e Hiraoka <i>et al.</i> 2007, ³⁸ respectivamente.	29
Figura 9- Estruturas químicas dos componentes mais comumente encontrados em suplementos esportivos termogênicos. (A) Cafeína e (B) Alcaloides da família efedra. FONTE: Autora.....	34
Figura 10- Estrutura química dos amino ácidos de cadeia ramificada (BCAA). FONTE: Autora.....	35
Figura 11- Sistema PS-MS utilizado. (1) Entrada do espectrômetro de massas; (2), (3) e (4) Ajuste ao longo dos eixos z-, y- e x-, respectivamente; (5) Fonte de alta tensão; (6) Conector para fechar o circuito e (7) clipe metálico onde o papel é posicionado. FONTE: Autora.	37
Figura 12- Espectro de massas adquirido para os suplementos de amino ácidos de cadeia ramificada. Para cada amostra de BCAA, indicada no canto superior esquerdo, mostra-se os espectros: (a) PS-(+)-MS e (b) PS-(-)-MS.	39

Figura 13- Espectros de fragmentação obtido para confirmar a identificação dos analitos valina ($[\text{val}+\text{H}]^+$ m/z 118); leucina e isoleucina ($[\text{leu}+\text{H}]^+$ e $[\text{ile}+\text{H}]^+$ m/z 132); vitamina B6 ($[\text{B6}+\text{H}]^+$ m/z 170) e o íon de m/z 249.	42
Figura 14- Espectros PS-(+)-MS obtidos para os 9 suplementos esportivos de ação termogênica, nomeados de TERM1 a TERM9 (canto superior esquerdo).....	43
Figura 15- Perfil de fragmentação para o íon de m/z 195.	45
Figura 16- Perfis de fragmentação obtidos para os íons de m/z 136, 150 e 166, conforme indicado.....	46
Figura 17- Diagrama do funcionamento de uma fonte: (A) DESI, na qual os números indicam a fonte de energia, o fluxo de solvente, a entrada do espectrômetro de massas, o capilar do <i>spray</i> , o capilar do gás nebulizador, o <i>spray</i> formado, o jato de gás, a amostra, o suporte amostral, e os íons desorvidos, respectivamente; (B) DESI-MSI, na qual o suporte é capaz de realizar movimentos bidimensionais no plano XY. FONTE: Adaptado de Lebedev, 2015 ²⁶ e Ifa <i>et al.</i> 2007, ¹²⁹ respectivamente.....	50
Figura 18- Imagens químicas obtidas via DESI-MS. (A) e (B) Imagens químicas bidimensionais da distribuição dos íons referentes aos corantes <i>basic violet 3</i> e <i>basic blue 2</i> , respectivamente; (C) Sobreposição das duas imagens; (D) Imagem óptica da superfície analisada.	51
Figura 19- Diagrama simplificado de uma fonte de ionização EASI-MS. FONTE: Adaptado de Lalli <i>et al.</i> 2010.	51
Figura 20- Procedimento para simular uma situação real de falsificação de assinatura. (à esquerda) Assinatura original, feita com a caneta azul apagável; (no centro) Porção apagada obtida através do uso da caneta branco apagador na assinatura escrita e (à direita) Assinatura falsificada feita sobre a segunda porção apagada usando a caneta azul não apagável.	53
Figura 21- Procedimento para simular uma situação real de falsificação. (à esquerda) Escrita original, feita com a caneta azul apagável; (no centro) Porção apagada obtida através do uso da caneta branco apagador na escrita original e (à direita) Resultado da falsificação feita sobre a segunda porção apagada usando a caneta azul não apagável.	53
Figura 22- <i>Fingerprints</i> obtidos para as canetas (A) branco apagador; (B) azul apagável e (C) azul não apagável.	55
Figura 23- Espectros PS-(+)-MS para as regiões (A) da assinatura apagada e (B) da assinatura falsificada.....	56
Figura 24- Espectros EASI-(+)-MS obtidos para (A) caneta branco apagador; (B) caneta azul apagável e (C) caneta azul não apagável.	58

Figura 25- Resultados EASI-(+)-MS para das seções correspondentes a (A) a escrita apagada e (B) a falsificação da escrita original.	59
Figura 26- Espectros DESI-(+)-MS obtidos para as canetas (A) branco apagador; (B) azul apagável e (C) azul não apagável.	60
Figura 27- Imagens químicas obtidas para as três áreas analisadas para o experimento de falsificação.....	61
Figura 28- À esquerda: Equipamento LCMS8030 disponível no laboratório do ICPC-MG. (1) Sistema HPLC; (2) Porta de fechamento hermético; (3) Fonte de ionização e (4) Espectrômetro de massas. À direita: Interface entre fonte de ionização e a entrada do espectrômetro de massas. FONTE: Adaptada de: https://goo.gl/qSk68y Acessado em 21/Jan/2019	66
Figura 29- Fonte PS-MS construída. (1) clipe metálico; (2) Fio para conectar a fonte de alta voltagem; (3) suporte para ajustes finos ao longo do eixo z- e (4) contrapeso.....	67
Figura 30- Fonte de ionização PS-MS construída.....	68
Figura 31- Estrutura química dos possíveis analitos com as respectivas m/z das espécies protonadas.	71
Figura 32-Espectros PS-(+)-MS gerado para 10 amostras de cocaína apreendidas, representativas de todo o conjunto amostral.	72
Figura 33- Espectro de fragmentação para os íons de m/z (A) 195; (B) 304; (C)205; (D) 235 e (E)180, obtidos para as transições MRM monitoradas.	75
Figura 34- <i>Fingerprint</i> gerado pelo papel usado nas análises.....	76
Figura 35- Espectros PS-(+)-MS gerado para 10 amostras de cocaína apreendidas, representativas de todo o conjunto amostral.	77
Figura 36- Estrutura química, massa molar e valores de m/z para a cinamoilcocaína.....	78
Figura 37- Perfis de fragmentação para os íons de m/z (A) 195; (B) 304; (C)205; (D) 235 e (E)180 obtidos para experimentos MS ²	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Informações de tipo de suplemento, marca, forma e principais ingredientes listados para as amostras analisadas.	35
Tabela 2- Principais analitos investigados e suas respectivas fórmulas químicas, massas nominais e relação massa/carga esperada para os modos positivo e negativo.	38
Tabela 3- Valores otimizados dos parâmetros utilizados nas análises PS-MS.	39
Tabela 4- Parâmetros alterados para o método de análise PS-MS.	68
Tabela 5- Transições MRM para cada uma das substâncias monitoradas com suas respectivas massas molares e razão massa/ carga.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MS: Espectrometria de Massas, do inglês, *mass spectrometry*

m/z: Razão massa/ carga

EI: Ionização por impacto de elétrons, do inglês, *electron impact*

CI: Ionização química, inglês, *chemical ionization*

MALDI: Ionização/dessorção a laser assistida por matriz, do inglês, *matrix assisted laser desorption/ionization*

DESI: Ionização por dessorção via electrospray, do inglês, *desorption electrospray ionization*

DART: análise direta em tempo real, do inglês, *direct analysis in real time*

ESI: Ionização electrospray, do inglês, *electrospray ionization*

APCI: Ionização química à pressão atmosférica, do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*

APPI: Fotoionização à pressão atmosférica, do inglês, *atmospheric pressure photoionization*

EASI: *Easy ambient sonic spray ionization*

PSI: *Paper spray ionization*

PESI: *Probe electrospray ionization*

kDa: Quilo-Dalton

PS-MS: *Paper spray mass Spectrometry*

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance, do inglês, *high performance liquid chromatography*

GC: cromatografia gasosa, do inglês, *gas chromatography*

ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária

QuEChERS: do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*

UHPLC: Cromatografia líquida de ultra alta performance, do inglês, *ultra-high performance liquid chromatography*

SNC: Sistema nervoso central

BCAA: amino ácidos de cadeia ramificada, do inglês, *branched chain amino acids*

TLC: Cromatografia em camada delgada

DESI-MSI: DESI *mass spectrometry imaging*

CID: Dissociação induzida por colisão, do inglês, *collision-induced dissociation*

UNODC: do inglês, *united nations office on drug and crime*

ONU: Organização das nações unidas

SWGDRUG: do inglês, *scientific working group for the analysis of seized drugs*

SUMÁRIO

Capítulo 1_ Introdução geral e objetivos.....	16
1. espectrometria de massas	17
1.1. Fontes de ionização.....	18
1.1.1. Fontes de ionização ambiente	19
1.1.2. Electrospray Ionization – ESI	21
1.2. Fonte de ionização Paper Spray	23
1.2.1. Procedimento e características.....	24
1.2.2. Variáveis e suas influências.....	26
1.2.3. Modificações do sistema PS-MS.....	27
2. ciências forenses	29
3. objetivos.....	30
3.1. Objetivos específicos.....	30
Capítulo 2_ Análise e controle de qualidade de suplementos esportivos.....	31
1. Introdução.....	32
1.1. O mercado de suplementos esportivos	32
1.2. Adultrações de suplementos esportivos.....	33
1.3. Termogênicos e amino ácidos de cadeia ramificada	33
2. Parte Experimental.....	35
2.1. Amostras	35
2.2. Preparo das amostras.....	36
2.3. Análises por paper spray mass Spectrometry	37
3. Resultados e Discussão	38
3.1. BCAA.....	39
3.2. Termogênicos.....	43
4. conclusões.....	47

Capítulo 3_Detecção de fraude em documentos escritos.....	48
1. Introdução.....	49
2. Parte experimental.....	52
2.1. Análises PS-MS	52
2.2. Análises DESI-MSI e EASI-MS.....	53
3. Resultados e discussão.....	54
3.1. PS-MS	54
3.2. EASI-MS	57
3.3. DESI-MSI.....	59
4. Conclusões.....	61
Capítulo 4_Análise de entorpecentes: Produção de uma fonte PS-MS para um equipamento Shimadzu LCMS8030	63
1. Introdução.....	64
2. Manufatura da fonte ps-ms	66
3. Parte experimental.....	69
3.1. Amostras	69
3.2. Análises LCMS8030 Shimadzu	69
3.3. Análises LCQ-FLEET Thermo Scientific.....	70
4. Resultados e discussão.....	70
4.1. Análises LCMS8030 Shimadzu	71
4.2. Análises LCQ-FLEET Thermo Scientific.....	76
5. Conclusão	79
Capítulo 5_Considerações Finais	81
Capítulo 6_Referências Bibliográficas.....	84
Capítulo 7_Apêndices	97

Capítulo 1

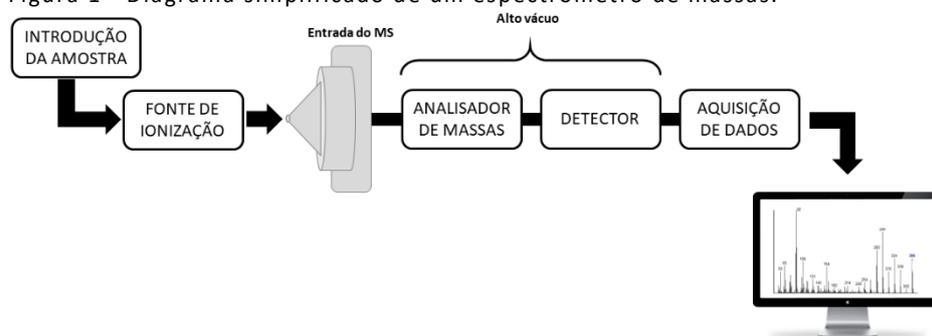
Introdução geral e objetivos

1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) se baseia, fundamentalmente, na “pesagem” em alto vácuo de moléculas ionizadas através das medições de suas trajetórias após aplicação de um campo elétrico, magnético ou eletromagnético.¹ Sendo assim, é uma poderosa instrumentação analítica, fornecendo informações acerca da massa e estrutura química de analitos nas mais diversas matrizes fornecendo informações físico-químicas, *i.e.* razão massa/ carga (m/z) e perfis de fragmentação.²

Todos os espectrômetros de massas possuem, basicamente, os mesmos componentes (Figura 1). A introdução da amostra deve ser compatível com o método de ionização, podendo acontecer de forma direta (*e.g.* via sonda) ou indireta (*e.g.* saída de uma etapa cromatográfica). Uma fonte de ionização produz íons do(s) analito(s) presente(s) na amostra que são separados em função de suas respectivas m/z por um (ou mais) analisador(es) de massas. O detector quantifica os íons separados pelo analisador produzindo sinais elétricos que são ampliados, processados e interpretados para elaboração de espectros de massas (representação gráfica da relação entre a intensidade relativa dos íons detectados e suas respectivas m/z).^{1,3}

Figura 1 - Diagrama simplificado de um espectrômetro de massas.



FONTE: Autora

Cada componente é responsável por um (ou mais) processo(s) que caracterizam esta ferramenta analítica e podem ser modificados para adaptar-se à natureza da amostra e analitos assim como para melhorar a performance analítica. O analisador de massas define a resolução do equipamento como baixa (*e.g.* analisador do tipo *ion trap*) ou alta (*e.g.* analisador do tipo *orbitrap*), de acordo com a capacidade de produzir sinais distintos para íons com uma pequena diferença em suas relações massa/ carga. A presença de múltiplos analisadores ou de analisadores capazes de realizar fragmentação de íons selecionados viabiliza a análise do perfil de fragmentação de analitos, auxiliando em elucidações estruturais e na confirmação da identidade de moléculas-alvo.^{1,3}

Os analisadores fazem medidas baseando-se na massa, carga ou velocidade das espécies iônicas, balanceando sensibilidade, exatidão de massa e tempo de resposta. Em vias gerais, respostas rápidas e baixos erros de massa exata são mutuamente excludentes e, assim como a introdução da amostra deve ser compatível com a fonte de ionização, analisadores de massa e detectores possuem interdependência.^{1,3}

1.1. Fontes de ionização

Uma grande variedade de fontes de ionização é capaz de produzir íons de analitos presentes em amostras de interesse para serem analisados via espectrometria de massas. A formação de íons se dá, basicamente, pela remoção (ou captura) de elétrons, formação de adutos e protonação/ desprotonação da molécula neutra em fase gasosa. A escolha adequada da fonte depende de propriedades físico-químicas da(s) molécula(s)-alvo (como volatilidade e presença de sítios ácidos ou básicos) bem como do processo de transferência de energia interna para a formação de íons.³

O mecanismo e intensidade da transferência de energia interna durante o processo de ionização divide as fontes de ionização em dois grandes grupos:

1. Fontes altamente energéticas: promovem extensa fragmentação do íon de interesse, desfavorecendo a detecção da espécie molecular, *e.g.* ionização por impacto de elétrons (EI – *Electron Impact*)⁴ e ionização química (CI – *Chemical Ionization*)⁵. No entanto o processo de ionização ocorre em alto vácuo, com os íons em fase gasosa, sendo indicado apenas para amostras e analitos voláteis e termicamente estáveis.^{3,6,7}

2. Técnicas de ionização brandas: promovem principalmente a formação de íons das espécies moleculares, uma vez que a energia transferida não é suficiente para quebrar a maioria das ligações químicas. São indicadas para analitos termicamente instáveis (que possuem baixa pressão de vapor) uma vez que é possível extraí-los diretamente de fases condensadas, *i.e.* líquidos e sólidos. Contudo, ainda é possível que ocorra fragmentação na fonte sob condições de ionização branda, dependendo essencialmente da estabilidade da espécie iônica e de parâmetros operacionais da fonte utilizada.^{3,6,7}

Técnicas de ionização branda se subdividem de acordo com a fase condensada da qual o analito é extraído. No caso de analitos presentes em matrizes não-volatilizáveis, a ionização se dá através da irradiação da superfície com fótons ou outras partículas energizadas capazes de dessorver íons que são direcionados para a entrada do espectrômetro de massas, *e.g.* ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – *matrix assisted laser*

desorption/ionization),⁸⁻¹⁰ ionização por dessorção via *electrospray* (DESI - *Desorption Electrospray Ionization*),¹¹ a análise direta em tempo real (DART - *Direct Analysis in Real Time*)¹².

Quando os analitos estão presentes em solução, a amostra é nebulizada após percorrer um capilar metálico com auxílio de gases inertes formando um *spray* que é introduzido na fonte onde íons são gerados à pressão atmosférica e direcionados ao espectrômetro de massas, passando por diferentes estágios de vácuo até que a pressão seja compatível com o analisador, e.g. Ionização *electrospray* (ESI - *Electrospray Ionization*),¹³ Ionização química à pressão atmosférica (APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*),¹⁴ Fotoionização à pressão atmosférica (APPI – *Atmospheric Pressure Photoionization*).¹⁵

Fontes de ionização branda atuam à pressão atmosférica aumentando exponencialmente o campo de atuação da espectrometria de massas, uma vez que uma nova gama de amostras se torna passível de análise. Assim, eliminaram-se problemas que existiam entre o preparo da amostra e sua introdução no sistema a vácuo dos equipamentos.¹⁶ Desde sua introdução, quase trinta anos atrás, novos métodos de ionização à pressão atmosférica vem sendo desenvolvidos visando melhorar parâmetros da técnica e diminuir o consumo de insumos, tempo gasto em preparo de amostras, erros associados à análises, dentre outros.

1.1.1. Fontes de ionização ambiente

A introdução de fontes de ionização capazes de funcionar à pressão atmosférica na década de 1980 revolucionou a área de espectrometria de massas simplificando análises e aumentando o escopo de amostras possíveis de serem analisadas.^{6,17} O desenvolvimento dos métodos de ionização por dessorção via *electrospray* – DESI – por Cooks e colaboradores em 2004¹¹ e análise direta em tempo real – DART – por Cody e colaboradores em 2005¹² possibilitou, pela primeira vez, que amostras fossem analisadas de maneira direta em sua forma nativa, sem a necessidade de etapas de preparo e/ ou manipulação de amostras colmatando a lacuna entre as condições ambientes onde a amostra se encontra e o alto vácuo necessário para a realização de análises via espectrometria de massas.¹⁷

As técnicas de ionização ambiente (também conhecidas como ionização direta) se derivam dos métodos de ionização atmosférica e são caracterizadas pela análise direta de amostras em condições ambiente de temperatura e pressão, minimizando ou eliminando a necessidade de uma etapa de preparo ou pré-concentração de analitos, com alta sensibilidade e boa performance.¹⁷⁻²¹ Devido às suas características, este tipo de ionização permite a análise direta de amostras e superfícies em condições nativas, conservando sua integridade e características químicas espaciais.^{22,23}

A espectrometria de massas com ionização ambiente despertou um grande interesse devido às vantagens que apresenta:

- Baixos limites de detecção: permitem análises com sensibilidade adequada para a detecção de baixas quantidades absolutas do analito em amostras e matrizes complexas;^{21,23,24}
- Análises diretas permitem a obtenção de perfis químicos e confirmação qualitativa da identidade química de analitos;^{21,25}
- Viabiliza a ionização e, portanto, a detecção de analitos ionizáveis (voláteis ou não) de uma extensa faixa de m/z , uma vez que a energia interna é dispersada em sucessivas colisões com moléculas de gases atmosféricos;^{22,24,26}
- Por se tratar de técnicas de ionização branda, a fragmentação na fonte ocorre em menor extensão; no entanto a fragmentação de íons ainda é possível se a configuração do equipamento permitir;^{22,27}
- Remove restrições de tamanho e forma da amostra, possibilitando investigações de distribuição espacial de espécies químicas e formação de imagens químicas;^{24,25}
- Permite análises *in vivo* e *in situ* com amostras a distâncias de até 4 metros da entrada do espectrômetro de massas e miniaturização do sistema de análise;^{24,26}
- Aumenta a frequência analítica, uma vez que a aquisição e subsequente obtenção de dados acontece em um curto período de tempo (usualmente entre 1 s e 1 min).^{22,26}

Considerando os diferentes processos analíticos de ionização envolvidos, os métodos de ionização ambiente podem ser classificados em três categorias nas quais a dessorção – mudança de fase – e aquisição de carga dos componentes da amostra podem acontecer simultânea ou sequencialmente. (1) Nos processos que utilizam *spray*, há transferência de carga entre moléculas iônicas de solvente e o analito neutro via reações ácido-base de Brønsted-Lowry, sendo rápidos e de alto desempenho analítico. (2) Nos que utilizam plasma, gases ionizados (*e.g.* He e Ar) são usados para a dessorção e ionização eliminando, assim, a necessidade do uso de solventes. (3) Os que utilizam *laser* nos processos de dessorção/ ionização apresentam maior resolução espacial e são capazes de analisar compostos de alta massa molecular.^{6,16,21,23,26}

Fontes de ionização ambiente que operam utilizando *spray* vem sendo estudadas e empregadas em diversas áreas como análises biológicas de interesse médico e toxicológico,^{28,29} controle de qualidade e avaliação de fármacos,^{30,31} investigações de cunho forense³²⁻³⁴, segurança alimentar³⁵, monitoramento de reações químicas,³⁶ dentre outras.^{16,18,21,23,27} São exemplos deste tipo de fonte as ionizações DESI, EASI (*Easy Ambient Sonic Spray Ionization*),³⁷

PSI (*Paper Spray Ionization*),² PESI (*Probe Electrospray Ionization*)³⁸ e suas derivações como *Glass Spray*,³⁹ *Leaf Spray*⁴⁰ e *Woodentip Spray*.⁴¹

1.1.2. *Electrospray Ionization – ESI*

O mecanismo utilizado em fontes de ionização ambiente que operam via *spray* se assemelha ao empregado pela técnica ESI, de modo que os espectros obtidos para ambas são comparáveis e compatíveis.^{19,20,26}

A formação de macro-íons em fase gasosa via *electrospray* foi primeiramente idealizada por Malcolm Doyle no final da década de 1960. Na ocasião, Doyle e seus colaboradores foram capazes de produzir moléculas de poliestireno carregadas em fase gasosa — com massa na ordem de grandeza de quilo-Daltons (kDa) — a partir de soluções diluídas do polímero misturadas a um solvente de volatilidade apropriada obtendo resultados promissores, porém ambíguos.⁴² Cerca de 20 anos depois, em meados da década de 1980, Fenn e colaboradores demonstraram a capacidade do sistema de ionização ESI de produzir cátions e ânions em fase gasosa de pequenas moléculas a biomoléculas de alto peso molecular, possibilitando o acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas.^{13,43}

Na técnica de ionização ESI, uma solução atravessa um tubo capilar metálico submetido a um forte campo elétrico formando um *electrospray*.³ A aplicação do campo induz o acúmulo de cargas na interface líquido/ ar formando um cone de Taylor⁴⁴ que libera gotículas altamente carregadas (formadas basicamente do solvente, analitos carregados e íons solvatados). A evaporação do solvente acontece até o limite de Rayleigh,⁴⁵ quando a tensão superficial do líquido não consegue mais sustentar a repulsão causada pelo aumento da densidade eletrônica na superfície esférica, culminando em uma explosão Coulômbica que dá origem a gotículas menores.^{46–48} O processo ocorre continuamente e o solvente residual é evaporado, liberando as espécies iônicas em fase gasosa que são direcionadas para o espectrômetro de massas (Figura 2 e Figura 3).^{3,6}

Figura 2- Diagrama da formação de um electrospray. FONTE: modificado de: <https://goo.gl/u1Z3Cb>
 Acessado em: 30/12/2018 11h10

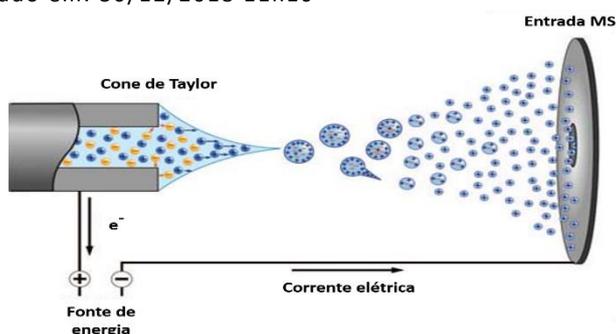
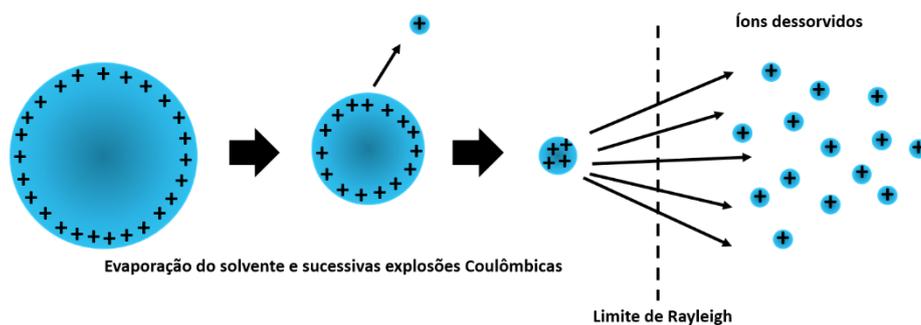


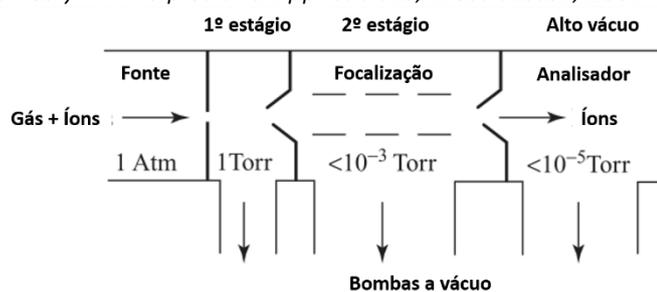
Figura 3- Diagrama da formação de íons dessorvidos via ionização electrospray. FONTE: Autora.



A formação do *electrospray* é um processo eletroquímico no qual processos de oxidação e redução formam espécies catiónicas e aniónicas, respectivamente. No entanto, a formação de espécies carregadas dos analitos ocorre através de equilíbrios do tipo ácido-base de Brønsted-Lowry no interior das gotículas. De maneira geral, analitos de peso molecular baixo (na ordem de 1 kDa) formam íons monocarregados, enquanto grandes moléculas dão origem a íons multicarregados. Em ambos os casos pode ocorrer formação de adutos com íons de sódio, potássio, cloro, dentre outros.^{3,17,26}

O direcionamento dos íons para análise se dá através de compartimentos nos quais a pressão é reduzida com o auxílio de bombas a vácuo (Figura 4). *Skimmers* (lentes condutoras com um pequeno orifício) conectam cada estágio até o compartimento do analisador e, por se tratar de um processo adiabático, o sistema é mantido em temperaturas próximas de 200°C para uma eficiente dessorção dos íons.³

Figura 4- Diagrama de uma interface baixo/alto vácuo em dois estágios. FONTE: Adaptada de *Mass Spectrometry - Principles and Applications, West Sussex, 2007*.³

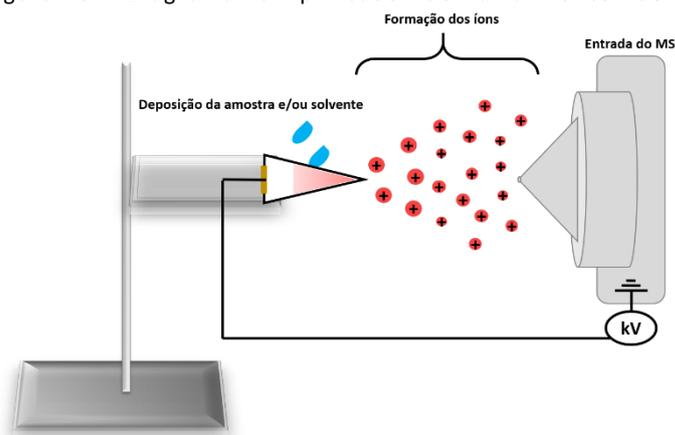


1.2. Fonte de ionização Paper Spray

J. B. Fenn idealizou, em 1998, um método de ionização direta baseado em materiais porosos permeáveis em sua patente intitulada “*Method and apparatus for electrospray ionization*”. Cerca de 12 anos depois, no início de 2010, a técnica de ionização *paper spray mass spectrometry* (PS-MS) foi proposta pelo grupo de pesquisas coordenado por G. R. Cooks e Z. Ouyang como uma alternativa rápida, simples e confiável para a análise de matrizes complexas. Por se tratar de uma fonte de ionização ambiente, a técnica é capaz de oferecer análises diretas, simples e rápidas sem comprometer a confiabilidade e qualidade dos resultados obtidos. Nela, três procedimentos analíticos são integrados em uma única metodologia, *i.e.* amostragem, extração (e separação) de analitos e ionização. Devido às suas características e vantagens, um grande número de estudos vem sendo desenvolvido comprovando sua aplicabilidade nas mais diversas áreas.^{2,6,23,49}

A PS-MS usa um sistema simples que consiste, basicamente, no posicionamento de um pedaço de papel cortado em formato triangular voltado diretamente para a entrada do espectrômetro de massas. O sistema é suportado por uma plataforma capaz de se mover ao longo dos eixos -x, -y e -z para garantir o alinhamento entre os componentes. A amostra é depositada no pedaço de papel que é, então, molhado com alguns microlitros de solvente (ou mistura de solventes). Uma alta voltagem é aplicada através de um clipe metálico em contato direto com o papel úmido de modo que um *spray* de microgotas carregadas é ejetado e íons em fase gasosa são produzidos, seguindo um mecanismo similar ao da ESI (Figura 5).^{2,6,23}

Figura 5- Diagrama simplificado de uma fonte de ionização PS-MS. FONTE: Autora.



A metodologia permite a análise de moléculas de uma grande faixa de massa (desde pequenas moléculas orgânicas até grandes proteínas e polímeros) gerando espectros comparáveis com os obtidos em análises via ESI-MS. A PS-MS pode ser descrita como um processo que ocorre em três etapas. (1) O solvente depositado no papel extrai os analitos (e componentes da matriz de solubilidade adequada) da amostra; (2) Eluição da solução pelo papel; (3) Formação de um *spray* de microgotas carregadas. A ionização dos analitos ocorre durante a evaporação do solvente via transferência de cargas em reações ácido/ base de Brønsted-Lowry, dando origem a espécies protonadas/ desprotonadas e adutos com íons presentes em solução, *e.g.* sódio, potássio, cloro.^{2,6,23,26,50}

1.2.1. Procedimento e características

Existem, essencialmente, três abordagens distintas para a realização de amostragem na PS-MS, todas sendo vantajosas devido à sua simplicidade. As amostras podem ser diretamente adicionadas ao papel, solubilizadas e adicionadas como uma solução ou transferidas para o papel através de contato direto, *e.g.* prensagem e fricção.^{2,26} Pequenas quantidades de amostra —aproximadamente 1-10 µg para amostras sólidas e 0,5-20 µL para soluções —e solvente (usualmente entre 10-30 µL) são necessárias para execução de análises. Em todos os casos, o contato entre amostra e solvente promove a extração dos analitos (e componentes solúveis da matriz) para a fase líquida que forma o *spray*.^{23,50}

Os solventes adequados para a ionização *paper spray* são os mesmos utilizados em experimentos ESI-MS, uma vez que ambos os processos de formação de *spray* e ionização são semelhantes.⁶ Assim, metanol e acetonitrila (puros ou em misturas) são os solventes orgânicos comumente utilizados podendo ser acidificados ou basificados adicionando ácidos e bases orgânicos fracos, *e.g.* amônia e ácido fórmico, para facilitar o processo de transferência de carga. No entanto, outros solventes (polares e apolares) podem ser usados, desde que possuam as

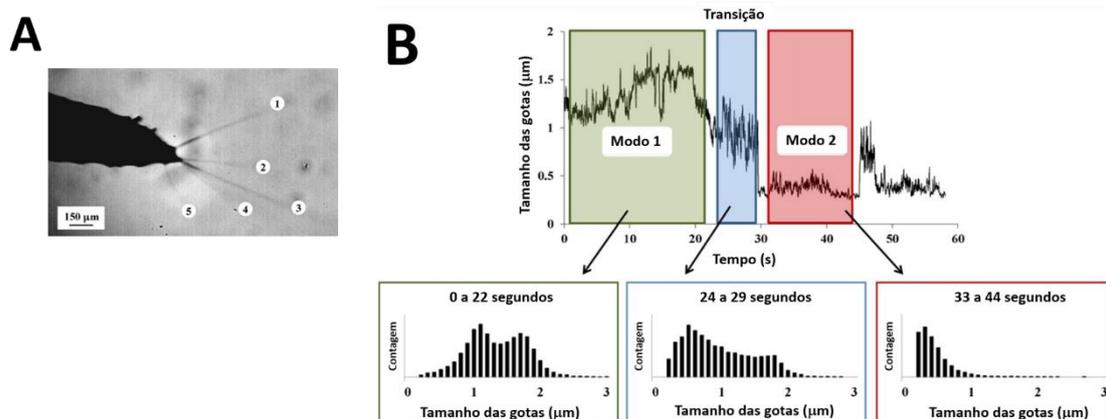
características necessárias para promover a ionização como volatilidade e solubilidade adequadas.^{2,23,26,51,52}

O substrato utilizado e suas características são fundamentais no desempenho do método PS-MS. Por se tratar de um material poroso hidrofílico, o papel é capaz de reter, em sua estrutura de microcanais, componentes da amostra insolúveis no solvente de *spray*. Assim, efeitos de matriz indesejáveis são reduzidos — ou até eliminados — caracterizando uma das maiores vantagens do sistema PS-MS.^{2,53}

O transporte da fase móvel pelo substrato ocorre principalmente através de dois mecanismos: ação capilar e movimento da solução como um filme fino.⁵⁴ No primeiro caso, a percolação do líquido acontece pela micro-estrutura do papel em todas as direções, através de poros e microcanais.²³ O segundo mecanismo é consequência do excesso de solvente adicionado, de modo que à medida que o líquido é consumido para geração do *spray* o filme fino formado se move em direção à extremidade do substrato.^{26,54}

No processo PS o *spray* é formado na ponta mais aguda do triângulo de papel, onde cargas tendem a se acumular na presença de um forte campo elétrico. Quando o sistema é rico em solvente observa-se um modo operacional metastável e multimodal, no qual diversos cones de Taylor podem ser observados e as microgotas formadas apresentam tamanhos variados (modo 1 — Figura 6A). Em contrapartida, o modo 2 é observado quando o sistema já consumiu grande parte do solvente. Nele um único cone de Taylor ocorre simultaneamente a uma descarga corona, aumentando a corrente observada e gerando microgotas de tamanho monodisperso (Figura 6B). Independentemente do modo operacional, o *spray* é ejetado do papel com velocidade suficiente para alcançar o espectrômetro de massas (cerca de $6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), eliminando a necessidade de gases auxiliares e bombeamento.^{6,51}

Figura 6- (A) Múltiplos cones de Taylor observados no modo 1. (B) Modos de ionização e dispersão do tamanho das gotas do *spray* formado por PS-MS. FONTE: Adaptada de Espy *et al.* 2012.⁵¹



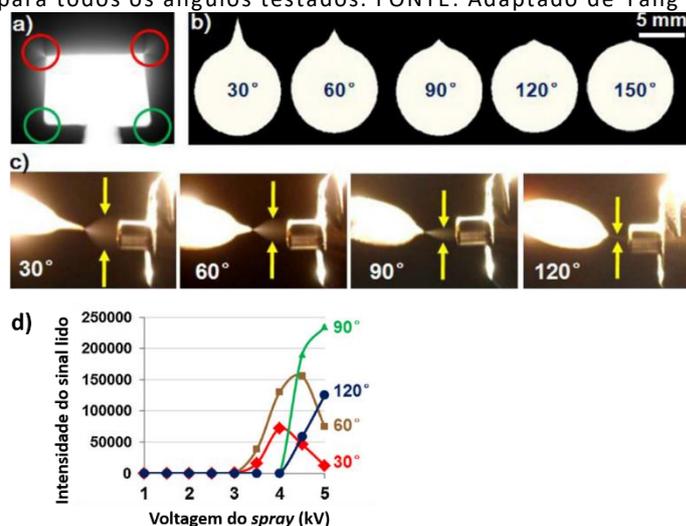
1.2.2. Variáveis e suas influências

Embora a ionização por *paper spray* seja simples, várias variáveis afetam seu desempenho. Duas destas variáveis — tipo de papel utilizado como substrato e seu posicionamento em relação à entrada do espectrômetro de massas — foram avaliadas por Liu *et al.* em 2010.⁵³ Seis tipos de papel foram testados usando soluções de cocaína em metanol/água: quatro papéis de filtro com diferentes tamanhos de poros, um papel de fibra de vidro e um papel cromatográfico.

Os resultados obtidos demonstram que o papel cromatográfico gera espectros melhores com relações sinal/ ruído adequadas, enquanto o papel de fibra de vidro tem a pior performance. Discute-se que a qualidade superior dos espectros utilizando papel cromatográfico é consequência da organização das fibras de celulose, favorecendo o movimento da fase móvel em um sentido. O posicionamento do sistema em relação ao espectrômetro no plano XY afeta diretamente a intensidade dos sinais gerados, sendo que o alinhamento pode variar em uma área de 5x10 mm em torno do orifício de entrada, sem grandes variações de intensidades.⁵³

A geometria do substrato também é uma variável de grande importância, uma vez que o campo elétrico é mais forte em extremidades de ângulos mais agudos, favorecendo a formação do *spray*. Resultados obtidos por Yang e colaboradores em 2012 demonstram que a largura do *spray* formado é mais estreita para ângulos maiores, aumentando a quantidade de amostra que chega ao analisador. No entanto, o fluxo do *spray* segue a tendência contrária: nenhum *spray* é observado para ângulos de 150°. Além disso, observou-se que a maior intensidade de sinal foi detectada para triângulos retos. Deste modo, os autores recomendam o uso de papéis com pontas entre 60° e 90°.⁵⁴

Figura 7- Influência da geometria do papel na formação do *spray*. (a) Formação do *spray* apenas em pontas angulares (vermelho); (b) Diferentes ângulos testados; (c) *spray* formado para cada ângulo testado; (d) Gráfico da intensidade do sinal lido pelo analisador *versus* voltagem do *spray* para todos os ângulos testados. FONTE: Adaptado de Yang *et al.* 2012.⁵⁴



O volume e natureza do solvente utilizado, assim como concentração das espécies analisadas afetam, principalmente, a intensidade dos sinais e duração do *spray*. Soluções aquosas de solvente com mais de 50% de água desfavorecem a formação do *spray* por possuírem tensão superficial elevada dificultando a ocorrência das explosões coulômbicas. De forma semelhante, solventes altamente voláteis secam muito rapidamente de modo que o *spray* não tem duração satisfatória. Por motivos óbvios existe uma relação direta entre o volume de solvente e a duração do *spray* assim como entre a concentração dos analitos e intensidade do sinal.^{6,51}

O sistema PS pode ser utilizado para análises quantitativas e semi-quantitativas apesar de ser influenciado por várias variáveis. Resultados de qualidade, reprodutíveis e com sensibilidade apropriada, são obtidos utilizando-se padrões internos adequados (padrões deuterados ou compostos de estrutura similar à dos analitos), de modo que ambas as intensidades dos sinais sofram as mesmas influências e variações das respostas instrumentais.^{2,6,23}

Esta capacidade foi descrita na primeira publicação da técnica, na qual o fármaco imatinib foi quantificado em amostras de sangue bovino utilizando o padrão deuterado do composto como padrão interno.² Desde então, diversos estudos comprovaram a eficiência da metodologia em detectar e quantificar drogas de abuso em amostras biológicas e de rua;^{29,55,56} contaminantes em matrizes alimentares;⁵⁷ dentre outros.^{34,35,58}

1.2.3. Modificações do sistema PS-MS

A simplicidade do mecanismo de ionização *paper spray* e sua versatilidade possibilita diversas modificações no sistema inicialmente proposto de modo a difundir ainda mais a

utilização da técnica. Tais modificações abrangem desde dispositivos que aumentam a eficiência e performance da técnica até modificações na superfície e tipo de substrato, dando origem a novas técnicas de ionização similares.

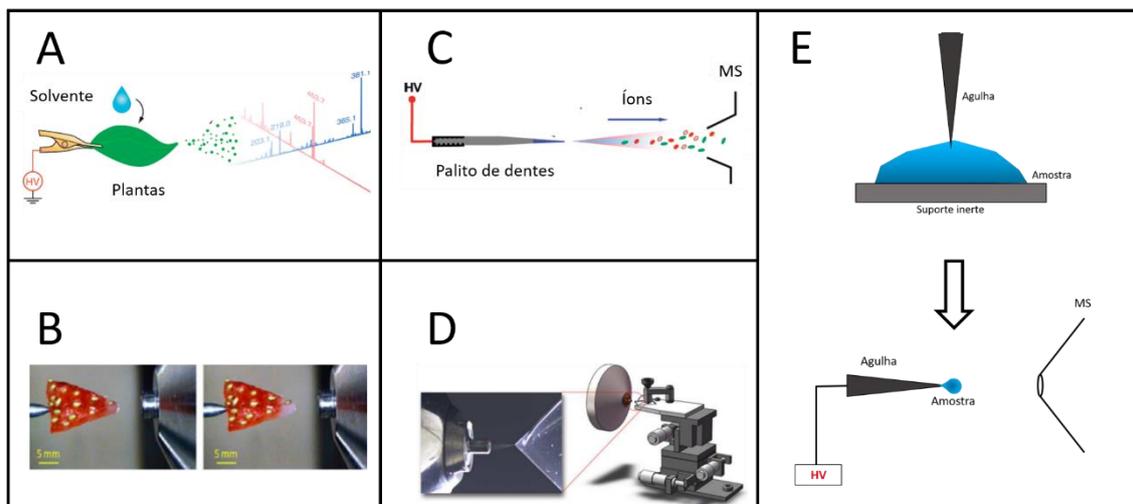
Procurando otimizar o processo de ionização, foram propostos dispositivos que permitem a alimentação contínua de solvente no papel prevenindo a variação do fluxo do *spray* (*nib-assisted paper spray*);⁵⁹ a ionização de sistemas em fluxo através do gotejamento controlado de amostras analisadas (*droplet monitoring paper spray*)⁶⁰ e aumento da frequência analítica mediante automatização do processo, viabilizando análises sequencias (*high-throughput paper spray*).⁶¹

Diversos estudos demonstram aumento de sensibilidade, diminuição de efeitos indesejáveis de supressão iônica e efeitos de matriz e aumento de seletividade do método PS-MS realizando modificações físicas e/ ou químicas na superfície do papel, alterando suas interações com a amostra, os analitos e o solvente. Barreiras físicas de parafina foram utilizadas para evitar a dispersão da amostra enquanto tratamentos químicos do papel promovem limites de detecção e quantificação inferiores aos obtidos para substratos não modificados.⁶²⁻⁷¹

Seguindo os mesmos conceitos adotados para a PS-MS, diversos materiais vêm sendo usados como substrato para a geração de *spray* viabilizando obtenção de *fingerprints*, ou perfis químicos de amostras, assim como quantificação de analitos. Em todos os casos, o substrato deve possuir uma extremidade com ângulo agudo onde será formado o *spray* e o processo de ionização se dá pelos menos mecanismos já detalhados.

A técnica denominada *leaf spray* (Figura 8A) faz uso de cortes triangulares de folhas para a obtenção do perfil bioquímico de plantas, permitindo análises *in vivo* deste tipo de material.⁴⁰ De modo semelhante, a técnica *tissue spray* (Figura 8B) abrange a aplicabilidade do uso da espectrometria de massas possibilitando análises de tecidos vegetais e animais, também cortados em formato triangular, de maneira direta, aplicando solvente e alta voltagem para a obtenção de *fingerprints*.⁷² Utilizando palitos de maneira de ponta afiada para coleta de amostras em solução e subsequente análise aplicando-se alta voltagem, a ionização denominada *woodentip spray* (Figura 8C) é capaz de extrair analitos e formar o *spray* através de ação capilar nas fibras celulósicas da madeira.⁴¹ As técnicas *glass spray* (Figura 8D) e *probe spray* (Figura 8E) fazem uso, respectivamente, de lamínulas de vidro e agulhas metálicas como substrato para a formação do *spray*, obtendo resultados promissores na detecção de analitos e obtenção de perfis químicos.^{38,39}

Figura 8- Representação esquemática das técnicas de ionização ambiente (a) *leaf spray*; (b) *tissue spray*; (c) *wooden tip spray*; (d) *glass spray*; (e) *probe electrospray*. FONTE: Adaptados de Liu *et al.* 2011;⁴⁰ Hu *et al.* 2012;⁷² Hu *et al.* 2011;⁴¹ Jiang *et al.* 2015;³⁹ e Hiraoka *et al.* 2007,³⁸ respectivamente.



O uso do método de ionização ambiente *paper spray* apresenta vantagens claras, dentre as quais se destacam a possibilidade de análise direta de diversas matrizes abrangendo uma larga faixa de massa, com mínimo preparo e manipulação de amostras. Resultados de qualidade, com sensibilidade e reprodutibilidade adequadas são obtidos de forma rápida em um procedimento analítico relativamente simples e capaz de ser adaptado para atender à diversas situações. Deste modo, a PS-MS vem sendo cada vez mais difundida como alternativa para métodos clássicos de análise, *i.e.* HPLC-MS e GC-MS (cromatografias líquida de alta performance e gasosa acopladas à espectrometria de massas, respectivamente).

2. CIÊNCIAS FORENSES

O uso de conhecimento científico na investigação e elucidação das mais diversas questões legais é de suma importância para a tomada de decisões do poder judiciário. Assim, as chamadas ciências forenses se estabeleceram como parte vital do sistema de justiça criminal. Neste âmbito, a química forense se destaca como um ramo de grande importância, sendo capaz de fornecer provas irrefutáveis acerca de evidências criminais a partir da aplicação de conhecimentos químicos.

Na rotina de laboratórios forenses são feitas análises químicas preliminares e definitivas de natureza investigativa, comparativa e comprobatória. Frequentemente são feitas análises de substâncias proscritas (drogas de abuso) e de uso controlado (medicamentos e reagentes), identificação de compostos de alta toxicidade (venenos e pesticidas), avaliação da autenticidade de documentos e produtos, etc. As técnicas analíticas mais utilizadas são testes colorimétricos,

imuno-ensaios, cromatografia em camada delgada, microscopia, decomposição térmica, espectroscopia nas regiões UV-vis e infravermelho e cromatografias líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massas.

O grande fluxo de evidências gera uma alta demanda de análises químicas, de modo que laboratórios investigativos possuem necessidade constante do desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, simples, sensíveis, precisos e de baixo custo que promovam aumento na produtividade sem afetar a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

A ionização *paper spray* se apresenta, então, como uma alternativa promissora para análises de cunho forense, uma vez que simplifica o processo analítico, elimina a necessidade de laboriosos procedimentos de preparo de amostra e gera resultados comparáveis aos obtidos por meio de técnicas convencionais.

A metodologia PS-MS foi aplicada, com sucesso, na análise de drogas de abuso e terapêuticas (em forma bruta e em matrizes biológicas),^{34,56,73} identificação de fraudes em documentos escritos,^{74,75} falsificações de alimentos e produtos,^{57,76,77} dentre outros.^{33,78-80} Tais resultados comprovam a eficácia da técnica como alternativa na solução de problemas forenses.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral aplicar a técnica de ionização ambiente *paper spray* como solução para problemas forenses, comprovando sua eficácia como alternativa para técnicas tradicionalmente empregadas.

3.1. Objetivos específicos

- a) Verificar a capacidade da técnica de ionização PS-MS na análise de suplementos esportivos (BCAA e termogênicos) para a avaliação da qualidade destes produtos;
- b) Identificar a ocorrência de falsificação de documentos escritos usando canetas apagáveis utilizando técnicas de ionização ambiente (PS-MS e DESI-MSI);
- c) Implementar a técnica de ionização PS-MS no laboratório de Análises Química da Polícia Civil de Minas Gerais construindo uma fonte PS-MS para adaptação do equipamento de espectrometria de massas;
- d) Comprovar a eficácia da fonte PS-MS construída analisando amostras reais de cocaína apreendidas pela força policial.

Capítulo 2

Análise e controle de qualidade de suplementos esportivos

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mercado de suplementos esportivos

Atividades físicas e um estilo de vida saudável e ativo trazem benefícios físicos, psicológicos e bioquímicos influenciando os sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico.⁸¹ Atletas profissionais, amadores e praticantes de atividades físicas frequentemente fazem uso de suplementos para que possam ter uma rotina de treinos consistente e intensa, com recuperação muscular rápida e redução de lesões e doenças.⁸²

O mercado de suplementos alimentares tem crescido exponencialmente em escala global, independente das flutuações locais de poder de compra, estimando que alcance movimentação anual de US\$ 12 bilhões até 2020.⁸³ No Brasil, a indústria nacional deste tipo de produto cresce continuamente (cerca de 10% ao ano) movimentando cerca de R\$ 1,5 bilhão em 2018.^{84,85} Este crescimento acompanha a tendência da busca por hábitos saudáveis e prática de exercícios e se deve, principalmente, a estratégias de *marketing*.^{86,87}

Atletas de alta performance, bem como amadores e entusiastas buscam os benefícios anunciados pelos fabricantes de suplementos nutricionais (esportivos e dietéticos) de melhoria do desempenho (físico e mental), perda de peso, aumento de energia, perda de apetite, dentre outros. O aumento na popularidade é tamanho, que pesquisas de mercado reportam que 60-85% dos atletas suplementam a dieta com algum destes produtos de modo que são levantadas questões de eficácia, segurança e legislação.^{87,88}

As fronteiras que definem um produto como “suplemento” não são bem estabelecidas, fluindo entre definições de fármacos/ drogas e alimentos.^{86,89} No Brasil, em julho de 2018 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) passou a regulamentar os suplementos alimentares de forma específica. As regras especificam 189 atribuições funcionais, *e.g.* ação antioxidante ou fortalecimento ósseo, que devem constar no rótulos dos produtos, assim como lista completa de ingredientes e a indicação de eficácia e segurança.⁹⁰

São considerados suplementos alimentares vitaminas, minerais, ervas (produtos botânicos), *shakes* de proteína, bebidas com altas concentrações de eletrólitos ou carboidratos, amino ácidos e outros. No entanto, os benefícios prometidos pela ingestão e possíveis efeitos energéticos e adversos não possuem respaldo científico significativo, com poucos estudos e resultados, muitas vezes pouco robustos e divergentes.^{86,91,92}

1.2. Adultrações de suplementos esportivos

A falta de regulamentação e grande consumo de suplementos possibilita que produtos adulterados com fármacos ou drogas e em desacordo com os componentes declarados no rótulo sejam vendidos, se tornando um problema de saúde pública.^{89,91,93,94} Especula-se que o número de produtos adulterados seja maior do que o reportado; ainda assim, foram registrados 180 casos no Brasil entre 2007 e 2013.⁹⁵

Um número significativo de produtos disponíveis no mercado possui substâncias ativas em quantidades maiores ou menores do que as indicadas ou são adulterados com compostos não declarados como anabolizantes, estimulantes, laxantes, substâncias anorexígenas, ansiolíticos, etc.⁹⁶ Pesquisas recentes analisaram suplementos esportivos vendidos por todo o mundo detectando estimulantes derivados da metanfetamina,^{97,98} novas drogas (não testadas em humanos),⁹⁹ testosterona,⁹³ dentre outros.¹⁰¹ De forma similar, estudos comprovam tanto quantidades excessivas (chegando a 150% do declarado no rótulo) quanto quantidades muito inferiores e ausência de componentes principais das formulações comercializadas.¹⁰¹⁻¹⁰⁵

A análise química deste tipo de material tradicionalmente envolve etapas de preparo de amostra extensivos e separação cromatográfica, em fase líquida e gasosa, dada a alta complexidade das matrizes. A maioria das etapas de extração é essencial para reduzir efeitos de matriz e supressão iônica e envolve uso de solventes orgânicos e métodos derivados da metodologia QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*).^{106,107} A detecção de analitos é feita por técnicas que acoplam cromatografias gasosa, líquida de alta performance e líquida de ultra alta performance (GC, HPLC e UHPLC, respectivamente) e detecção óptica ou por espectrometria de massas.^{108,109}

Recentemente, estudos demonstraram a capacidade de análise de suplementos botânicos utilizando técnicas de ionização direta em espectrometria de massas com mínimo preparo de amostras, *i.e. wooden tip spray* e *paper cone spray*, obtendo sucesso na identificação de adulterantes nos produtos testados.^{110,111}

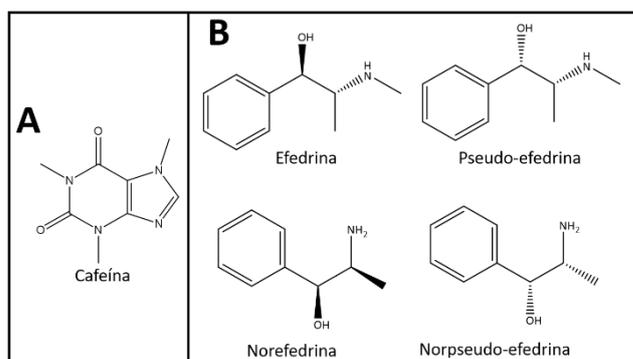
1.3. Termogênicos e amino ácidos de cadeia ramificada

Termogênicos são caracterizados por anunciar efeitos energéticos e de aumento do metabolismo e, conseqüentemente, queima de calorias pelo corpo. Estimulantes naturais (como a efedrina) e sintéticos (como a cafeína sintética) são os ingredientes mais comuns e abundantes neste tipo de formulação.

A cafeína (Figura 9A) é o estimulante mais consumido no mundo, sendo encontrada em alimentos, bebidas e mais de 60 tipos de plantas.⁹⁵ Seus efeitos ergogênicos incluem aumento da circulação de sangue e redução da percepção de fadiga, além de possuir propriedades diuréticas.^{92,95,104} No entanto, sua ação no sistema nervoso central (SNC) pode causar ansiedade e dependência.^{104,112}

A erva chinesa conhecida como Ma Huang (*Ephedra sp.*) é a maior fonte natural de efedrina, componente que representa 80% dos alcaloides da planta.¹¹³ Compostos da família efedra (efedrina, pseudo-efedrina, norefedrina, etc) possuem semelhanças estruturais com o hormônio epinefrina, portanto são considerados drogas simpaticomiméticas (Figura 9B).⁸⁷ O uso de efedrina como suplemento é disseminado por possuir propriedades estimulantes (aumento de energia e queima de gordura) e ocorre, muitas vezes, em conjunto com a cafeína.¹¹³

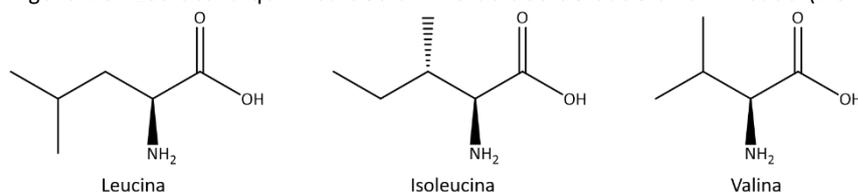
Figura 9- Estruturas químicas dos componentes mais comumente encontrados em suplementos esportivos termogênicos. (A) Cafeína e (B) Alcaloides da família efedra. FONTE: Autora.



Termogênicos contendo efedrina e cafeína promovem efeitos no SNC e respostas cardiovasculares significantes, que podem acarretar problemas de saúde.^{86,113} Suplementos deste tipo frequentemente apresentam adulterações e discrepâncias entre os ingredientes listados no rótulo e presentes no produto.⁹²⁻⁹⁴

Os amino ácidos de cadeia ramificada (BCAA — *branched chain amino acids*, do inglês) leucina, isoleucina e valina representam um terço dos amino ácidos essenciais (Figura 10). Sua oxidação acontece nos músculos esqueléticos, enquanto os demais amino ácidos são catabolizados no fígado. Assim acredita-se que a suplementação destes compostos previna degradação muscular, combatendo dores pós-treino e reduzindo o tempo de recuperação.¹¹⁴⁻¹¹⁷ No entanto, esta teoria possui pouco respaldo científico, com estudos escassos e resultados ambíguos e, muitas vezes, conflitantes.^{118,119}

Figura 10- Estrutura química dos amino ácidos de cadeia ramificada (BCAA). FONTE: Autora.



Apesar da falta de comprovação de seus efeitos ergogênicos, suplementos de proteína animal e vegetal são os mais populares entre atletas e praticantes de atividades físicas em geral; com os BCAA entre os cinco mais vendidos.¹¹⁸ O grande interesse por este suplemento e falta de regulamentação faz com que casos de contaminação (proposital ou não) e adulteração ocorram, apresentando risco aos consumidores.

Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo analisar suplementos esportivos populares, *i.e.* BCAA e termogênicos, utilizando a técnica de ionização direta *paper spray mass spectrometry* para a obtenção de seus perfis químicos. Pretende-se aplicar o método como uma alternativa simples e rápida para detecção de possíveis fraudes e controle de qualidade destes produtos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Amostras

Todas as amostras de suplementos BCAA e termogênicos foram doadas por consumidores deste tipo de produto no decorrer do ano de 2018. No total, 16 amostras de suplementos esportivos foram analisadas, das quais sete são BCAA e nove, termogênicos. A Tabela 1 reúne as informações relevantes de cada amostra.

Tabela 1- Informações de tipo de suplemento, marca, forma e principais ingredientes listados para as amostras analisadas.

Código	Tipo de suplemento	Forma	Principais ingredientes
BCAA1	BCAA	Comprimido	Leucina, isoleucina, valina
BCAA2	BCAA	Pó	Leucina, isoleucina, valina
BCAA3	BCAA	Pó	Leucina, isoleucina, valina, isomaltulose
BCAA4	BCAA	Comprimido	Leucina, isoleucina, valina, vitamina B6
BCAA5	BCAA	Pó	Leucina, isoleucina, valina, isomaltulose
BCAA6	BCAA	Pó	Leucina, glutamina, alanina, isoleucina
BCAA7	BCAA	Cápsula	Leucina, isoleucina, valina
TERM1	Termogênico	Cápsula	Cafeína natural do Guaraná, vitaminas
TERM2	Termogênico	Pó	Cafeína natural dos chás verde e preto
TERM3	Termogênico	Cápsula	Cafeína
TERM4	Termogênico	Cápsula	Cafeína anidra
TERM5	Termogênico	Comprimido	Cafeína anidra
TERM6	Termogênico	Tablete	Efedrina, cafeína, metilsinefrina,
TERM7	Termogênico	Cápsula	Cafina anidra
TERM8	Termogênico	Cápsula	Cafeína anidra, N-acetil-L-tirosina, vitaminas B6 e B12
TERM9	Termogênico	Tablete	Efedrina, cafeína, metilsinefrina,

A maior parte dos termogênicos analisados é comercializada em forma de comprimidos, cápsulas e tabletes. Em contrapartida, os BCAA podem ser encontrados tanto como comprimidos e cápsulas quanto em pó para preparo de bebidas.

Das dezesseis amostras doadas, três, *i.e.* BCAA6, TERM8 e TERM9, foram importadas e as treze restantes, produzidas e comercializadas nacionalmente. Dentre os BCAA, a porção de amino ácidos oferecida pela dose diária varia entre cerca de 2,4 g e 6 g (amostras BCAA7 e 6, respectivamente). Todos os termogênicos declaram conter cafeína em sua composição com quantidades entre 85 mg e 420 mg (dose diária máxima recomendada); já a efedrina é declarada como ingrediente em dois produtos, no entanto sua quantidade exata não é declarada.

Dentre o conjunto amostral, há grande variabilidade de fabricantes e marcas dos produtos. No entanto, foi observado um caso de duplicidade para cada tipo de suplemento esportivo estudado: as amostras BCAA3 e BCAA5 correspondem ao mesmo produto assim como os termogênicos TERM6 e TERM9.

As amostras TERM6 e TERM9 são as únicas que possuem extrato da planta *Ephedra sp.*, com 25 mg por tablete (dose diária recomendada pelo fabricante). No entanto, as quantidades de efedrina e outros alcaloides não é informada. Apesar de se tratarem essencialmente do mesmo produto, a amostra TERM6 é um produto nacional enquanto a TERM9 foi importada dos Estados Unidos.

Todas as amostras foram recolhidas em sacos plásticos com fechamento hermético e mantidas ao abrigo de luz, calor e umidades excessivos até serem analisadas.

2.2. Preparo das amostras

Antes do procedimento de análise PS-MS, todas as amostras foram simplesmente solubilizadas em metanol. Em todos os casos, o material foi homogeneizado individualmente e uma pequena quantidade foi qualitativamente transferida para tubos de polipropileno de fundo cônico com capacidade para 1,5 mL (tipo *ependorf*) aos quais foram adicionados 1000 µL de metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA) com auxílio de micropipetas (Finnpipette, Thermo Scientific).

Para amostras em forma de pó e cápsulas, a homogeneização foi feita agitando manualmente o material doado. Os comprimidos foram pulverizados utilizando gral e pistilo de porcelana, enquanto os tabletes foram macerados com auxílio de bastões de vidro.

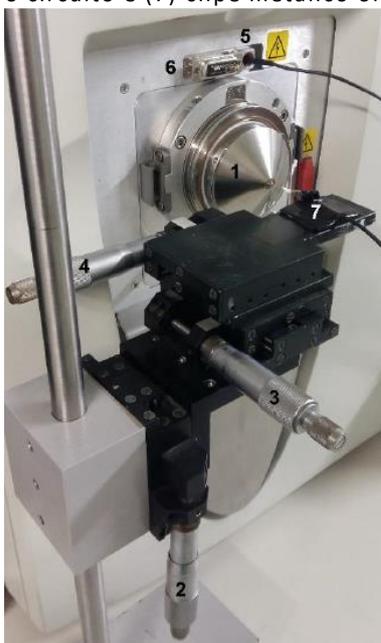
Após a adição do solvente, todos os tubos foram agitados automaticamente em *vortex* (Phoenix, modelo AP 56) por 1 min e as amostras foram armazenadas em geladeira, a aproximadamente 10 °C, até o momento das análises.

2.3. Análises por Paper Spray Mass Spectrometry

Todas as análises foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas LCQ-FLEET (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) operando nos modos positivo (PS-(+)-MS) e negativo (PS-(-)-MS) de leitura de íons. Para a obtenção dos perfis químicos (*fingerprints*), foram coletados espectros em modo *full scan* dentro da faixa de m/z entre 100 e 250.

As análises PS-MS foram realizadas utilizando uma fonte manufaturada (Figura 11). Neste sistema, o clipe metálico que segura o papel é suportado em uma plataforma com capacidade de ajuste fino ao longo dos eixos x-, y- e z- de modo a garantir o melhor alinhamento entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas.

Figura 11- Sistema PS-MS utilizado. (1) Entrada do espectrômetro de massas; (2), (3) e (4) Ajuste ao longo dos eixos z-, y- e x-, respectivamente; (5) Fonte de alta tensão; (6) Conector para fechar o circuito e (7) clipe metálico onde o papel é posicionado. FONTE: Autora.



Para cada análise, utilizaram-se triângulos de papel de filtro qualitativo com 15 mm de altura e 10 mm de base aos quais 10 μ L de solução foram adicionados com auxílio de uma micropipeta com capacidade máxima de 100 μ L (Finnpipette, Thermo Scientific). Quando necessário (extinção do sinal analítico causado pelo esgotamento do *spray*) o sistema foi realimentado com alíquotas de mesmo volume da solução correspondente. Para prevenir efeitos de memória entre análises subsequentes, tanto a entrada do equipamento quanto o clipe

metálico foram limpos com papel embebido em metanol e, para cada análise, utilizou-se um novo triângulo de papel.

Para obter espectros com a melhor qualidade possível, com sinais intensos, estáveis e com boa relação sinal-ruído, os parâmetros de voltagem aplicada, distância entre a ponta do triângulo e a entrada do espectrômetro de massas, voltagem e temperatura do capilar de transferência, pressão interna e voltagem das lentes foram otimizados inspecionando visualmente a qualidade dos espectros obtidos e, também, pelo monitoramento das propriedades do equipamento. Uma vez otimizados, todos foram mantidos constantes.

A confirmação da identidade química dos compostos detectados foi feita analisando-se os perfis de fragmentação dos íons selecionados. Para tal, foram selecionados os íons de interesse e energias de colisão apropriadas e o papel foi umedecido uma segunda vez com 10 µL da solução em questão.

Em todos os casos, a corrente do *spray* formado foi acompanhada durante as análises para que não excedesse os limites de segurança do equipamento e a aquisição de dados foi feita armazenando 20 *scans*. A posterior leitura e tratamento dos dados obtidos foi feita com o *software* Xcalibur versão 4.1.31.9 (Thermo Scientific, EUA, 2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 resume os possíveis analitos presentes nas amostras, obtidos a partir da lista de ingredientes do rótulo de cada um dos produtos doados. Dentre os BCAA, além dos ingredientes principais, são listados frequentemente vitaminas, minerais e outros amino ácidos, *i.e.* alanina e glutamina. Os termogênicos possuem composição mais simples, com exceção das amostras TERM2, TERM6 e TERM9 que contém extratos de ervas em sua composição.

Tabela 2- Principais analitos investigados e suas respectivas fórmulas químicas, massas nominais e relação massa/carga esperada para os modos positivo e negativo.

Composto	Sigla	Fórmula Química	Massa Nominal	m/z	
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Cafeína	caf	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194	195	-
Efedrina	efe	C ₁₀ H ₁₅ NO	165	166	-
Sinefrina	sin	C ₉ H ₁₃ NO ₂	167	168	-
Leucina	leu	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131	132	130
Isoleucina	ile	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131	132	130
Valina	val	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117	118	116
Alanina	ala	C ₃ H ₇ NO ₂	89	90	88
Glutamina	glu	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	132	133	131
Vitamina B3	B3	C ₆ H ₅ NO ₂	123	124	122
Vitamina B6	B6	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169	170	-
Vitamina C	vitC	C ₆ H ₈ O ₆	176	177	-

Os parâmetros internos de análise foram otimizados pela calibração do equipamento utilizando solução e procedimentos padrões indicados pelo fabricante, enquanto as variáveis relacionadas à ionização foram otimizadas para cada um dos tipos de suplemento. (Tabela 3). A corrente do *spray* gerado variou entre 0,5 μA e 0,8 μA para todas as amostras e se manteve estável durante as análises.

Tabela 3- Valores otimizados dos parâmetros do espectrômetro de massas utilizados nas análises PS-MS.

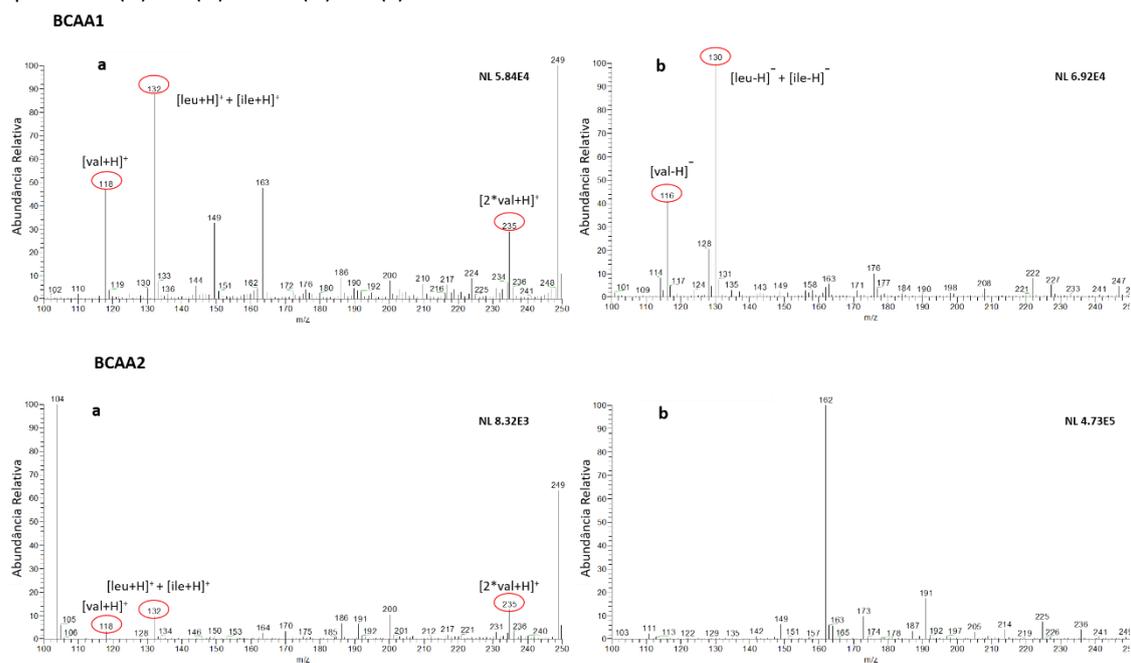
	BCAA	Termogênico
Voltagem aplicada (kV)	4	3,2 - 3,5
Distância PS-->MS (cm)	0,5	0,5
Voltagem do capilar (V)	26	2
Temperatura do capilar (°C)	200	275
Pressão interna ($\times 10^{-5}$ Torr)	0,75	0,75
Voltagem das lentes (V)	25	40

3.1. BCAA

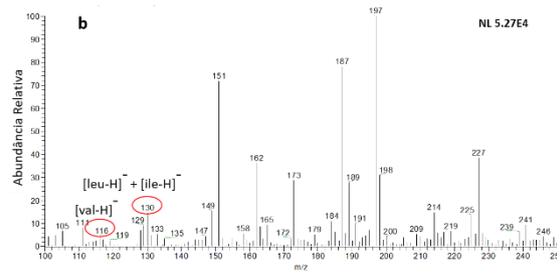
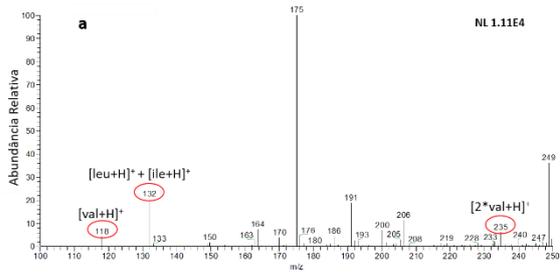
A natureza anfótera dos amino ácidos de cadeia ramificada possibilitou a realização de análises nos modos positivo (PS-(+)-MS) e negativo (PS-(-)-MS) de leitura de íons e todas as análises apresentaram sinais intensos e estáveis com relação sinal/ ruído alta.

A Figura 12 mostra os espectros PS-(+)-MS, à esquerda, e PS-(-)-MS, à direita, obtidos para as sete amostras de BCAA.

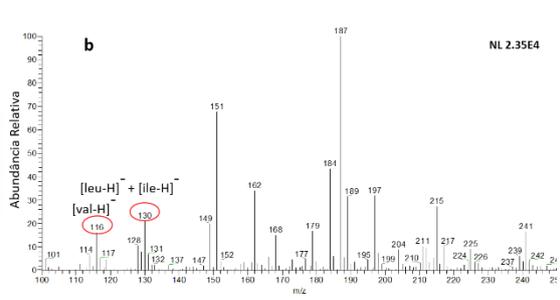
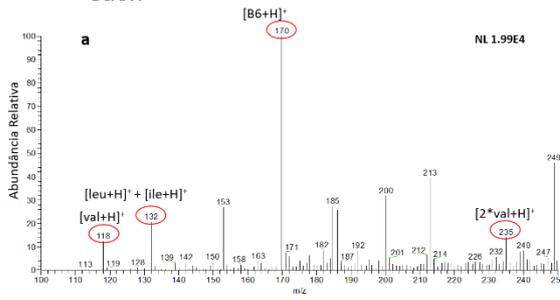
Figura 12- Espectro de massas adquirido para os suplementos de amino ácidos de cadeia ramificada. Para cada amostra de BCAA, indicada no canto superior esquerdo, mostra-se os espectros: (a) PS-(+)-MS e (b) PS-(-)-MS.



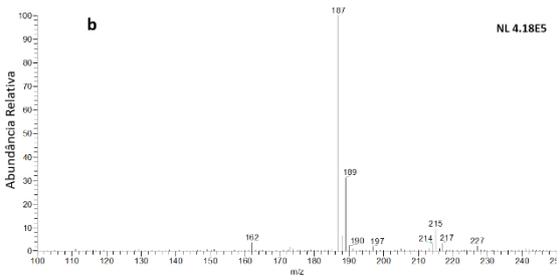
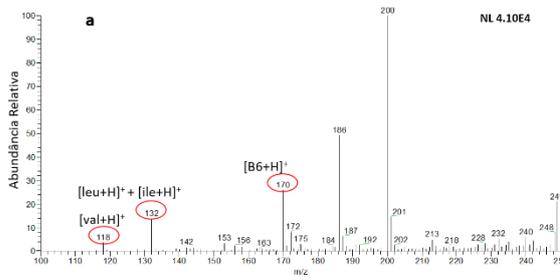
BCAA3



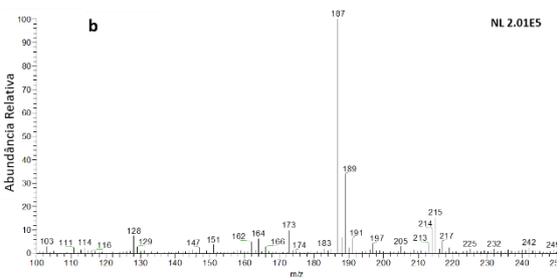
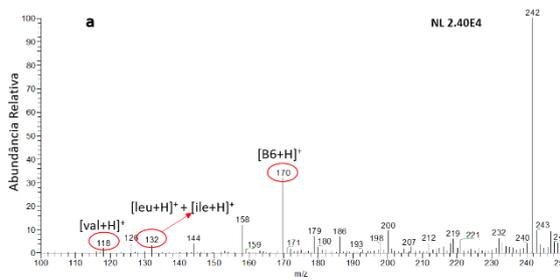
BCAA4



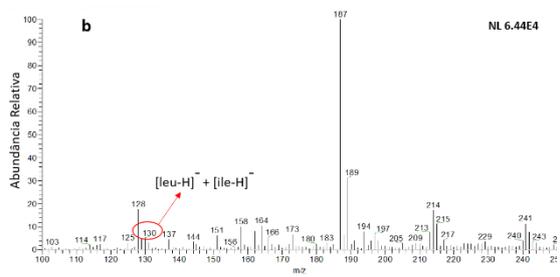
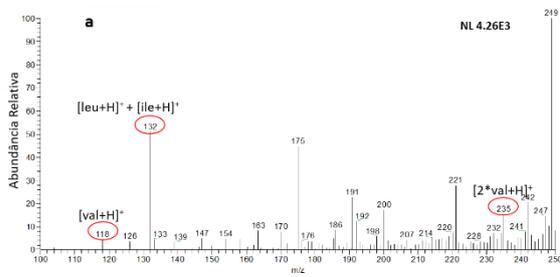
BCAA5



BCAA6



BCAA7



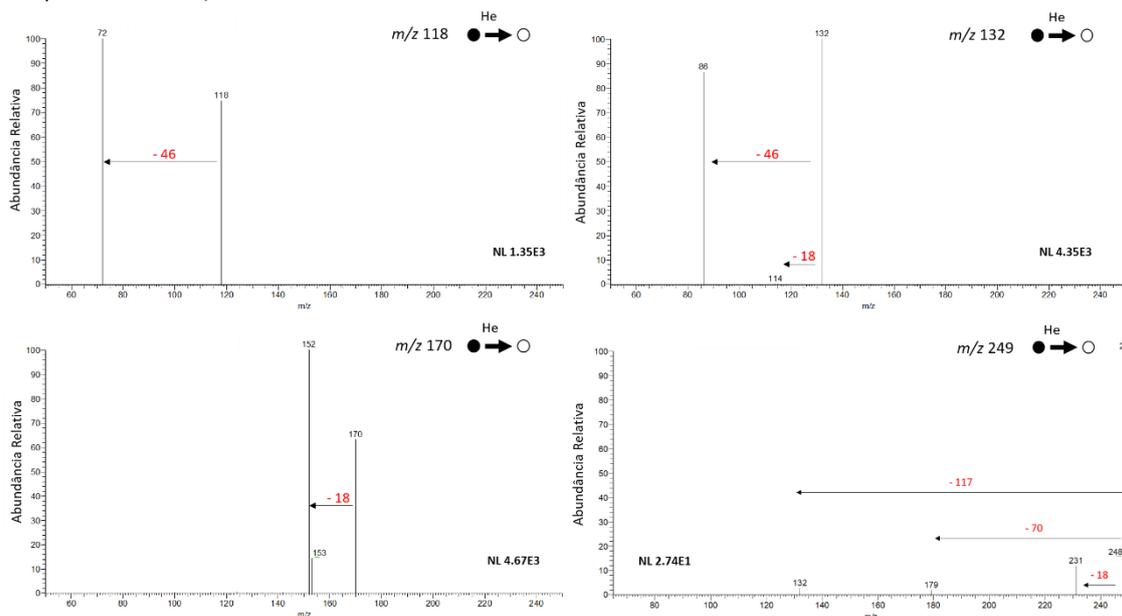
Em todos os espectros de massas obtidos no modo positivo (Figura 12, à esquerda), foi possível observar a presença dos sinais correspondentes às moléculas protonadas de valina, leucina e isoleucina, de m/z 118 e 132, respectivamente. Observou-se que o sinal de m/z 118 foi sempre menor do que o de m/z 132, um fato esperado considerando que as moléculas de leucina e isoleucina são isômeros de posição e apresentam o mesmo sinal analítico, de modo que suas intensidades se somam.

Foi possível propor a identidade de outros sinais presentes nos espectros de massas, como o dímero de próton da valina, $[2.\text{val}+\text{H}]^+$, com razão massa/carga 235, que foi observado em todos os espectros. Um íon de m/z 249 foi detectado em seis amostras (todas com exceção da BCAA6), identificado como sendo um aduto formado pela atração eletrostática entre $[\text{leu}+\text{H}]^+$ (ou $[\text{ile}+\text{H}]^+$) e uma molécula de valina e vice-versa (atração eletrostática entre $[\text{val}+\text{H}]^+$ e uma molécula de leucina ou isoleucina). Excluindo a amostra BCAA1, o sinal referente à molécula protonada de vitamina B6 foi observado em todos os suplementos desta categoria.

Os *fingerprints* obtidos para as amostras BCAA3 e BCAA5 foram comparáveis e compatíveis, apresentando perfis semelhantes. Por se tratarem do mesmo produto, esperava-se que os espectros fossem sobreponíveis. No entanto, as diferentes condições de fabricação, armazenamento, consumo e lotes, bem como as variações durante o procedimento analítico de formação do *spray*, *e.g.* posicionamento do papel, número de cones de Taylor formados, provavelmente fizeram com que as intensidades dos sinais observados fossem diferentes.

Para confirmar a identidade proposta para os íons citados, foram realizadas análises MS^2 utilizando energias de colisão entre 12% e 15%, para os íons de m/z 118 e 132; 15% e 24%, para o sinal 249 e entre 15% e 25%, para os demais cátions (unidades arbitrárias do fabricante). Considerando que todos os perfis de fragmentação para os amino ácidos de cadeia ramificada investigados foram praticamente idênticos, a Figura 13 representa os espectros obtidos para estes analitos de maneira representativa.

Figura 13- Espectros de fragmentação obtido para confirmar a identificação dos analitos valina ($[\text{val}+\text{H}]^+$ m/z 118); leucina e isoleucina ($[\text{leu}+\text{H}]^+$ e $[\text{ile}+\text{H}]^+$ m/z 132); vitamina B6 ($[\text{B6}+\text{H}]^+$ m/z 170) e o íon de m/z 249.



Idealmente, a identidade dos sinais seria confirmada através da comparação entre os espectros PS-MS/MS coletados para as amostras e padrões analíticos. Devido a inviabilidade deste cenário, a comparação foi feita utilizando referências bibliográficas de experimentos ESI-MS/MS dada a semelhança entre os processos de ionização. Assim, foi possível confirmar a identidade de todos os três BCAA bem como da vitamina B6.^{120,121} As perdas mais comuns foram de moléculas de água (M-18), CO_2 (M-44) e $\text{CO}+\text{H}_2\text{O}$ (M-46); compatíveis com as estruturas dos analitos.

Outros sinais intensos foram observados, porém suas identidades não foram determinadas, uma vez que não são compatíveis com nenhum outro ingrediente listado pelos fabricantes dos suplementos e a fragmentação não forneceu informações suficientes para uma elucidação estrutural.

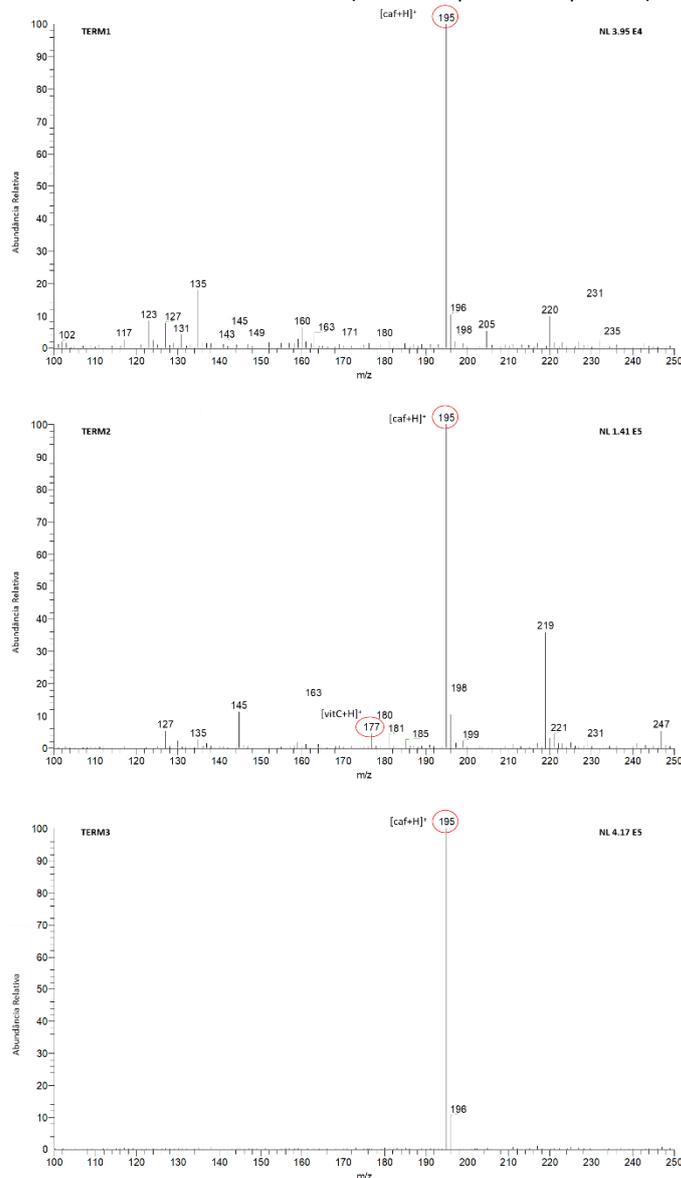
Nos espectros obtidos para análises em modo negativo (PS(-)-MS — Figura 12, à direita), as formas desprotonadas dos analitos ($[\text{M}-\text{H}]^-$) não foram observadas em três ocasiões (amostras BCAA2, BCAA6 e BCAA7). Para as amostras BCAA4 – BCAA7 um par de sinais intensos de m/z 187 e 189 foi observado com proporção 3:1, compatível com o padrão isotópico de moléculas contendo um átomo de cloro em sua estrutura, contudo, a inspeção dos ingredientes e experimentos MS^2 não foram conclusivos na identificação deste composto. Considerando a composição dos produtos, é possível que o sinal seja referente a um aduto de cloro com uma molécula de massa nominal 152 Da.

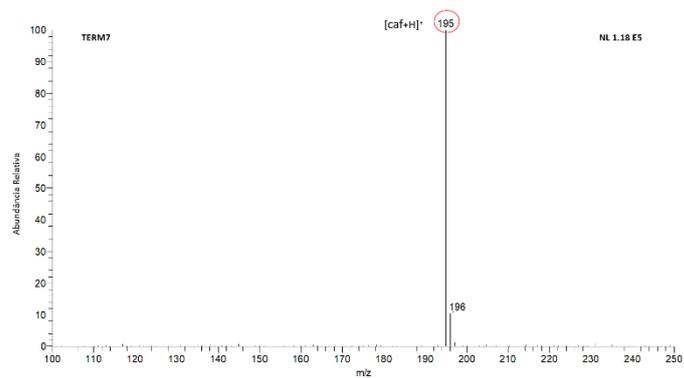
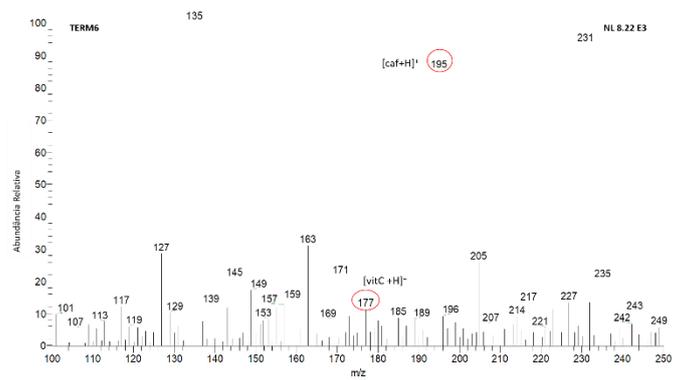
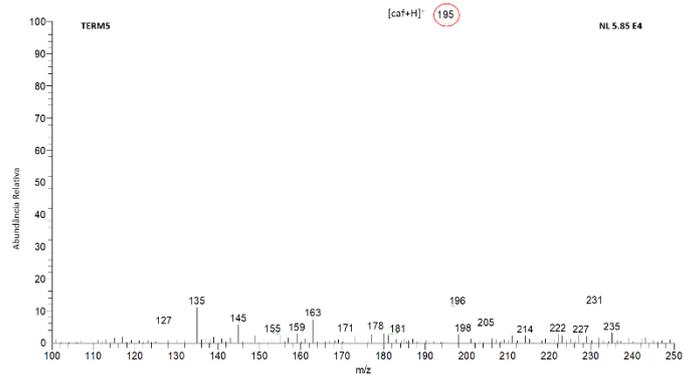
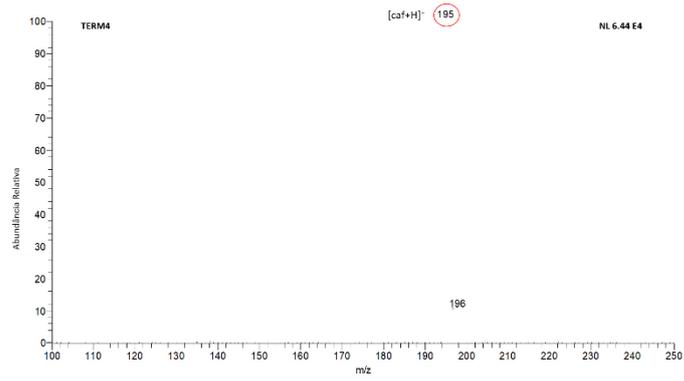
3.2. Termogênicos

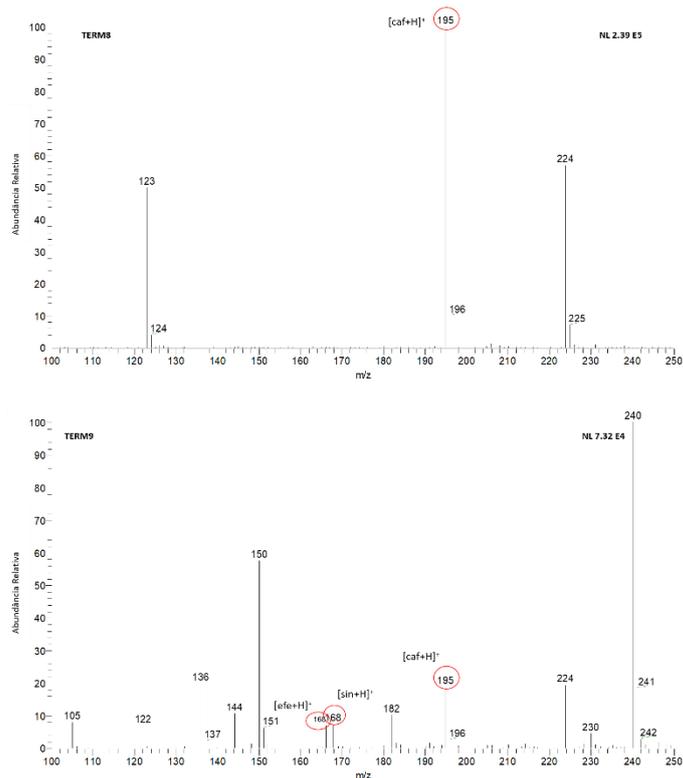
As análises foram feitas no modo positivo de leitura de íons, uma vez que o modo negativo não apresentou sinais com amplitude significativa para todos os nove termogênicos investigados. Este comportamento corrobora com as estruturas químicas dos analitos esperados (citados nos rótulos de cada produto), uma vez que apresentam diversos sítios básicos capazes de receber prótons durante o processo de ionização.

A Figura 14 mostra todos os espectros PS-(+)-MS dos suplementos esportivos de ação termogênica.

Figura 14- Espectros PS-(+)-MS obtidos para os 9 suplementos esportivos de ação termogênica, nomeados de TERM1 a TERM9 (canto superior esquerdo).

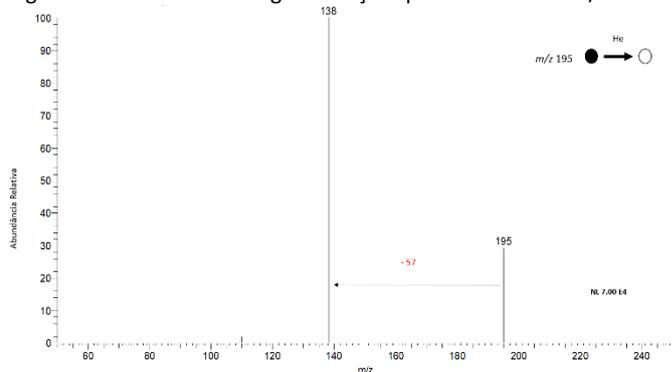






Observa-se que, foi possível detectar o sinal correspondente à molécula protonada de cafeína (m/z 195) em todo os casos. Para as amostras TERM3, TERM4 e TERM7 este sinal foi o único detectado na faixa de massa analisada e era o único ingrediente listado no rótulo. A amostra TERM5 também lista apenas cafeína anidra como constituinte do produto, no entanto o espectro apresenta outros sinais. A identidade deste composto foi confirmada em todas as amostras através da realização de análises PS-(+)-MS/MS do sinal de m/z 195 com energia de 25% (Figura 15). O principal fragmento corresponde a perda de 57 Da referente à saída do grupo que forma o anel externo à fenila principal e os resultados são compatíveis com experimentos ESI-MS/MS para esta substância.¹²²

Figura 15- Perfil de fragmentação para o íon de m/z 195.



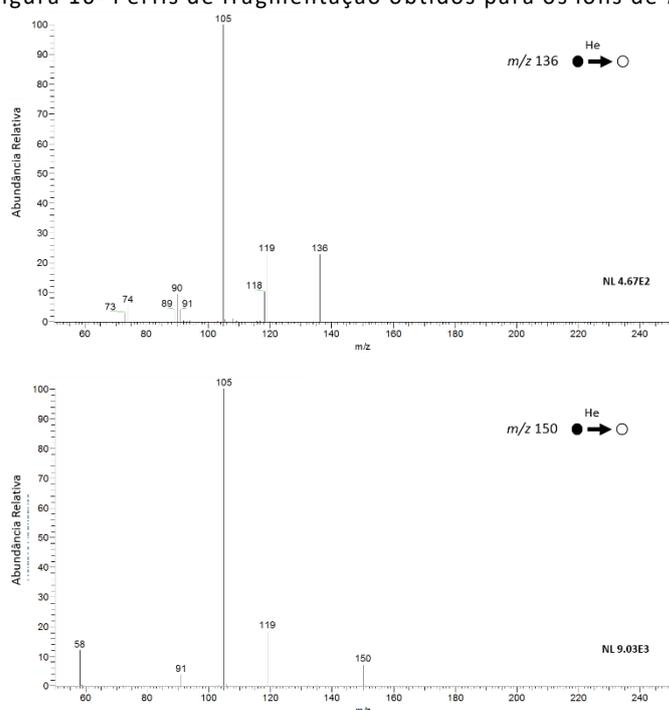
As amostras TERM1, TERM2, TERM5, TERM6, TERM8 e TERM9 possuem extratos de plantas e chás naturais em sua composição, consequentemente os espectros obtidos foram mais

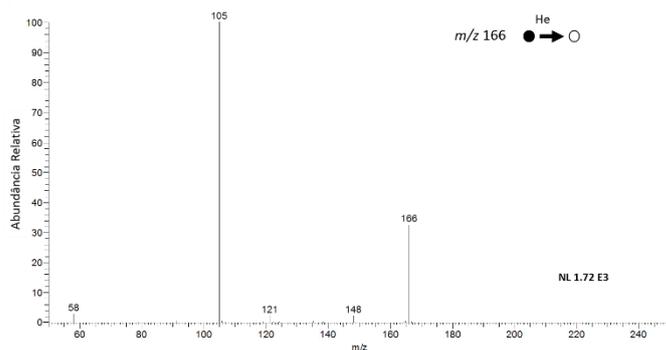
ricos em sinais. Apesar de compartilharem semelhanças (e.g. os sinais de m/z 135, 231 e 224 aparecem em mais de uma amostra), estes *fingerprints* são essencialmente diferentes. Assim, mesmo que vendidos como o mesmo produto, as versões nacional e importada do produto correspondente às amostras TERM6 e TERM9 não apresentam o mesmo perfil químico.

Os rótulos de ambos os produtos são idênticos e não sugerem diferenciação das formulações. No entanto, os alcaloides e estimulantes derivados da planta *Ephedra* não foram detectados no extrato obtido para o produto nacional que, por sua vez, apresentou outros sinais com intensidade significativa. No suplemento importado foram observados íons referentes às formas $[M+H]^+$ da efedrina e sinefrina (m/z 166 e 168, respectivamente), em acordo com a informação disponibilizada no rótulo.

Adicionalmente, é possível observar no *fingerprint* da amostra TERM9 sinais de intensidade significativa de m/z 136 e 150, identificados como anfetamina e metanfetamina, respectivamente. A confirmação da identidade das substâncias foi feita pela fragmentação dos íons selecionados utilizando energias de colisão entre 15% e 24% (Figura 16). Foram observados sinais em conformidade com dados de fragmentação de padrões destas substâncias utilizando ionização *electrospray*.^{122,123} Derivados da fenietilamina, as anfetaminas são poderosos estimulantes do sistema nervoso central e são frequentemente usadas como droga recreativa, sendo que a metanfetamina é uma substância proscrita no Brasil.

Figura 16- Perfis de fragmentação obtidos para os íons de m/z 136, 150 e 166, conforme indicado.





4. CONCLUSÕES

A técnica de ionização ambiente *paper spray mass spectrometry* foi utilizada para obtenção de *fingerprints* de suplementos esportivos BCAA e de ação termogênica minimizando ao máximo etapas de preparo de amostras. Utilizando um procedimento analítico simples, as amostras foram solubilizadas e analisadas gerando espectros com alta relação sinal/ ruído, apresentando sinais intensos e estáveis, mostrando o potencial desta técnica para análises onde há suspeita de fraudes e adulterações destes produtos.

A identificação de todos os compostos foi confirmada através da fragmentação dos íons selecionados, fornecendo resultados em acordo com a literatura. Desta forma, os amino ácidos de cadeia ramificada foram detectados em todos os suplementos de BCAA analisados, enquanto nos termogênicos verificou-se a presença de cafeína em todos os casos, sendo que os termogênicos de composição herbal apresentaram perfis mais ricos do que os demais.

As amostras TERM6 e TERM9 apresentaram perfis químicos distintos apesar de serem vendidas como o mesmo produto. A amostra nacional não apresentou sinais de nenhum dos alcaloides da planta *Ephedra sp.* (listada como ingrediente). No produto importado foram observados sinais referentes à efedrina e sinefrina, bem como da anfetamina e metanfetamina, esta última uma droga ilícita com efeitos adversos significativos e não declarada no rótulo.

Assim, demonstra-se a viabilidade do uso da técnica PS-MS em análises forenses de investigação de fraudes e adulterações de suplementos alimentares, *i.e.* BCAA e termogênicos, como uma alternativa simples, rápida e econômica a técnicas tradicionais que envolvem pré tratamento das amostras e separação cromatográfica.

Capítulo 3

Detecção de fraude em documentos

escritos

1. INTRODUÇÃO

Fraudes em documentos escritos, que podem ter datas, valores e assinaturas alterados, ocorrem frequentemente de modo que a investigação deste tipo de documentos em âmbito forense é de grande importância. Análises documentoscópicas incluem comparação visual e exame da escrita de suspeitos e análises preliminares de natureza física usando microscópios e luzes forenses (lâmpadas monocromáticas de diferentes comprimentos de onda), uma vez que são de baixo custo e não requerem equipamentos especiais. Usualmente, no entanto, essas etapas precisam ser complementadas com análises químicas das escritas para determinar se houve modificação ou adição de informações *post factum*.^{32,74,124,125}

Todas as canetas contêm em sua composição, basicamente, um veículo e substâncias com a coloração desejada. O veículo é, geralmente, uma mistura de solventes, surfactantes, biocidas e aditivos que impedem o bloqueio do sistema de entrega de tinta, sendo também responsáveis pelo ajuste de pH, viscosidade e grau de polimerização. A cor desejada é alcançada com uso de corantes, *i.e.* substâncias solúveis no veículo, ou pigmentos (materiais pulverizados e dispersos na mistura líquida).^{125,126}

Canetas apagáveis foram introduzidas no mercado na década de 1970, facilitando o procedimento de falsificação e dificultando seu reconhecimento. O processo de remoção de tinta é puramente físico e pode acontecer de duas formas: atrito ou aumento de temperatura local, utilizando borrachas de goma para as duas situações. No primeiro caso a tinta não é absorvida pelas fibras do papel e são removidas de forma semelhante à remoção de escritas feitas com grafite; já o aumento de temperatura é utilizado em tintas termolábeis que são visíveis apenas entre -10°C e 60°C.¹²⁷ Quando suspeita-se deste tipo de prática, comparações visuais e observações microscópicas podem falhar em detectar adulterações, de modo que a análise química se torna, em muitos casos, imperativa.

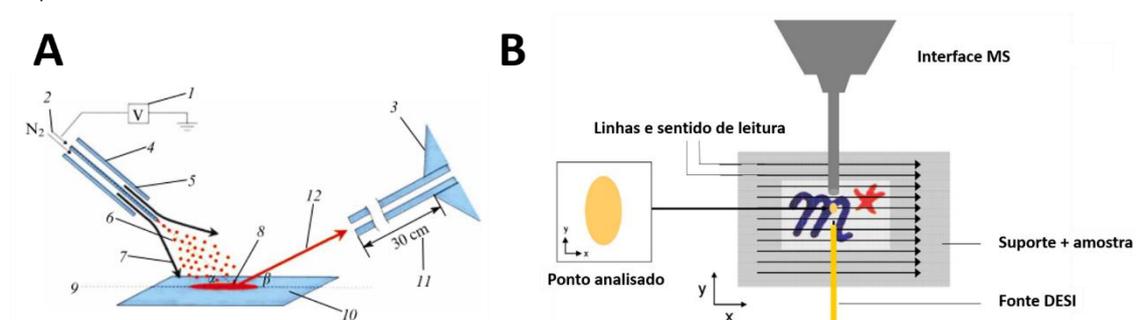
A análise forense de tintas usualmente é feita utilizando técnicas tradicionais como cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia em camada delgada (TLC) e eletroforese capilar associadas à espectrometria de massas ou às espectroscopias UV-vis, infravermelho e Raman.^{124,125,127-129} Apesar de eficientes em seus propósitos, estas técnicas são, em geral, lentas, trabalhosas e afetam a integridade das amostras.

Assim, as técnicas de ionização ambiente se tornam particularmente úteis na investigação de fraudes em documentos, uma vez que combinam as vantagens claras de análise direta, rápida

e minimamente destrutiva com a sensibilidade e resolução dos analisadores de massas.⁷⁴ As técnicas *desorption electrospray ionization* (DESI) e *easy ambiente sonic-spray ionization* (EASI) promovem ionização em condições ambiente utilizando fluxo de gás e solvente e já se provaram eficientes em análises forenses.^{11,124} Em ambos os casos, os mecanismos de ionização são similares à ESI e, conseqüentemente, à PS-MS. No entanto a dessorção dos analitos ocorre de maneira distinta.

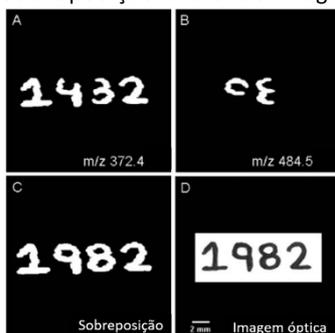
Na técnica DESI um *electrospray* direcionado apropriadamente atinge a amostra formando um filme fino de líquido que extrai analitos da superfície. A colisão entre o filme e novas gotas do *spray* gera microgotas secundárias que contém o analito e entram no espectrômetro de massas (Figura 17A).^{11,26} As características de análise permitem mapeamento de superfícies e formação de imagens químicas, chamada então de DESI-MSI (*DESI mass spectrometry imaging*). O procedimento é feito através da adaptação da fonte original, de modo que o suporte amostral passa a ter livre movimento nos eixos -x e -y permitindo fazer análises em pontos ao longo de linhas uniformemente distribuídas por toda a amostra adquirindo espectros que são tratados com *softwares* para formar imagens químicas em duas dimensões, mostrando a distribuição espacial e intensidade de íons (Figura 17B).

Figura 17- Diagrama do funcionamento de uma fonte: (A) DESI, na qual os números indicam a fonte de energia, o fluxo de solvente, a entrada do espectrômetro de massas, o capilar do *spray*, o capilar do gás nebulizador, o *spray* formado, o jato de gás, a amostra, o suporte amostral, e os íons desorvidos, respectivamente; (B) DESI-MSI, na qual o suporte é capaz de realizar movimentos bidimensionais no plano XY. FONTE: Adaptado de Lebedev, 2015²⁶ e Ifa *et al.* 2007,¹²⁹ respectivamente.



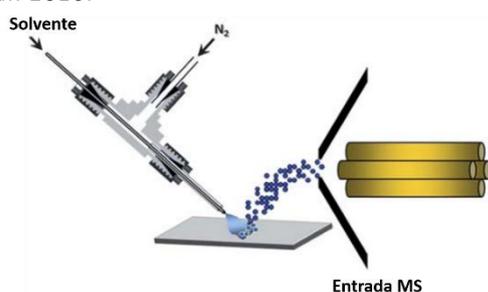
Ifa e colaboradores demonstraram, em 2007, a capacidade da técnica DESI-MSI em detectar tintas de diferentes canetas usadas em uma situação simulada de falsificação. Na simulação, o número 1432 foi alterado para 1982 utilizando canetas distintas. As imagens químicas obtidas para os íons referentes aos corantes de cada caneta evidencia a adulteração e a combinação de ambas gera uma imagem idêntica à observada a olho nu (Figura 18).¹²⁹

Figura 18- Imagens químicas obtidas via DESI-MS. (A) e (B) Imagens químicas bidimensionais da distribuição dos íons referentes aos corantes *basic violet 3* e *basic blue 2*, respectivamente; (C) Sobreposição das duas imagens; (D) Imagem óptica da superfície analisada.



Já a técnica EASI (Figura 19) é considerada uma das mais simples e eficazes fontes de ionização ambiente. Baseada na ionização por *spray* supersônico, a técnica consiste na criação de um fluxo de solvente de microgotas diminutas carregadas positiva e negativamente que penetram a superfície da amostra extraíndo e ionizando analitos sem a necessidade de aplicação de corrente elétrica, uso de fonte para emissão de fótons ou aquecimento.^{26,37,124}

Figura 19- Diagrama simplificado de uma fonte de ionização EASI-MS. FONTE: Adaptado de *Lalli et al. 2010*.



Em 2010, *Lalli et al.* demonstraram o potencial uso desta técnica na análise de tintas e estudos de decomposição de tintas de escritas para determinar a cronologia do conteúdo de documentos.¹²⁴ Análises EASI-MS foram feitas de forma simples, rápida e direta em linhas escritas em papel comum utilizando canetas azul e vermelha. Os perfis químicos obtidos foram característicos para cada caneta e a decomposição ao longo do tempo se mostrou regular, possibilitando a detecção de adições feitas em documentos *post factum*.

Em 2017, a técnica de ionização por *paper spray*, descrita em detalhes anteriormente (Capítulo 1), teve seu potencial em analisar documentos e tintas de canetas avaliado por Amador e colaboradores.⁷⁵ No estudo, canetas esferográficas de tinta preta foram diferenciadas por seus perfis químicos obtidos em modo negativo e a associação de ferramentas quimiométricas aos dados de massas forneceu informações acerca da degradação dos componentes das canetas avaliadas.

Recentemente, a fabricante alemã de artigos de escrita Stabilo® lançou um conjunto de canetas que utiliza métodos químicos para a remoção da coloração presente no papel. O conjunto conta com canetas coloridas de qualidade apagável e uma caneta branca que provoca o desaparecimento de qualquer uma das tintas presentes no conjunto ao ser passada sobre a porção que se deseja apagar. Assim, é razoável assumir que o uso desta tecnologia para fins criminais e fraudulentos é possível, de modo que o presente trabalho visa demonstrar a capacidade das técnicas de ionização ambiente *paper spray mass spectrometry* e *desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging* na detecção rápida e irrefutável de assinaturas falsificadas utilizando este novo mecanismo.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Para a análise de tintas e detecção de falsificação em assinaturas, canetas da marca alemã Stabilo® de qualidade apagável e não apagável foram compradas em lojas de comércio local. As canetas utilizadas têm ponta porosa com diâmetro de 0,4 cm e as seguintes cores: branco apagador (código de cor 00), azul apagável (código de cor 0041) e azul não apagável (código de cor 41). Os códigos apresentados são designados pelo fabricante e indicam tanto a qualidade (canetas apagáveis possuem o código '00') quanto o tom da coloração de uma dada caneta (representados pelos numerais).

2.1. Análises PS-MS

Para a obtenção dos perfis químicos (*fingerprints*), foram realizadas análises de cada caneta, bem como do papel utilizado. Para isso, linhas foram desenhadas em pedaços triangulares (com aproximadamente 10 mm de altura e 5 mm de largura da base), recortados de folhas de papel A4 branco simples (Ripax 75 g.m⁻²).

Um experimento de prova foi proposto para simular uma situação real de falsificação (Figura 20). Nele, um voluntário assinou três vezes em uma folha de papel A4 branco comum utilizando a caneta azul apagável (Figura 20, à esquerda). Duas destas assinaturas foram apagadas com a caneta branco apagador, deixando uma intacta para ser tomada como 'padrão' da assinatura original (Figura 20, no centro). Por fim, um segundo voluntário assinou sobre uma das porções apagadas com a caneta azul não apagável (Figura 20, à direita). Seções triangulares (com 5 mm de largura de base e 10 mm de altura) representativas de cada área, *i.e.* assinatura original, assinatura apagada e assinatura falsificada, foram recortadas e analisadas.

Figura 20- Procedimento para simular uma situação real de falsificação de assinatura. (à esquerda) Assinatura original, feita com a caneta azul apagável; (no centro) Porção apagada obtida através do uso da caneta branco apagador na assinatura escrita e (à direita) Assinatura falsificada feita sobre a segunda porção apagada usando a caneta azul não apagável.



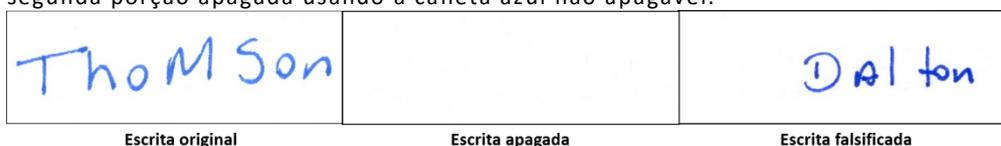
As análises PS-MS foram realizadas em um equipamento LCQ-FLEET (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) operando em modo *full scan* e positivo de leitura de íons na faixa de razão massa/ carga (m/z) entre 100 e 1200, utilizando o sistema descrito em detalhes anteriormente (Capítulo 2). Em todos os casos, o papel triangular foi posicionado a uma distância de 10 mm da entrada do espectrômetro de massas e segurado por um clipe metálico. O papel foi umedecido com 10 μL de metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA) com auxílio de micropipetas (Finnpipette, Thermo Scientific) e, em seguida, aplicou-se alta voltagem (3 kV) através do contato metálico. Para prevenir a ocorrência de efeitos de memória, as análises das amostras foram intercaladas com análises 'brancas', *i.e.* papel sem amostra.

Os seguintes parâmetros instrumentais foram otimizados e mantidos constantes durante as análises: voltagem do spray (3 kV); voltagem do capilar (35 V); temperatura do capilar (275 °C) e voltagem dos *skimmers* (65 V). A aquisição de dados foi feita através do armazenamento de 40 *scans* e a posterior leitura e tratamento dos dados obtidos foi feita com o *software* Xcalibur versão 4.1.31.9 (Thermo Scientific, EUA, 2017).

2.2. Análises DESI-MSI e EASI-MS

A realização das análises DESI-MSI e EASI-MS foram feitas no laboratório ThoMson, liderado pelo Professor Marcos Eberlin na Universidade de Campinas (UNICAMP, SP). Ambos os experimentos seguiram os mesmos passos descritos acima, para as análises PS-MS (Figura 21).

Figura 21- Procedimento para simular uma situação real de falsificação. (à esquerda) Escrita original, feita com a caneta azul apagável; (no centro) Porção apagada obtida através do uso da caneta branco apagador na escrita original e (à direita) Resultado da falsificação feita sobre a segunda porção apagada usando a caneta azul não apagável.



Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro de massas Q Extractive (Thermo Scientific, Alemanha) acoplado às fontes adequadas. Para análises EASI-MS foi utilizado um sistema manufaturado no próprio laboratório e, nos experimentos DESI, a plataforma móvel comercial Omni Spray Ion Source 2-D (Prosolia, Indianapolis, USA). Em ambos os casos, parâmetros-chave foram otimizados para maximizar a intensidade dos sinais detectados: solvente do *spray* (metanol); fluxo do solvente ($10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$); voltagem do capilar (5 kV) e temperatura do capilar ($300 \text{ }^\circ\text{C}$). Os espectros foram adquiridos em modo *full scan* e positivo de leitura de íons na faixa de m/z entre 100 e 1000.

Os espectros de massas foram processados através do *software* Xcalibur versão 4.1.31.9 (Thermo Scientific, EUA, 2017) e, para a obtenção das imagens químicas, foram convertidos em imagem e visualizados no *software* BioMAP versão 3.8.04.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises, em todos os casos, foram feitas apenas em modo positivo de leitura de íons devido à falta de sinais observada para o modo negativo. É possível inferir, portanto, que os componentes presentes na formulação das canetas analisadas possuem sítios básicos capazes de receber prótons (H^+) durante o processo de ionização ou são naturalmente catiônicos.

Os experimentos foram feitos utilizando papel ofício comum sem nenhum tratamento e, em todos os casos, os perfis químicos obtidos para o papel em branco foram pobres em sinais e, apesar de característicos, os sinais observados para o papel não foram observados em nenhum outro espectro.

Na falsificação simulada, a caneta branco apagador levou pouco menos de 40 segundos para desvanecer completamente a tinta da caneta azul apagável utilizada nas assinaturas originais. Após 20 minutos a folha estava completamente seca e, então, a caneta azul não apagável foi utilizada para realizar a falsificação. Nota-se que, em ambos os casos analisados (Figura 20 e Figura 21), uma simples inspeção visual não é capaz de detectar a fraude, comprovando a necessidade de análises químicas para comprovar ou descartar a suspeita de adulteração.

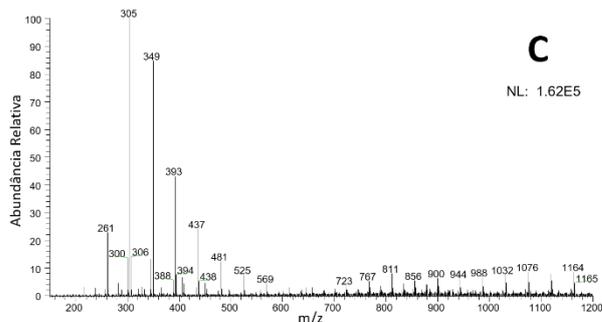
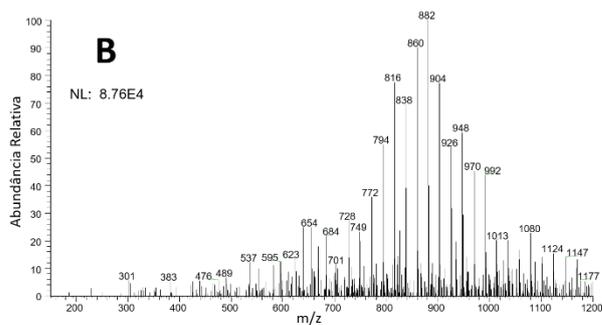
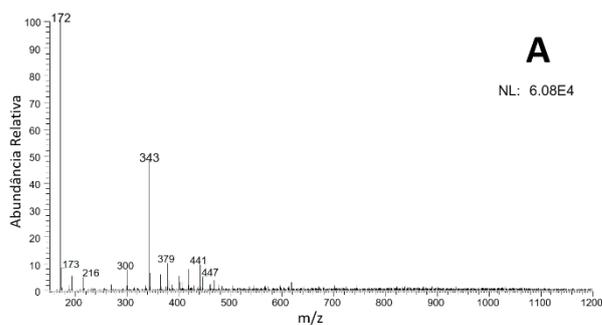
3.1. PS-MS

A Figura 22 mostra os espectros obtidos para as análises das tintas de cada caneta individualmente. Para a caneta branco apagador (Figura 22A) apenas dois sinais intensos são observados, de m/z 172 e 343; estes íons não são encontrados nos espectros de nenhuma das

canetas azuis (apagável e não apagável — Figura 22B e Figura 22C, respectivamente) que, em contrapartida, são característicos de polímeros, *i.e.* sinais igualmente espaçados seguindo uma distribuição Gaussiana.

Apesar de apresentarem *fingerprints* característicos e essencialmente diferentes, cada um destes espectros apresentam dois clusters poliméricos com sinais adjacentes separados por uma diferença constante de 44 Da que pode se referir a grupos $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$. Para a caneta apagável (Figura 22B) eles se aglomeram na faixa de m/z entre 700 e 1200. Contudo, para a caneta não apagável, eles são observados como dois conjuntos distintos: um com sinais de massa predominantemente mais baixa (de m/z entre 200 e 600) e um segundo na faixa de m/z entre 700 e 1200 (Figura 22C). Assim, comprova-se a facilidade em diferenciar as canetas analisadas através da comparação de seus perfis químicos.

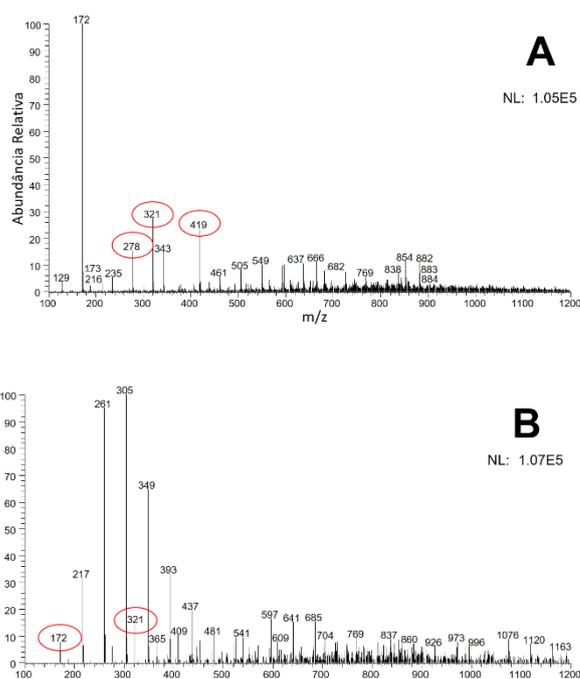
Figura 22- *Fingerprints* obtidos para as canetas (A) branco apagador; (B) azul apagável e (C) azul não apagável.



Como esperado, o *fingerprint* da assinatura original (Figura 20) apresentou as mesmas características do padrão obtido para a caneta azul apagável (Figura 22B). Em contrapartida, os perfis químicos obtidos para as seções da assinatura apagada e falsificada apresentaram diferenças em relação aos seus respectivos padrões (Figura 23).

No espectro da região da assinatura apagada (Figura 23A) são observados os íons característicos da caneta branco apagador (de m/z 172 e 343) em detrimento dos sinais correspondentes à assinatura original. A ausência dos *clusters* poliméricos característicos da caneta azul apagável pode acontecer, muito provavelmente, devido à efeitos de supressão iônica destes sinais. No entanto, a hipótese de que os componentes das suas canetas reagem quimicamente para desaparecimento da tinta é corroborada pelo aparecimento de sinais não observados anteriormente de m/z 278, 321 e 419 que podem se referir a subprodutos desta reação.

Figura 23- Espectros PS-(+)-MS para as regiões (A) da assinatura apagada e (B) da assinatura falsificada.



Os dados obtidos para a assinatura falsificada (Figura 23B) são compatíveis com o *fingerprint* da caneta usada nesta etapa (azul não apagável) com exceção da presença notável de dois íons de m/z 172 e 321, característicos da caneta branco apagador e da reação que ocorre durante o processo de adulteração, respectivamente. Estes íons não foram detectados no perfil químico da caneta azul não apagável e podem, portanto, ser usados como evidência irrefutável de que assinatura original foi substituída por outra.

A tentativa de fragmentar os possíveis subprodutos (m/z 278, 321, 343 e 419), bem como o íon característico da caneta branco apagador (m/z 172) não produziu fragmentos detectáveis, sugerindo que estas substâncias são estáveis e resistem a dissociação induzida por colisão (CID – *collision-induced dissociation*, do inglês) utilizando energias de até 30% (unidades arbitrárias do fabricante).

3.2. EASI-MS

Por se tratar de um equipamento com analisador Orbitrap (de alta resolução), em todas as análises realizadas em Campinas, os sinais observados foram muito mais intensos (cerca de duas ordens de grandeza maior) quando comparado com as intensidades obtidas com o sistema PS-MS.

Apesar de compatíveis, os resultados obtidos via *easy ambient sonicspray ionization* (EASI-MS) diferem em alguns aspectos dos obtidos utilizando a ionização PS-MS. Por se tratar de uma ionização ambiente mais branda do que a PS-MS, esta técnica tem maior dificuldade em ionizar e direcionar analitos de massas maiores para serem analisados, dificultando sua detecção, uma vez que a transferência de energia envolvida no processo de ionização é menor e os íons gerados devem percorrer um trajeto mais longo até a entrada do espectrômetro de massas de modo que moléculas de maior peso podem ter dificuldade em alcançar o equipamento. Assim, os *clusters* poliméricos observados em faixas de m/z maiores presentes nos perfis das canetas azuis foram observados com intensidades muito menores nos espectros EASI-(+)-MS enquanto, para regiões de m/z menores os espectros são semelhantes (Figura 24).

Para o experimento de falsificação, os dados gerados por ambas as técnicas são semelhantes. Na seção apagada (Figura 21 ao centro), o resultado obtido foi mais pobre em informações e sinais, muito provavelmente, devido à supressão iônica causada pelos íons característicos da caneta branco apagador, uma vez que foi possível observar, no espectro da escrita adulterada (Figura 21, à direita), os dois íons diagnósticos do processo de falsificação, de m/z 172 e 321, assim como o polímero característico da caneta azul não apagável (Figura 25).

Figura 24- Espectros EASI-(+)-MS obtidos para (A) caneta branco apagador; (B) caneta azul apagável e (C) caneta azul não apagável.

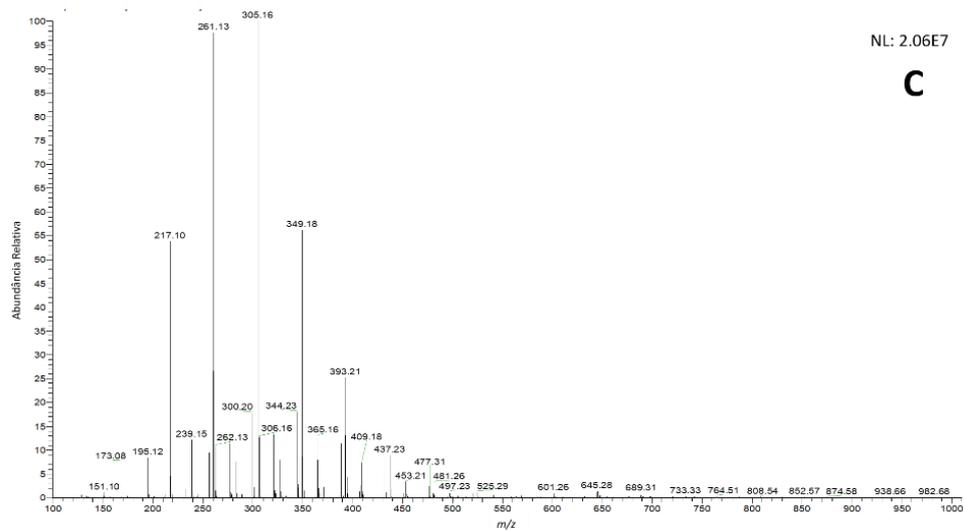
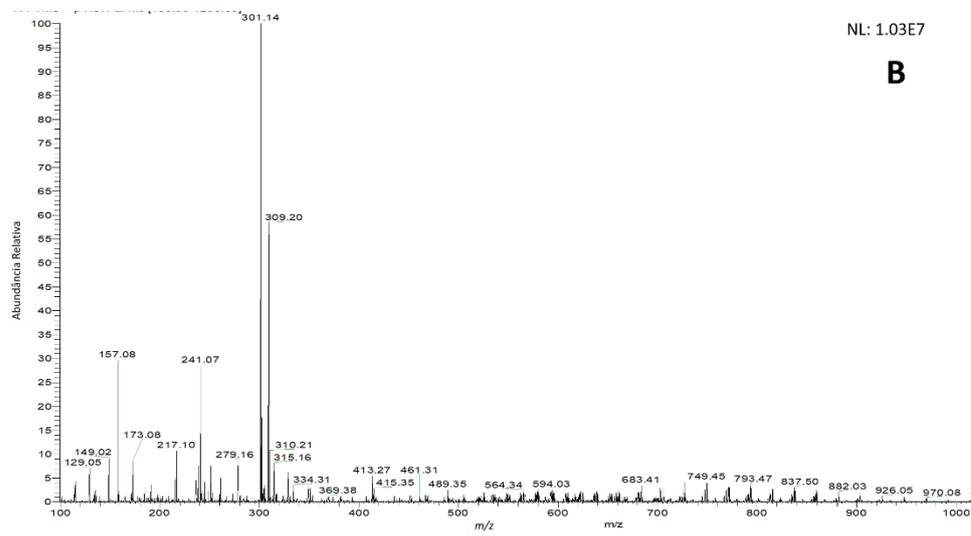
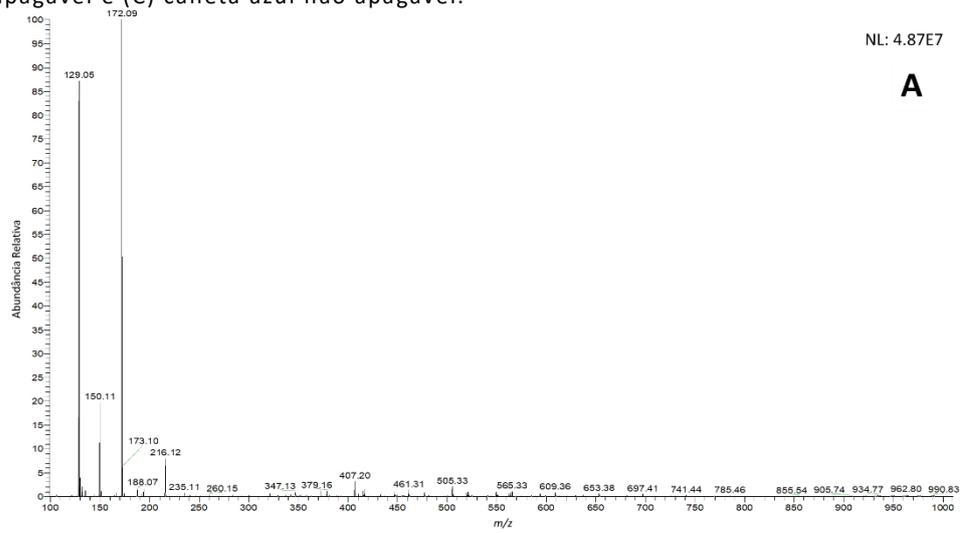
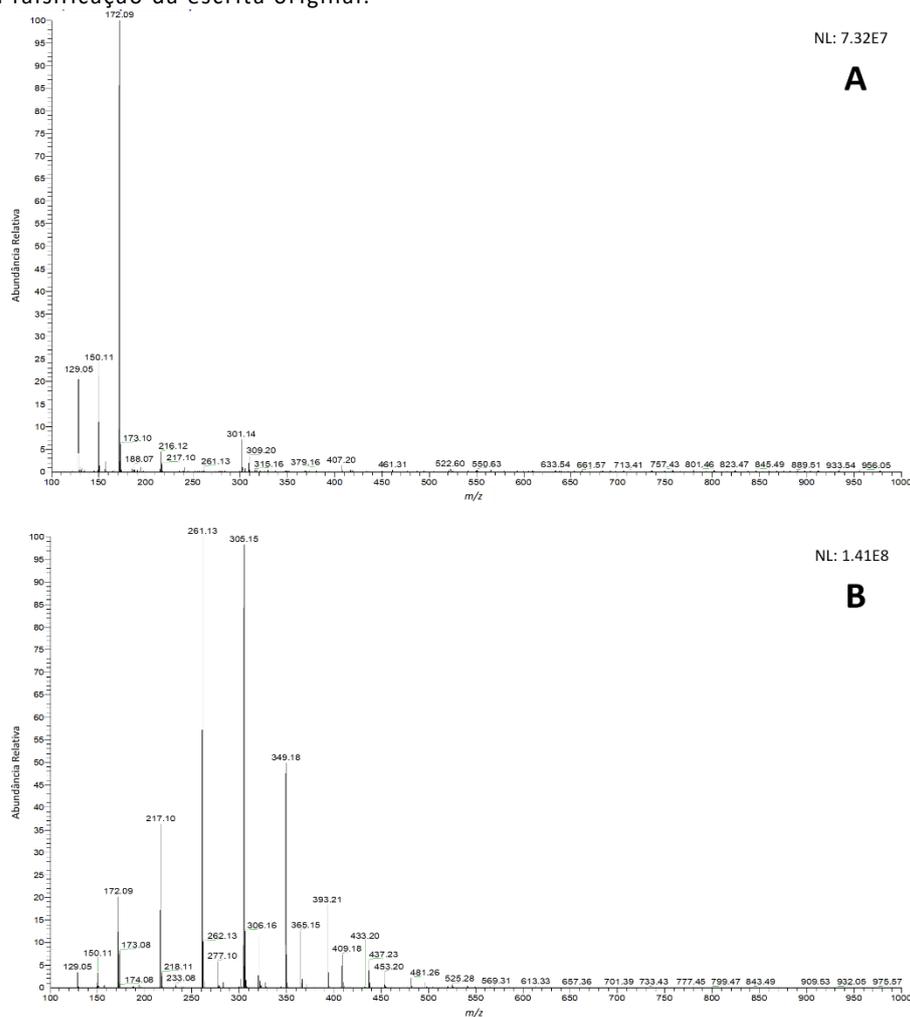


Figura 25- Resultados EASI-(+)-MS para das seções correspondentes a (A) a escrita apagada e (B) a falsificação da escrita original.



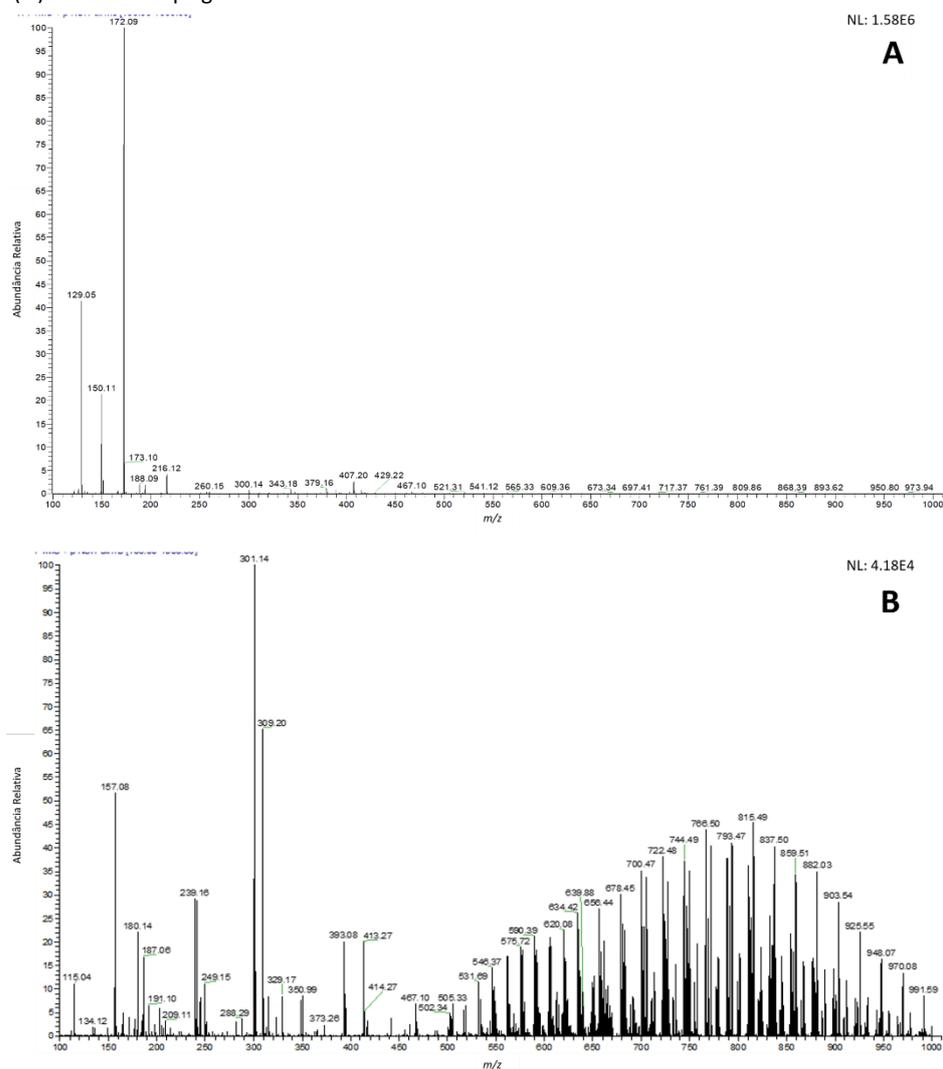
3.3. DESI-MSI

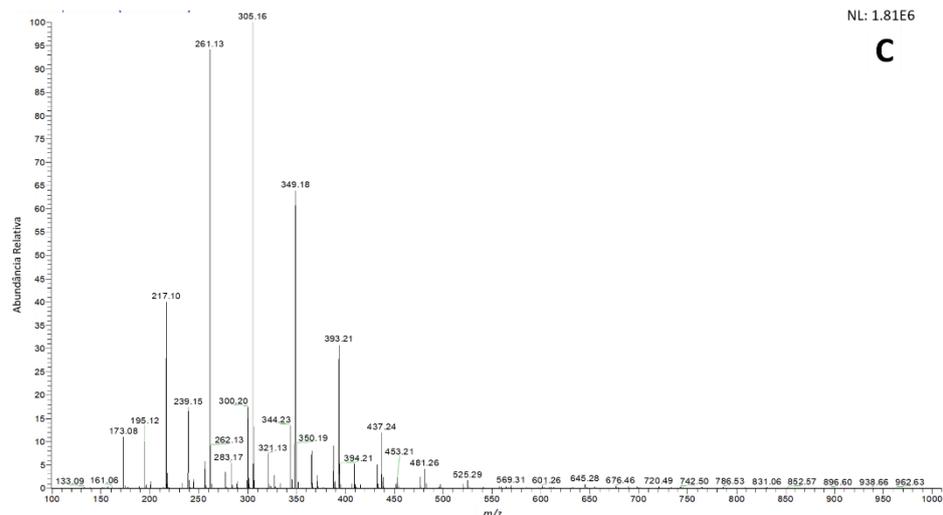
Foram realizados experimentos DESI-MS para a obtenção dos *fingerprints* de cada caneta (Figura 26). As técnicas de ionização DESI e PS possuem grandes similaridades, de modo que os espectros obtidos para ambos os casos são praticamente iguais.

O pico base observado para cada caneta foi monitorado para a obtenção das imagens químicas, *i.e.* m/z 815,5 para a caneta azul apagável; m/z 172,1 para a branco apagador e m/z 305,2 para a caneta azul não apagável. A intensidade de cada íon foi monitorada nas três áreas analisadas (escrita original, apagada e falsificada) de modo que tons de roxo a azul correspondem a intensidades mais baixas e tons de verde a vermelho, intensidades maiores (Figura 27).

Através das imagens obtidas é possível observar todas as etapas do processo de falsificação de forma clara como prova inquestionável do ocorrido. A escrita original 'ThoMSon' foi detectada em todas as seções com intensidades significativas do íon monitorado de m/z 815,5 (Figura 27, primeira coluna). Nas seções que tiveram a escrita original apagada, as imagens do íon característico da caneta branco apagador correspondem ao modo com o qual ela foi passada em toda extensão da escrita original, cobrindo-a (Figura 27, segunda coluna). Finalmente, o escrito 'Dalton' aparece na área correspondente ao documento adulterado através do mapeamento da distribuição do íon de m/z 305,2 que não é detectado com intensidade significativa nas duas outras áreas analisadas (Figura 27, terceira coluna).

Figura 26- Espectros DESI(+)-MS obtidos para as canetas (A) branco apagador; (B) azul apagável e (C) azul não apagável.

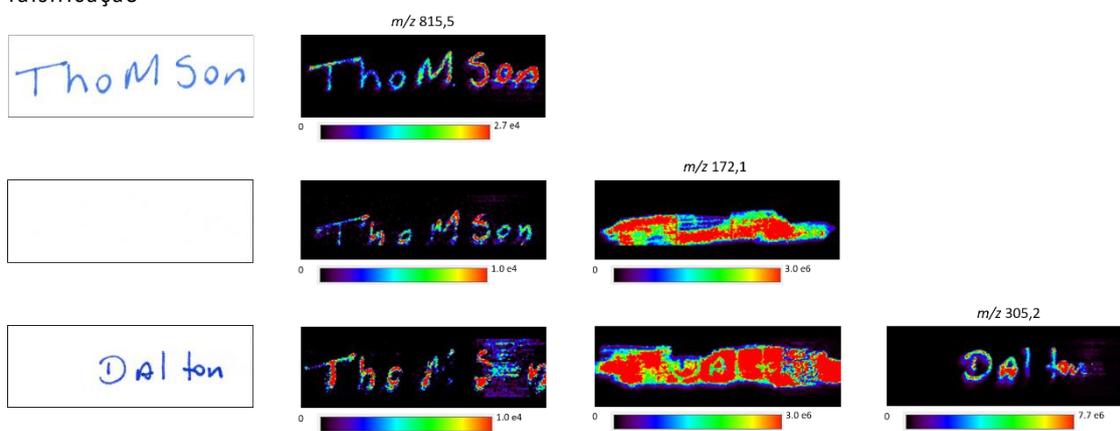




NL: 1.81E6

C

Figura 27- Imagens químicas obtidas para as três áreas analisadas para o experimento de falsificação



4. CONCLUSÕES

As ionizações ambientes *paper spray*, *easy ambient sonicspray ionization* e *desorption electrospray ionization* possibilitaram a detecção imediata da falsificação em documentos escritos feitas utilizando um novo conjunto de canetas apagáveis que usam processos químicos para remover a coloração das tintas.

O sistema PS-MS se mostrou adequado para análises diretas de documentos suspeitos fornecendo sinais intensos, estáveis, reprodutíveis, com boa relação sinal/ ruído e representativos de cada amostra. O reconhecimento irrefutável da falsificação foi alcançado adotando um procedimento analítico simples, rápido e pouco trabalhoso. A destruição da amostra é reduzida, uma vez que seções diminutas são necessárias para a realização das análises e podem ser armazenadas sob condições controladas para serem analisadas posteriormente, se necessário, como contraprova.

A ionização EASI também demonstrou ser capaz de detectar a presença dos íons que diagnosticam a adulteração, no entanto este método se mostrou menos sensível e mais demorado quando comparado com a PS-MS.

Imagens químicas explicitando a distribuição espacial de íons selecionados e sua intensidade foram geradas evidenciando todas as etapas do processo de falsificação de maneira inquestionável com sensibilidade adequada. Apesar de eficiente esta metodologia tem alto custo associado: é mais lenta, trabalhosa e demanda conhecimento técnico avançado, características que dificultariam sua implementação na rotina de laboratórios forenses.

Conclui-se, portanto, que dentre as técnicas de ionização empregadas, a *paper spray mass spectrometry* se destaca como uma real alternativa para a detecção de fraude em documentos escritos. Contudo, a implementação desta metodologia na prática de laboratórios de perícia forense depende da condução de outros estudos que avaliem, por exemplo, a degradação dos componentes das tintas com o passar do tempo.

Capítulo 4

Análise de entorpecentes

Produção de uma fonte PS-MS para um equipamento

Shimadzu LCMS8030

1. INTRODUÇÃO

Segundo o último relatório oficial *World Drug Report 2018* publicado pelo órgão *United Nations Office on Drug and Crime* (UNODC) vinculado à organização das nações unidas (ONU), cerca 5,6% da população mundial entre 15 e 64 anos de idade é usuária de drogas — o correspondente a 275 milhões de pessoas. Deste demográfico, 18,2 milhões são usuários de cocaína.¹³⁰

Os dados mais atuais demonstram que o cultivo de *Eritroxylum coca*, planta da qual a cocaína é extraída, cresceu 76% entre 2013 e 2016 após mais de uma década de retração. Seguindo essa tendência, o mercado ilegal de produção e distribuição da droga atingiram os maiores valores já registrados e estima-se que 1.410 toneladas de cloridrato de cocaína pura foram manufaturadas em 2016, um crescimento de 25% em relação ao ano anterior.¹³¹

Ainda segundo a UNODC, os maiores consumidores de cocaína estão no continente americano e Europa Ocidental, regiões que registraram maior quantidade de droga apreendida. No entanto novas rotas de tráfico tem disseminado o uso desta substância em todo o mundo. Considerando a proximidade com os principais países que cultivam e produzem cocaína (Peru, Bolívia e Colômbia), mais da metade das apreensões desta substância ocorre na América do Sul.¹³²

No Brasil, o número de usuários é cerca de quatro vezes maior do que a média mundial, com 1,75% da população adulta admitindo uso do entorpecente. Sua posição geográfica privilegiada faz com que seja parte importante das rotas de tráfico e, como consequência do aumento observado na produção, uma maior quantidade de cocaína está circulando no país.¹³³

O investimento em políticas de combate ao tráfico resultou na apreensão de 75 toneladas de cocaína em 2018, quase 60% a mais do que no ano anterior e a maior desde o primeiro registro, segundo dados de um levantamento da Polícia Federal do Brasil feito a pedido do jornal O Globo.¹³⁴ Assim, verifica-se uma necessidade imediata de métodos analíticos rápido, simples, e baratos capazes de identificar e confirmar a presença de cocaína no material apreendido, atendendo às grandes demandas atuais.

Entre produção e consumo, a droga bruta passa por procedimentos de diluição com adulterantes — fármacos e outras substâncias com propriedades que simulam o efeito do entorpecente mascarando a diluição — e diluentes, *i.e.* qualquer componente branco que possa ser usado para aumentar o volume e massa do produto final. Assim, o material apreendido tem

uma matriz muito mais complexa do que a droga isolada que dificulta e mascara a detecção da cocaína propriamente dita.¹³⁵

A análise de substâncias apreendidas é feita seguindo as diretrizes recomendadas pelo grupo SWGDRUG (do inglês *scientific working group for the analysis of seized drugs*) que sugere o uso de análises preliminares e confirmatórias para verificar a presença de substâncias ilícitas. Considerando sua capacidade discriminatória, o documento divide as técnicas analíticas em três categorias. Técnicas pouco específicas, pertencentes a categoria C, incluem imuno-ensaios e testes colorimétricos. As cromatografias — gasosa, líquida e em camada delgada — pertencem a categoria B devido à sua capacidade de separação, enquanto a grande capacidade discriminatória de técnicas como espectrometria de massas e espectroscopia Raman, as classificam na categoria A.^{136,137}

Seguindo estas recomendações, a análise de apreensões de cocaína em forma de pó ou pedra (conhecida popularmente como *crack*) ocorre, de maneira preliminar, através do uso do teste colorimétrico de Scott modificado, que forma um complexo de cor azul para cocaína e outras substâncias de estrutura química semelhante. A confirmação é feita utilizando métodos cromatográficos associados à espectrometria de massas, *i.e.* cromatografias gasosa e líquida de alta performance — HPLC-MS e GC-MS.^{56,136}

A espectrometria de massas com ionização ambiente se torna uma alternativa muito eficiente e promissora para análises desta natureza, tendo seu potencial demonstrado por diversas vezes na literatura.^{138,139} Neste âmbito, a ionização PS-MS se destaca com vantagens de tempo e simplicidade, sendo capaz de detectar substâncias de interesse forense com eficiência e facilidade.^{33,75,77} No caso específico da cocaína, a técnica *paper spray mass spectrometry* foi utilizada com sucesso na detecção e quantificação desta substância e de seus metabólitos em diversas matrizes de interesse forense que incluem materiais apreendidos (*crack* e cocaína em pó), urina, sangue, dentre outros.^{140,141}

Apesar de ter se tornado uma técnica difundida que se estabeleceu no meio acadêmico como uma alternativa eficaz aos métodos tradicionalmente empregados em diversas situações, a implementação de metodologias que usam PS-MS em laboratórios da polícia científica depende, entre alguns fatores, da disponibilidade comercial desta fonte de ionização. Atualmente a fabricante Thermo Scientific produz, com exclusividade, a fonte Prosolia Velox 360™ Paper Spray System™ de modo que equipamentos de outros fabricantes devem ter suas fontes manufaturadas.

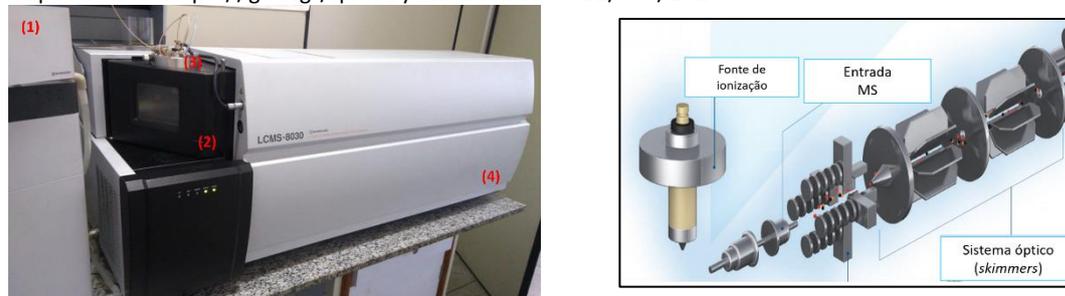
Assim, o presente trabalho tem como objetivo construir uma fonte de ionização *paper spray mass spectrometry* compatível com um equipamento LCMS8030 da fabricante japonesa Shimadzu para implementação da técnica PS-MS na rotina do laboratório da seção técnica de química e física do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais (ICPC-MG). A eficácia da fonte manufaturada foi demonstrada através da análise de amostras reais de cocaína apreendidas pela PC-MG.

2. MANUFATURA DA FONTE PS-MS

Para a construção de uma fonte de ionização *paper spray mass spectrometry* compatível com o equipamento disponível no laboratório da seção técnica de química e física do ICPC-MG foi feita, inicialmente, uma avaliação da máquina e seu funcionamento.

Fabricado pela japonesa Shimadzu, o equipamento LCMS8030 (Figura 28, à esquerda) é composto de um sistema HPLC com amostragem automática acoplado a um espectrômetro de massas com analisador triplo quadropolo (QQQ), de modo que a remoção da coluna cromatográfica possibilita experimentos de injeção direta automatizados.

Figura 28- À esquerda: Equipamento LCMS8030 disponível no laboratório do ICPC-MG. (1) Sistema HPLC; (2) Porta de fechamento hermético; (3) Fonte de ionização e (4) Espectrômetro de massas. À direita: Interface entre fonte de ionização e a entrada do espectrômetro de massas. FONTE: Adaptada de: <https://goo.gl/qSk68y> Acessado em 21/Jan/2019



As fontes de ionização disponíveis comercialmente para o modelo em questão são a *electrospray Ionization* (ESI) e *atmospheric pressure chemical Ionization* (APCI). Em ambos os casos, a ionização ocorre à pressão atmosférica e a fonte fica em posição perpendicular à entrada do espectrômetro de massas, isolada do ambiente por uma porta de fechamento hermético (Figura 28).

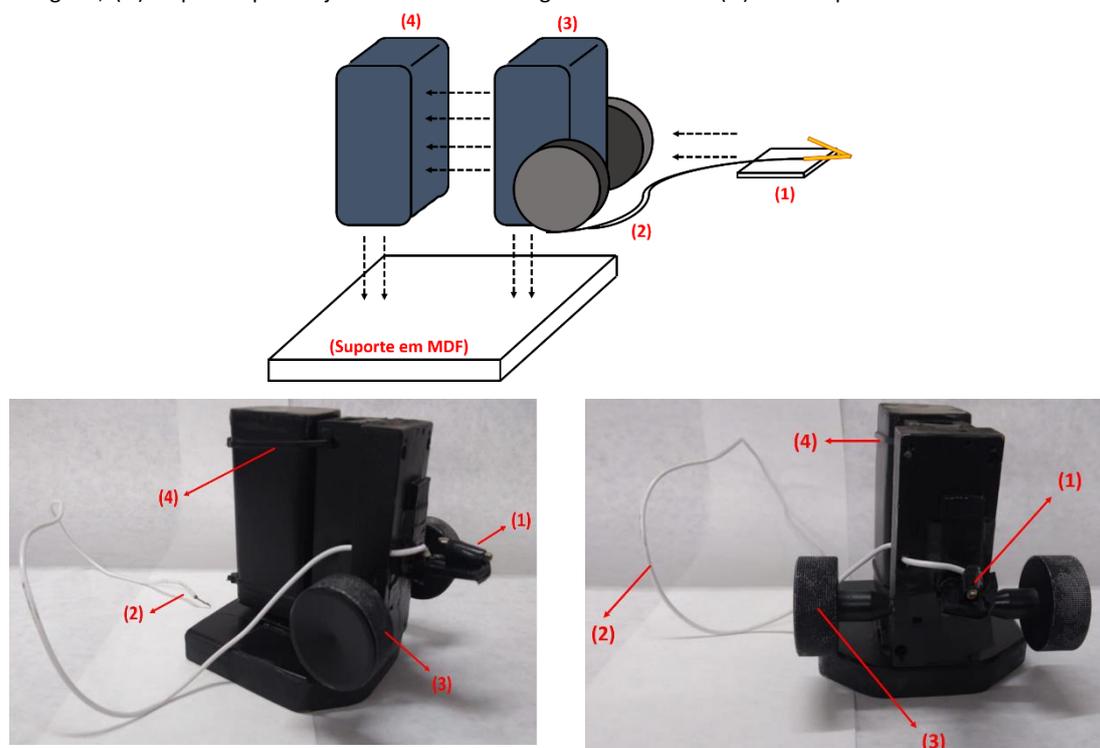
A comunicação com o sistema, assim como tratamento dos dados obtidos, é feita através do *software* LabSolutions que, apesar de muito eficiente, possui diversos mecanismos que defendem todo o sistema de análise contra eventualidades que podem comprometer a integridade dos componentes do equipamento, *e.g.* não é possível zerar o fluxo dos gases que

auxiliam a ionização e a abertura da porta de acesso à fonte aborta qualquer operação em andamento.

Como mencionado anteriormente, a ionização PS-MS acontece quando alta voltagem é aplicada a um substrato cortado em formato triangular alinhado com a entrada do espectrômetro de massas e umedecido com o solvente apropriado. Assim, para a construção de uma fonte operacional, necessita-se de um suporte capaz de promover o melhor alinhamento entre o papel e o MS e um componente que conecta a fonte de alta voltagem do equipamento ao papel.

A fonte de ionização PS-MS construída é mostrada na (Figura 29). Como o *layout* da máquina limita o espaço disponível para acessar a entrada do espectrômetro de massas, optou-se pela construção de um sistema compacto. A fonte é composta por uma plataforma móvel capaz de ajustar a posição do papel ao longo do eixo z (retirada de um aparelho de microscópio sucateado) e montada em um suporte em MDF que possui um contrapeso que estabiliza a plataforma. Um cabo flexível de cobre liga a fonte de alta tensão do MS ao clipe metálico (soldado utilizando ponta de solda de tungstênio) que segura o papel para que a ionização ocorra.

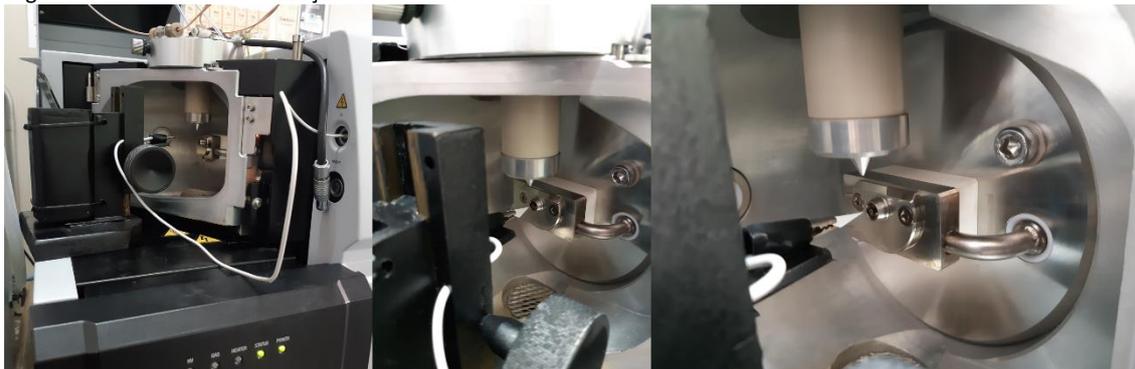
Figura 29- Fonte PS-MS construída. (1) clipe metálico; (2) Fio para conectar a fonte de alta voltagem; (3) suporte para ajustes finos ao longo do eixo z- e (4) contrapeso.



A Figura 30 mostra a fonte construída conectada ao equipamento. Para a realização de análises não é necessário retirar a fonte ESI (ou APCI) original, no entanto deve-se desconectar

a cânula responsável pelo fluxo de gás e o fio de alta tensão, uma vez que o fluxo pode ser minimizado, mas não zerado, e a alta tensão deve ser conectada ao fio da fonte PS-MS para que ela funcione corretamente. O posicionamento do papel e deposição de amostras e solventes é feito manualmente, como descrito nos capítulos anteriores.

Figura 30- Fonte de ionização PS-MS construída



Considerando que o *software* não reconhece a fonte PS-MS, alterações devem ser feitas em parâmetros-chave para que a análise seja feita corretamente. Assim, o método utilizado para a realização de análises *paper spray* foi criado com os parâmetros resumidos na Tabela 4. Parâmetros internos para o sistema de lentes e detecção foram otimizados utilizando os procedimentos de calibração indicados pelo fabricante de modo a maximizar a intensidade e qualidade dos sinais detectados. No momento da análise, com o papel já posicionado, inicia-se uma corrida (*'single run'*) alterando os dados de amostragem do auto amostrador de modo que ele não faça injeção; após a ativação da corrida (que inicia o processo analítico) é feita a deposição da amostra e/ ou solventes para que ocorram a ionização e detecção dos analitos.

Tabela 4- Parâmetros alterados para o método de análise PS-MS.

Parâmetro	Valor
Tempo de análise (min)	1
Fluxo da bomba de fase orgânica (mL/min)	0
Fluxo da bomba de fase aquosa (mL/min)	0
Temperatura da linha de dessorção (°C)	250
Temperatura do bloco de aquecimento (°C)	400
Fluxo do gás nebulizador N ₂ (L/min)	0,5
Fluxo do gás secante (L/min)	0

Finalmente, para verificar a performance da fonte construída, um conjunto de cinquenta amostras de cocaína foi analisado e os resultados obtidos foram comparados com os obtidos para o mesmo conjunto utilizando a fonte PS-MS implementada no laboratório do grupo de

pesquisa liderado pelo professor Doutor Rodinei Augusti, com eficácia já estabelecida na literatura.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Amostras

Para o estudo comparativo da performance das fontes de ionização PS-MS foram feitas análises de um conjunto de amostras de cocaína apreendidas em operações da Polícia Civil de Minas Gerais entre os meses de Outubro e Novembro de 2017.

Para todas as amostras, uma massa de aproximadamente 0,05 g foi solubilizada em 1 mL de metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA) em frascos de vidro tipo *vial* com capacidade de 2 mL; a solução resultante foi mantida refrigerada (0 °C) até o momento das análises. Como parte do procedimento interno do ICPC-MG, foram feitos exames preliminares das amostras, *i.e.* teste colorimétrico de Scott modificado e cromatografia em camada delgada (TLC).

3.2. Análises LCMS8030 Shimadzu

Todas as análises foram realizadas utilizando a fonte de ionização e espectrômetro de massas supracitados operando nos modos positivo (PS-(+)-MS) e negativo (PS-(-)-MS) de leitura de íons. Os perfis químicos (*fingerprints*) das amostras foram coletados em modo *full scan* dentro da faixa de m/z entre 100 e 1000 e a confirmação da identidade dos analitos foi feita através de experimentos MRM (monitoramento de reações múltiplas) acompanhando três transições para cada substância.

Para cada análise, foram utilizados triângulos de papel de filtro qualitativo com 15 mm de altura e 10 mm de base aos quais 10 µL de solução foram adicionados com auxílio de uma micropipeta com capacidade máxima de 100 µL (Finnpipette, Thermo Scientific). Para prevenir a ocorrência de efeitos de memória, as análises de amostras foram intercaladas com quantas análises 'brancas', *i.e.* papel sem amostra, fossem necessárias para extinguir o sinal analítico dos analitos da amostra anterior.

Além dos parâmetros alterados para o método de análise proposto, os parâmetros de voltagem aplicada (3,5 kV); voltagem do detector (2 kV) e pressão interna ($1,6 \times 10^{-3}$ Pa) foram otimizados e mantidos constantes. A distância da interface PS à entrada do MS foi ajustada manualmente para aproximadamente 5 mm e a aquisição e posterior leitura e tratamento dos dados obtidos foi feita com o *software* LabSolutions, versão 5.91 (Shimadzu, Japão, 2017).

3.3. Análises LCQ-FLEET Thermo Scientific

Neste caso, utilizou-se a fonte e equipamento especificados nos capítulos 2 e 3. As análises foram realizadas em modo *full scan* e positivo de leitura de íons na faixa de m/z entre 100 e 1000.

Em concordância com os experimentos realizados no ICPC-MG, foram utilizados triângulos de papel de filtro qualitativo com 15 mm de altura e 10 mm de base mantidos a 5 mm da entrada do espectrômetro de massas. Uma alíquota de 10 μL de solução foi adicionada ao papel com auxílio de uma micropipeta com capacidade máxima de 100 μL (Finnpipette, Thermo Scientific). Todo o sistema, *i.e.* a entrada do equipamento e o clipe metálico que entra em contato com o papel, foi limpo com toalhas de papel embebidas em metanol entre as análises, eliminando, assim, possíveis efeitos de memória e, para cada análise, utilizou-se um novo triângulo de papel.

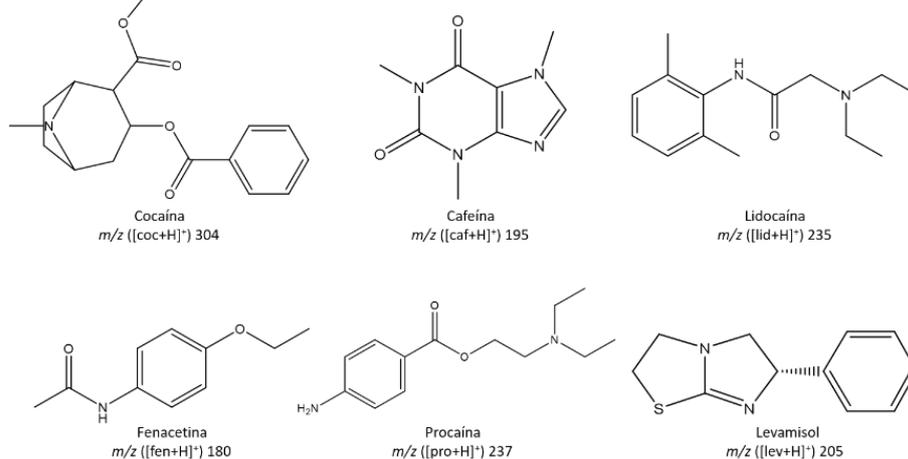
A confirmação da identidade dos analitos monitorados foi feita através dos perfis de fragmentação coletados para os íons selecionados com energias de colisão entre 15% e 28% (unidades arbitrárias do fabricante). Para evitar extinção do sinal analítico causado pelo esgotamento do *spray*, quando necessário, o sistema foi re-alimentado com 10 μL de solução.

Em todos os casos, os seguintes parâmetros instrumentais foram otimizados e mantidos constantes durante as análises: voltagem do *spray* (3 kV); voltagem do capilar (2 V); temperatura do capilar (275 °C) e voltagem das lentes (40 V); e a aquisição de dados foi feita através do armazenamento de 40 *scans*. A posterior leitura e tratamento dos dados obtidos foi feita com o software Xcalibur versão 4.1.31.9 (Thermo Scientific, EUA, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os resultados das análises preliminares (teste colorimétrico e TLC) realizadas pelos peritos, cinco analitos, além da cocaína, foram observados com frequência nas amostras (Figura 31). As cinco substâncias, *i.e.* cafeína, fenacetina, levamisol, lidocaína e procaína, são fármacos que simulam alguns efeitos provocados pela cocaína, como euforia e dormência localizada, de modo que o uso destes compostos como adulterantes da droga é comum e acontece para camuflar a diluição da cocaína.

Figura 31- Estrutura química dos possíveis analitos com as respectivas m/z das espécies protonadas.



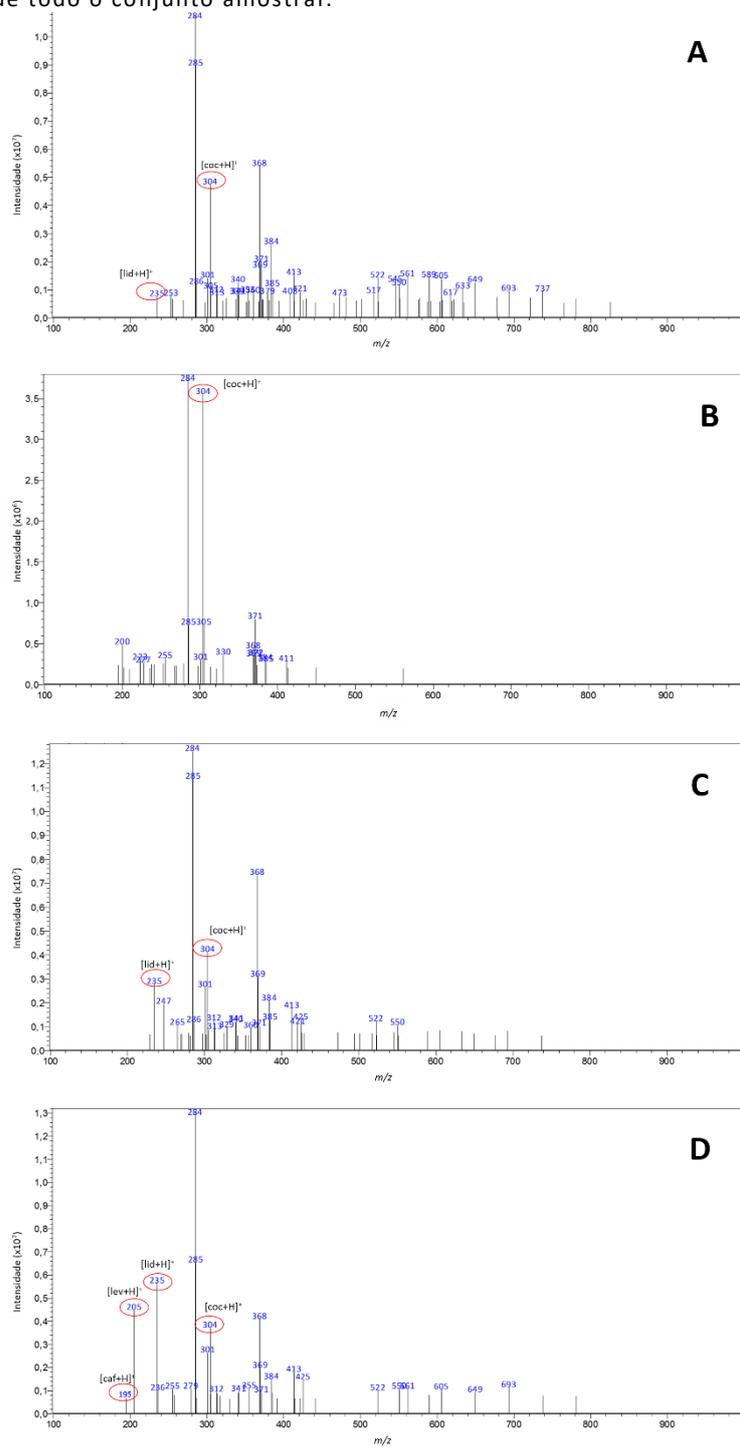
4.1. Análises LCMS8030 Shimadzu

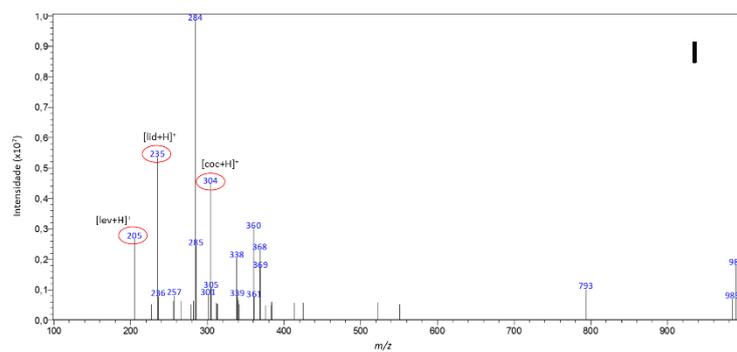
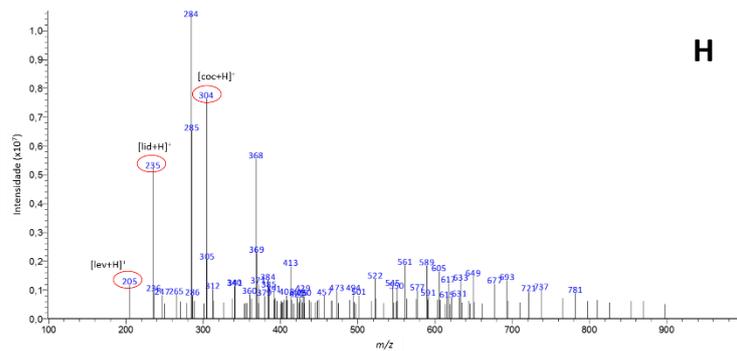
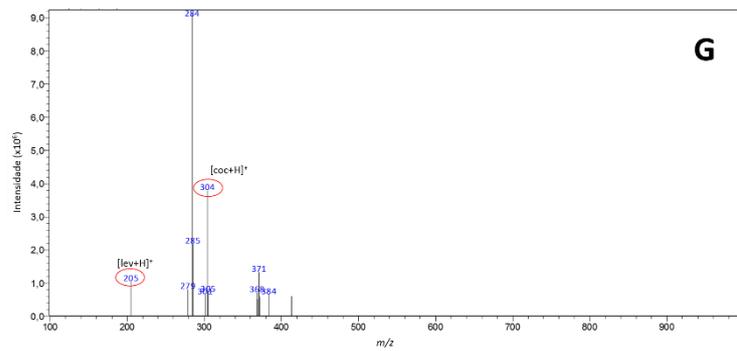
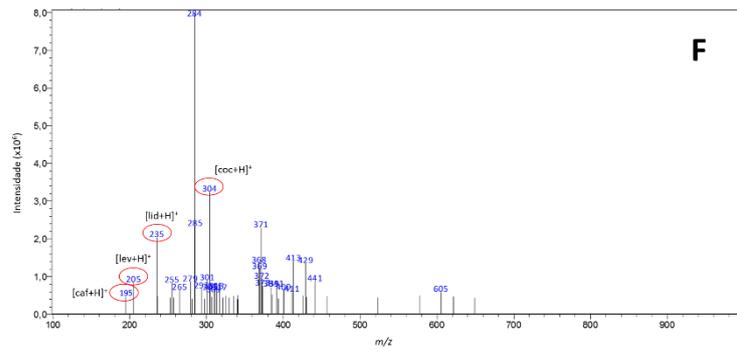
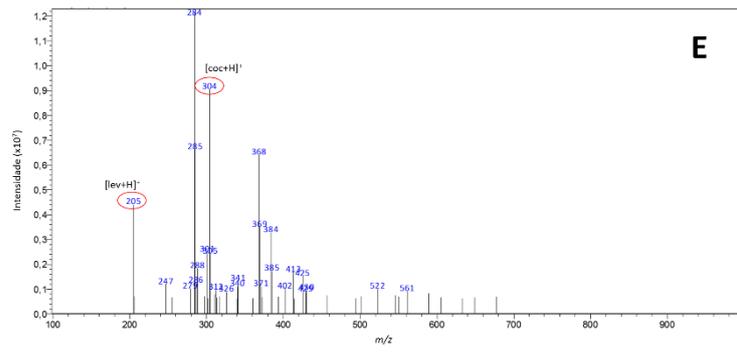
Devido às características do analisador de massas QQQ, o espectrômetro LCMS8030 possui maior sensibilidade quando comparado ao analisador *ion trap* do equipamento LCQ-FLEET. Assim, foi observada a necessidade de diluição das amostras solubilizadas. Para isso, 10 μ L da solução foram adicionados a um novo *vial* contendo 1,0 mL de metanol grau HPLC e as novas soluções foram analisadas.

Para todas as amostras, o modo positivo de leitura de íons forneceu espectros com sinais intensos e estáveis enquanto o modo negativo gerou dados ruidosos e pouco informativos. A diferença observada se deve à natureza dos analitos, que possuem sítios básicos em sua estrutura capazes de receber prótons durante o processo de ionização.

A Figura 32 mostra os espectros PS-(+)-MS de dez amostras, de forma representativa do conjunto amostral. Em todas as análises, foi possível observar o sinal correspondente à molécula protonada de cocaína (m/z 304) com intensidade significativa. Os sinais correspondentes aos adulterantes cafeína e levamisol — m/z 195 e 205, respectivamente — foram os mais frequentemente detectados. Em contrapartida, as substâncias fenacetina e procaina não foram detectadas com intensidade significativa — a pesar de menos frequentes, estes compostos foram identificados pelos testes de triagem.

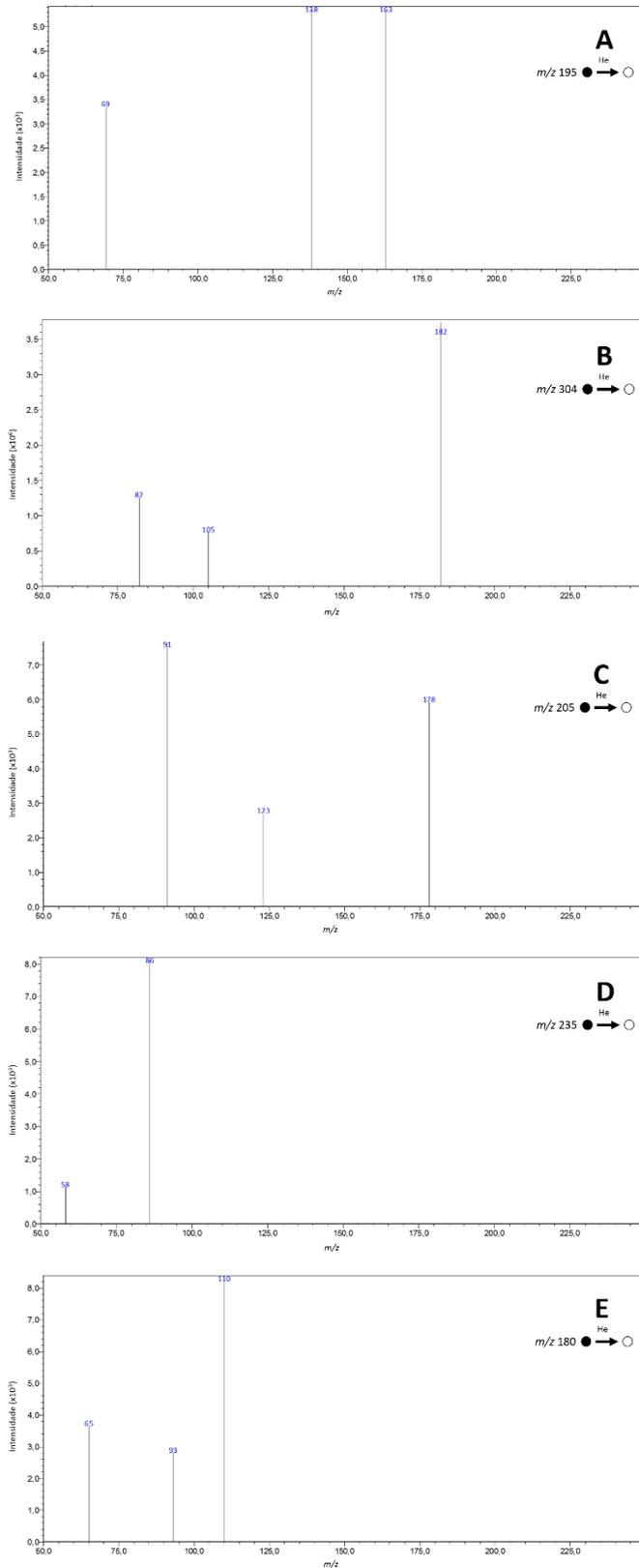
Figura 32-Espectros PS-(+)-MS gerado para 10 amostras de cocaína apreendidas, representativas de todo o conjunto amostral.





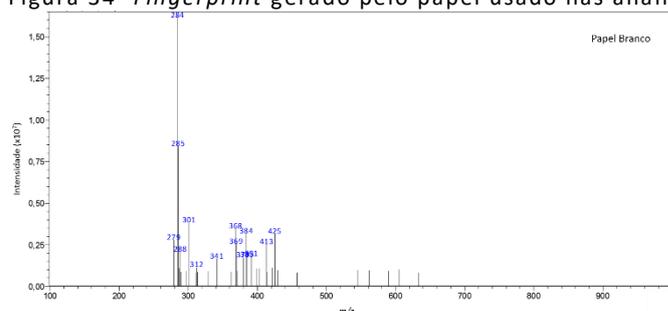
uma mesma amostra, evidencia que o sinal de cada íon acompanha a formação e extinção do *spray* como prova adicional de que os sinais pertencem, de fato, à amostra analisada.

Figura 33- Espectro de fragmentação para os íons de m/z (A) 195; (B) 304; (C) 205; (D) 235 e (E) 180, obtidos para as transições MRM monitoradas.



Um sinal muito intenso de m/z 284, observado em todas as amostras, não foi identificado, pois se mostrou resistente à fragmentação induzida por colisão. No entanto, análises do papel sem amostra ('branco') mostram que este íon é parte do perfil químico do substrato utilizado, sendo o pico base do espectro gerado por ele (Figura 34).

Figura 34- *Fingerprint* gerado pelo papel usado nas análises.

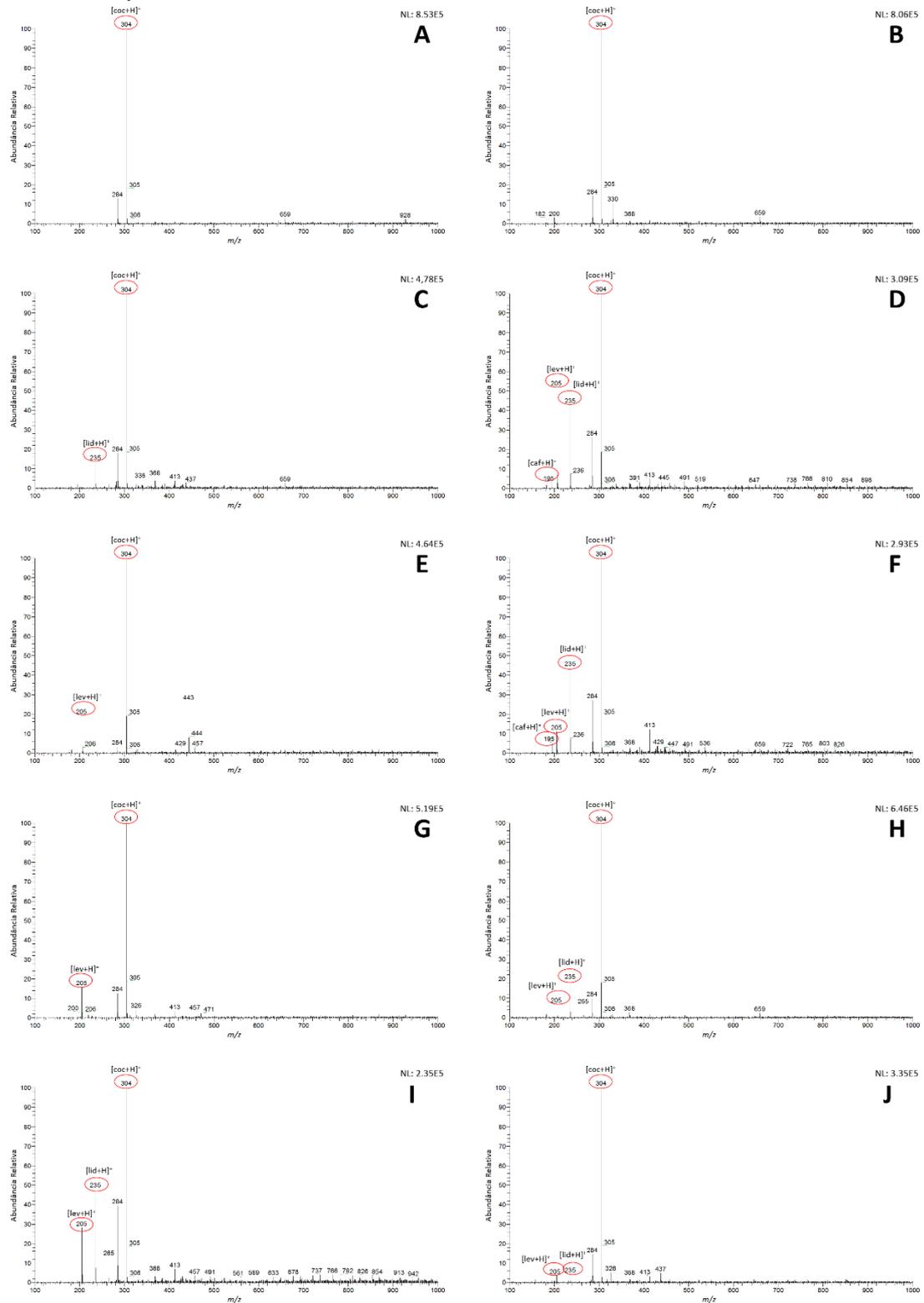


4.2. Análises LCQ-FLEET Thermo Scientific

Para as análises feitas utilizando o equipamento da Thermo Scientific, a intensidade dos sinais esperados para cada amostra utilizando a solução diluída foi muito pequena; optou-se, então, por utilizar as soluções concentradas das amostras.

A Figura 35 representa os espectros PS-(+)-MS para as mesmas amostras representadas no tópico anterior. A sensibilidade dos detectores presentes em cada espectrômetro de massas alterou qualitativamente o *fingerprint* apresentado por cada amostra. Conseqüentemente, em comparação aos resultados obtidos anteriormente, os espectros gerados possuem menos sinais e maior relação sinal/ ruído.

Figura 35- Espectros PS-(+)-MS gerado para 10 amostras de cocaína apreendidas, representativas de todo o conjunto amostral.

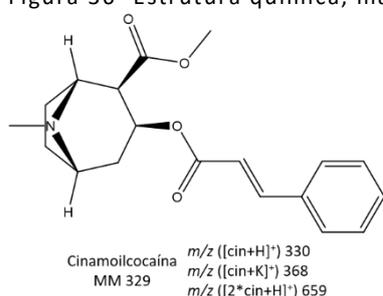


O sinal referente à molécula de cocaína protonada foi detectado com facilidade, sendo observado como pico base em todos os casos e suprimindo o sinal proveniente do papel (m/z 284). A facilidade da molécula de cocaína em se ionizar reduz a intensidade dos picos referentes

aos adulterantes cafeína, levamisol e lidocaína, entretanto, apenas em casos isolados esse efeito inviabilizou a detecção dos analitos.

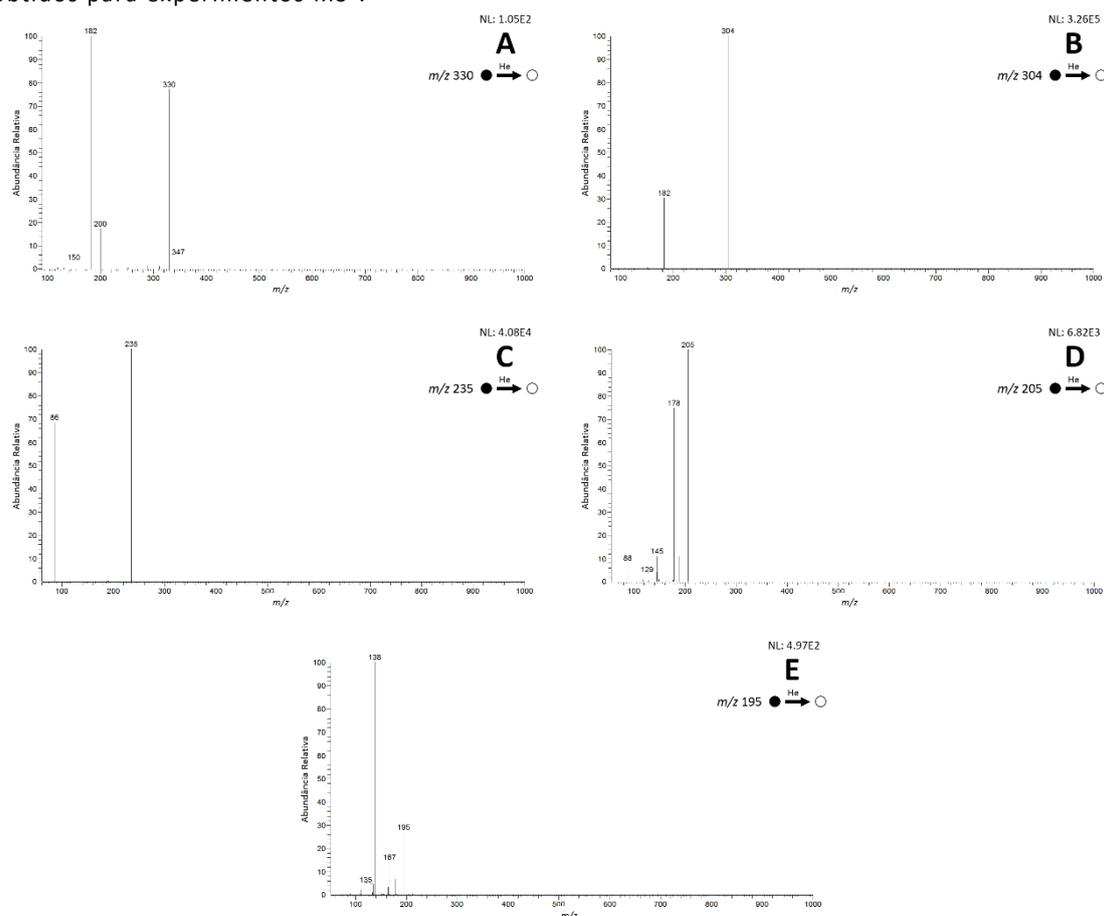
A maior relação sinal/ ruído possibilitou que outros sinais observados com frequência nos resultados obtidos pudessem ser identificados. Um sinal intenso de m/z 330 foi observado em praticamente todas as análises e tem comportamento compatível com a molécula de cinamoilcocaína — um metabólito natural das folhas de *coca*, extraída concomitantemente ao entorpecente (Figura 36).¹⁴² A presença deste composto é adicionalmente corroborada pelos sinais de m/z 368 e 659 (observados apenas em espectros que possuem o sinal em m/z 330) atribuídos ao aduto de potássio e dímero de próton da cinamoilcocaína, respectivamente.

Figura 36- Estrutura química, massa molar e valores de m/z para a cinamoilcocaína.



A identidade dos analitos foi verificada através de seus respectivos perfis de fragmentação (Figura 37). As diferenças observadas nestes espectros, quando comparados aos obtidos no laboratório do ICPC-MG, são consequência da diferença no processo analítico: Experimentos MRM detectam apenas íons-filho pré-selecionados após a fragmentação do íon-pai enquanto o perfil de fragmentação MS^2 detecta o sinal de todos os íons-filho gerados após a fragmentação do íon-pai.

Figura 37- Perfis de fragmentação para os íons de m/z (A) 195; (B) 304; (C)205; (D) 235 e (E)180 obtidos para experimentos MS².



5. CONCLUSÃO

No presente trabalho construiu-se uma fonte de ionização *paper spray mass spectrometry* compatível com um equipamento LCMS8030 da fabricante japonesa Shimadzu para implementação da técnica PS-MS na rotina do laboratório da seção técnica de química e física do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais (ICPC-MG).

A fonte construída é compacta e de fácil manipulação e o processo de adaptação para seu uso é simples, seguro, rápido e não oferece riscos à integridade física do equipamento. A fonte manufaturada se demonstrou capaz de gerar *sprays* estáveis e realizar a ionização de maneira eficiente.

O sistema construído foi utilizado com sucesso na identificação de cocaína e seus adulterantes, *i.e.* cafeína, fenacetina, levamisol e lidocaína, gerando espectros com sinais intensos, estáveis e com boa relação sinal/ ruído. Em análises de apenas um minuto, foi possível realizar a identificação (através do *fingerprint* obtido em modo *full scan*) e confirmação (através de transições MRM) da presença da droga nas amostras e os resultados obtidos foram

comparados com análises utilizando uma fonte PS-MS bem-estabelecida que comprovou o funcionamento adequado da adaptação realizada.

Quando comparados qualitativamente, os espectros gerados para as amostras de cocaína analisadas nos equipamentos LCQ-FLEET e LCMS8030 são equivalentes. As diferenças de intensidade, sensibilidade e relação sinal/ ruído observadas são esperadas, uma vez que, apesar de utilizarem ionização PS-MS, os dois conjuntos de experimentos foram realizados em espectrômetros de massas diferentes.

Assim, foi demonstrado que a implementação da técnica de ionização PS-MS na rotina de um laboratório forense como alternativa aos métodos tradicionalmente utilizados para a detecção de cocaína em amostras apreendidas é possível e vantajosa, uma vez que resultados de qualidade e sensibilidade satisfatórias são obtidos em análises rápidas e simples.

Capítulo 5

Considerações Finais

Neste trabalho, a técnica de ionização *paper spray mass spectrometry* foi utilizada, com sucesso, como ferramenta analítica em três situações de interesse forense, *i.e.* análises documentoscópicas, investigação de suplementos esportivos e detecção de cocaína. Em todos os casos, foram gerados espectros de qualidade (sinais intensos, estáveis, reprodutíveis e com boa relação sinal/ ruído) em análises simples, rápidas e pouco onerosas

Na investigação de suspeita de fraudes em suplementos esportivos BCAA e de ação termogênica, a técnica PS-MS foi utilizada para obtenção de *fingerprints* destes produtos eliminando a necessidade de etapas de preparo de amostras e separação cromatográfica. Para os amino ácidos de cadeia ramificada, os resultados obtidos confirmam a composição declarada pelos fabricantes nos rótulos de cada amostra. Em todos os termogênicos analisados a cafeína foi o composto presente com maior intensidade sendo, em muitos casos, o único analito presente. No entanto, em uma amostra foram detectados sinais correspondentes a anfetaminas e metanfetamina, um poderoso estimulante de uso e venda proscritos.

De maneira similar, a PS-MS foi empregada na identificação de falsificação de documentos escritos usando canetas apagáveis, de modo a oferecer respaldo químico a observações microscópicas. A adulteração é indubitavelmente identificada através da detecção de íons que diagnosticam a ocorrência da prática ilegal (m/z 172 e 343). Apesar de capaz de detectar a presença dos íons que diagnosticam a adulteração, a técnica EASI se mostrou menos sensível e mais demorada quando comparada com a PS-MS.

Imagens químicas explicitando a distribuição espacial de íons selecionados e sua intensidade foram geradas, evidenciando todas as etapas do processo de falsificação de maneira inquestionável e com sensibilidade adequada. Apesar de eficiente, esta metodologia tem alto custo associado: é mais lenta, trabalhosa e demanda conhecimento técnico avançado, características que dificultariam sua implementação na rotina de laboratórios forenses.

Por fim, a técnica PS-MS foi implementada no laboratório de análises química da Polícia Civil de Minas Gerais através da manufatura de uma fonte PS-MS para adaptação do equipamento de espectrometria de massas. A fonte construída é compacta e de fácil manipulação e o processo de adaptação para seu uso é simples, seguro, rápido e não oferece riscos à integridade física do equipamento.

Análises de amostras reais de cocaína apreendidas pela força policial foram realizadas utilizando a fonte produzida e uma fonte já bem-estabelecida e os resultados foram comparados de modo a demonstrar a eficácia da adaptação feita.

Assim, demonstra-se a elegibilidade da técnica PS-MS em análises forenses de investigação de fraudes e adulterações de produtos e documentos bem como na identificação de substâncias ilícitas em amostras de drogas como uma alternativa simples, rápida e econômica a análises utilizando técnicas tradicionais que envolvem pré tratamento das amostras e separação cromatográfica. Conclui-se, portanto, que dentre as técnicas de ionização empregadas, a *paper spray mass spectrometry* se destaca como uma real alternativa para ser implementada na prática de laboratórios de perícia forense.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

1. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. (John Wiley & Sons, 2005).
2. Wang, H., Liu, J., Cooks, R. G. & Ouyang, Z. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. *Angew. Chemie Int. Ed.* **49**, 877–880 (2010).
3. de Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. (Wiley, 2007).
4. Nier, A. O. Electron impact mass spectrometry. *Rev. Sci. Instrum.* **415**, (1947).
5. Munson, M. S. B. & Field, F. H. Chemical Ionization Mass Spectrometry: General Introduction. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2621–2630 (1966).
6. Pereira, H. V., Amador, V. S., Jurisch, M., Cristina, C. & Paula, A. De. in *Mass Spectrometry Techniques in Food and Environment* 187–220 (2019).
7. Vekey, K. & Chj, H.-C. I.-. Internal Energy Effects in Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 445–463 (1996).
8. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
9. Karas, M. & Bahr, U. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **10**, 335–357 (1991).
10. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. & Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. of Mass Spectrom. Ion Processes.* **78**, 53–68 (1987).
11. Takáts, Z., Wiseman, J. M. & Cooks, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J. Mass Spectrom.* **40**, 1261–1275 (2005).
12. Cody, R. B., Laramée, J. A. & Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **77**, 2297–2302 (2005).
13. Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S. & Whitehouse, C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (80-.).* **246**, 64–71 (1989).
14. Carroll, D. I., Dzidic, I., Stillwell, R. N., Haegele, K. D. & Horning, E. C. Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry: Corona Discharge Ion Source for Use in Liquid

- Chromatograph-Mass Spectrometer-Computer Analytical System. *Anal. Chem.* **47**, 2369–2373 (1975).
15. Robb, D. B., Covey, T. R. & Bruins, A. P. Atmospheric Pressure Photoionization : An Ionization Method for Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 3653–3659 (2000).
 16. Weston, D. J. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst* **135**, 661 (2010).
 17. Venter, A., Nefliu, M. & Graham Cooks, R. Ambient desorption ionization mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 284–290 (2008).
 18. Cooks, R. G. Ambient Mass Spectrometry. *Science (80-.)*. **311**, 1566–1570 (2006).
 19. Huang, M.-Z., Yuan, C.-H., Cheng, S.-C., Cho, Y.-T. & Shiea, J. Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **3**, 43–65 (2010).
 20. Huang, M., Cheng, S., Cho, Y. & Shiea, J. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **702**, 1–15 (2011).
 21. Ifa, D. R., Jackson, A. U., Paglia, G. & Cooks, R. G. Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1995–2008 (2009).
 22. Harris, G. a, Nyadong, L. & Fernandez, F. M. Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry. *Analyst* **133**, 1297 (2008).
 23. Klampfl, C. W. & Himmelsbach, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. *Anal. Chim. Acta* **890**, 44–59 (2015).
 24. Ma, X. & Ouyang, Z. Ambient ionization and miniature mass spectrometry system for chemical and biological analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **85**, 10–19 (2016).
 25. Ifa, D. R., Wiseman, J. M., Song, Q. & Cooks, R. G. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *Int. J. Mass Spectrom.* **259**, 8–15 (2007).
 26. Lebedev, A. T. Ambient ionization mass spectrometry. *Russ. Chem. Rev.* **84**, 665–692 (2015).
 27. Alberici, R. M. *et al.* Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. *Anal.*

- Bioanal. Chem.* **398**, 265–294 (2010).
28. Kerian, K. S., Jarmusch, A. K. & Cooks, R. G. Touch spray mass spectrometry for in situ analysis of complex samples. *Analyst* **139**, 2714–2720 (2014).
 29. Espy, R. D. *et al.* Paper Spray and Extraction Spray Mass Spectrometry for the Direct and Simultaneous Quantification of Eight Drugs of Abuse in Whole Blood. *Anal. Chem.* **86**, 7712–7718 (2014).
 30. Kauppila, T. J. *et al.* Desorption electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 387–392 (2006).
 31. Rodriguez-Cruz, S. E. Rapid analysis of controlled substances using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 53–60 (2006).
 32. Jurisch, M. & Augusti, R. Detection of signature forgery with erasable pens using paper spray mass spectrometry (PS-MS). *Anal. Methods* **8**, 4543–4546 (2016).
 33. de Paula, C., Jurisch, M., Piccin, E. & Augusti, R. Recognizing drug-facilitated crimes: Detection and quantification of benzodiazepines in beverages using fast liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and paper spray mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* **10**, 1348–1357 (2018).
 34. Su, Y. *et al.* Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse. *Analyst* **138**, 4443 (2013).
 35. Li, A., Wei, P., Hsu, H.-C. & Cooks, R. G. Direct analysis of 4-methylimidazole in foods using paper spray mass spectrometry. *Analyst* **138**, 4624 (2013).
 36. de Paula, C. C. A., Valadares, A., Jurisch, M., Piccin, E. & Augusti, R. Paper spray mass spectrometry applied in the monitoring of a chemical system in dynamic chemical equilibrium: the redox process of methylene blue. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **30**, 1176–1180 (2016).
 37. Haddad, R., Sparrapan, R., Kotiaho, T. & Eberlin, M. N. Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-Membrane Interface Mass Spectrometry for Direct Analysis of Solution Constituents. *Anal. Chem.* **80**, 898–903 (2008).
 38. Hiraoka, K., Nishidate, K., Mori, K., Asakawa, D. & Suzuki, S. Development of probe

- electrospray using a solid needle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3139–3144 (2007).
39. Jiang, J. *et al.* Droplet Spray Ionization from a Glass Microscope Slide : Real-Time Monitoring of Ethylene Polymerization. *Anal. Chem.* **87**, 8057–8062 (2015).
 40. Liu, J., Wang, H., Cooks, R. G. & Ouyang, Z. Leaf Spray: Direct Chemical Analysis of Plant Material and Living Plants by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **83**, 7608–7613 (2011).
 41. Hu, B., So, P., Chen, H. & Yao, Z. Electrospray Ionization Using Wooden Tips. *Anal. Chem.* **83**, 8201–8207 (2011).
 42. Dole, M. *et al.* Gas Phase Macroions. *Macromolecules* **1**, 96–97 (1968).
 43. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* **57**, 675–679 (1985).
 44. Taylo, G. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* **280**, 383–397 (1964).
 45. Rayleigh, Lord. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **14**, 184–186 (1882).
 46. Crotti, A. E. M., Vessecchi, R., Lopes, J. L. C. & Lopes, N. P. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY”: PROCESSOS QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE ÍONS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS DE BAIXO PESO MOLECULAR. *Quim. Nova* **29**, 287–292 (2006).
 47. Nemes, P., Marginean, I. & Vertes, A. Spraying Mode Effect on Droplet Formation and Ion Chemistry in Electrosprays. *Anal. Chem.* **79**, 3105–3116 (2007).
 48. Banerjee, S. & Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, 1–40 (2012).
 49. Fenn, J. B. Method and apparatus for electrospray ionization. (1998).
 50. Vega, C., Spence, C., Zhang, C., Bills, B. J. & Manicke, N. E. Ionization Suppression and Recovery in Direct Biofluid Analysis Using Paper Spray Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **27**, 726–734 (2016).
 51. Espy, R. D., Muliadi, A. R., Ouyang, Z. & Cooks, R. G. Spray mechanism in paper spray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.* **325–327**, 167–171 (2012).

52. Li, A., Wang, H., Ouyang, Z. & Cooks, R. G. Paper spray ionization of polar analytes using non-polar solvents. *Chem. Commun.* **47**, 2811 (2011).
53. Liu, J. *et al.* Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. *Anal. Chem.* **82**, 2463–2471 (2010).
54. Yang, Q. *et al.* Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **312**, 201–207 (2012).
55. Ren, Y. *et al.* Analysis of Biological Samples Using Paper Spray Mass Spectrometry: An Investigation of Impacts by the Substrates, Solvents and Elution Methods. *Chromatographia* **76**, 1339–1346 (2013).
56. Almeida de Paula, C. C., Lordeiro, R. A., Piccin, E. & Augusti, R. Paper spray mass spectrometry applied to the detection of cocaine in simulated samples. *Anal. Methods* **7**, 9145–9149 (2015).
57. Zhang, Z., Cooks, R. G. & Ouyang, Z. Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs. *Analyst* **137**, 2556 (2012).
58. Wang, H. *et al.* Direct Quantitative Analysis of Nicotine Alkaloids from Biofluid Samples using Paper Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 11540–11544 (2013).
59. Lee, H., Jhang, C., Liu, J. & Lin, C. Rapid screening and determination of designer drugs in saliva by a nib-assisted paper spray-mass spectrometry and separation technique. *J. Sep. Sci.* **35**, 2822–2825 (2012).
60. Liu, W., Mao, S., Wu, J. & Lin, J. Development and applications of paper-based electrospray ionization-mass spectrometry for monitoring of sequentially generated droplets. *Analyst* **138**, 2163–2170 (2013).
61. Shen, L., Zhang, J., Yang, Q., Manicke, N. E. & Ouyang, Z. High throughput paper spray mass spectrometry analysis. *Clin. Chim. Acta* **420**, 28–33 (2013).
62. Zheng, Y. *et al.* Facile preparation of paper substrates coated with different materials and their applications in paper spray mass spectrometry. *Anal. Methods* **7**, 5381–5386 (2015).
63. Liu, J. *et al.* New urea-modified paper substrate for enhanced analytical performance of negative ion mode paper spray mass spectrometry. *Talanta* **166**, 306–314 (2017).
64. Wang, Q. *et al.* A silica coated paper substrate: development and its application in paper spray mass spectrometry for rapid analysis of pesticides in milk. *Analyst* **140**, 8048–8056

- (2015).
65. Murray, I., Walker, G. & Bereman, M. S. Improving the analytical performance and versatility of paper spray mass spectrometry via paper microfluidics. *Analyst* **141**, 4065–4073 (2016).
 66. Martinez, A. W., Phillips, S. T. & Whitesides, G. M. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19606–19611 (2008).
 67. Zheng, Y. *et al.* Development and Application of Zirconia Coated Paper Substrate for High Sensitivity Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. *Anal. Chem.* **88**, 7005–7013 (2016).
 68. Damon, D. E. *et al.* Direct Biofluid Analysis Using Hydrophobic Paper Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **88**, 1878–1884 (2016).
 69. Narayanan, R., Sarkar, D., Cooks, R. G. & Pradeep, T. Molecular Ionization from Carbon Nanotube Paper. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 5936–5940 (2014).
 70. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J. & Whitesides, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 1318–1320 (2007).
 71. Colletes, T. C. *et al.* A new insert sample approach to paper spray mass spectrometry: a paper substrate with paraffin barriers. *Analyst* **141**, 1707–1713 (2016).
 72. Hu, B., Lai, Y.-H., So, P.-K., Chen, H. & Yao, Z.-P. Direct ionization of biological tissue for mass spectrometric analysis. *Analyst* **137**, 3613 (2012).
 73. Manicke, N. E., Abu-Rabie, P., Spooner, N., Ouyang, Z. & Cooks, R. G. Quantitative Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spot Samples by Paper Spray Mass Spectrometry: An Avenue to Therapeutic Drug Monitoring. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1501–1507 (2011).
 74. Priscila da Silva Ferreira, Débora Fernandes de Abreu e Silva, R. A. and E. P. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. *Analyst* **140**, 811–819 (2015).
 75. Amador, V. S., Pereira, H. V., Sena, M. M., Augusti, R. & Piccin, E. Paper Spray Mass Spectrometry for the Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1965–1976 (2017).

76. Teodoro, J. A. R. *et al.* Forensic discrimination between authentic and counterfeit perfumes using paper spray mass spectrometry and multivariate supervised classification. *Anal. Methods* **9**, 4979–4987 (2017).
77. Pereira, H. V., Amador, V. S., Sena, M. M., Augusti, R. & Piccin, E. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. *Anal. Chim. Acta* **940**, 104–112 (2016).
78. Deng, J. & Yang, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **785**, 82–90 (2013).
79. McKenna, J. *et al.* Detection of chemical warfare agent simulants and hydrolysis products in biological samples by paper spray mass spectrometry. *Analyst* **142**, 1442–1451 (2017).
80. Ma, Q. *et al.* Direct identification of prohibited substances in cosmetics and foodstuffs using ambient ionization on a miniature mass spectrometry system. *Anal. Chim. Acta* **912**, 65–73 (2016).
81. Meeusen, R. & Meirleir, K. De. Exercise and Brain Neurotransmission. *Sport. Med.* **20**, 160–188 (1995).
82. Maughan, R. J., King, D. S. & Lea, T. Dietary supplements. *J. Sports Sci.* **22**, 95–113 (2004).
83. Eichner, A. & Tygart, T. Adulterated dietary supplements threaten the health and sporting career of up-and-coming young athletes. *Drug Test. Anal.* **8**, 304–306 (2016).
84. Mercado de suplementos inova na oferta e deve crescer 8,5% em 2018. *Diário Comércio Indústria & Serviços* (2018).
85. Folha de, S. P. Mercado de suplementos nutricionais tem crescimento de 11% em 2017. (2017).
86. Molinero, O. & Márquez, S. Use of nutritional supplements in sports : risks , knowledge , and behavioural-related factors. *Nutr. Hosp.* **24**, 128–1344 (2009).
87. Juhn, M. S. Popular Sports Supplements and Ergogenic Aids. *Sport. Med.* **33**, 921–939 (2003).
88. Deldicque, L. & Francaux, M. Potential harmful effects of dietary supplements in sports medicine. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **19**, 439–445 (2016).

89. Smith-Bindman, R. Is Computed Tomography Safe? *N. Engl. J. Med.* **363**, 1–4 (2010).
90. Revista, E. Anvisa cria regras para suplementos alimentares. (2018).
91. Ayotte, C. *et al.* Sport Nutritional Supplements : Quality and Doping Controls. *Can. J. Appl. Physiol.* **26**, S120–S129 (2001).
92. Baume, N., Mahler, N., Kamber, M., Mangin, P. & Saugy, M. Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **16**, 41–48 (2006).
93. Van Poucke, C., Detavernier, C., Van Cauwenberghe, R. & Van Peteghem, C. Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **586**, 35–42 (2007).
94. Geyer, H. *et al.* Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *J. Mass Spectrom.* **43**, 892–902 (2008).
95. Neves, D. B. da J. & Caldas, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **105**, 194–202 (2017).
96. Walker, M. J., Naughton, D. P., Deshmukh, N. & Burns, D. T. A Review of Methods for the Simultaneous Detection of Illegal Ingredients in Food Supplements. *J. Assoc. Public Anal.* **44**, 51–66 (2016).
97. Cohen, P. A., Travis, J. C. & Venhuis, B. J. A methamphetamine analog (N,α -diethylphenylethylamine) identified in a mainstream dietary supplement. *Drug Test. Anal.* **6**, 805–807 (2014).
98. Kwiatkowska, D. *et al.* N,N-dimethyl-2-phenylpropan-1-amine - new designer agent found in athlete urine and nutritional supplement. *Drug Test. Anal.* **7**, 331–335 (2015).
99. Cohen, P. A., Travis, J. C. & Venhuis, B. J. A synthetic stimulant never tested in humans, 1,3-dimethylbutylamine (DMBA), is identified in multiple dietary supplements. *Drug Test. Anal.* **7**, 83–87 (2015).
100. Maughan, R. Contamination of dietary supplements and positive drug tests in sport. *J. Sports Sci.* **23**, 883–889 (2005).
101. Molins, R. Authenticity, Adulteration, and Counterfeits in Food, Drugs, and Dietary Supplements. *J. Regul. Sci.* **5**, 1–2 (2017).

102. Gurley, B., Gardner, S. & Hubbard, M. Content versus label claims in ephedra-containing dietary supplements. *Am. J. Heal. Pharm.* **57**, 963–969 (2000).
103. Kamber, M., Baume, N., Saugy, M. & Rivier, L. Nutritional Supplements As a Source for Positive Doping Cases ? *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Biochem.* **11**, 258–263 (2001).
104. Maughan, R. J., Depiesse, F. & Geyer, H. The use of dietary supplements by athletes. *J. Sports Sci.* **25**, S103–S113 (2007).
105. Carvalho, B. G. & Souza, E. B. de. Análise de Rótulos de BCAA comercializados no município de Volta Redonda/RJ. *Rev. Bras. Nutr. Esportiva* **9**, 25–29 (2015).
106. Paíga, P. *et al.* Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. *Eur. J. Pharm. Sci.* **99**, 219–227 (2017).
107. Rocha, T., Amaral, J. S. & Oliveira, M. B. P. P. Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs : A Review. *Compr. Rev. food Sci. food Saf.* **15**, 43–62 (2016).
108. Cho, S.-H. *et al.* Determination of anabolic–androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **111**, 138–146 (2015).
109. Schaneberg, B. T. & Khan, I. A. Quantitative and qualitative HPLC analysis of thermogenic weight loss products. *Pharmazie* **59**, 819–823 (2004).
110. Jun, G., Park, T.-M. & Cha, S. Fast and Simple Chemical Fingerprinting Analysis of Medicinal Herbs by Paper Cone Spray Ionization Mass Spectrometry (PCSI MS). *Bull. Korean Chem. Soc.* **37**, 1337–1343 (2016).
111. Hu, B. *et al.* Rapid detection of adulterated drugs in herbal dietary supplements by wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Methods* **8**, 6840–6846 (2016).
112. Nehlig, A., Daval, J. & Debry, G. Caffeine and the central nervous system : mechanisms of action , biochemical , metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res. Rev.* **17**, 139–170 (1992).
113. Haller, C. A., Jacob, P. & Benowitz, N. L. Pharmacology of ephedra alkaloids and caffeine after single-dose dietary supplement use*. *Clin. Pharmacol. Ther.* **71**, 421–432 (2002).
114. Negro, M., Giardina, S., Marzani, B. & Marzatico, F. Branched-chain amino acid supplementation does not enhance athletic performance but affects muscle recovery

- and the immune system. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **48**, 347–351 (2008).
115. Bassit, R. A. *et al.* Branched-Chain Amino Acid Supplementation and the Immune Response of Long-Distance Athletes. *Nutrition* **18**, 376–379 (2002).
 116. Ra, S. *et al.* Combined effect of branched-chain amino acids and taurine supplementation on delayed onset muscle soreness and muscle damage in high-intensity eccentric exercise. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **10**, 1–11 (2013).
 117. BASSIT, R. A., SAWADA, L. A., BACURAU, R. F. P., NAVARRO, F. & ROSA, L. F. B. P. C. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **32**, 1214–1219 (2000).
 118. Williams, M. Dietary Supplements and Sports Performance : Amino Acids. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2**, 63–67 (2005).
 119. Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Nagasaki, M. & Harris, R. A. Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise. *J. Nutr.* **134**, 1583S–1587S (2004).
 120. Piraud, M. *et al.* ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 1297–1311 (2003).
 121. Chen, Z., Chen, B. & Yao, S. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Anal. Chim. Acta* **569**, 169–175 (2006).
 122. Kim, H. J. *et al.* Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A* **31**, 777–783 (2014).
 123. Concheiro, M. *et al.* Fast LC-MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine. *Forensic Sci. Int.* **171**, 44–51 (2007).
 124. Lalli, P. M. *et al.* Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analyst* **135**, 745–750 (2010).
 125. Williams, M. R. *et al.* Analysis of black writing ink by electrospray ionization mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **191**, 97–103 (2009).

126. Brunelle, R. L. & Crawford, K. R. *Advances in the forensic analysis and dating of writing ink*. (Charles C. Thomas, 2003).
127. Kao, Y.-Y., Cheng, S.-C., Cheng, C.-N., Shiea, J. & Ho, H.-O. Detection of trace ink compounds in erased handwritings using electrospray-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **49**, 445–451 (2014).
128. Liu, Y.-Z. *et al.* Classification and dating of black gel pen ink by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1135**, 57–64 (2006).
129. Ifa, D. R., Gumaelius, L. M., Eberlin, L. S., Manicke, N. E. & Cooks, R. G. Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Analyst* **132**, 461 (2007).
130. The United Nations Office on Drugs and Crime, U. *World Drug Report 2018 - Booklet 1. United Nations publication* (2018).
131. The United Nations Office on Drugs and Crime, U. *World Drug Report 2018 - Booklet 4. United Nations publication* (2018).
132. The United Nations Office on Drugs and Crime, U. *World Drug Report 2018 - Booklet 3. United Nations publication* (2018). doi:978-92-1-060623-3
133. The United Nations Office on Drugs and Crime, U. *World Drug Report 2018 - Booklet 2. United Nations publication* (2018). doi:10.18356/bdc264f4-en
134. Schmitt, G. & Ribeiro, A. Brasil tem recorde nas apreensões de cocaína em 2018. *O Globo* (2018).
135. Sabino, B. D. *et al.* Analysis of Cocaine and Crack Cocaine via Thin Layer Chromatography Coupled to Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Am. J. Anal. Chem.* **02**, 658–664 (2011).
136. Philp, M. & Fu, S. A review of chemical ‘spot’ tests: A presumptive illicit drug identification technique. *Drug Test. Anal.* **10**, 95–108 (2018).
137. SWGDRUG. *Scientific working group for the analysis of seized drugs - Recommendations*. (2014).
138. Morelato, M., Beavis, A., Kirkbride, P. & Roux, C. Forensic applications of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS). *Forensic Sci. Int.* **226**, 10–21 (2013).

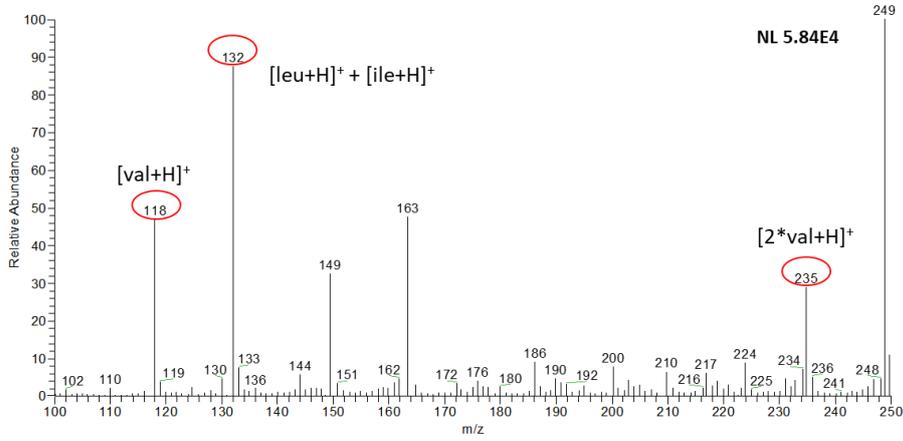
139. Green, F. M., Salter, T. L., Stokes, P., Gilmore, I. S. & O'Connor, G. Ambient mass spectrometry: advances and applications in forensics. *Surf. Interface Anal.* **42**, 347–357 (2010).
140. McKenna, J., Jett, R., Shanks, K. & Manicke, N. E. Toxicological Drug Screening using Paper Spray High-Resolution Tandem Mass Spectrometry (HR-MS/MS). *J. Anal. Toxicol.* **42**, 300–310 (2018).
141. Tavares, L. S., Carvalho, T. C., Romão, W., Vaz, B. G. & Chaves, A. R. Paper Spray Tandem Mass Spectrometry Based on Molecularly Imprinted Polymer Substrate for Cocaine Analysis in Oral Fluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **29**, 566–572 (2018).
142. Kondrat, R. W., McClusky, G. A. & Cooks, R. G. Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. *Anal. Chem.* **50**, 2017–2021 (1978).

Capítulo 7

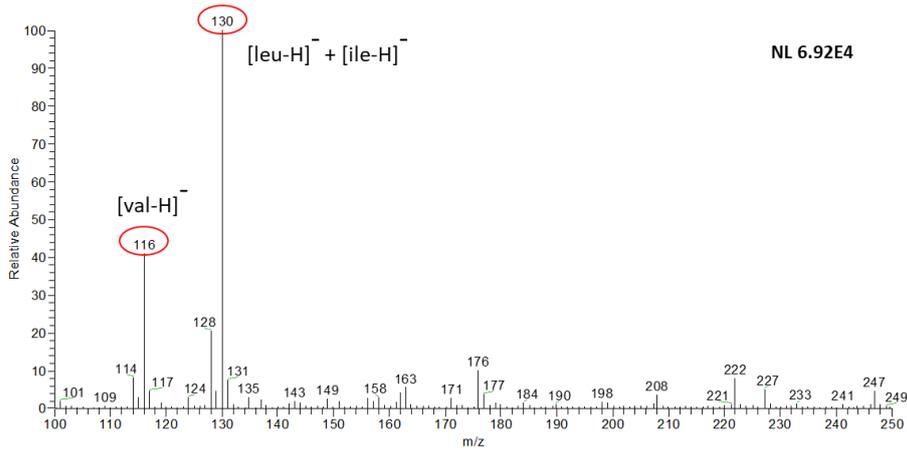
Apêndices

Figura 12- Espectro de massas adquirido para os suplementos de amino ácidos de cadeia ramificada. Para cada amostra de BCAA, indicada no canto superior esquerdo, mostra-se os espectros: (a) PS-(+)-MS e (b) PS-(-)-MS.

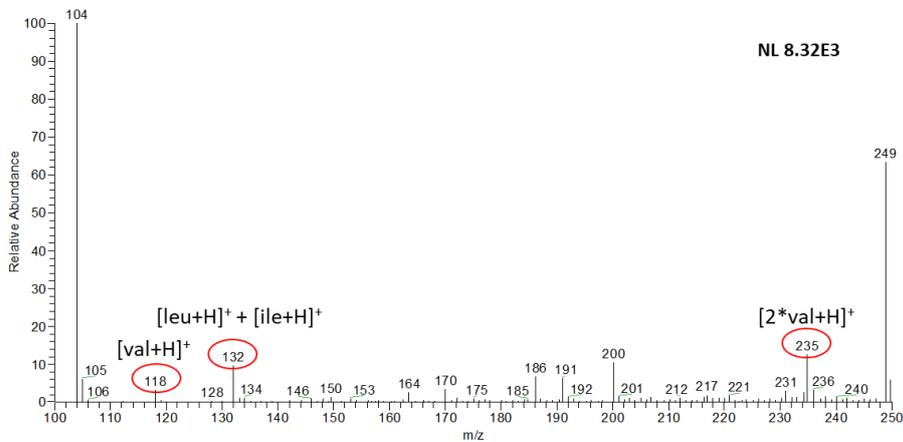
BCAA1 – PS-(+)-MS



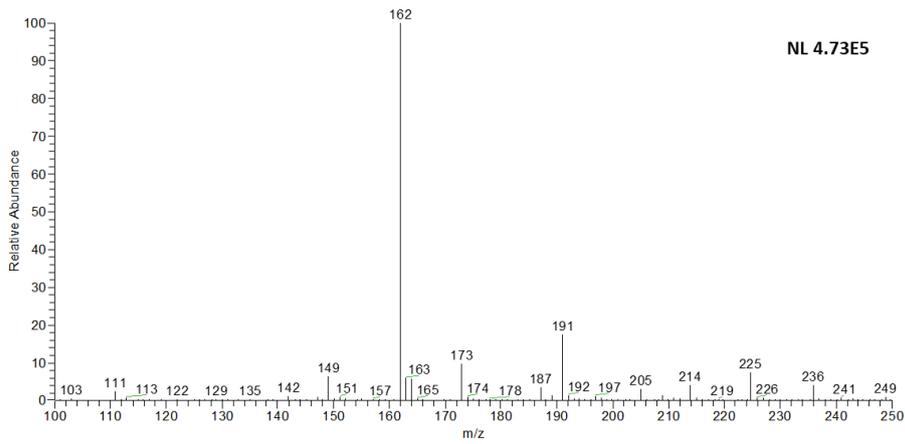
BCAA1 – PS-(-)-MS



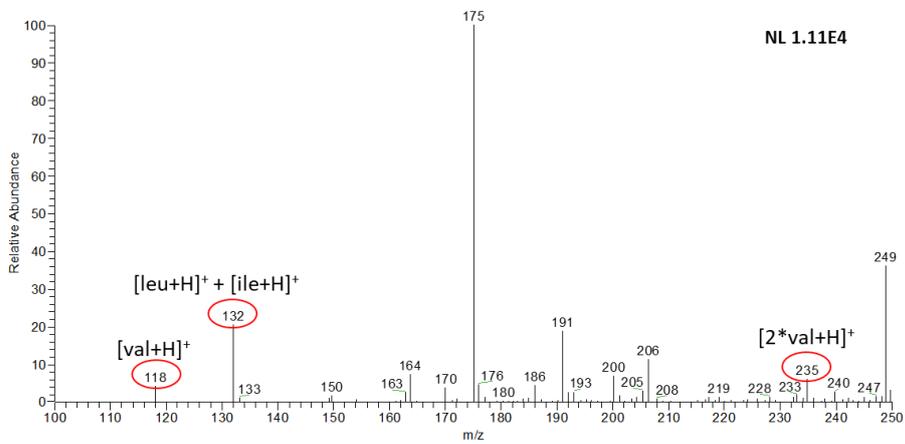
BCAA2 – PS-(+)-MS



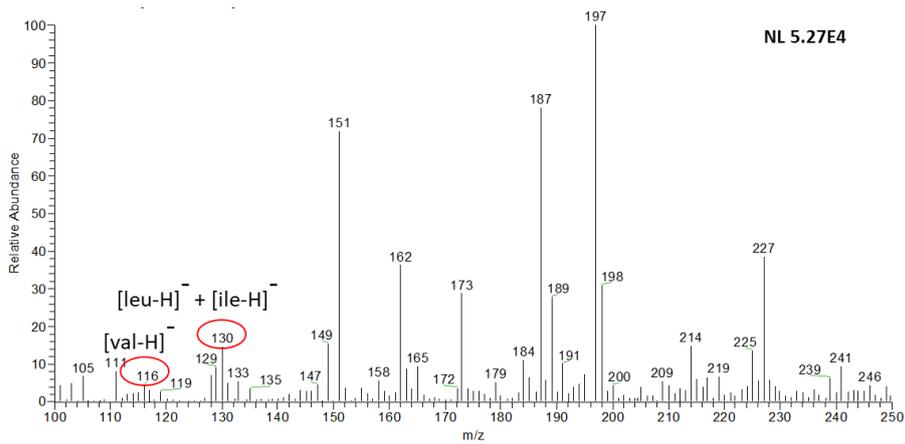
BCAA2 – PS-(-)-MS



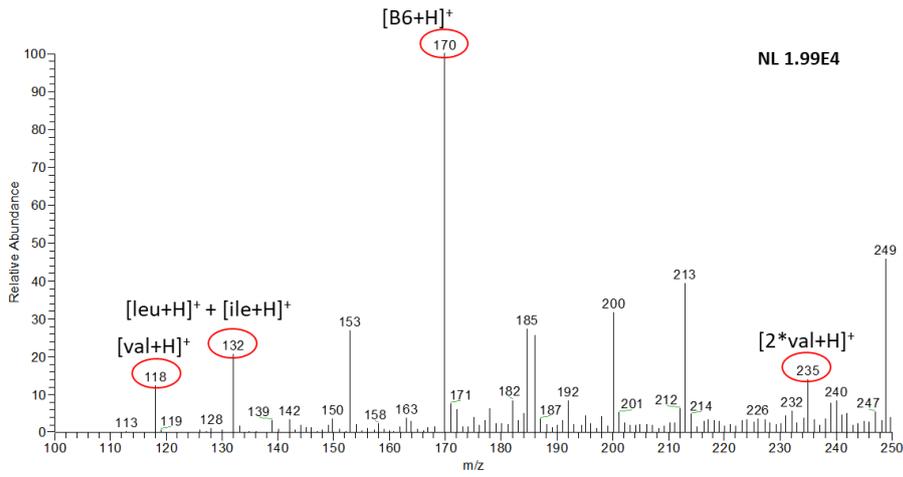
BCAA3 – PS-(+)-MS



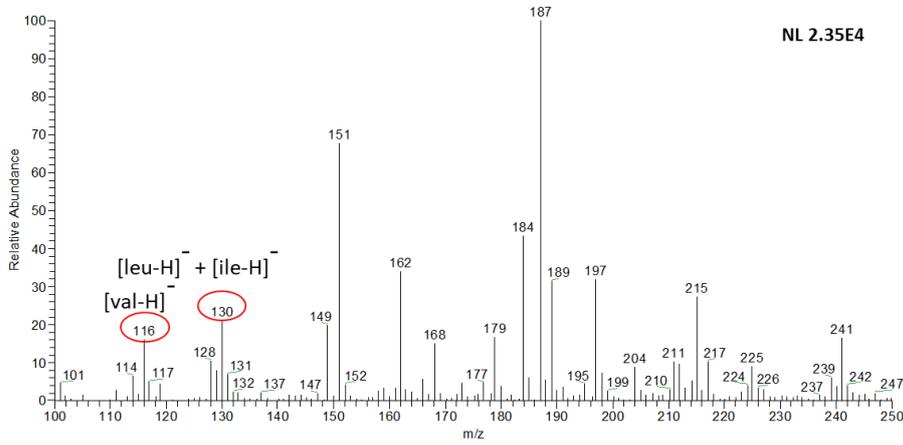
BCAA3 – PS-(-)-MS



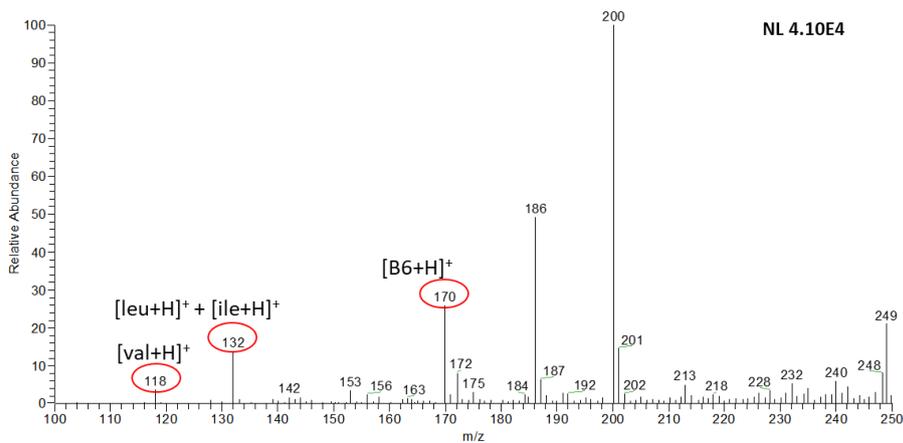
BCAA4 – PS-(+)-MS



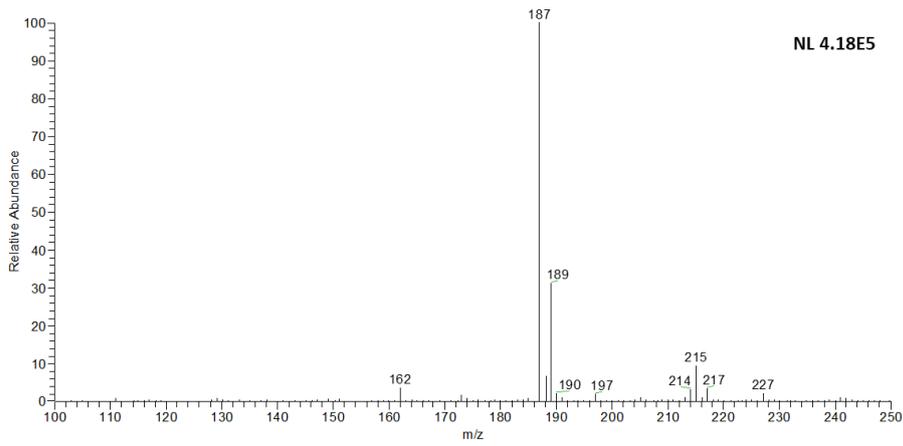
BCAA4 – PS-(-)-MS



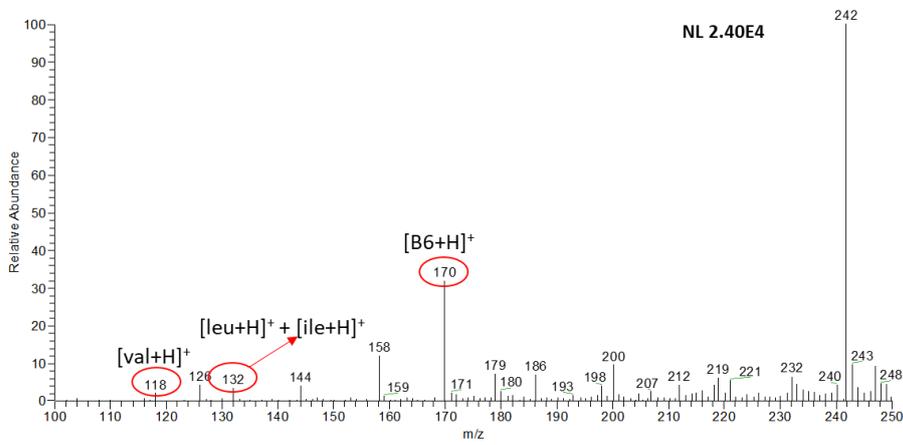
BCAA5 – PS-(+)-MS



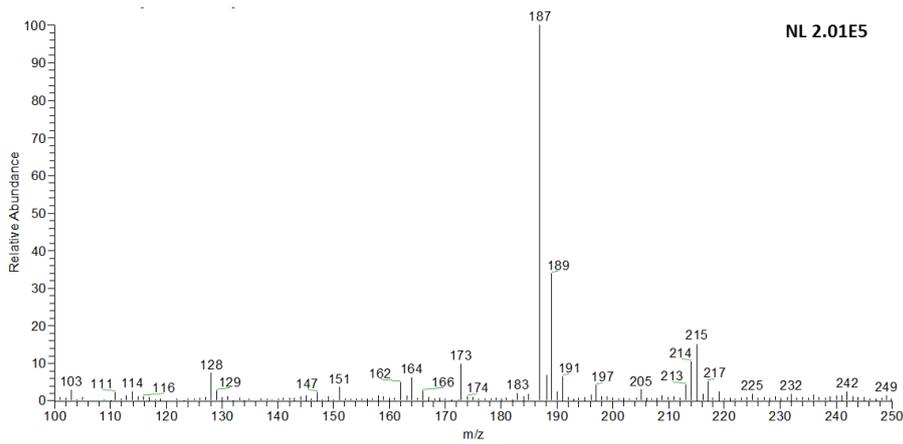
BCAA5 – PS-(-)-MS



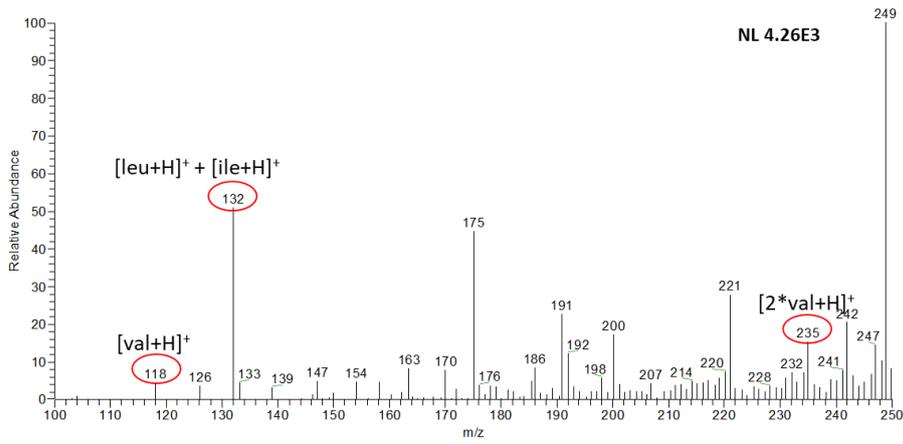
BCAA6 – PS-(+)-MS



BCAA6 – PS-(-)-MS



BCAA7 – PS-(+)-MS



BCAA7 – PS-(-)-MS

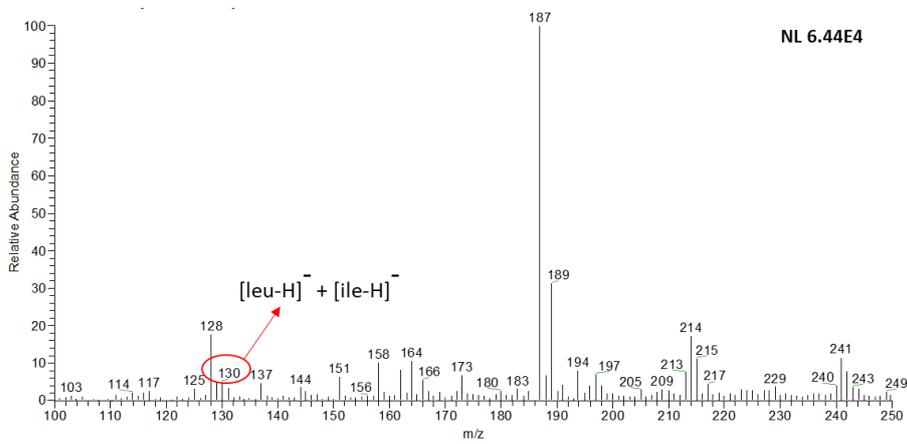
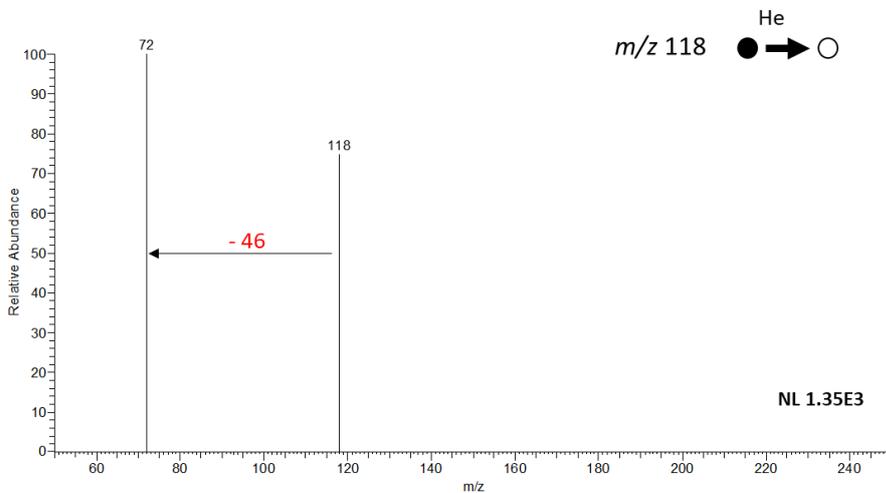


Figura 13- Espectros de fragmentação obtido para confirmar a identificação dos analitos valina ([val+H]⁺ m/z 118); leucina e isoleucina ([leu+H]⁺ e [ile+H]⁺ m/z 132); vitamina B6 ([B6+H]⁺ m/z 170) e o íon de m/z 249.



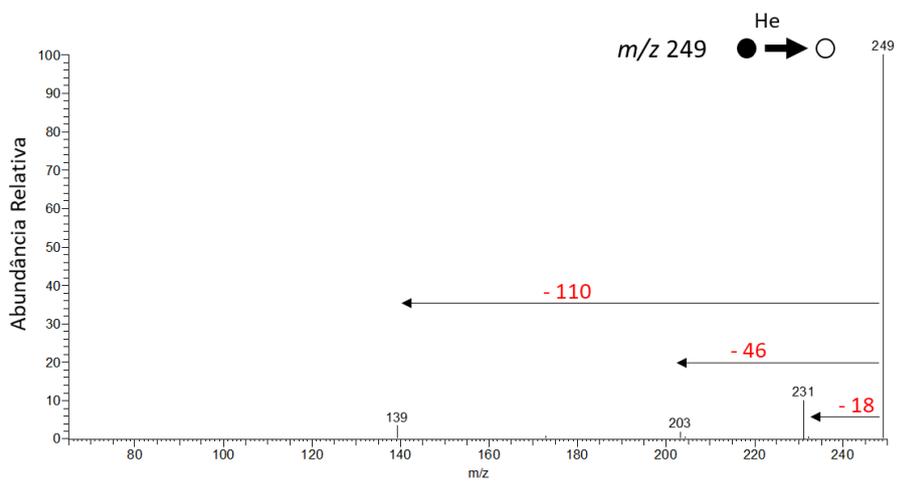
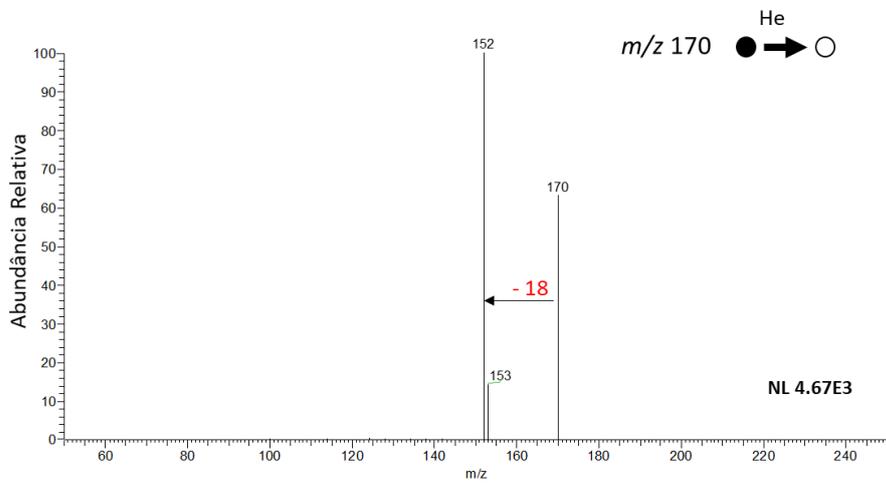
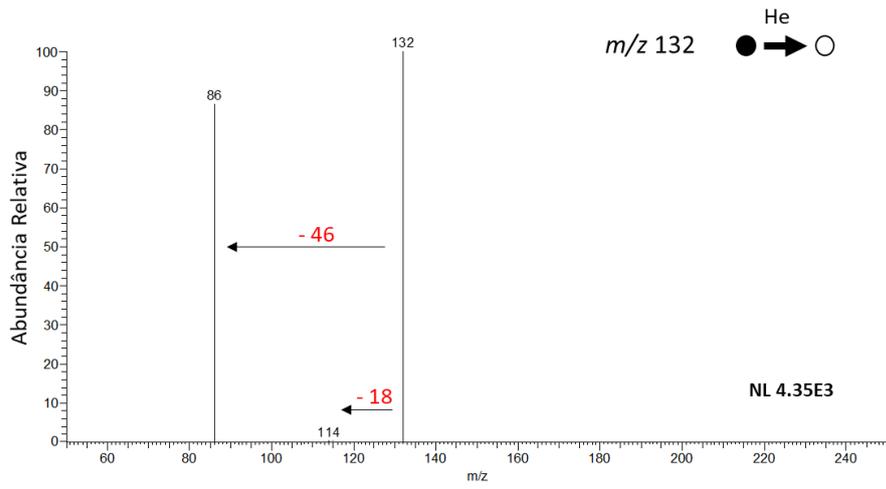
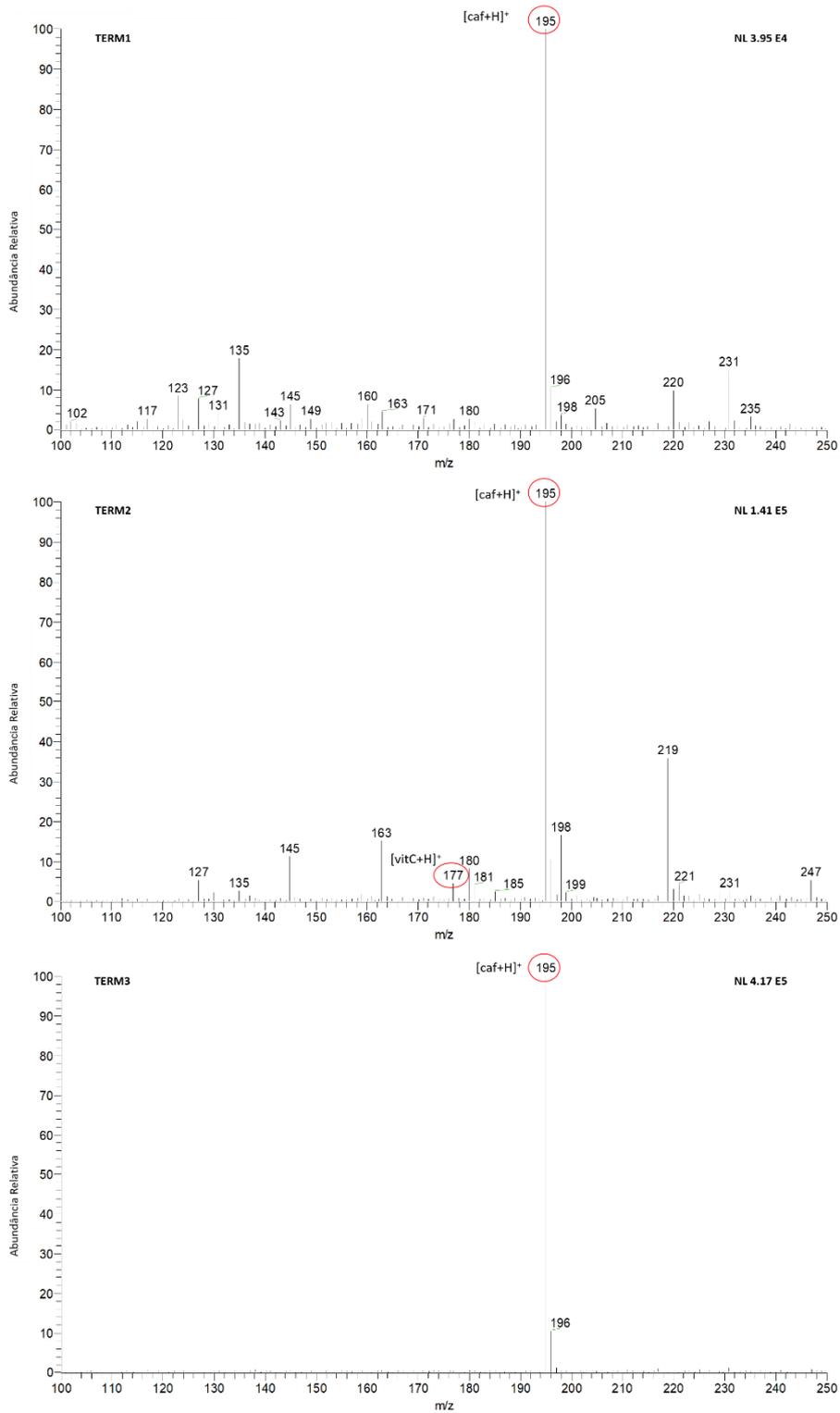
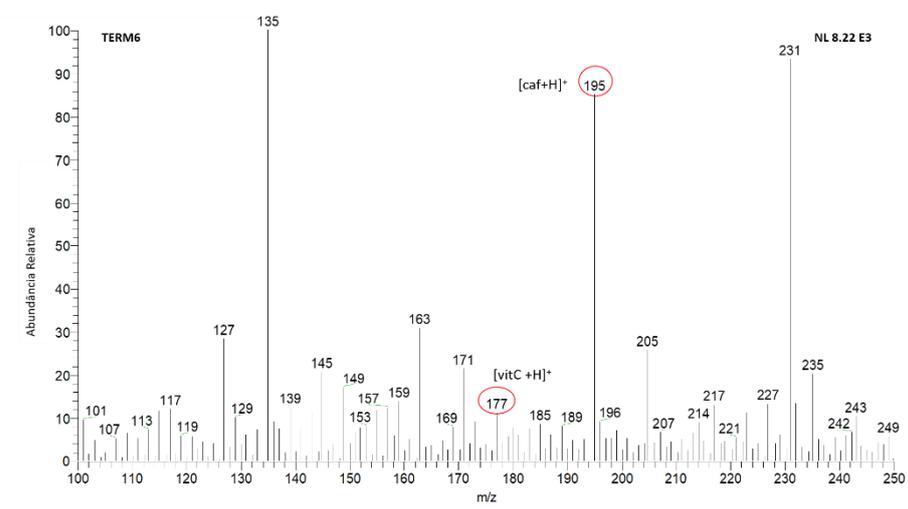
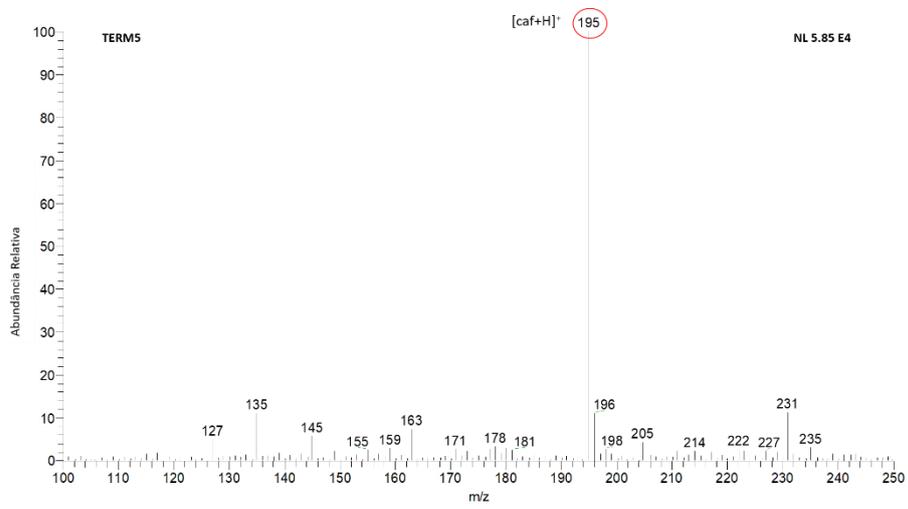
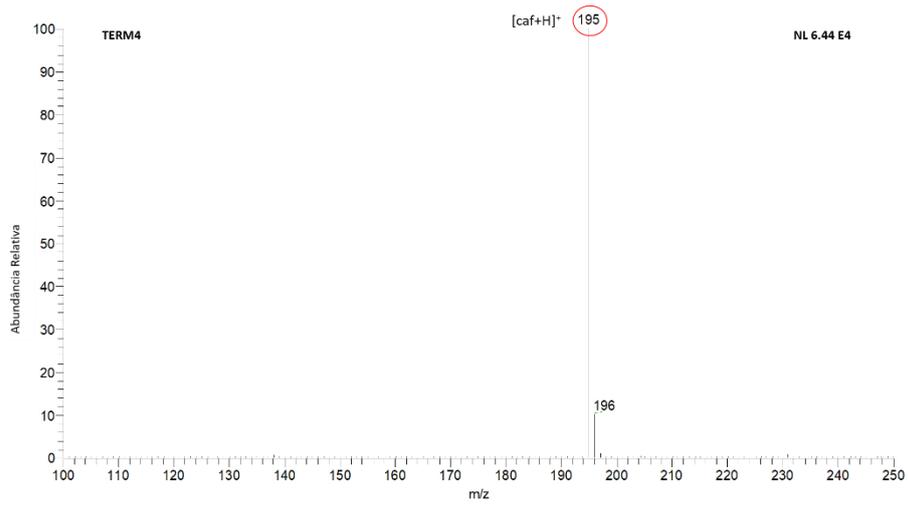


Figura 14- Espectros PS-(+)-MS obtidos para os 9 suplementos esportivos de ação termogênica, nomeados de TERM1 a TERM9 (canto superior esquerdo).





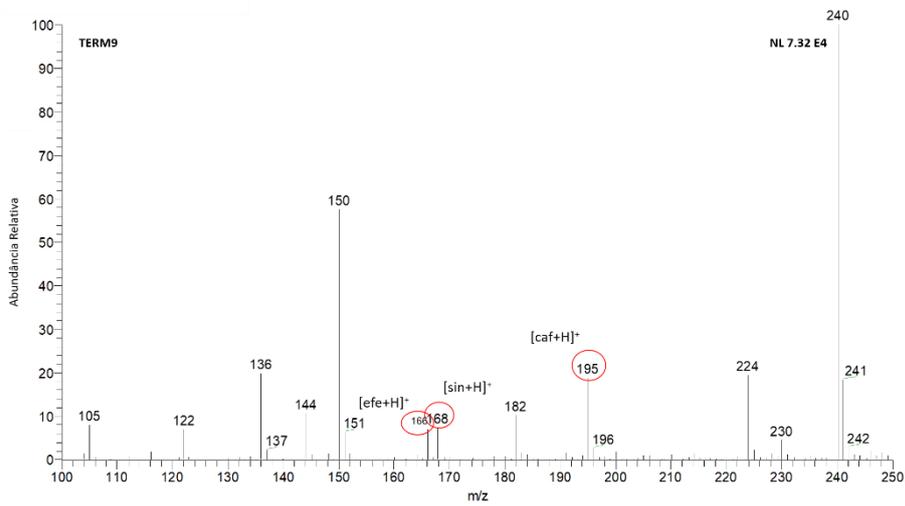
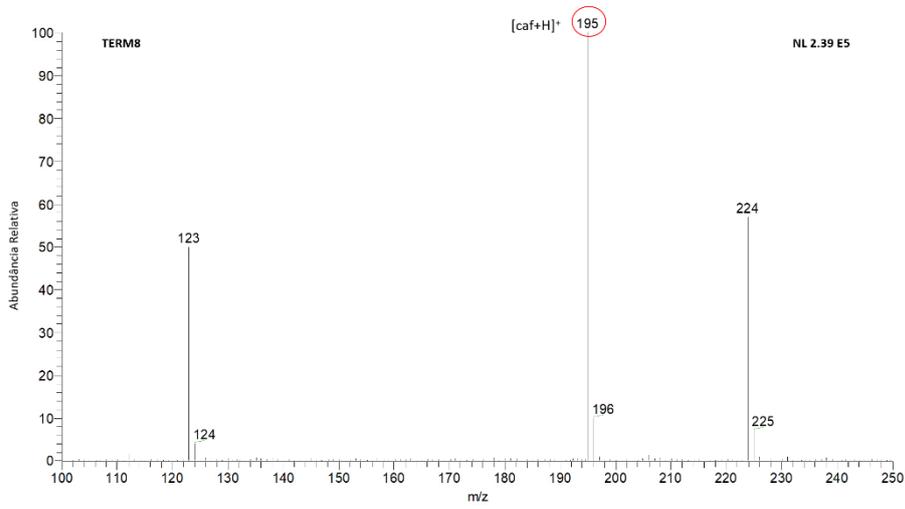
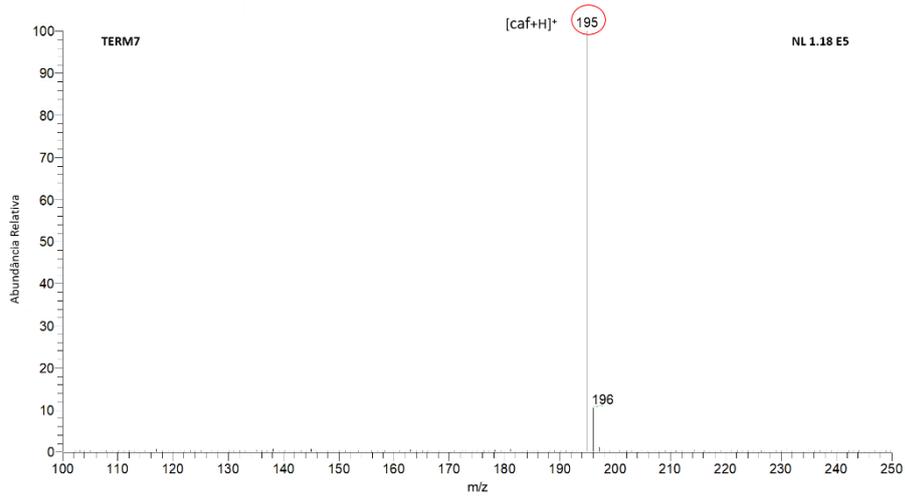


Figura 15- Perfil de fragmentação para o íon de m/z 195.

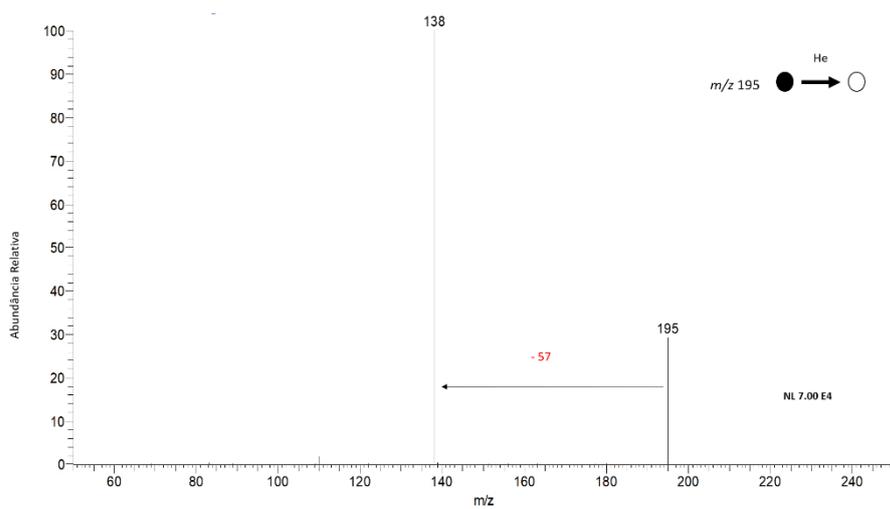
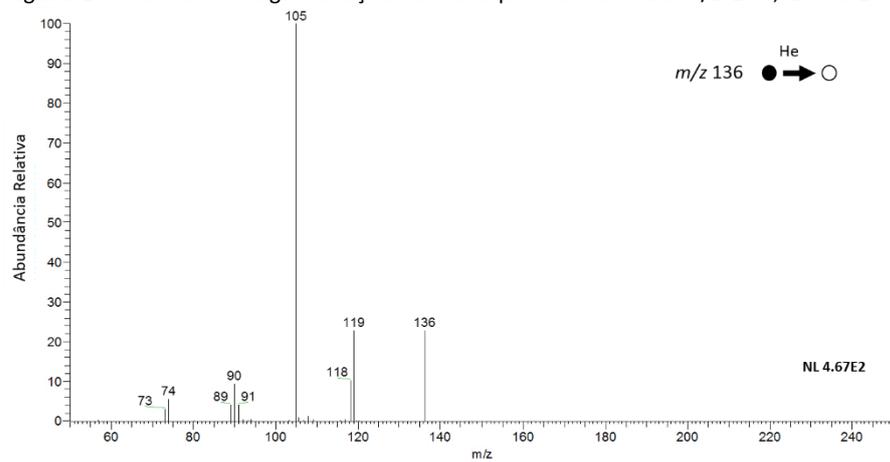


Figura 16- Perfis de fragmentação obtidos para os íons de m/z 136, 150 e 166, conforme indicado.



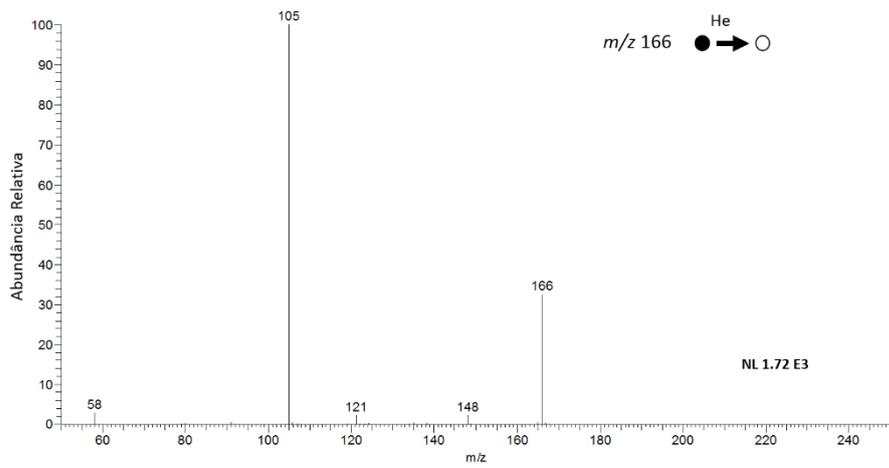
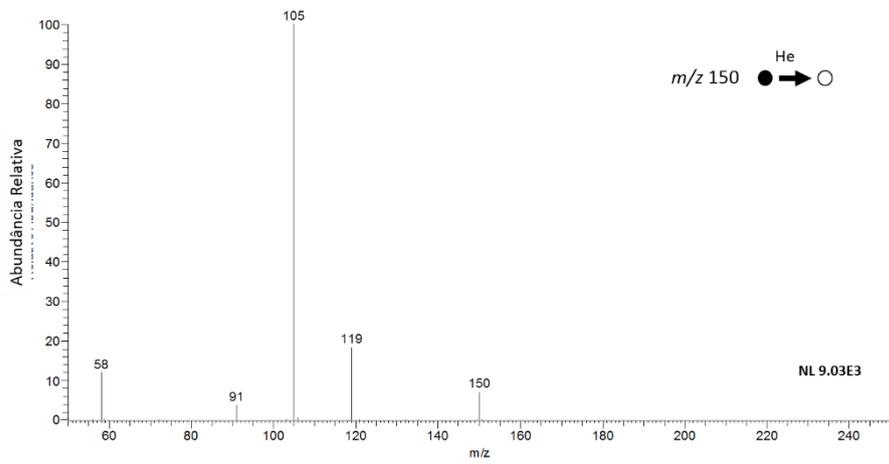


Figura 22- Fingerprints obtidos para as canetas (A) branco apagador; (B) azul apagável e (C) azul não apagável.

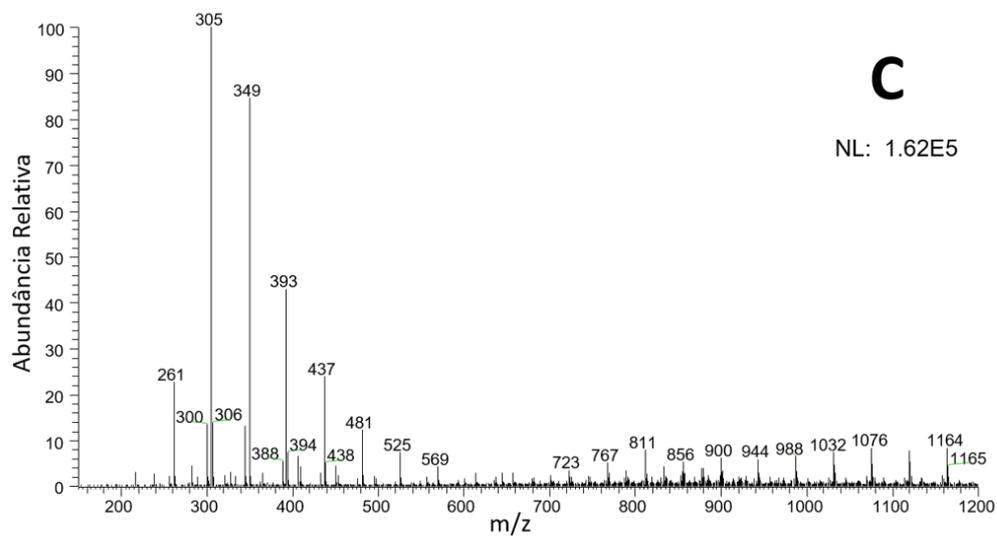
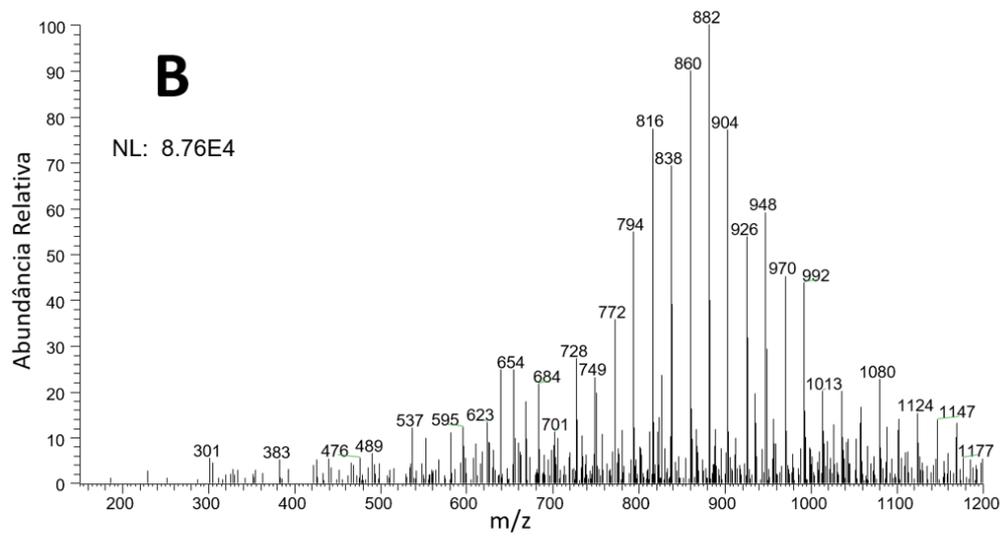
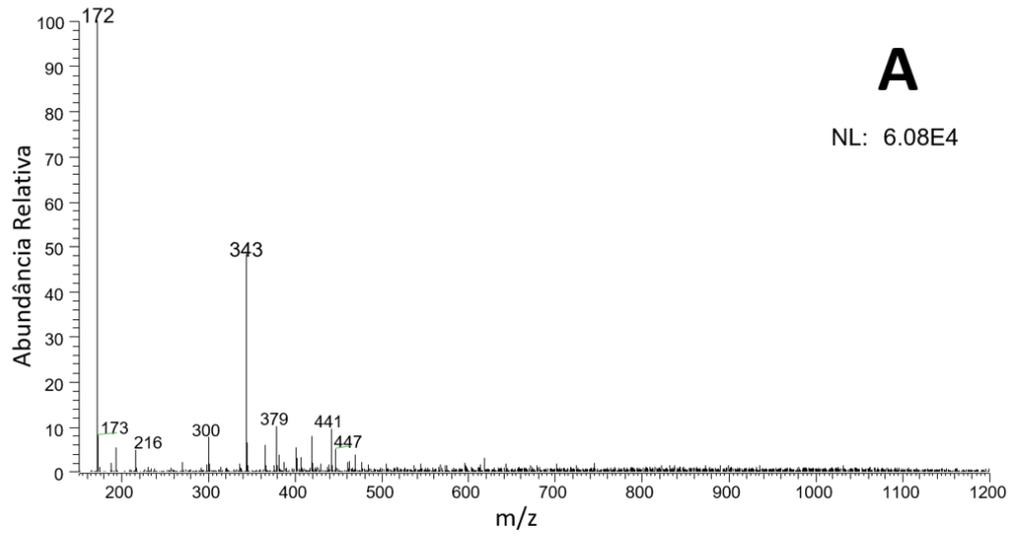


Figura 23- Espectros PS-(+)-MS para as regiões (A) da assinatura apagada e (B) da assinatura falsificada.

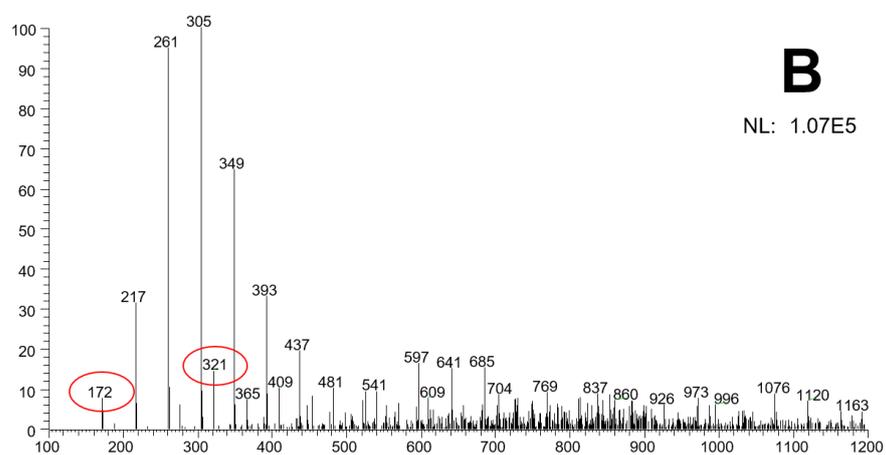
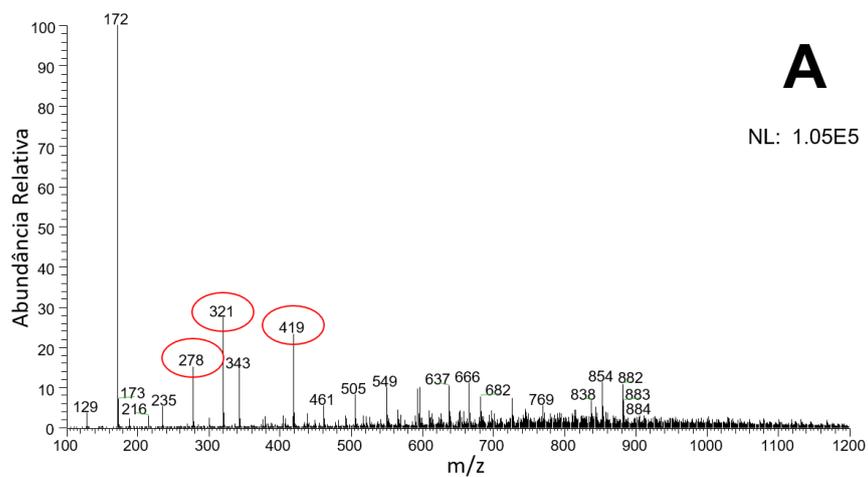
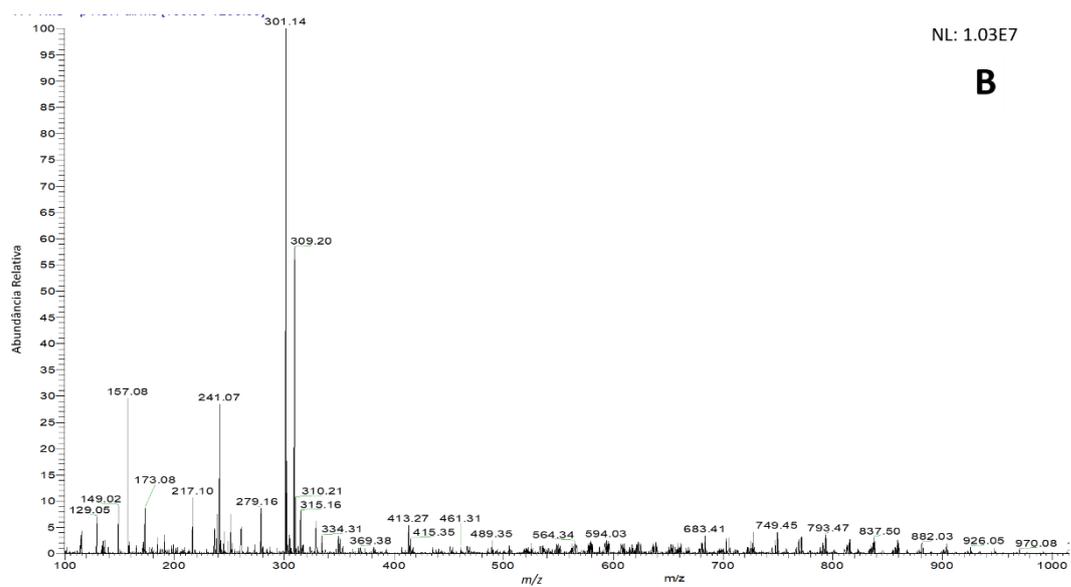
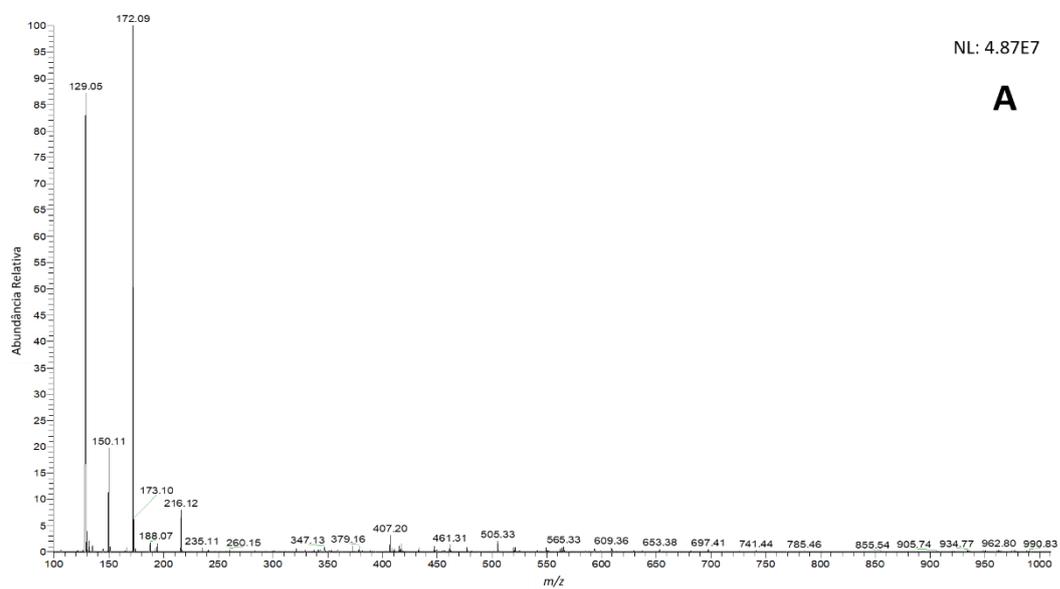


Figura 24- Espectros EASI-(+)-MS obtidos para (A) caneta branco apagador; (B) caneta azul apagável e (C) caneta azul não apagável.



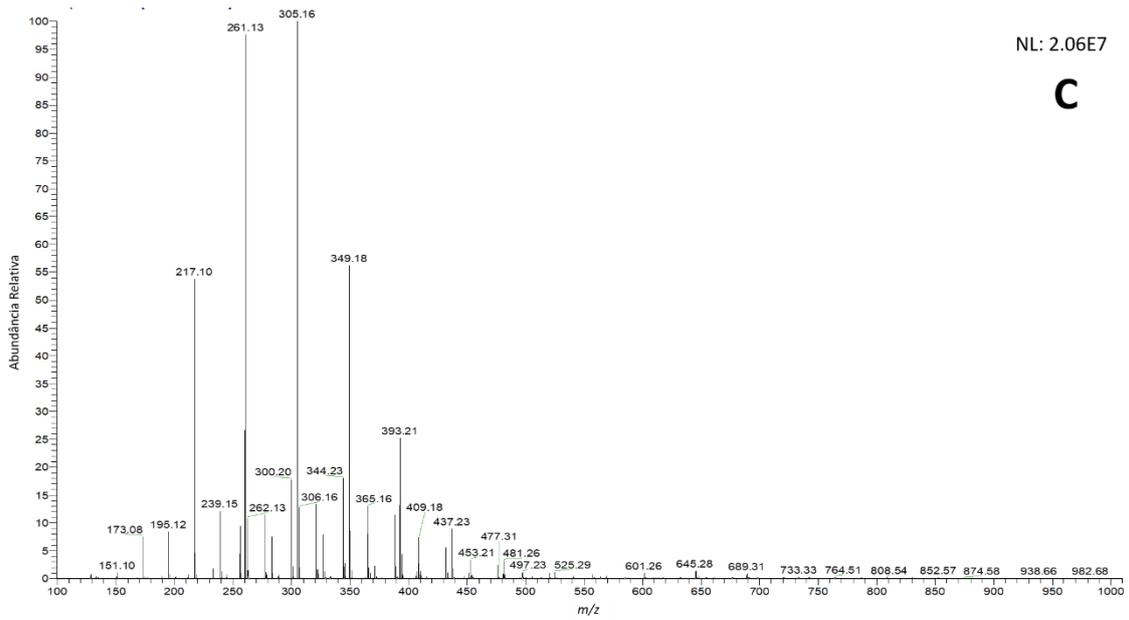
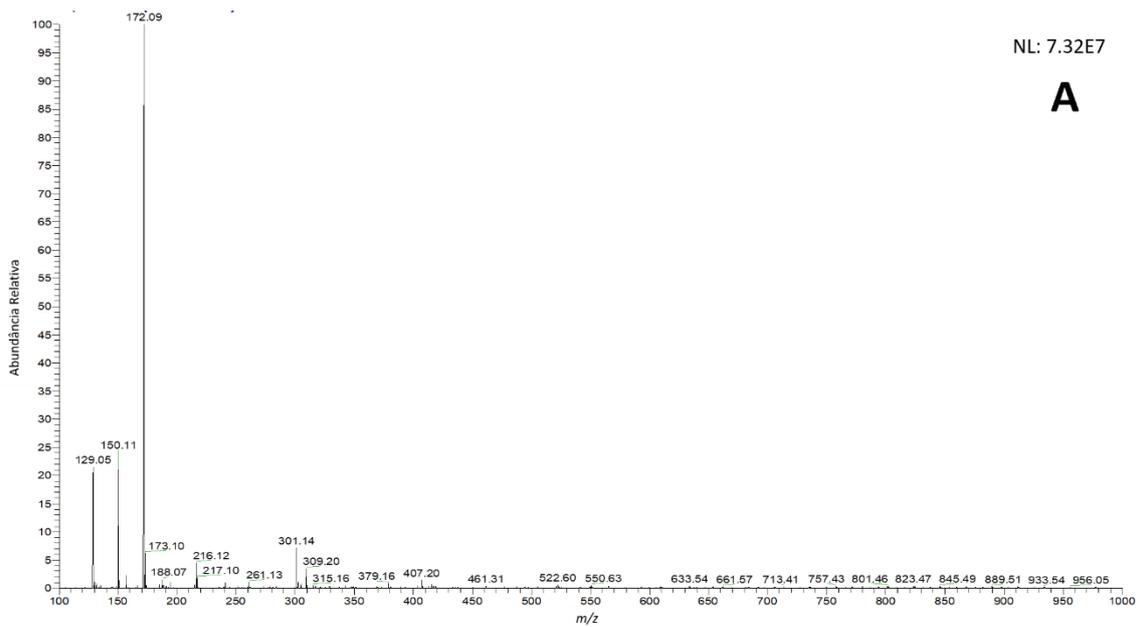


Figura 25- Resultados EASI-(+)-MS para das seções correspondentes a (A) a escrita apagada e (B) a falsificação da escrita original.



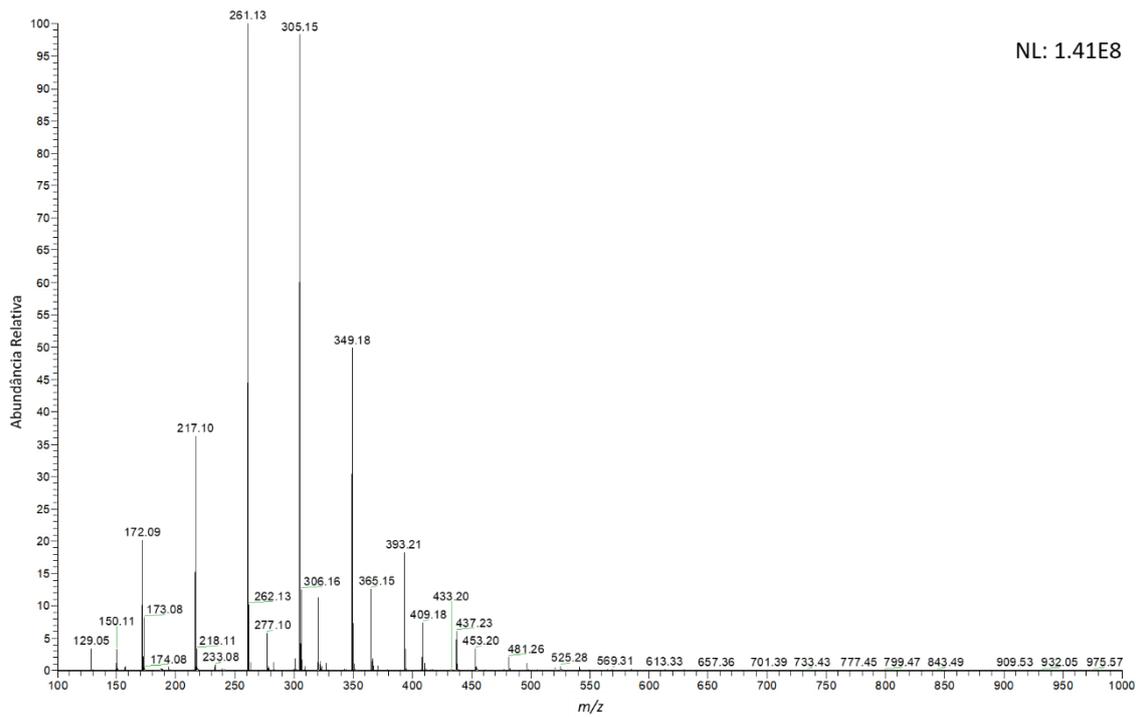
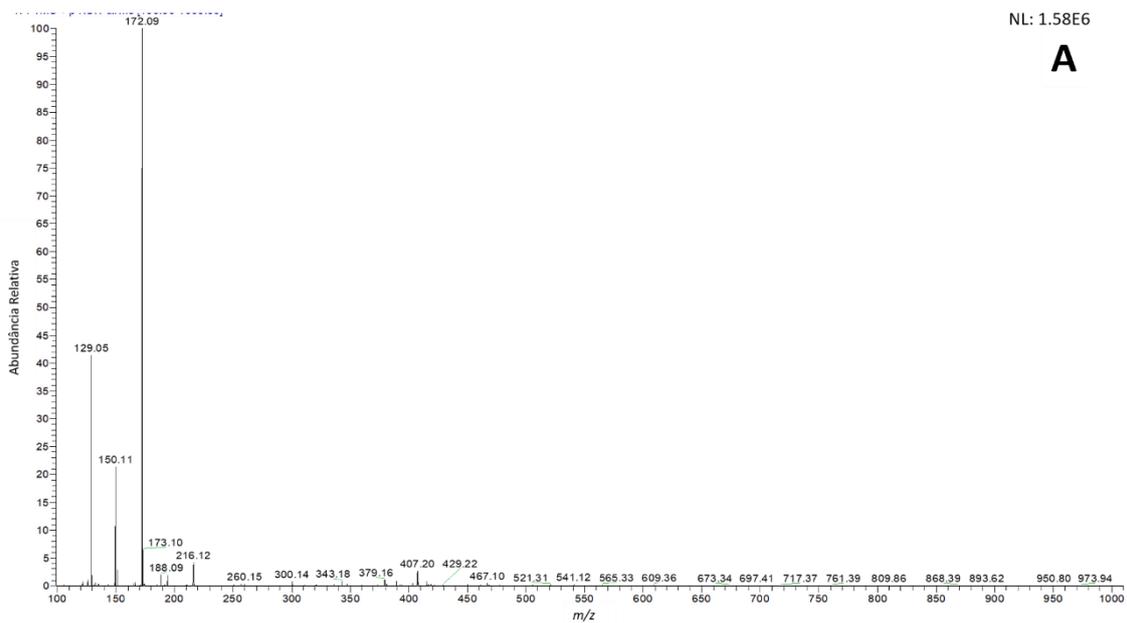


Figura 26- Espectros DESI-(+)-MS obtidos para as canetas (A) branco apagador; (B) azul apagável e (C) azul não apagável.



NL: 1.58E6

A

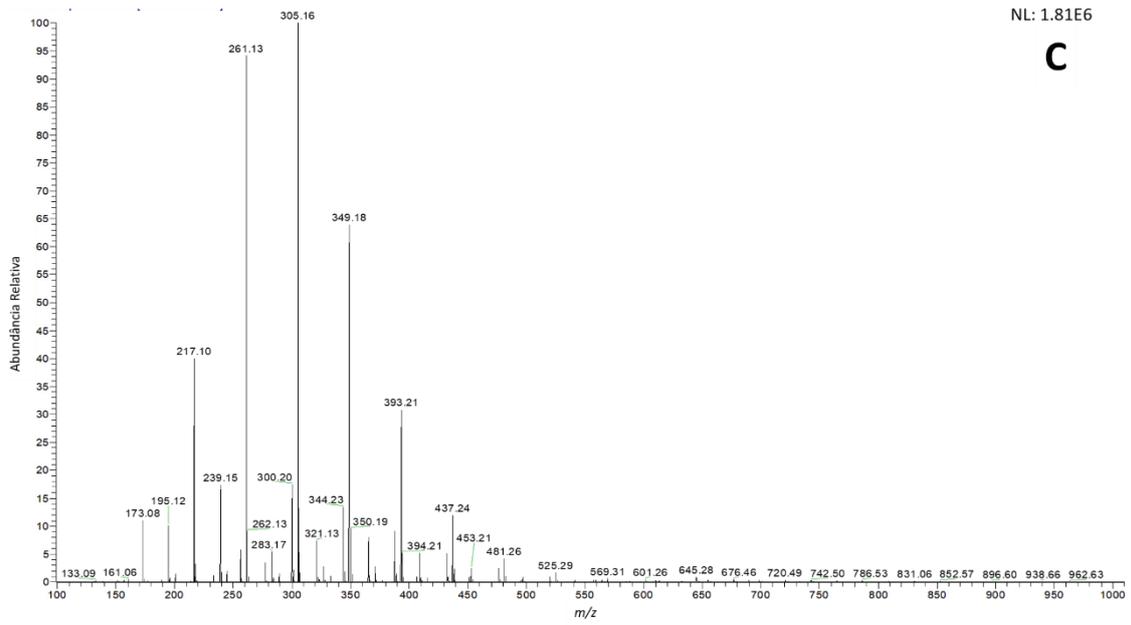
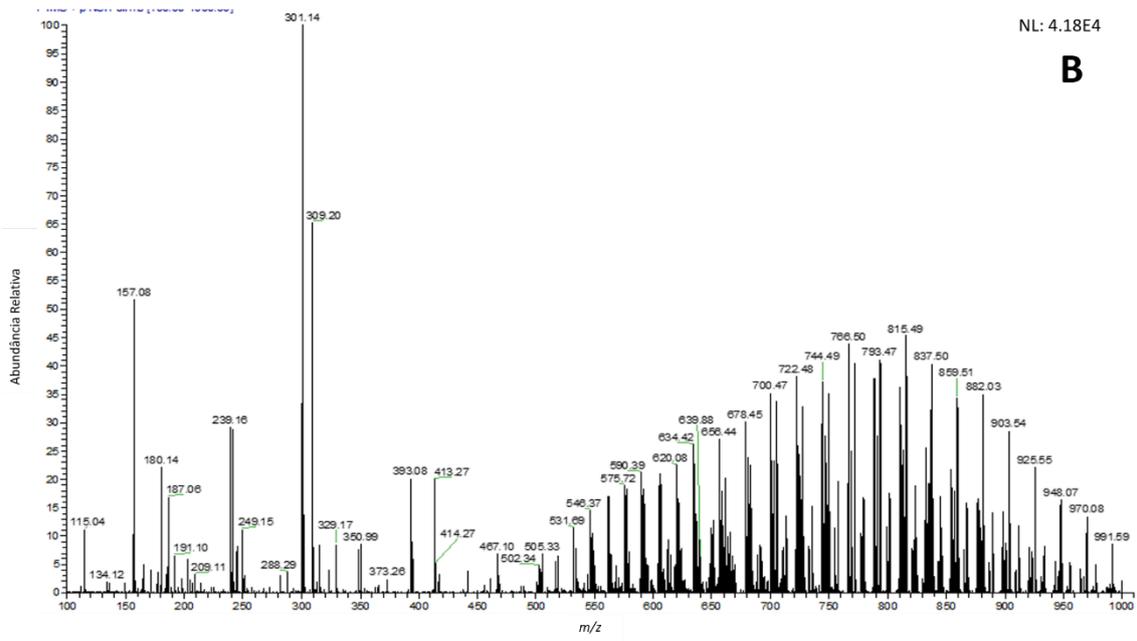
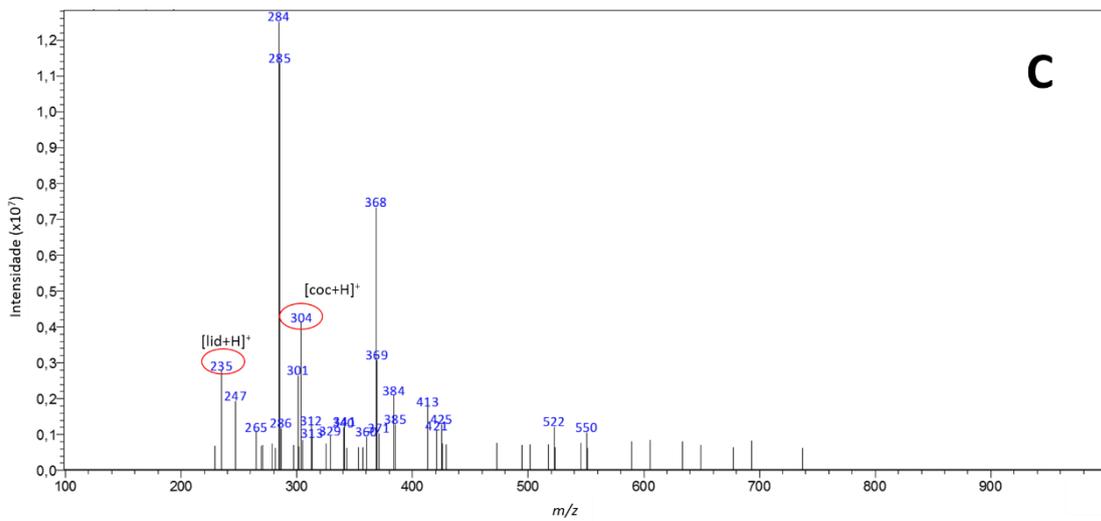
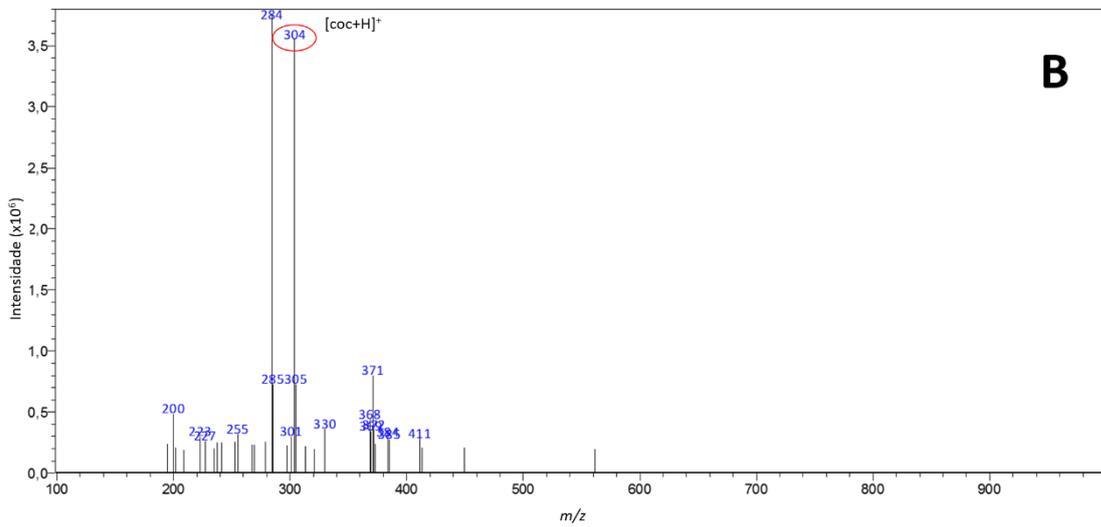
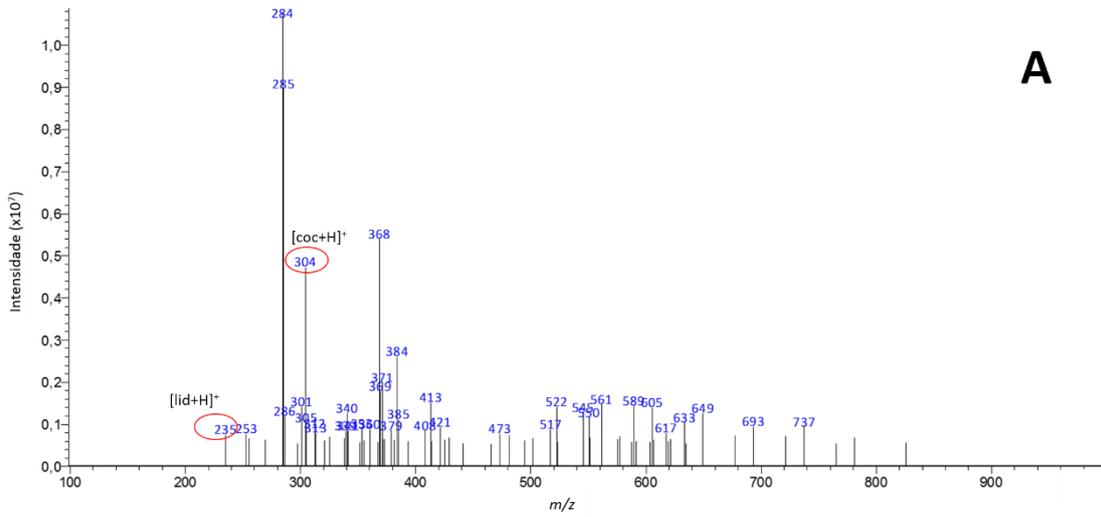
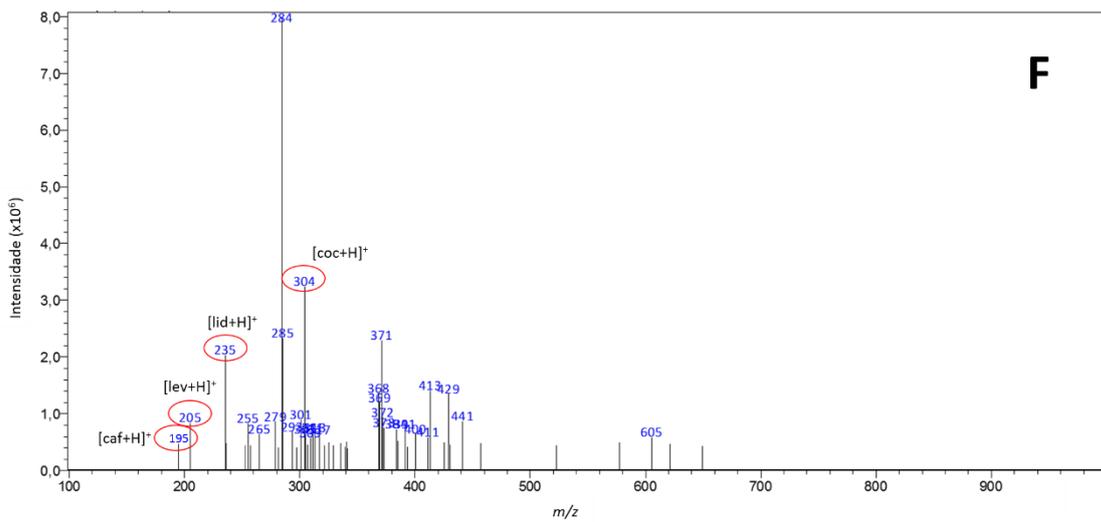
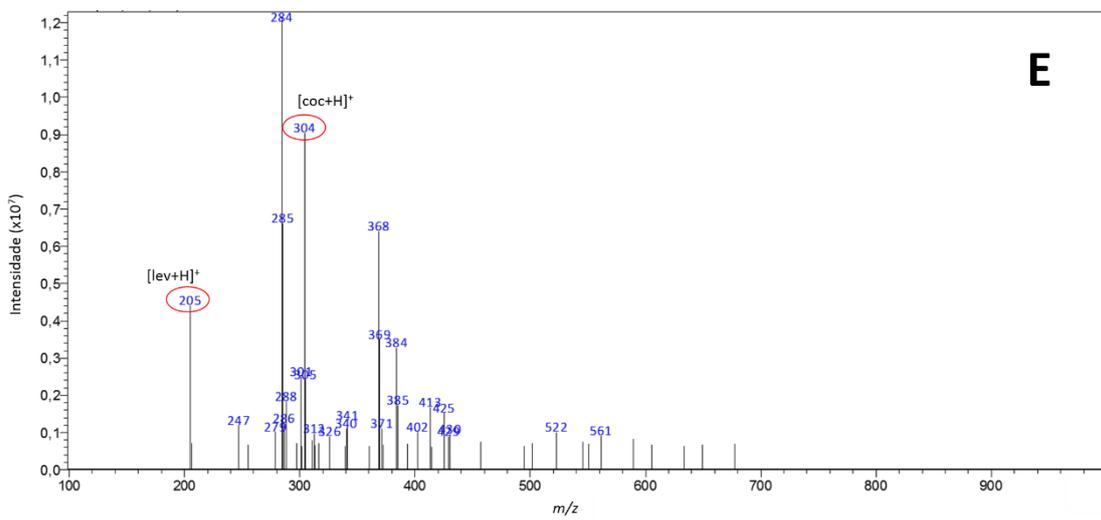
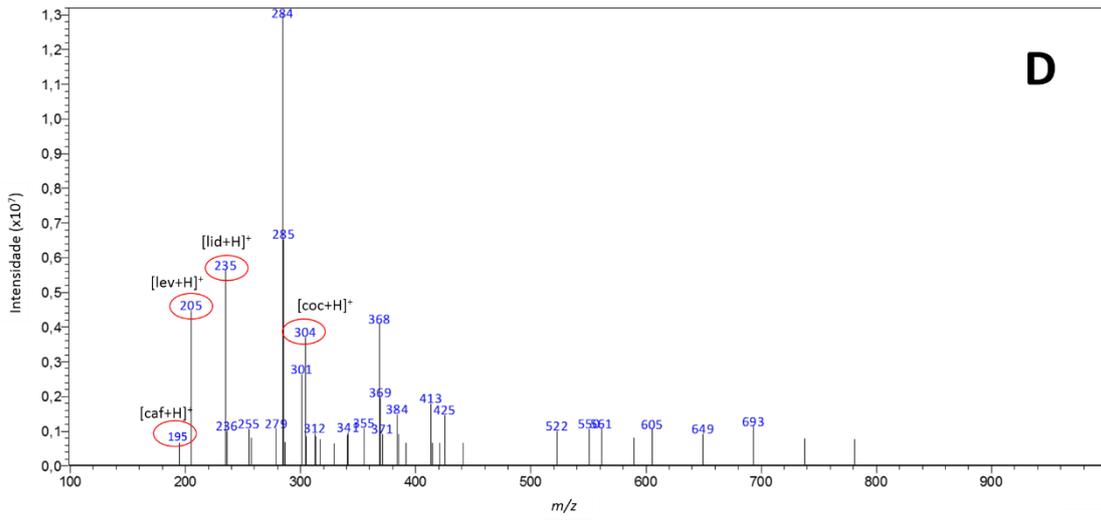
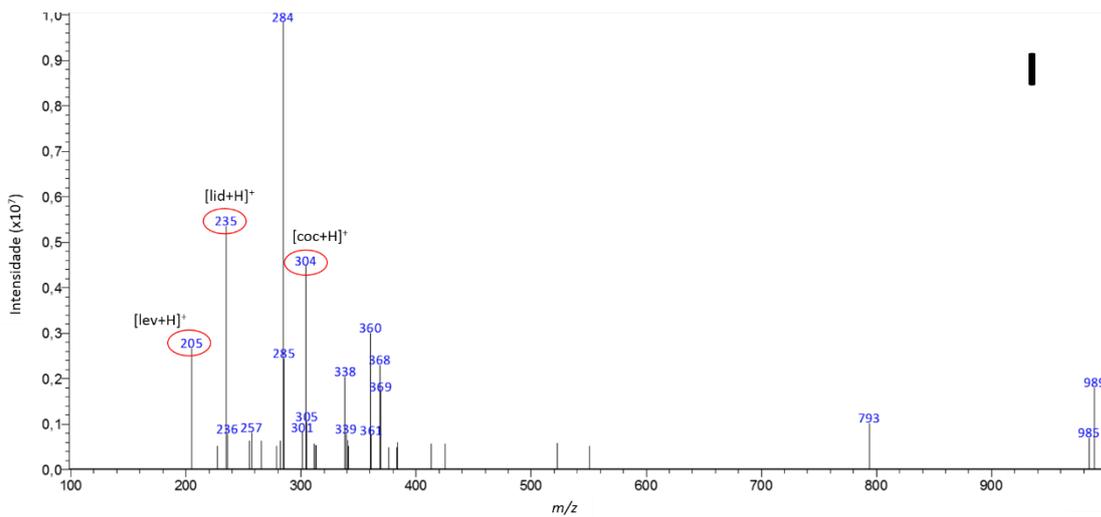
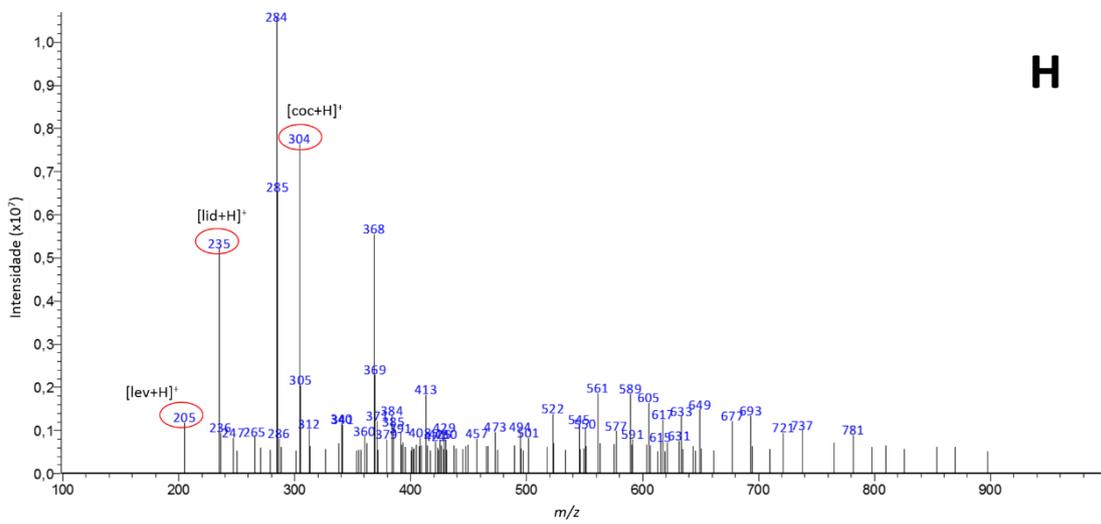
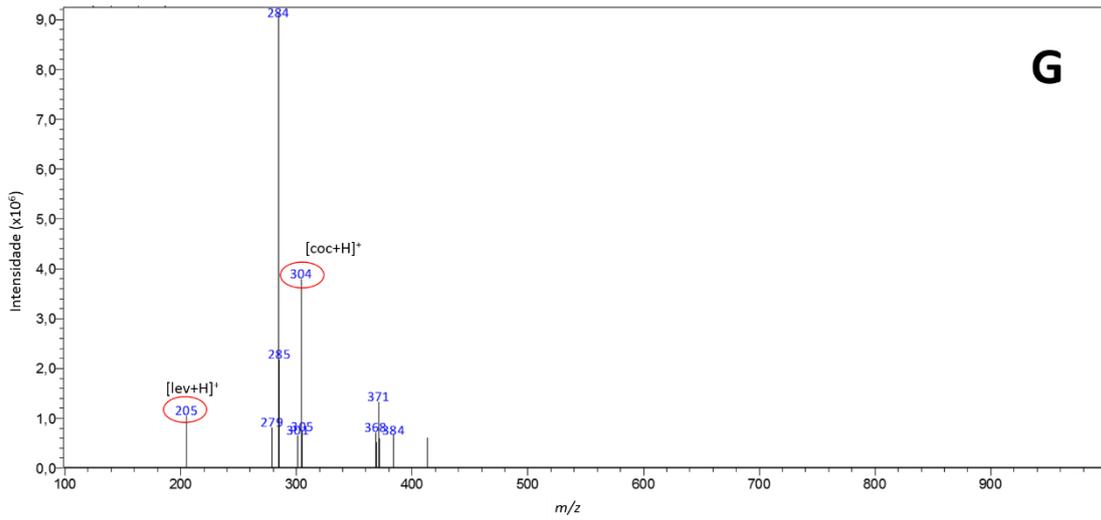


Figura 32-Espectros PS-(+)-MS gerado para 10 amostras de cocaína apreendidas, representativas de todo o conjunto amostral.







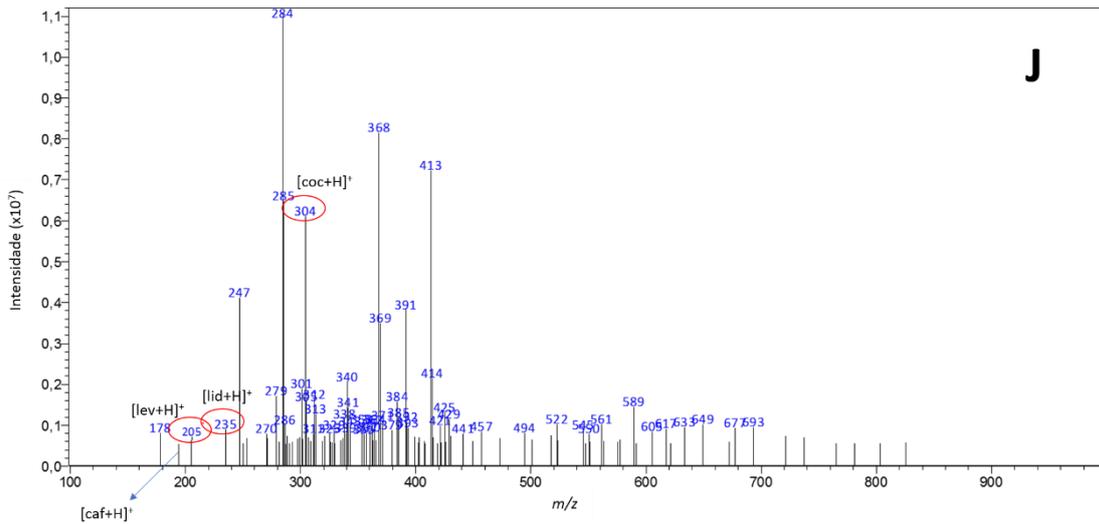
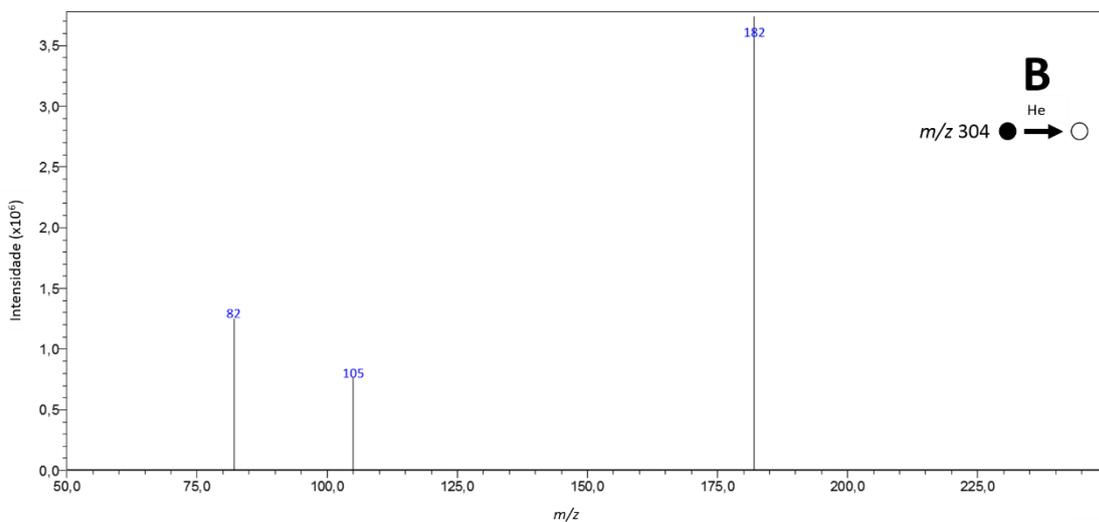
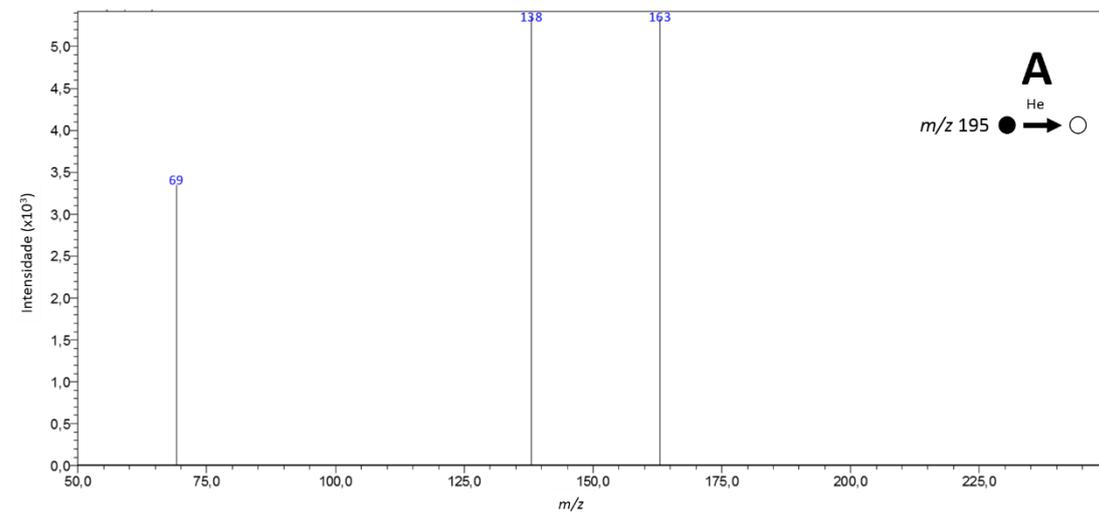


Figura 33- Espectro de fragmentação para os íons de m/z (A) 195; (B) 304; (C)205; (D) 235 e (E)180, obtidos para as transições MRM monitoradas.



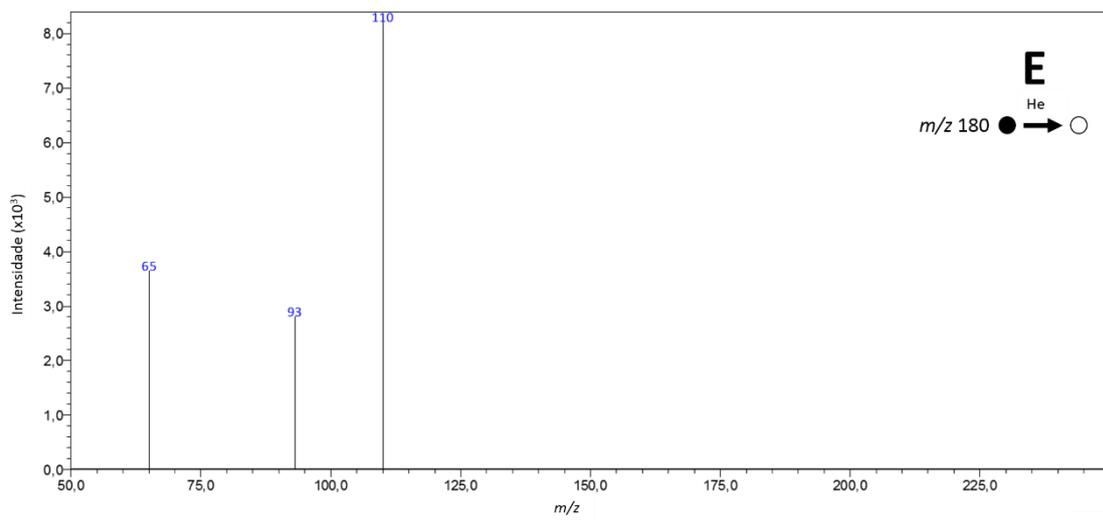
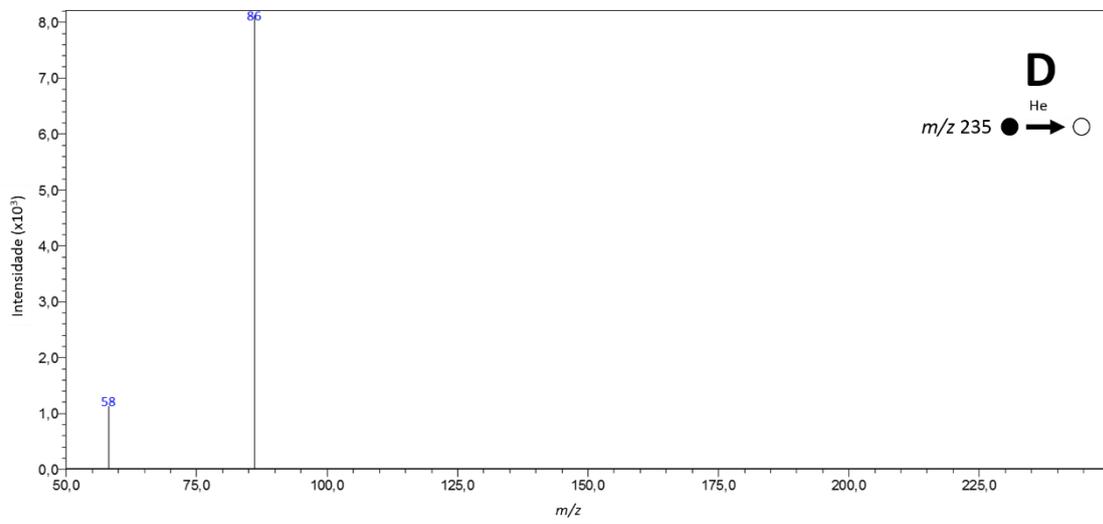
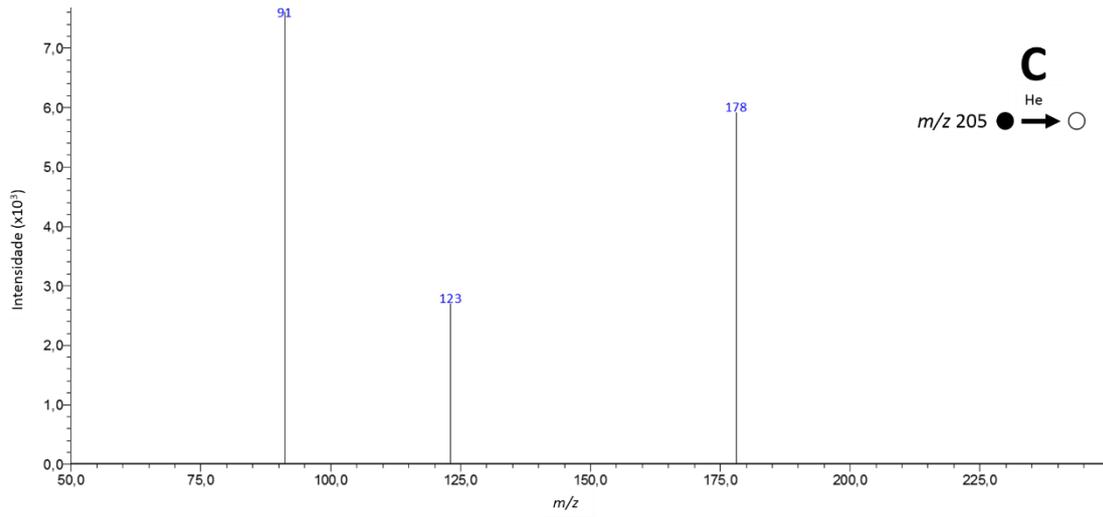


Figura 34- *Fingerprint* gerado pelo papel usado nas análises.

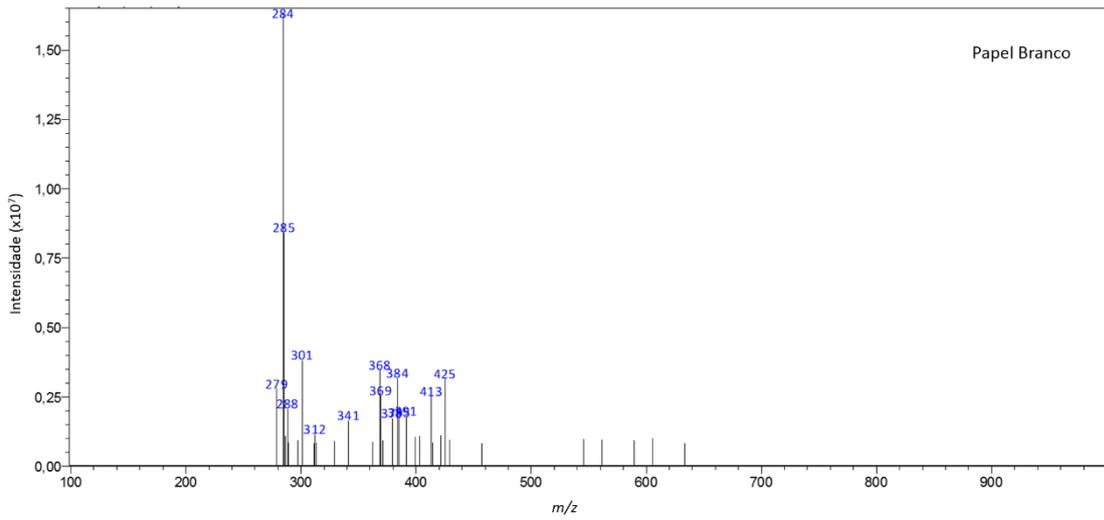
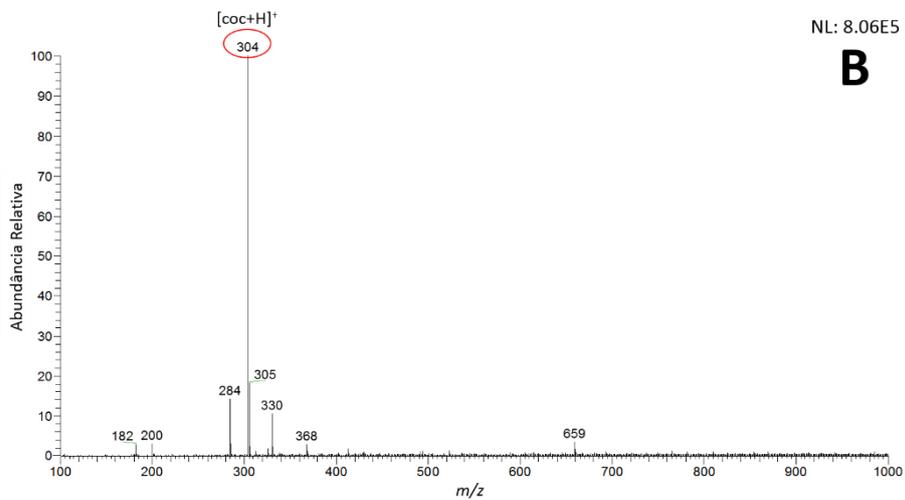
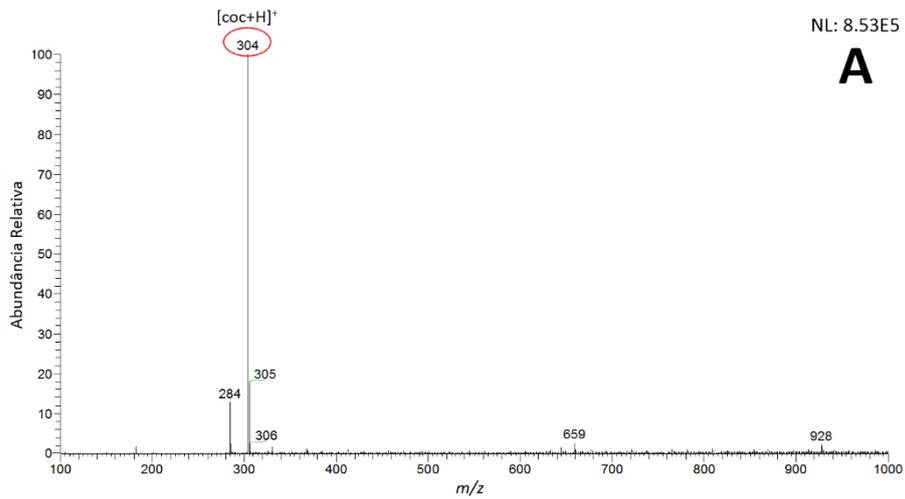
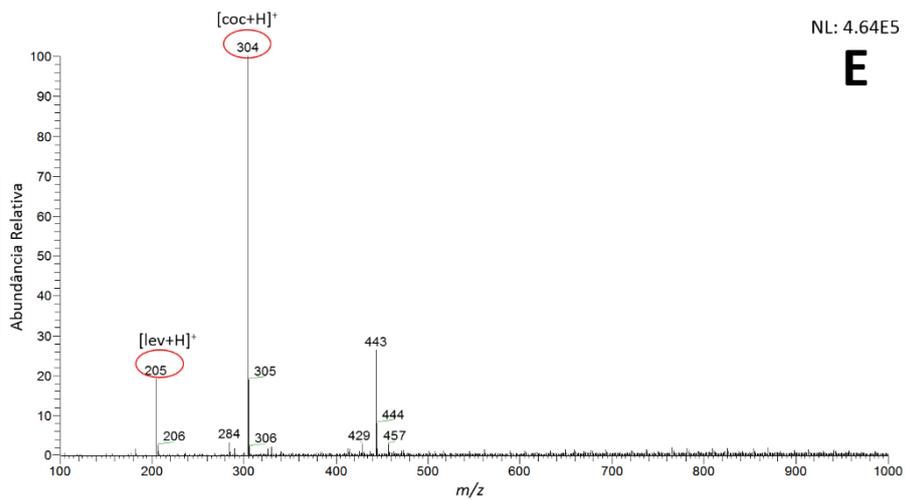
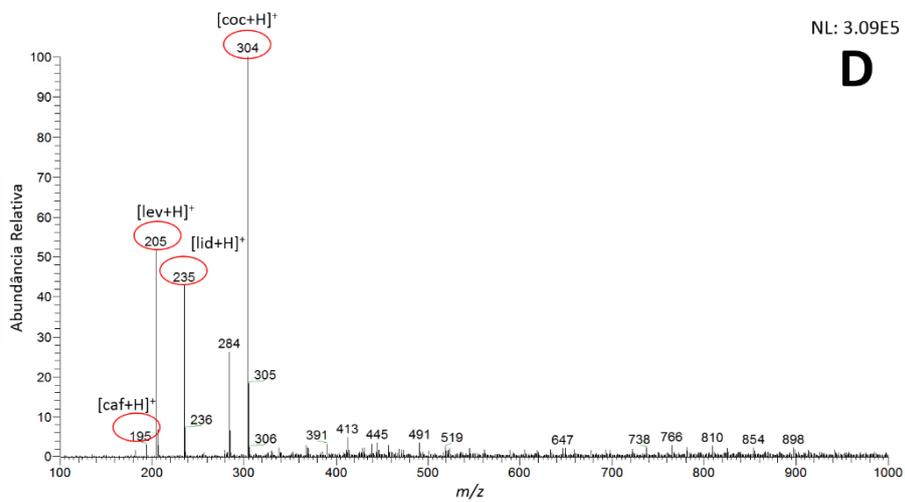
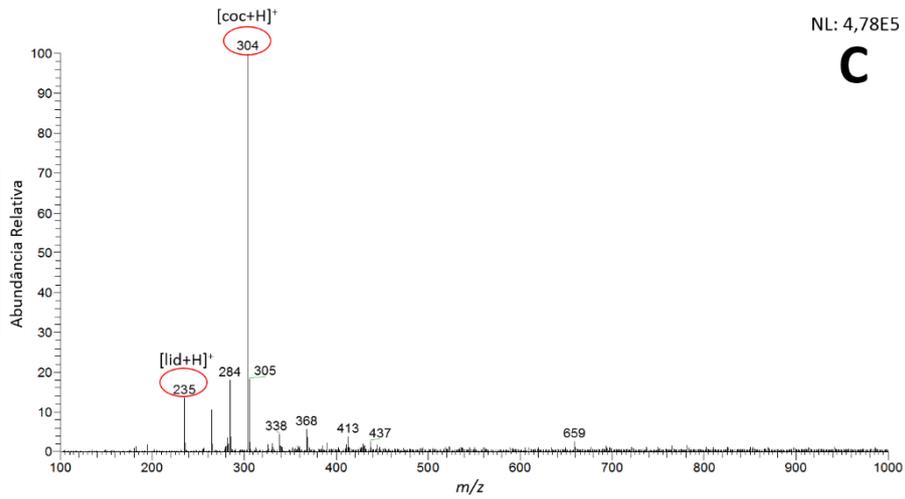
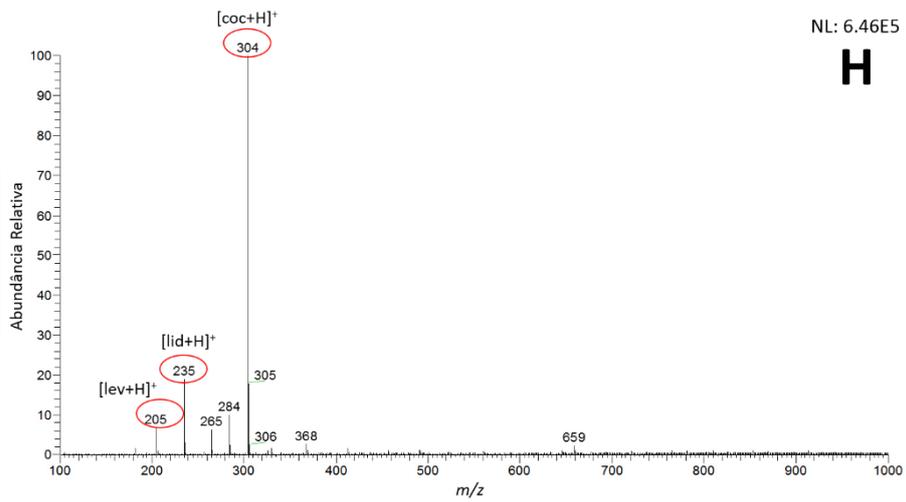
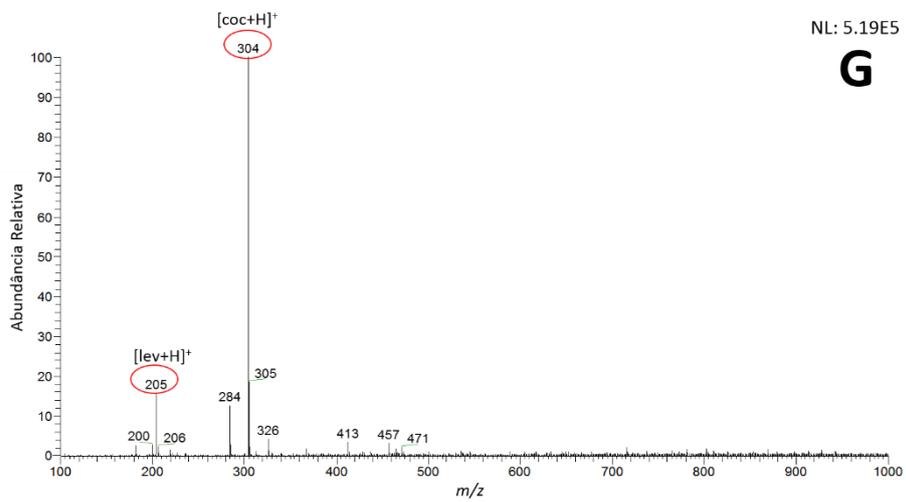
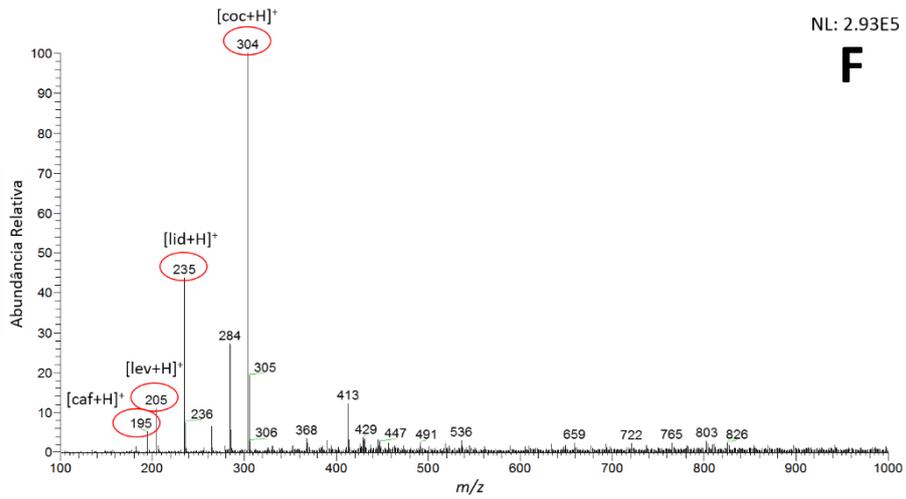


Figura 35- Espectros PS-(+)-MS gerado para 10 amostras de cocaína apreendidas, representativas de todo o conjunto amostral.







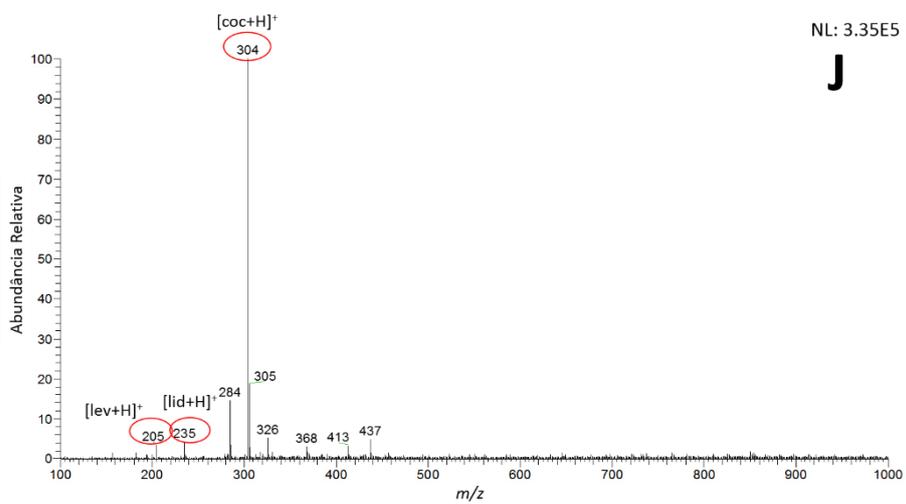
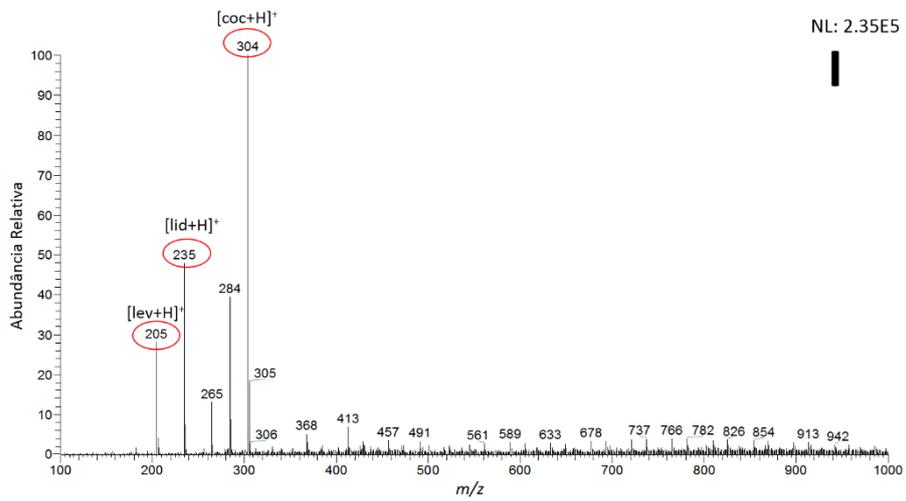


Figura 37- Perfis de fragmentação para os íons de m/z (A) 195; (B) 304; (C) 205; (D) 235 e (E) 180 obtidos para experimentos MS².

