

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Aplicação da Espectrometria de Massas Ambiente
por *Paper Spray Ionization* na Identificação e Quantificação
de Cocaína e no Controle de Qualidade de Bebidas**

Flávia Tosato

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2016**

Flávia Tosato

**Aplicação da Espectrometria de Massas Ambiente
por *Paper Spray Ionization* na Identificação e Quantificação
de Cocaína e no Controle de Qualidade de Bebidas**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
do Centro de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Espírito Santo
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Química, na área de
Química Forense.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson
Romão

VITÓRIA

2016

Aplicação da Espectrometria de Massas Ambiente
por *Paper Spray Ionization* na Identificação e Quantificação de
Cocaína e no Controle de Qualidade de Bebidas

Flávia Tosato

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Química.

Aprovada em 09/12/2016 por:

Prof. Dr. Wanderson Romão
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Fabrício Souza Pelicão
Perito da Polícia Civil do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 09 de dezembro de 2016

A minha mãe e familiares que são o meu suporte para caminhar e estão sempre ao meu lado quando preciso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria, sempre me sustentando, acalentando meus choros e me fortalecendo. A Nossa Senhora que é minha mãe do Céu e sempre me protege por onde eu caminhar.

A minha mãe, Maria José Tosato, que mesmo sem entender, aceita minhas decisões e por me amar de uma forma que não tem explicação, ao meu pai, Wanderley Malta Zago, e a minha tia Nilcéia Tozatto Zago, por me apoiar, auxiliar, amar, cuidar, e ensinar durante toda minha vida, sem eles eu não chegaria a qualquer lugar.

Aos meus primos, Gabriel Tozatto Zago e Dayana Tozatto Zago, por serem como irmãos para mim, sempre me aconselhando e incentivando os meus sonhos e a minha família Zago que sempre estão torcendo por mim.

Agradeço ao Guilherme Vasconcelos Borgui, pela grande paciência, companheirismo, atenção e amor que tem comigo não só na construção deste trabalho e sim em todos os dias. Agradeço a Deus por ter você como meu anjo na Terra.

Aos meus sogros Luis e Alcineia por me terem como uma filha, e minha cunhada Glendha.

Agradeço aos meus amigos Priscilla, Alanyella, Cléo e Adriano por todo apoio, carinho, preocupação e amizade.

A toda equipe do Laboratório de Petroleômica e Forense que apoiou e incentivou o trabalho, Lilian, Heloisa, Heloá, Fernanda, Lindamara Bruno, Eloison, Rayana, Larissa, Eliane, que ajudaram tanto com amizade e incentivos quanto como mão de obra. Em especial a Jade, Nayara e Radigya pela amizade que cultivamos nesse tempo. E a todos do LabPetro que não pouparam esforços para ajudar.

Ao Wanderson Romão, pela orientação durante todo o desenvolvimento não só deste trabalho, mas desde de 2013. Seus ensinamentos e advertências foram de grande importância, não só para esse trabalho, pois muitos são os ensinamentos que levarei para minha vida acadêmica profissional e pessoal.

Ao professor Paulo que teve muita paciência em me ensinar essa tal de quimiometria e por aceitar em participar da minha banca juntamente com o perito Fabricio Pelição, contribuindo para o crescimento do meu trabalho.

Ao corpo docente do PPGQUI da UFES que contribuiu para conhecimento que adquiri, apoio e ajudou para a minha formação.

A Polícia Civil do Estado do Espírito Santo por disponibilizar o material de pesquisa. Às agências CAPES, FAPES e CNPq pelo suporte às minhas pesquisas.

Agradeço a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta.

[...] É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se eu quiser conhecer as borboletas [...]

(O Pequeno Príncipe - *Antoine de Saint-Exupéry*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama geral do espectrômetro de massas. ⁴	19
Figura 2. Esquema geral do espectrômetro de massas Ion trap LTQ-XL, Thermo Scientific.....	23
Figura 3. Etapas de obtenção e purificação de cloridrato de cocaína.	27
Figura 4. Estrutura da cocaína na forma de base livre (a) e na forma de cloridrato (b) em equilíbrio ácido/base com seus respectivos valores de pKa e pKb. ¹⁶	28
Figura 5. Estruturas dos principais adulterantes.	29
Figura 6. Diagrama dos diferentes tipos de cromatografia. ²³	30
Figura 7. Cálculo do fator de retenção.	31
Figura 8. Sistemas de eluição de CCD avaliados para a identificação de cocaína e seus adulterantes: fenacetina, lidocaína, benzocaína e cafeína.	34
Figura 9. Ilustração do desenho experimental. Cada mancha de CCD foi transferido para um frasco com metanol e 0,1 v / v% de HCOOH. A solução resultante foi, em seguida, transferida para a fonte de PS(+)-MS.	35
Figura 10. A Otimização do sistema de CCD variando (a) métodos de aplicação (micropipeta, capilares de sílica e micro-seringa); (b) volume (μL); e (c) concentração do analito ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).	37
Figura 11. Placas de CCD utilizando os seguintes sistemas de eluição: (a) $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (75:20:5 v %); (b) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3:\text{CHCl}_3$ (50:50 %); e (c) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (100:1.5 v %).	38
Figura 12. Variação da razão dos solventes do sistema de eluição $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ em: (a) 99.5:0.5 v%; (b) 99:1.0 v%; (c) 97.5:2.5 v%; (d) 97:3 v%; (e) 96.5:3.5 v%. .	40
Figura 13. Variação da concentração dos padrões a partir de 0,5 a $14\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ na CCD com o sistema $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (99,5:0,5 %v).....	41
Figura 14. Espectros de PS(+)-MS dos padrões benzocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina e cocaína em função da concentração: 0,5; 4,0; 10,0 e $14,0\text{ mg mL}^{-1}$	42

Figura 15. PS(+)-MS/MS para os padrões de (a) benzocaína, (b) cafeína, (c) lidocaína, (d) fenacetina e (e) cocaína.	43
Figura 16. Curvas de calibração para a cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina.....	44
Figura 17. Extração de cerveja utilizando Chromabond® C18ec cartucho de SPE com água/metanol.....	53
Figura 18. Ilustração da metodologia experimental. a) Foram aplicados 20 µL de cada extrato das cervejas no papel triangular e submetidos a ionização no PS-MS. b) Após as variações de concentração com whisky e cachaça a solução resultante foi aplicada a 10 µL no papel triangular e feita a ionização no PS-MS.....	54
Figura 19. Espectros de PS(+)-MS relacionados à para análise das amostras brutas das 10 marcas de cerveja.	56
Figura 20. Espectros de PS(+)-MS para as quatro frações produzidas para duas típicas marcas de cerveja Pilsen e Lager (marca 4 e marca 8).....	57
Figura 21. Espectros de PS(+)-MS das 10 amostras de cerveja (extrato 4) após a evaporação do solvente.	58
Figura 22. Gráfico de SCORES-3D obtido dos dados dos espectros adquiridos no modo PS(+)-MS. PC1 = 16,24%, PC2 = 13,95% e PC4 = 9,01%.	59
Figura 23. Gráfico de Loadings gerado a partir dos dados dos espectros obtidos no modo PS(+)-MS para o quarto extrato após a evaporação do solvente.....	60
Figura 24. Espectros das blendas de whisky e cachaça por PS(+)-MS. A partir da letra (a) a (k) é demonstrado o aumento da porcentagem de cachaça na mistura binária.	61
Figura 25. Região de maior interesse nos conjuntos de espectros de whisky e cachaça, adquiridos no PS(+)-MS na construção do modelo PLS.....	62
Figura 26. Curva de calibração para as blendas de whisky e cachaça a partir dos espectros obtidos no PS-MS no modo positivo.	62
Figura 27. Espectros de PS(-)-MS das blendas de whisky/cachaça.	63

Figura 28. Região de maior interesse nos conjuntos de espectros de whisky e cachaça, adquiridos no PS(-)-MS na construção do modelo PLS.....	64
Figura 29. Curva de calibração e parâmetros medidos a partir da blenda de whisky e cachaça no PS-MS no modo negativo.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns adulterantes de cocaína e seus efeitos no SNC. ¹⁶	28
Tabela 2. Valores de Rf para os padrões de fenacetina, cafeína, cocaína, benzocaína e lidocaína.....	39
Tabela 3. Valores de Rf dos padrões para diferentes proporções da fase móvel (em % de volume) de CH ₃ OH:NH ₄ OH.....	40
Tabela 4. LOD observada na CCD e calculada para o PS(+)-MS para cada padrão	45
Tabela 5. Valores de sinais proporção de m / z 304/290 correspondente à cocaína / benzoilecgonina obtido por PS (+) análise por MS de nove repetições de cinco dias diferentes.....	45
Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA) dos resultados individuais obtidos em cinco dias diferentes por PS (+) MS da relação de cocaína / benzoilecgonina.	46
Tabela 7. Marcas de cervejas exploradas no trabalho bem como o teor alcoólico e classificação entre Pilsen e Lager.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MS – *Mass spectrometry*

EI – Ionização por elétrons

CI - Ionização química

ESI - Electrospray Ionization

MALDI – Dessorção e ionização por laser favorecida por matriz

DART– Direct analysis in real time

DESI – Desorption electrospray

EASI – Easy ambient sonic-spray ionization

PS-MS – Paper spray mass spectrometry

TOF- Tempo de voo

IT – Ion trap

RF – Radiofrequencia

ICR – Ressonância ciclotrônica de íons

FT – Transformada de Fourier

B – Campo magnético

LTQ XL - Linear trap quadropole XL

CCD – Cromatografia em camada delgada

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

UV - Ultravioleta

MeOH – Metanol

ACN - Acetonitrila

SPE – Extração em fase sólida

PCA – Análise de componentes principais

PLS – regressão de mínimos quadrados parciais

RMSEP – Erro médio de previsão

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius

g – Grama

μ – Micro

L – Litro

m – Mili

%V - Porcentagem em volume

min – Minuto

m/z – Razão massa carga

Nº – Número

ppm – Partes por milhão

kV – Quilovolt

rms - Root Mean Square

nm – Nanometro

Rf – Fator de retenção

RESUMO

Análises rápidas, baratas e eficientes são necessárias para as rotinas laboratoriais, principalmente quando aplicada em química forense. As utilizações de fontes ambientes permitem que as análises sejam diretas e rápidas. Assim, são opções inovadoras para melhorar a sensibilidade e seletividade. Neste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia utilizando a espectrometria de massas ambiente por *paper spray ionization mass spectrometry* (PS-MS) para diferentes matrizes de dados: (i) identificar e quantificar cocaína e seus adulterantes a partir da cromatografia em camada delgada acoplada ao PS-MS; (ii) realizar a discriminação ou classificação de dez marcas brasileiras de cervejas em *pilsen* e *lager*, e (iii) identificar a falsificação controlada de Uisque com cachaça visando quantificar o volume de cachaça adicionado na mistura. Na análise de cocaína e adulterantes, os padrões foram identificados na CCD e analisados por PS-MS, e uma curva de calibração foi otimizada. A cerveja foi previamente fracionada usando a metodologia de extração em fase sólida (SPE) com água/metanol e os quatro extratos foram caracterizados no modo positivo de ionização, PS(+)-MS. Para ambos os casos, foram aplicados de 20 μ L do analito sobre a superfície do papel do PS-MS. Na quantificação de cachaça em misturas de whisk-cachaça. Os resultados indicam que, utilização da CCD acoplado ao PS-MS possibilita a identificação de cocaína e seus adulterantes uma ótima linearidade para as curvas foi encontrada (cocaína ($R^2 = 0,9989$), benzocaína, ($R^2 = 0,9934$), a cafeína ($R^2 = 0,9988$), a fenacetina ($R^2 = 0,9966$), e a lidocaína ($R^2 = 0,9987$)) e LOD inferior ao da técnica de CCD. Para as amostras de cerveja os sinais de açúcares se sobressaem sobre os demais grupos, e após a extração com água/metanol foi possível distinguir os espectros das diferentes marcas de cervejas e classifica-las em *pilsen* e *lager* pela técnica de PCA. Utilizando o PS(\pm)-MS e PLS com seleção de variáveis foi possível estimar quantitativamente o teor de cachaça misturado ao uísque. Com isso, utilização de fontes ambientes, como PS mostra-se eficaz para identificação de diversas matrizes, facilitando as análises de rotina.

Palavras-Chaves: *paper spray ionization*, fonte ambiente de ionização, cocaína, adulterantes, cerveja, *whisky*.

ABSTRACT

Rapid, inexpensive and efficient analyzes are required for laboratory routines, especially when applied in forensic chemistry. Uses of the environment sources allow the analyzes to be direct and fast. Thus, they are innovative options to improve sensitivity and selectivity. In this work, a methodology was developed using environmental mass spectrometry by paper spray ionization mass spectrometry (PS-MS) for different data matrices: (i) to identify and quantify cocaine and its adulterants from PS-coupled chromatography -MS; (ii) discriminate or classify ten Brazilian beer brands in pilsen and lager; And (iii) to identify the controlled counterfeit of whiskey with cachaça in order to quantify the volume of cachaça added in the mixture. In the analysis of cocaine and adulterants, the standards were identified in the CCD and analyzed by PS-MS, and a calibration curve was optimized. The beer was previously fractionated using the solid phase extraction (SPE) methodology with water / methanol and the four extracts were characterized in positive ionization mode, PS (+) MS. For both cases, 20 μ L of the analyte was applied to the PS-MS paper surface. In the quantification of cachaça in blends of whisk-cachaça. The results indicate that the use of Cdc coupled to PS-MS allows the identification of cocaine and its adulterants. A good linearity for the curves was found (cocaine ($R^2 = 0.9989$), benzocaine, ($R^2 = 0.9934$) Caffeine ($R^2 = 0.9988$), phenacetin ($R^2 = 0.9966$), and lidocaine ($R^2 = 0.9987$)) and LOD lower than that of the CCD technique. For the beer samples the signs of sugars stand out over the other groups, and after extraction with water / methanol it was possible to distinguish the spectra of the different beer brands and classify them in pilsen and lager by the PCA technique. Using PS (\pm) -MS and PLS with variable selection it was possible to estimate quantitatively the cachaça content mixed with whiskey. With this, the use of environmental sources, such as PS, is effective for identification of several matrices, facilitating routine analyzes.

Keywords: ionization environment, ionizing environment, cocaine, adulterants, beer, whiskey.

Sumário

1	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	18
1.1	Espectrometria de Massas	18
1.1.1.	Métodos de Ionização Ambiente.....	19
1.1.2.	Analisadores de Massas	22
1.1.3.	Espectrômetro de massas Ion trap LTQ XL.....	23
1.1.4.	Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS)	Erro! Indicador não definido.
2	CAPÍTULO 2: ANÁLISE DE COCAÍNA POR CROMATOGRRAFIA EM CAMADA DELGADA ALIADA A PS-MS	26
2.1	Cocaína	26
2.2	Adulterantes	28
2.3	Técnicas analíticas	Erro! Indicador não definido.
2.3.1	Cromatografia	29
2.4	Análise estatística	31
2.5	OBJETIVOS DO CAPITULO 2	32
2.5.1	Objetivo Geral.....	32
2.5.2	Objetivos Específicos	32
2.6	PROCEDIMENTOS.....	32
2.6.1	Materiais e reagentes	32
2.6.2	Análise de Cocaína e Adulterantes por CCD e PS(+)-MS	32
2.7	RESULTADO E DISCUSSÃO	36
2.7.1	Drogas Ilícitas: Análise de Cocaína e Adulterantes por CCD e PS(+)-MS	36

2.8	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 2	46
3	CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE WHISKIE E CERVEJA POR PS-MS.....	47
3.1	Bebidas alcóolicas.....	47
3.1.1	Cerveja	47
3.1.2	Cachaça – água ardente	48
3.1.3	Whisky	49
3.2	Quimiometria	50
3.3	OBJETIVOS	50
3.3.1	Objetivo Geral.....	50
3.3.2	Objetivos Específicos	50
3.4	PROCEDIMENTOS.....	51
3.4.1	Materiais e reagentes	51
3.4.2	Análise de bebidas por SPE e PS(±)-MS	51
3.5	RESULTADO E DISCUSSÃO	55
3.6	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 3	66
4	CONCLUSÃO	67
5	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	68

1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (do inglês “*mass spectrometry*” - MS) é uma técnica que se baseia na ionização de moléculas e átomos, realizando de forma eficiente a separação dos íons com base nas diferentes razões massa/carga (m/z), sendo m a massa em u [massa atômica unificada, chamada também de Dalton (Da)] e z a carga formal.¹

Essa técnica não analisa átomos ou moléculas no estado fundamental, apenas espécies ionizadas. Dessa forma, para a análise dos íons necessita-se a formação dos mesmos a partir de fontes de ionização, que devido aos avanços tecnológicos tem evoluído constantemente buscando ampliar o campo de aplicação.² A espectrometria de massas é uma técnica analítica com ampla aplicação vista a sua alta sensibilidade e velocidade de análise.^{1,3}

A **Figura 1** mostra um esquema geral de um espectrômetro de massas, no qual seu funcionamento inicia-se pela introdução da amostra, ionização do analito por uma fonte que pode trabalhar a pressão atmosférica ou reduzida (10^{-6} mbar), um analisador (responsável pela resolução e qualidade do sinal), e detector que é responsável por contabilizar os íons e transformar sinais em corrente elétrica, que posteriormente são convertidos na razão m/z em um espectro.^{1,4}

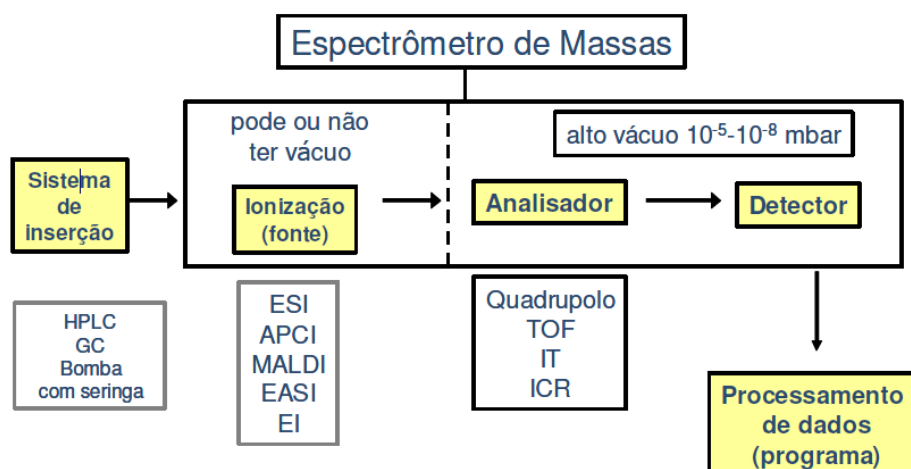


Figura 1. Diagrama geral do espectrômetro de massas.⁴

Dentre os componentes que compõem o espectrômetro de massas, a fonte de ionização e o analisador são partes com grande importância. Pois cada fonte de ionização possui características de ionização e com isso, tipos específicos de compostos são analisados. As diferentes formas de ionização juntamente com analisadores de massas são o que determinam a aplicabilidade da MS.⁵

As fontes de ionização então, demonstram a variedade da técnica, pois a partir delas é possível determinar os tipos de analitos a serem estudados. Assim existem diferentes métodos de ionização aplicáveis para uma diversidade de amostras, que vão desde moléculas apolares e voláteis por ionização por elétrons (EI) ou ionização química (CI) podendo ser moléculas polares e de alta massa molar analisada por ionização por *eletrospray* (ESI), também dessorção e ionização por laser favorecida por matriz (MALDI)) chegando a técnicas de ionização ambiente que possibilitam análises rápidas, diretas com alto rendimento e não necessitando de abertura de amostra, como nas fontes *direct analysis in real time* (DART), *desorption electrospray* (DESI), *easy ambient sonic-spray ionization* (EASI), além do *paper spray* (PS) que facilitam a introdução da amostra no espectrômetro.^{4,6}

1.1.1. Métodos de Ionização Ambiente

Atualmente a busca pela facilidade nas análises, e o preparo das amostras é uma das preocupações, e novas técnicas têm sido geradas em que há a formação de íons sob condições ambientes para posteriormente serem analisados por MS.⁷

As fontes de ionização ambientes estão sendo mais exploradas devido a sua simplicidade em comparação com as fontes que eram utilizadas sob alto vácuo. A vasta gama dessas fontes recentemente desenvolvidas, despertaram interesse significativo pela busca de aplicações em vários campos de interesse acadêmico ou industrial.⁸ Acontecem em condições ambientes que possibilitam a análise diretamente da superfície, onde as amostras foram aplicadas com o mínimo ou nenhum pré-tratamento.⁹⁻¹¹ Essas fontes, começaram a ser relatadas na literatura a partir de 2004, com DESI, DART entre outras, quem foram sendo criadas e modificadas ao longo dos anos.¹²

1.1.1.1 Paper Spray

A fonte de ionização PS criada em 2010 pelo grupo do Prof. Dr. R.G Cooks, é derivada do ESI, sendo simplesmente constituída de um fio soldado a uma garra de jacaré fixado a um papel de formato triangular, ao qual é umedecido e aplicado uma alta voltagem. Por capilaridade, os analitos presentes na amostra migram até as extremidades do papel.^{13,14} O estudo do mecanismo que ocorre no PS, tem sido discutido.^{13,15}

Como dito, o PS é derivado do ESI, e com isso espera-se que o processo de ionização seja similar, campo elétrico, oriundo da aplicação de alta voltagem (3-5 kV) no papel, induz a formação de um spray, contendo gotículas carregadas, na forma de cone de Taylor, que após a dessolvatação gera íons positivos ou negativos (dependendo no modo de ionização) em fase gasosa (**Figura 1**).^{13,16}

A interação da amostra na superfície porosa do papel é o principal processo responsável pelo movimento dos analitos que serão dessolvatados durante a formação do spray próximo à entrada do espectrômetro de massas e a partir deste processo tem-se a dessorção do analito em sua forma iônica a partir do papel.^{14,14} A duração do spray é em torno de 60 segundo, pois neste intervalo o solvente da amostra evapora e assim a amostra pulverizada. O tempo pode ser relacionado ao volume de amostra aplicado no papel.¹⁷ Outros fatores também podem influenciar na ionização, como o ângulo do corte, distância da entrada do espectrômetro, tudo isso pode interferir na sensibilidade, limite de detecção, entre outras respostas do equipamento.¹⁴

1.1.1.1.1. Aplicações de Paper Spray

Levando em consideração as condições atuais nos laboratórios analíticos, onde a busca por praticidade, custos, rapidez das análises são tão almejados. Esperava-se que as novas fontes ambientes crescessem em variadas aplicações tão rapidamente.¹⁸

O PS-MS é um exemplo dessas fontes ambientes, quanto aos mecanismos dos processos de ionização nos modos positivo e negativo estão sendo estudados, sua aplicação tem sido em variados compostos e matrizes.¹⁹

Liu e colaboradores (2010) analisaram diversos compostos como heroína, cocaína, entre outras substâncias utilizando como matriz sangue bovino, além disso, fez testes com 6 tipos de superfícies diferentes, incluindo quatro papéis de diferentes tamanhos de poros, papel de fibra de vidro e papel de cromatografia¹⁹. Manicke et al (2010) quantificou dois fármacos em sangue e observou que com a adição de padrão interno é possível quantificar esses fármacos que não sofrem interação com as proteínas presentes no sangue²⁰.

Análises de analitos sólidos depositados em papel incluindo fármacos, nucleótidos, fosfolípidos, derivados de colesterol, peptídeos pequenos e vários hidrocarbonetos e muitos compostos de baixo peso molecular que são solúveis em solventes não-polares, podem ser ionizados como demonstra Li e colaboradores (2011), em que utilizou hexano para ionizar o grupo de moléculas citado acima.²¹

Uma comparação entre um triplo quadrupolo e um ion trap foi feita, além da comparação do uso de um papel cromatográfico e um papel com revestimento de sílica para a análise de um conjunto de fármacos e foi encontrado que o triplo quadrupolo (0.1 ng.mL⁻¹) apresenta uma melhor resposta em relação ao ion trap (10-20 ng.mL⁻¹) e o papel de sílica tem uma melhoria de 5-50 vezes para esses analitos²². Manicke e colaboradores (2011) também conseguiu concentrações de ng.mL⁻¹ em moléculas terapêuticas em sangue seco utilizando padrão interno²³.

Ainda sobre papel com revestimento para facilitar a ionização, foi relatado a utilização de papel revestido com grafite para a ionização de biomoléculas, e demonstrou um aumento de 600 vezes para a detecção do sinal (m/z)²⁴.

Um estudo tamanho das gotas e velocidade foi avaliado por Espy et al (2012) utilizando um anemómetro de partículas Doppler de fase bidimensional e foi feita uma avaliação da velocidade em função do aumento da voltagem aplicada e distância do papel.¹⁵

Muitas são as aplicações dessa fonte, dentre elas destaca-se o uso para análise de fármacos em biofluidos²⁵, determinação de designer drugs²⁶, no controle de qualidade de alimentos²⁷, para análise de inibidores de corrosão em oleoduto²⁸, acompanhamento de reações químicas inorgânicas²⁹, identificação de quinonas in situ³⁰, discriminação de espécies de cândidas. Em um estudo, compostos foram ionizados a partir do PS-MS com nenhuma voltagem aplicada utilizando papel de filtro como substrato e os resultados encontrados foram compatíveis quando aplicado alguma voltagem³¹; para estudo de triagem para a identificação de pesticida em frutas e vegetais³², também pode ser usado para a diferenciação de tipos de canetas em apreensões de promissórias falsificadas³³, análise qualitativa de *designer drugs* a partir de selos apreendidos³⁴, discriminação de marcas de cerveja pelo valor comercial³⁵ também foram analisado por PS-MS entre outras matrizes.

1.1.2. Analisadores de Massas

Como são muitas as formas de ionização, surgiram também vários tipos de analisadores de massas. Cada analisador, possuem eletrônica e princípio físico particular.⁴

A propriedade física dos íons é medida pelo analisador a partir da razão massa/carga. Os diferentes tipos de analisadores, tem por princípio de funcionamento por campos elétricos e magnéticos (estáticos ou dinâmicos) que podem ser isolados ou combinados. E entre eles, uma das diferenças, está na maneira pela qual tais campos são usados para conseguir a separação dos íons. Obtendo então cada um suas vantagens e desvantagens.³⁶

Diferenças como resolução, que é a capacidade de medir o m/z experimental com a mínima diferença do m/z teórico, possibilitando deduzir uma fórmula molecular com base nos defeitos de massa, e exatidão que é medida através do erro calculado em ppm do desvio da medida feita experimentalmente em relação a valor teórico. Essas duas características, diferem por exemplo, os

tipos de analisadores existentes. O quadrupolo, o tempo de voo (TOF), *ion trap* (IT), ressonância ciclotrônica de íons, são exemplos de analisadores de massas.⁴

1.1.3. Espectrômetro de massas *ion trap* LTQ XL

O *ion trap* (IT) é um dispositivo que usa um campo elétrico e radiofrequência oscilante para armazenar íons.^{36,36}

De maneira geral, ITs podem ser considerados um quadrupolo dobrado a fim de formar um circuito fechado, ou mais especificamente, um eletrodo hiperbólico na forma circular é colocado entre dois eletrodos hiperbólicos. A amostra, é ionizada a partir da fonte, passando pelas lentes focalizadoras, skimmer, e passando por quadrupolos e um octapolo (que funcionam apenas no modo RF), no analisador, que é composto com duas lentes, sendo uma frontal e uma traseira (que tem por finalidade o controle da quantidade de íons), e uma câmara de trapeamento linear.³⁶⁻³⁹

No analisador quadrupolar, potenciais elétricos são adaptados a fim de seleccionar os íons a partir da sua razão m/z , os íons que estão em movimentação são esfriados por gás inerte diminuindo sua energia cinética, e com isso os fazendo “viajar” no eixo axial (eixo z) dentro do quadrupolo e indo para o sistema de detecção.³⁶

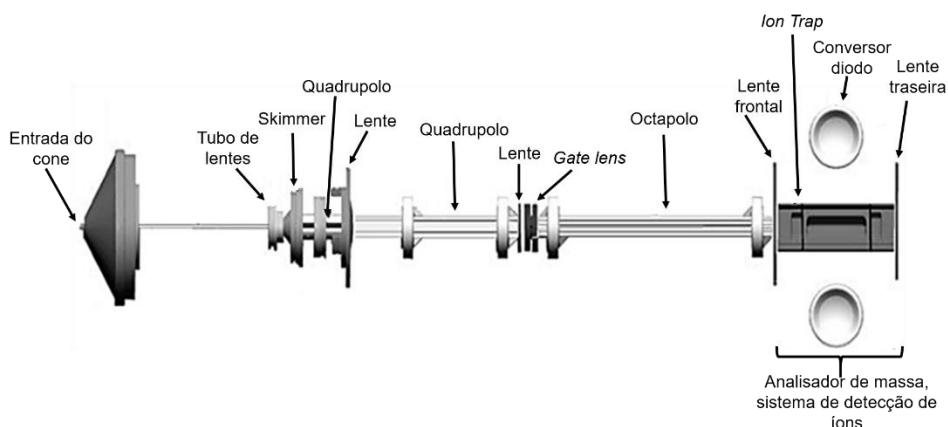


Figura 2. Esquema geral do espectrômetro de massas *ion trap* LTQ-XL, Thermo Scientific.⁴⁰

1.1.4. Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS)

A técnica de ressonância ciclotrônica de íons (ICR) foi criada no ano de 1930 por Lawrence e colaboradores; No ano de 1950, foi feita a junção da técnica de ICR a espectrometria de massas por Sommer e colaboradores. Em 1974, Comisarow e Marshall também introduziu a transformada de Fourier (FT) juntamente com o ICR e a MS.⁴¹

Essa junção das técnicas e conceitos, fez com que o analisador de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR ou simplesmente FT-MS) fosse considerado, o tipo mais complexo de analisadores de massas. E com isso faz essa técnica tenha uma ampla faixa de aplicação.¹

Os íons possuem um movimento circular, e a frequência de cada um deles é de acordo com o m/z que não é dependente da velocidade dos mesmos, e esse movimento é causado pelo campo magnético (B). Assim, um íon de massa m e carga q , se move perpendicularmente ao campo. Os íons de cargas contrárias terão orbitas em sentidos opostos.^{41,42}

A **figura 3** ilustra, que a cela de ICR é composta por pratos de aprisionamento, excitação e detecção, aonde armazena os íons e determina a razão m/z dos mesmos baseado na frequência ciclotrônica, a partir da presença de um campo magnético aplicado. Essa frequência é inversamente proporcional à razão m/z . O sinal do ICR é detectável apenas se os íons estiverem um movimento sincronizado. Para a obtenção dos íons em fase (sincronizados), um campo elétrico (RF) é aplicado uniformemente com a mesma frequência ciclotrônica, e assim os íons passam a ser detectados. Do sinal de ICR digitalizado em domínio de tempo, pela transformada de Fourier e é obtido um espectro em frequência e por cálculos matemáticos, o mesmo é transformado em domínio de massas. (**Figura 3**).⁴³

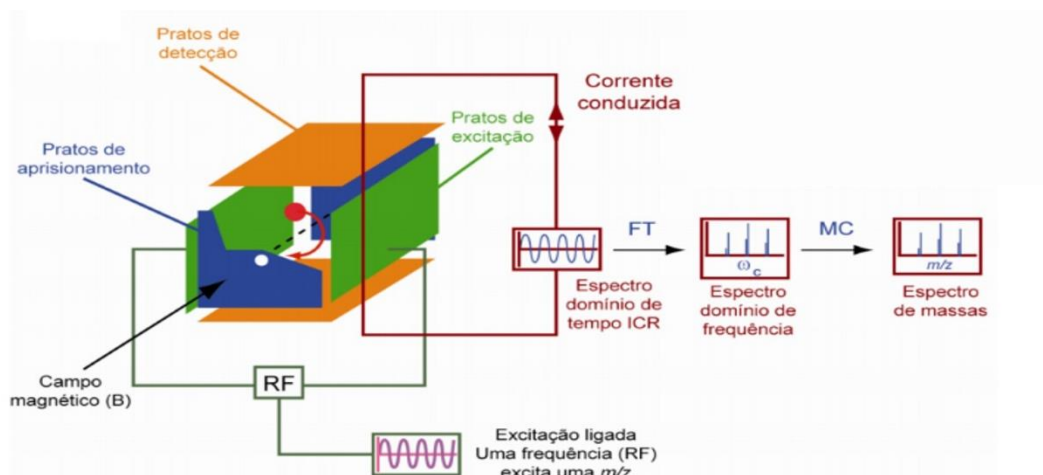


Figura 3. Esquema de funcionamento da cela de ICR.⁴⁴

O FT-ICR MS possui uma grande faixa de detecção, com alto poder de resolução de massa ($m/\Delta m > 300\,000$ a 9,4 T, onde m é o valor de m/z do íon analisado e Δm a largura do pico a meia altura), resolução de massa (menor diferença de massa entre dois picos de igual magnitude tal que o vale entre eles é uma fração especificada da altura do pico: $m_2 - m_1 > 0.003$ Da), e precisão de massa (ppm ou rms) que permite a separação e detecção dos íons pertencentes a amostra estudada, assim o controle do número de íons dentro da cela de ICR é essencial para obtenção de valores ótimos de resolução, exatidão e relação sinal-ruído.^{36, 41,42,45}

2 CAPÍTULO 2: ANÁLISE DE COCAÍNA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ALIADA A PS-MS

2.1 Cocaína

Historicamente era conhecida como a “planta divina dos Incas”, as folhas mais antigas de coca (*Erythroxylum coca* Lam. - Erythroxylaceae) foram descobertas na região do Peru. Os espanhóis em contato com os índios descobriram que costumavam mascar folhas de coca. A partir do século XIX, na Europa, a droga teve seu uso espalhado sendo indicadas para o tratamento de depressão, fadiga, neurastenia e também dependências, então passou a ser vendida de várias maneiras, nas farmácias, como medicação. Já em 1914, o comércio e uso foram proibidos, assim o consumo quase desapareceu, voltando novamente apenas a partir da década de 60.⁴⁶

O processo de extração de cocaína e seus derivados é feito a partir das folhas de coca por diversos métodos, envolvendo vários solventes orgânicos (querosene, thinner, etc.) e reações químicas que utilizam bases e ácidos. Nestes processos, relativamente simples, são extraídas diversas substâncias inorgânicas e orgânicas, principalmente os derivados de alcaloides (aminas cíclicas que possuem anéis heterocíclicos contendo nitrogênio) do tipo tropanos.

Dependendo do tipo do processo de extração, pode-se encontrar uma variação dos componentes, assim como traços de reagentes utilizados para a extração e obtenção da pasta-base de coca. Além dos componentes da planta e dos reagentes da extração, podem ser encontrados os diluentes e adulterantes no entorpecente. Todas essas substâncias são utilizadas como subsídios para obter informações sobre a forma de preparo da cocaína e seus derivados (**Figura 3**).⁴⁷

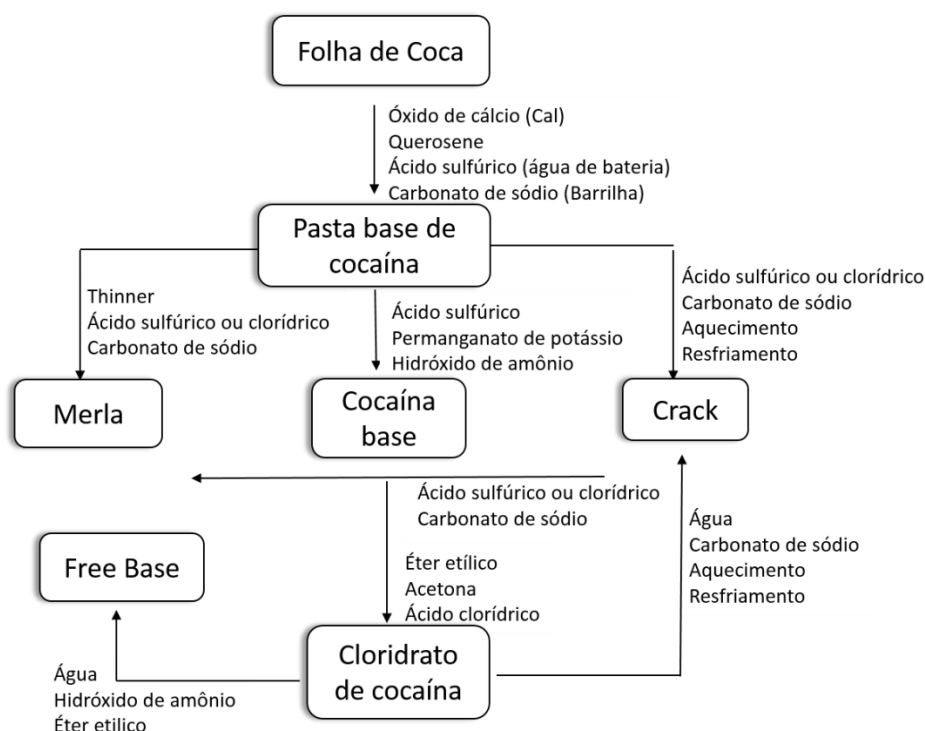


Figura 4. Etapas de obtenção e purificação de cloridrato de cocaína.⁴⁸

A cocaína pode ser consumida de diferentes formas, podendo ser aspirado sob forma de um sal, o cloridrato de cocaína, popularmente conhecido como “pó”. Este sal é solúvel em água o que permite ser consumido pela via intravenosa. Ainda, pode ser encontrada sob a forma de base, conhecida como *crack* e “merla”, que por serem pouco solúveis em água e voláteis quando aquecidas, são fumadas em “cachimbos” ou cigarros de tabaco ou maconha.⁴⁹

A **Figura 4** demonstra a cocaína em equilíbrio ácido/base formando o cloridrato cocaína e cocaína na forma de base livre. A protonação/desprotonação deve ocorrer no grupo amino do núcleo tropano.⁵⁰

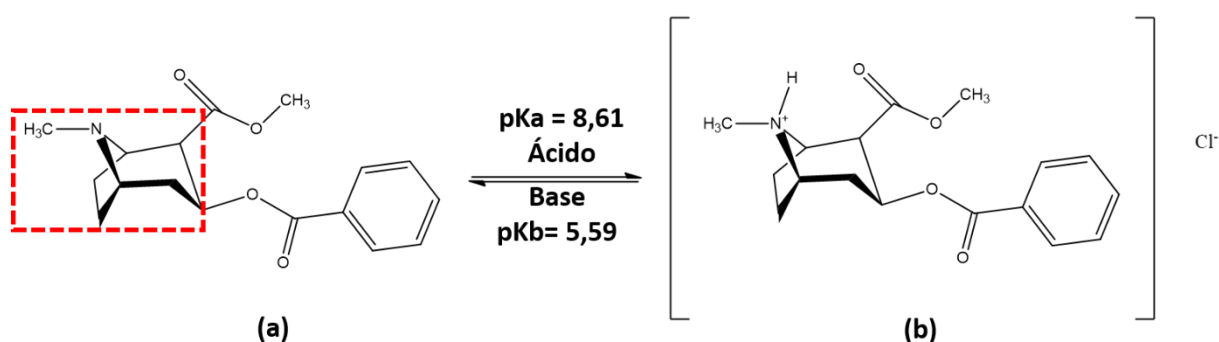


Figura 5. Estrutura da cocaína na forma de base livre (a) e na forma de cloridrato (b) em equilíbrio ácido/base com seus respectivos valores de pKa e pKb.⁴⁸

O mecanismo de ação da cocaína no SNC aumenta a liberação e prolonga o tempo de atuação de alguns hormônios como a dopamina, noradrenalina e serotonina, que atuam no cérebro. A dopamina está relacionada à situação de dependência, pois é responsável pela sensação de prazer ao se fazer uso da droga, assim como outros comportamentos que geram prazer como comer, ter relações sexuais entre outros. Além disso, está relacionada também ao comportamento motor fino (atividades que necessitam de maior precisão e coordenação motora).⁴⁶

2.2 Adulterantes

Normalmente os adulterantes são substâncias anestésicas que são adicionadas à cocaína/crack com a intenção de aumentar em volume e mitigar o mesmo efeito que a droga pura provoca ao usuário.⁵¹ A **Tabela 1** demonstra alguns adulterantes e como eles agem no SNC.

Tabela 1. Alguns adulterantes de cocaína e seus efeitos no SNC.⁴⁸

Adulterantes comuns encontrados na cocaína	Sintomas
Levamisol	Apresenta sinergia estimulante com a cocaína
Lidocaína	Anestésico Local (efeito similar a cocaína)
Procaína	Anestésico Local
Benzocaína	Anestésico Local
Cafeína	Estimulante
Ácido Bórico	Parece cocaína e age como anestésico
Hidroxizina	Anti-histamínico
Fenacetina	Analgésico relacionado ao paracetamol

A **Figura 5** ilustra a estrutura de quatro adulterantes que foram usados nesse trabalho bem como seus respectivos valores de pKa.⁵²

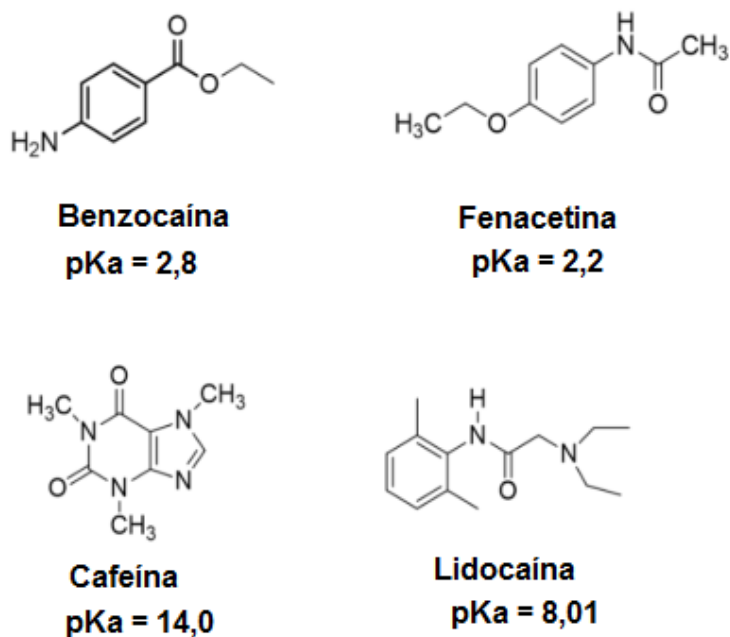


Figura 6. Estruturas dos principais adulterantes.

2.3 Cromatografia

É uma técnica de separação, que está baseada na diferenciação dos componentes de uma mistura, através de diferentes interações.⁵³ Collins (2006) traz o conceito de cromatografia como:

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela.⁵⁴

Os diferentes tipos de cromatografia diferem a partir dos tipos de interações possíveis entre os solutos e as fases estacionárias e móveis, podendo ser realizadas em uma coluna ou de forma planar.⁵⁵

A **Figura 6** demonstra um diagrama que exemplifica melhor os diversos tipos de cromatografia existentes.

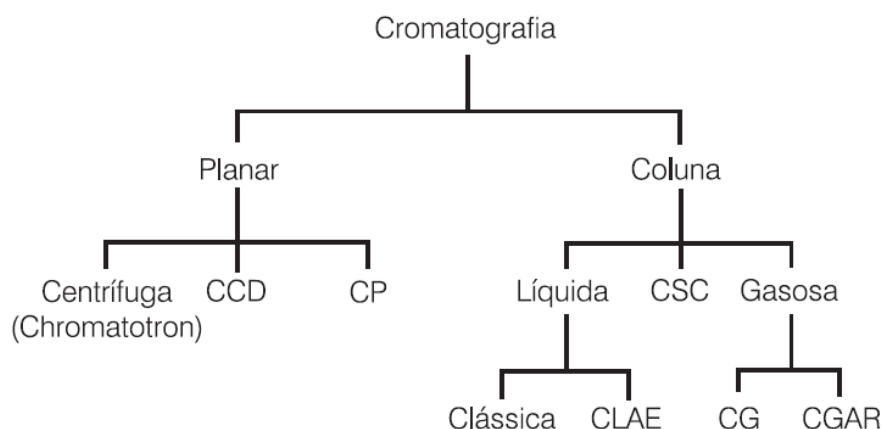


Figura 7. Diagrama dos diferentes tipos de cromatografia.⁵³

2.3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Do inglês, *thin layer chromatography*, essa técnica se baseia na adsorção líquido-sólido, onde a separação ocorre pela afinidade dos componentes do analito pela fase estacionária em relação a fase móvel.⁵³

A CCD é um método de escolha de análise e comparação de amostras, e possui como principais vantagens o curto tempo de análise e o seu baixo custo.⁵⁶ Ela é uma técnica tradicionalmente utilizada para a separação e identificação de drogas fabricadas ilegalmente.⁵⁷

O fator de retenção (R_f) é razão entre a distância percorrida pela substância estudada e a percorrida pela fase móvel, conforme **Figura 5**. É o principal parâmetro usado em CCD para determinar a eficiência de separação (seletividade) ou resolução cromatográfica⁵³ conforme ilustra a **Figura 7**.

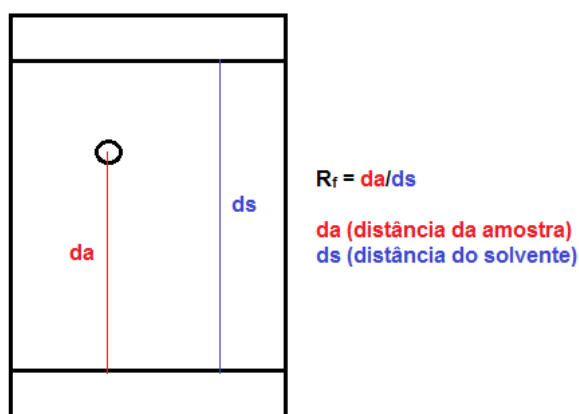


Figura 8. Cálculo do fator de retenção.

2.4 Análise estatística

No Brasil, existem duas agências credenciadoras para fiscalizar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA nº 129, de 12 de fevereiro de 2016 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de agosto/2016.^{58,59}

A curva de calibração univariada de dados é um modelo matemático que cria uma relação entre o sinal analítico e a concentração do analito, que deve resultar na melhor linearidade da análise pela minimização dos erros quadrados. O limite de detecção, LD, representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém esse parâmetro não é utilizado para a quantificação. Assim, para quantificação o limite previsto é chamado de limite de quantificação, LQ, que representa a menor concentração do analito em análise que pode ser quantificada, utilizando algum procedimento laboratorial para medição.^{60,61}

Além dessas duas figuras de méritos existe a precisão, que é um método que avalia as ocorrências nas análises e com isso, sua variabilidade, aferindo a qualidade das análises em consecutivas medidas de uma mesma amostra.⁶²

2.5 OBJETIVOS DO CAPITULO 2

2.5.1 Objetivo Geral

Aplicar a técnica de PS-MS na identificação e quantificação de cocaína a partir da análise de cromatografia em camada delgada.

2.5.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar testes com diversos sistemas de eluição para verificar a melhor resolução entre os principais adulterantes e a cocaína;
- ✓ Avaliar a sensibilidade da técnica em função da concentração.
- ✓ Identificar e quantificar a cocaína e seus principais adulterantes (cafeína, lidocaína, fenacetina e benzocaína) aliando a técnica de CCD e PS-MS.

2.6 PROCEDIMENTOS

2.6.1 Materiais e reagentes

Paras as análises de drogas ilícitas foram usadas: um padrão de referência de cocaína fornecida pela Polícia Federal do Rio Grande do Sul (PF-RS), e padrões de fenacetina, benzocaína (ambos fornecidos pela Sigma-Aldrich, São Paulo), lidocaína e cafeína anidra (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro e Bandeirante Brazmo Industria e Comercio Ltda, São Paulo, respectivamente). Os reagentes utilizados nas análises de CCD e PS-MS foram metanol grau HPLC (JTBaker), ácido fórmico a 99% RPE ACS PA (Cario Erba Reagentes), hidróxido de amónio (Sigma Aldrich), água Milli-Q, clorofórmio, ácido acético glacial e éter etílico, acetonitrila (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro).

2.6.2 Análise de Cocaína e Adulterantes por CCD e PS(+)-MS

Para a cocaína e seus adulterantes foram preparadas soluções de diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 mg.mL⁻¹) em metanol. As soluções entre 0,5 e 10,0 mg.mL⁻¹ foram preparadas a partir de solução estoque de cada padrão contendo 20,0 mg.mL⁻¹.

Inicialmente, as formas de aplicação do analito no sistema CCD foram otimizados, variando o volume de aplicação (5, 10, 15, 20 e 25 μL), a forma de aplicação (micropipeta, capilar de sílica e microseringa), e a concentração do analito (4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 14,0 e 16,0 mg mL^{-1}). Para esta etapa, foi utilizado cocaína como analito, sílica gel como fase estacionária com suporte de alumínio e metanol: NH_4OH na proporção de 99,5:0,5 v % como eluente. O sistema CCD foi eluído e revelado na câmara ultravioleta (UV) com a 254 nm.

Após a otimização do volume de aplicação (10 μL), concentração (10 mg mL^{-1}) e forma de aplicação, três diferentes eluentes foram avaliados para análise de cocaína e seus adulterantes (lidocaína, cafeína, benzocaína e fenacetina) por CCD. São eles: **i)** $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}_{\text{glacial}}$ 75:20:5 v %; **ii)** $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}:\text{CHCl}_3$ 50:50 v %; e **iii)** $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ em 100:1.5 v %. Esses três sistemas são comumente recomendados pelo manual da UNODC.⁶³ O fluxograma apresentado na **Figura 8** ilustra o procedimento experimental realizado. O último sistema composto de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$, teve a razão entre os reagentes variadas na proporção de 0.5:99.5; 1:99; 97.5:2,5; 97:3.0 e 96.5:3.5 v/v % com o objetivo de melhorar a resolução cromatográfica a partir da variação do pH do meio, **Figura 8**. Após a otimização da fase móvel, o LD da técnica de CCD foi visualmente determinado para todos os ingredientes ativos, no intervalo de concentrações de 0.5 a 14 mg mL^{-1}). As soluções entre 0.5 a 10 mg mL^{-1} foram preparadas a partir da solução estoque de 20 mg mL^{-1} .

Todas as placas foram reveladas na câmara ultravioleta (UV) a 254 nm. Os fatores de retenção (R_f) foram calculados a partir da divisão entre distância percorrida pela amostra (d_a) e a distância percorrida pelo solvente (d_s) conforme a **equação 1**:

$$R_f = d_a/d_s \quad (\text{eq. 1})$$

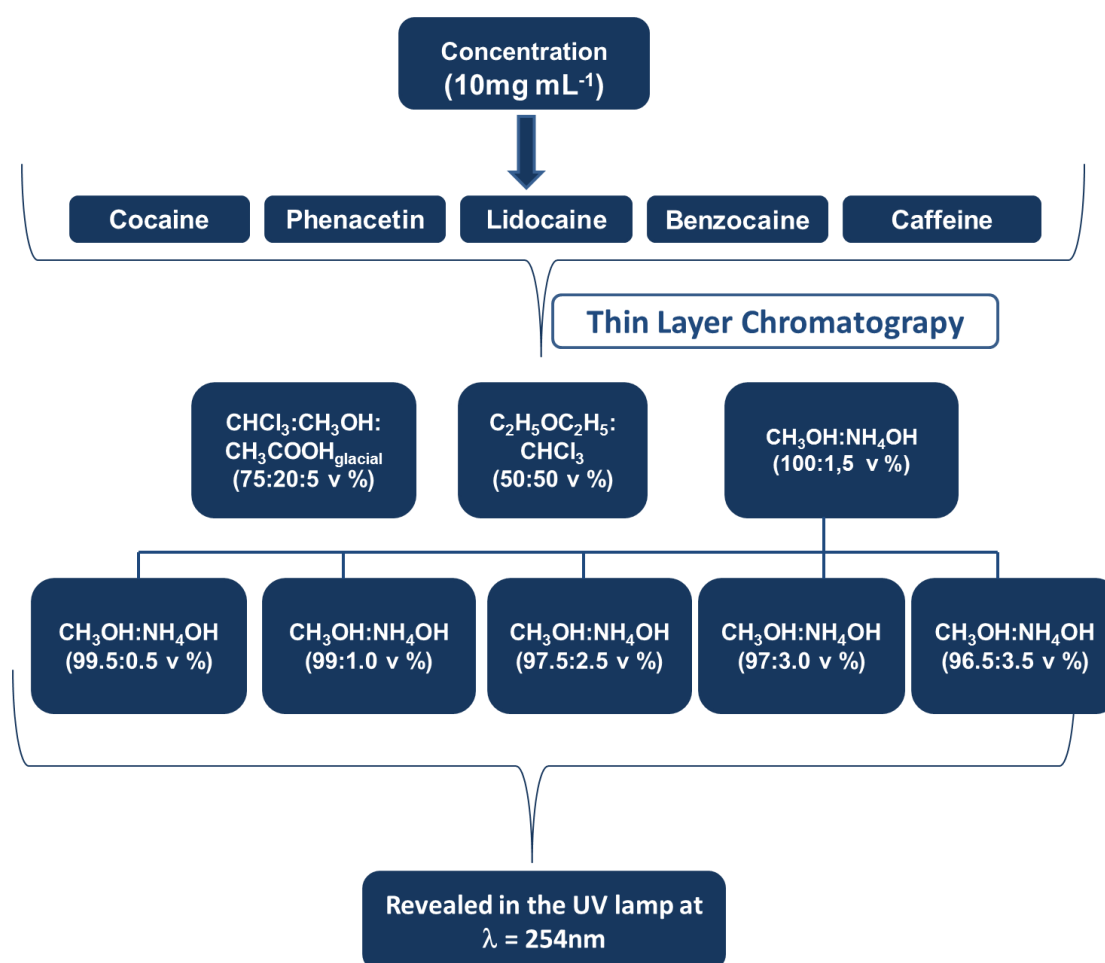


Figura 9. Sistemas de eluição de CCD avaliados para a identificação de cocaína e seus adulterantes: fenacetina, lidocaína, benzocaína e cafeína.

As análises de PS-MS foram realizadas no espectrômetro de massas LTQ XL (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com fonte de PS acoplada no modo positivo de ionização, PS(+), **Figura 9**.

Em geral, um pedaço de papel (*Whatman* Grade 1, GE Healthcare, USA) foi cortado com geometria triangular (base e altura de 1 cm) e fixado a uma garra do tipo jacaré, conectada a um fio de 0,5 mm ligado ao LTQ XL.⁶⁴ Foram utilizadas as seguintes definições: tensão no spray 3 kV, temperatura capilar = 275 °C, a tensão no capilar = 50 V. Os espectros de massa de verificação completa foram adquiridos no modo positivo sobre a faixa 100-1000 *m/z*. Posteriormente, cada *spot* do CCD contendo o analito foi resuspendido em metanol acidificado com HCOOH (0.1 % v) e 10 µL da solução resultante foi aplicado ao papel do PS(+)-MS. A montagem do protótipo da fonte de PS foi realizada seguindo a descrição de Yang *et al.* (YANG,

WANG, *et al.*, 2012). Uma das vantagens na utilização do espectrômetro de massas LTQ XL é a não necessidade da utilização de uma fonte externa de alta voltagem, pois a fonte de PS é alimentada por um potencial gerado a partir da interface da sonda que era de ESI.

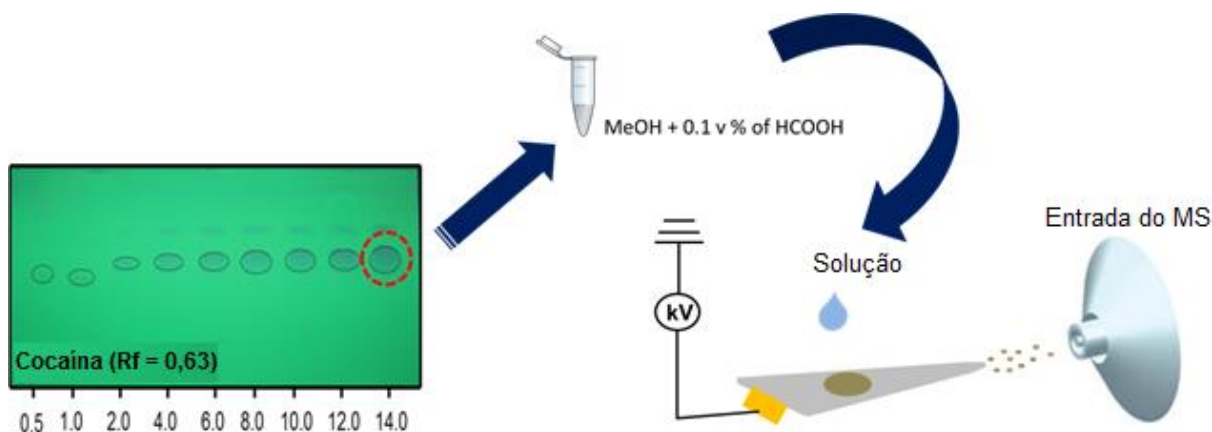


Figura 10. Ilustração do desenho experimental. Cada mancha de CCD foi transferido para um frasco com metanol e 0,1 v / v% de HCOOH. A solução resultante foi, em seguida, transferida para a fonte de PS(+)-MS.

A relação entre a intensidade do sinal (y) e a concentração de cocaína ou adulterante (x) é modelada por uma **equação 2** de primeira ordem:

$$y = ax + b \text{ (Eq. 2)}$$

Onde **b** e **a** são coeficientes lineares e angulares, respectivamente. A partir da curva de calibração o LOD foi determinada para cada substância utilizando a **equação 3**:

$$LD = k \cdot s / b_1 \text{ (Eq.3)}$$

Onde o fator **K** é número de confiança e escolhido o número de acordo com o grau desejável (geralmente $k = 3$ é aceito), **b₁** é determinado a partir da curva de calibração e **s** é o desvio padrão de dez análises do branco.

Uma outra figura de mérito que foi avaliada neste trabalho foi a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade). A repetibilidade mede o erro de uma determinação individual e são critérios importantes para julgar o desempenho de um

procedimento analítico. O desvio padrão da precisão intermediária ($\hat{\sigma}_{\text{precisão intermediária}}$) foi estimada pela **equação 4**⁶⁵:

$$\hat{\sigma}_{\text{precisão intermediária}} = \bar{R}/d_2 \quad (\text{Eq.4})$$

Onde \bar{R} é a média das razões de compostos cocaína/benzoilecgonina (304/290 m/z) a 10 mg.mL⁻¹ de uma solução de cocaína. Para este estudo, nove análises foram realizadas por PS(+)-MS utilizando sempre a mesma solução durante cinco dias consecutivos. O d_2 é um fator que depende do tamanho da amostra.²⁹ Neste estudo foi utilizado $d_2 = 2.970$, que está relacionada com o número de repetições ($n = 9$). Em seguida, uma análise de variância foi realizada para avaliar a influência do fator "dia" na repetibilidade das análises.

2.7 RESULTADO E DISCUSSÃO

2.7.1 Drogas Ilícitas: Análise de Cocaína e Adulterantes por CCD e PS(+)-MS

A fim de avaliar a melhor metodologia de aplicação do analito no sistema CCD, o formato do *spot* e seu valor de R_f foram avaliados em função do tipo de aplicador, (**Figura 10a**, micropipeta, capilar de vidro e microseringa); da variação do volume (μL) de aplicação (**Figura 10b**); e da concentração do analito (mg mL⁻¹, **Figura 10c**). Monitorando inicialmente o sistema de aplicação, um *spot* bem definido, homogêneo e uniforme é observado em todos os casos, **Figura 10a**. Portanto, qualquer um dos três sistemas podem ser empregados para análise de CCD em rotinas forenses. Quando o volume de aplicação é agora avaliado, a área do spot tem seu tamanho aumentado quando volumes $\geq 15 \mu\text{L}$ de cocaína são usadas. Esse comportamento pode ser prejudicial para análises de amostras de rua apreendidas, interferindo na resolução cromatográfica devido a problemas de coeluição. Portanto, um volume de 10 μL foi definido para todos os analitos. Apesar da técnica de CCD mostra sensibilidade analítica para todas as concentrações avaliadas (entre 4 e 16 mg mL⁻¹), a concentração de trabalho adotado foi de 10 mg mL⁻¹.

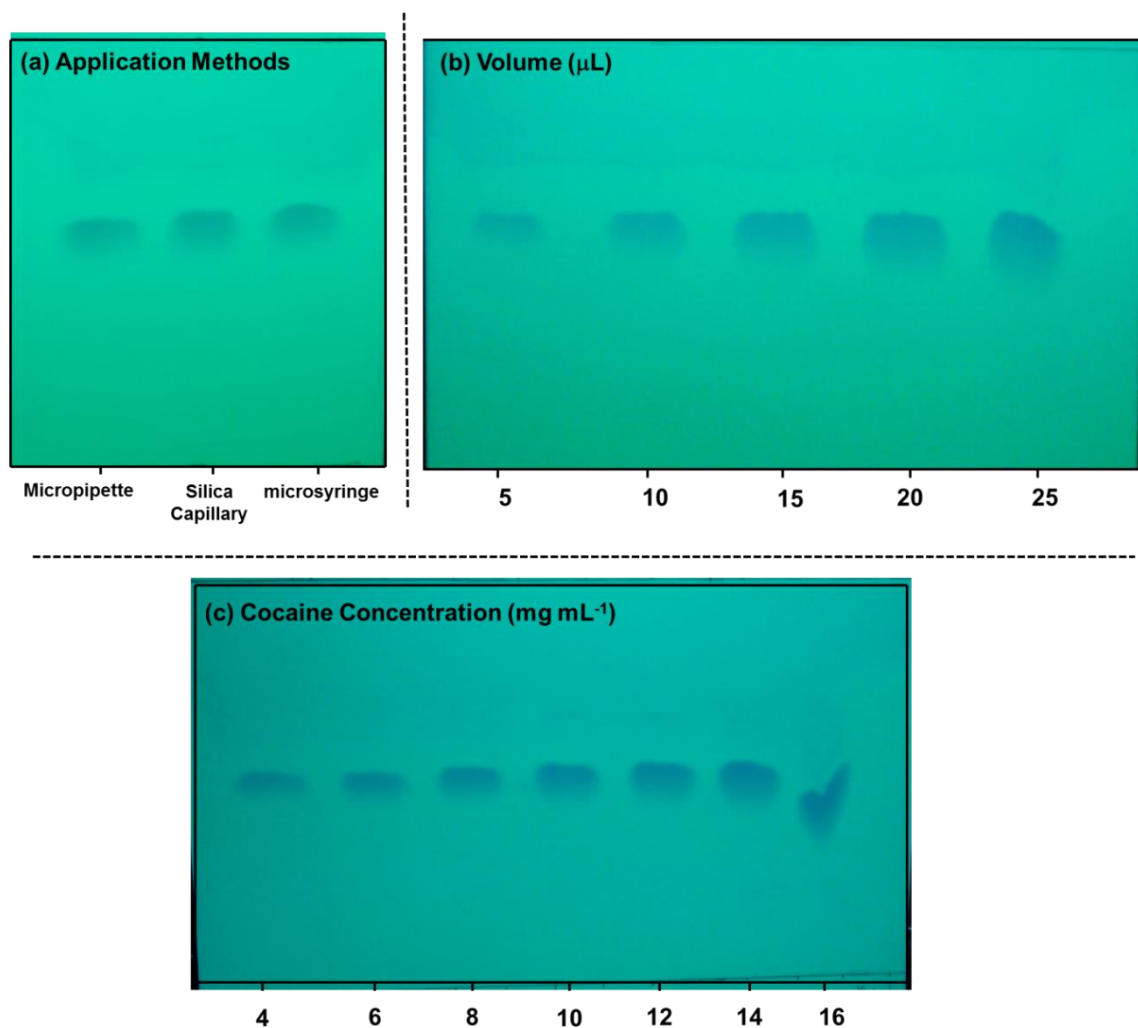


Figura 11. A Otimização do sistema de CCD variando (a) métodos de aplicação (micropipeta, capilares de sílica e micro-seringa); (b) volume (μL); e (c) concentração do analito ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A eficiência do CCD na detecção de padrões de cocaína e seus adulterantes (fenacetina, cafeína, cocaína, benzocaína e lidocaína) são avaliados agora em função de três diferentes eluentes ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{OH}$, 75:20:5 v%, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3:\text{CHCl}_3$, 50:50 v %); e $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 100:1.5 v %), **Figura 11a-c**. Todos os padrões foram preparados a 10 mg mL^{-1} em metanol, sendo aplicados no sistema CCD via capilar de sílica. Para o primeiro eluente ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{OH}$, 75:20:5 v%, **Figura 11a**), as manchas são observadas para todos os padrões, além de possuírem valores similares de R_f ($R_f = 0.71\text{-}0.76$, **Tabela 2**). Esse resultado difere ao reportado por Sabino et al.⁶⁶ Já para o sistema $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}:\text{CHCl}_3$, 50:50 v% (**Figura 11b**), uma melhor performance do sistema CCD é observado em relação a **Figura 11a**, onde as manchas são bem definidas e resolvidas e melhor

identificadas. Neste caso, entretanto, a maioria dos compostos apresentaram valores similares de R_f (R_f para 0.71 a 0.76, **Tabela 3**). A única exceção observada foi para o padrão de cocaína que apresenta $R_f = 0.63$, **Figura 11b**. Os melhores resultados são observados para o sistema CCD quando o eluente $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (100:1.5 v%) é empregado, onde distintos valores de R_f são observados para a maior parte dos compostos (R_f variando de 0.69 a 0.81), **Figura 11c** e **Tabela 3**. Um similar sistema de CCD foi também reportado por Nicola et al.⁶⁷ empregando clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio (100:20:1).

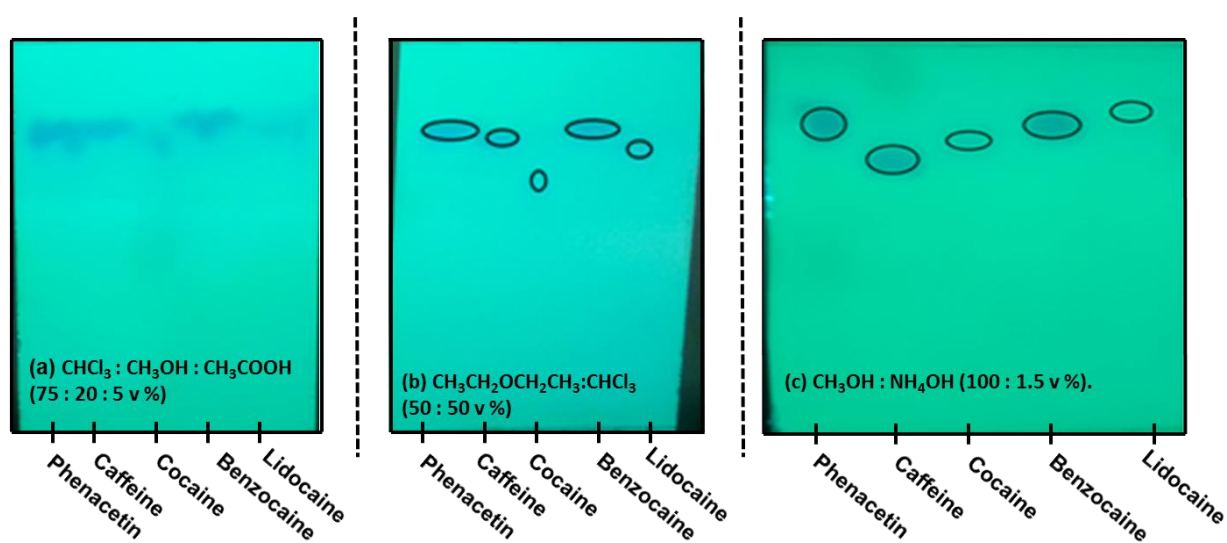


Figura 12. Placas de CCD utilizando os seguintes sistemas de eluição: (a) $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{OH}$ (75:20:5 v %); (b) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3:\text{CHCl}_3$ (50:50 %); e (c) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (100:1.5 v %).

Tabela 2. Valores de Rf para os padrões de fenacetina, cafeína, cocaína, benzocaína e lidocaína.

Padrões	CHCl ₃ :CH ₃ OH:CH ₃ OH (75:20:5 v %)	(CH ₃ CH ₂) ₂ O (50:50 v %)	CH ₃ OH:NH ₄ OH (100:1.5 v %)
Fenacetina	0.74	0.76	0.79
Cafeína	0.74	0.74	0.69
Cocaína	0.71	0.63	0.74
Benzocaína	0.76	0.76	0.78
Lidocaína	0.76	0.71	0.81

A fim de determinar melhores valores de Rf entre os analitos, aumentando assim a resolução cromatográfica, o sistema CH₃OH:NH₄OH teve a sua razão entre os solventes variada, onde a concentração de NH₄OH variou a partir de 0.5 a 3.5 % produzindo os sistemas 99.5:0.5; 99:1; 97.5:2.5; 97:3; e 96.5:3.5 v%. O sistema de CCD e os valores de Rf dos padrões são mostrados na **Figura 12** e **Tabela 3**. Note que o melhor sistema de CCD é obtido quando baixas concentrações de NH₄OH são usadas (< 1 v%). Nesta concentração, a interação entre cocaína com a fase estacionária aumenta. Isto está relacionado como fato do NH₄OH alterar o equilíbrio ácido/base da molécula, onde a cocaína, por exemplo, é mantida na forma de cloridrato quando a concentração de NH₄OH é reduzida no sistema. De maneira similar, a cafeína, que tem pka = 14 e alta polaridade, também interage principalmente com a fase estacionária. Por outro lado, os compostos lidocaína, benzocaína e fenacetina apresentam menores valores de pka (pKA ≤ 8), interagindo agora, preferencialmente com a fase móvel. Portanto, o sistema CH₃OH:NH₄OH na razão 99.5:0.5 v % foi definido como o de trabalho.

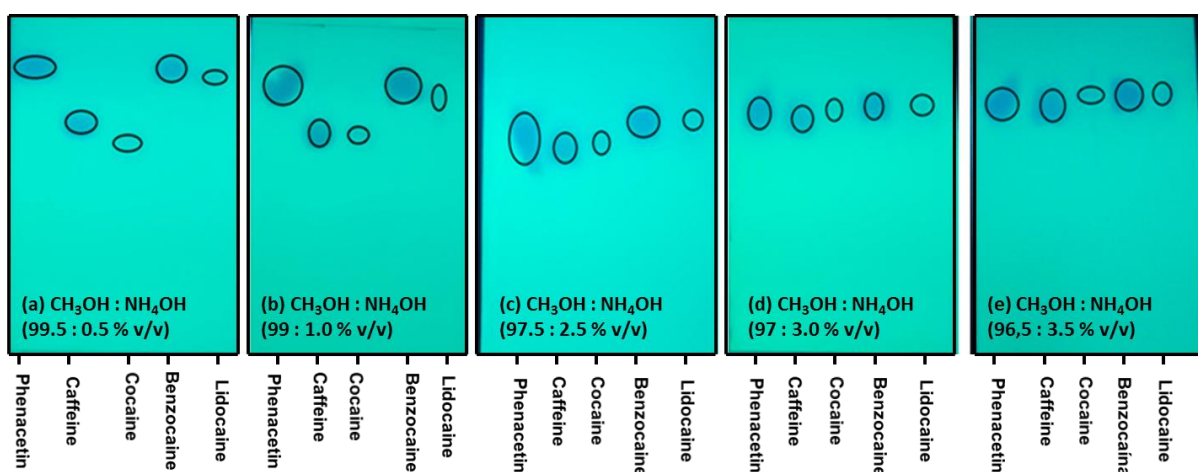


Figura 13. Variação da razão dos solventes do sistema de eluição $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ em: (a) 99.5:0.5 v%; (b) 99:1.0 v%; (c) 97.5:2.5 v%; (d) 97:3 v%; (e) 96.5:3.5 v%.

Tabela 3. Valores de R_f dos padrões para diferentes proporções da fase móvel (em % de volume) de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$.

Padrões	$\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (99.5:0.5 v)	$\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (99:1 %v)	$\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (97.5:2.5 %v)	$\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (97:3 %v)	$\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (96.5:3.5 %v)
Fenacetina	0.84	0.82	0.63	0.70	0.73
Cafeína	0.66	0.67	0.60	0.67	0.72
Cocaína	0.63	0,67	0.62	0.71	0.75
Benzocaína	0.86	0.82	0.68	0.72	0.76
Lidocaína	0.81	0.78	0.67	0.71	0.76

Com objetivo de avaliar o LOD do sistema CCD, a concentração dos analitos foi variado a partir de 0.5 a 14 mg mL^{-1} usando $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (99.5:0.5 v%) como fase móvel (**Figura 13**). Note que a fenacetina, benzocaína e cafeína se destacam por apresentar o menor LOD ($\geq 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$), enquanto que a cocaína e a lidocaína tiveram $\text{LOD} \geq 2.0$ e 4.0 mg mL^{-1} , respectivamente (**Tabela 4**).

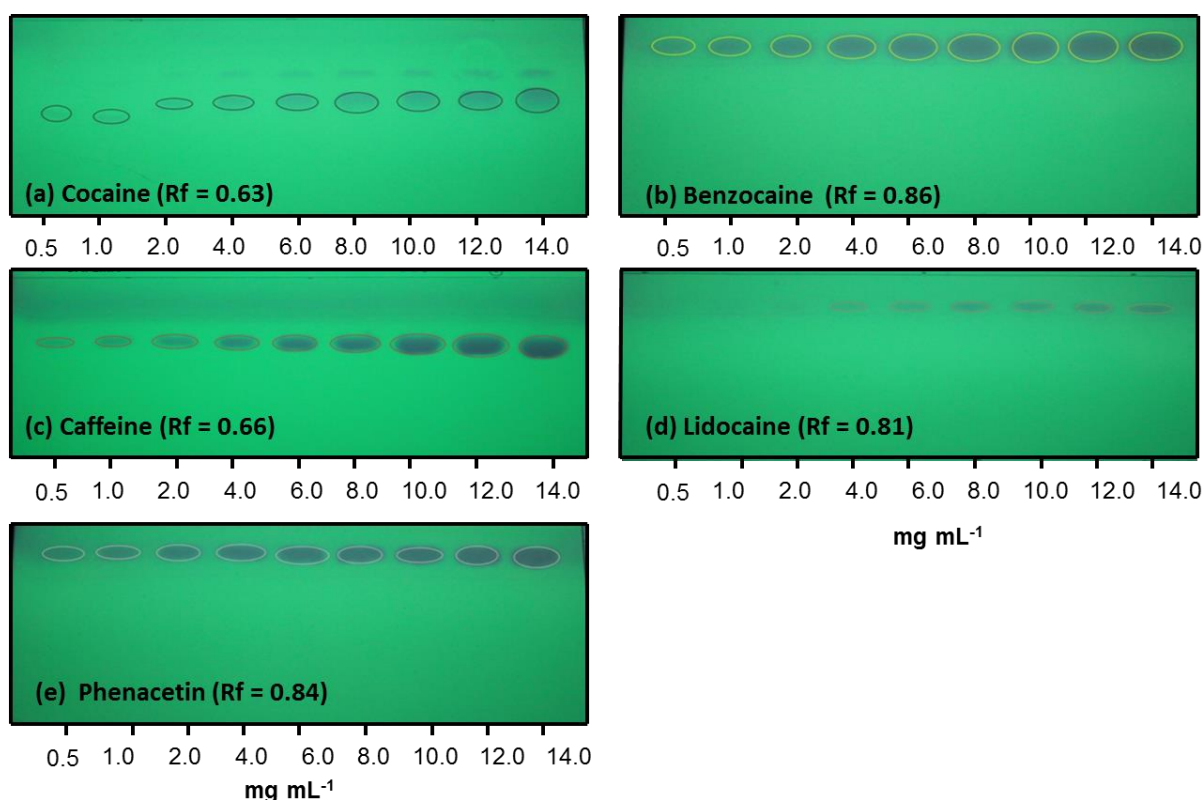


Figura 14. Variação da concentração dos padrões a partir de 0,5 a 14 mg.mL⁻¹ na CCD com o sistema CH₃OH:NH₄OH (99,5:0,5 %v).

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a seletividade da técnica de CCD, spots dos padrões foram também analisados pela técnica de PS(+)-MS. Para isto, as manchas reveladas foram extraídas e resuspendidas em metanol acidificado (0.1 v% de HCOOH). Depois o sobrenadante foi depositado sobre a superfície do papel de formato triangular com canal de parafina. Após a secagem, os analitos foram analisados pela técnica de PS-MS em função de sua concentração (0.5, 4, 10 e 14 mg mL⁻¹), **Figura 14**.

A **Figura 14** ilustra os espectros dos padrões de cocaína, benzocaina, cafeína, lidocaína e fenacetina. Em geral a benzocaina, cafeína e lidocaína são detectados como molécula protonada, cátion [M+H]⁺ de *m/z* 166, 195, e 235, enquanto a fenacetina é detectada como molécula cátion [M+H]⁺ *m/z* 180 e aduto de sódio, [M+Na]⁺ de *m/z* 202. Já para o padrão de cocaína fornecido pela PC-ES, houve a identificação de um derivado da cocaína, a benzoilecgonina, [M +H]⁺ *m/z* 290, um produto da degradação de cocaína. A Estrutura e conectividade dos analitos

foram confirmados a partir de experimentos de collision induced dissociation (CID) e os espectros de PS(+) MS/MS são ilustrados na **Figura 15**.

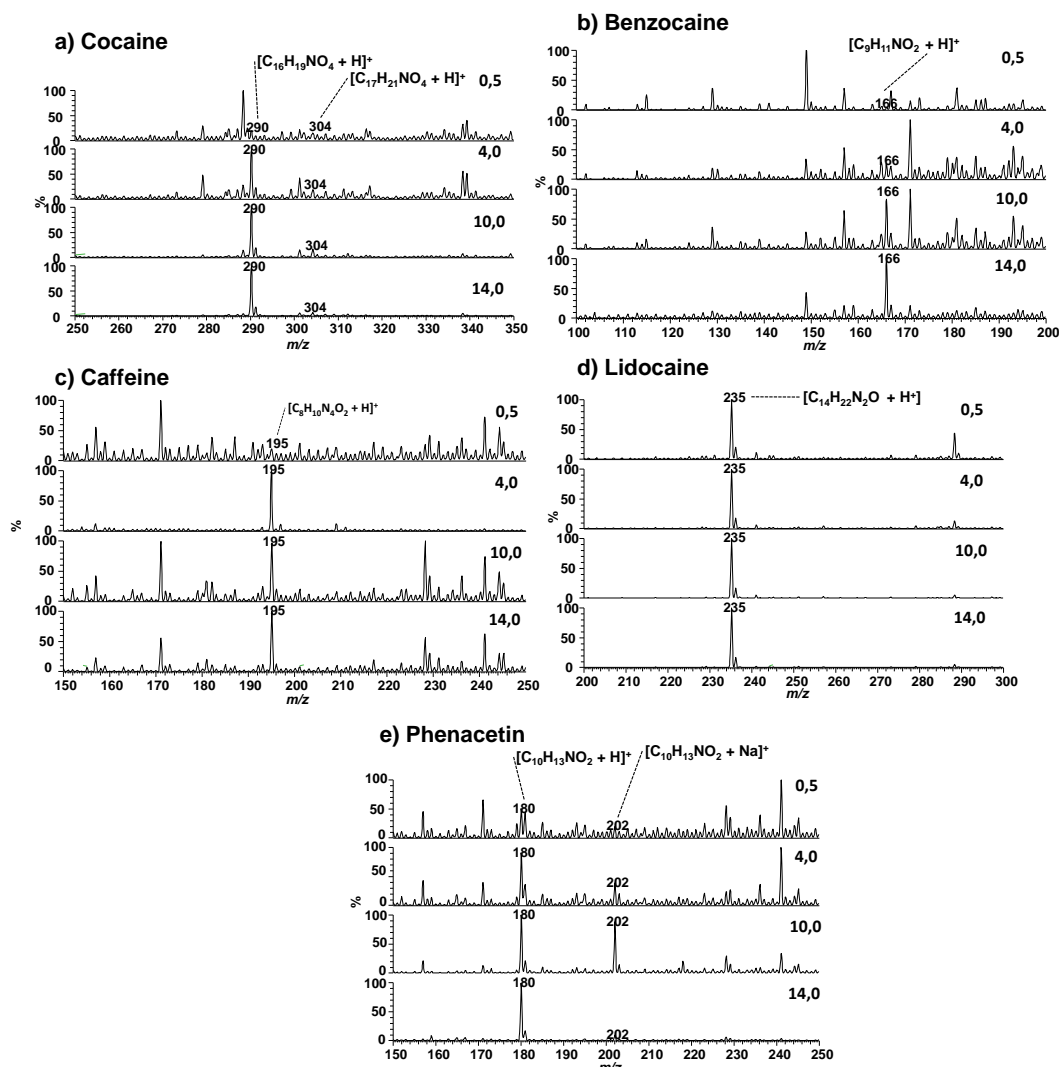


Figura 15. Espectros de PS(+)-MS dos padrões benzocaína, cafeína, lidocaína, fenacetina e cocaína em função da concentração: 0,5; 4,0; 10,0 e 14,0 mg mL⁻¹.

A cocaína (m/z 304), **Figura 15a**, é caracterizada pela perda de $C_7H_6O_2$ levando a formação do íon de m/z 182. A Benzocaina (m/z 166), **Figura 15b**, apresenta duas perdas neutras. A primeira de C_2H_2 leva a formação do íon m/z 138, já a segunda, uma perda de H_2O gera o íon m/z 120. O espectro de PS(+)-MS/MS da cafeína, **Figura 15c**, é caracterizado pela perda de H_2O formando o íon m/z 177, que por uma perda subsequente de CO forma o íon m/z 149. A perda de HCN a partir do íon de m/z 177 leva a formação do íon m/z 150. É observado minoritariamente também duas perdas consecutivas de CHO levando a formação

primeiramente do íon m/z 163 e em seguida o íon m/z 133. A lidocaína, **Figura 15d**, é caracterizada pela fragmentação de $C_9H_{10}NO$ formando o íon m/z 86. Já a fenacetina, **Figura 15e**, é caracteriza-se pela perda de H_2O levando a formação do íon de m/z 162, e pela perda de C_2H_4 formando o íon m/z 152. A principal rota de fragmentação da fenacetina é a perda de C_2H_2O formando o íon de m/z 138 que por sua vez perde etileno levando ao íon m/z 110. Finalmente, a benzoilecgonina, produto de hidrólise da cocaína, **Figura 15f**, é caracterizada pela perda de H_2O formando o íon de m/z 272 e por uma perda similar a cocaína, $C_7H_6O_2$ que leva ao íon m/z 168.

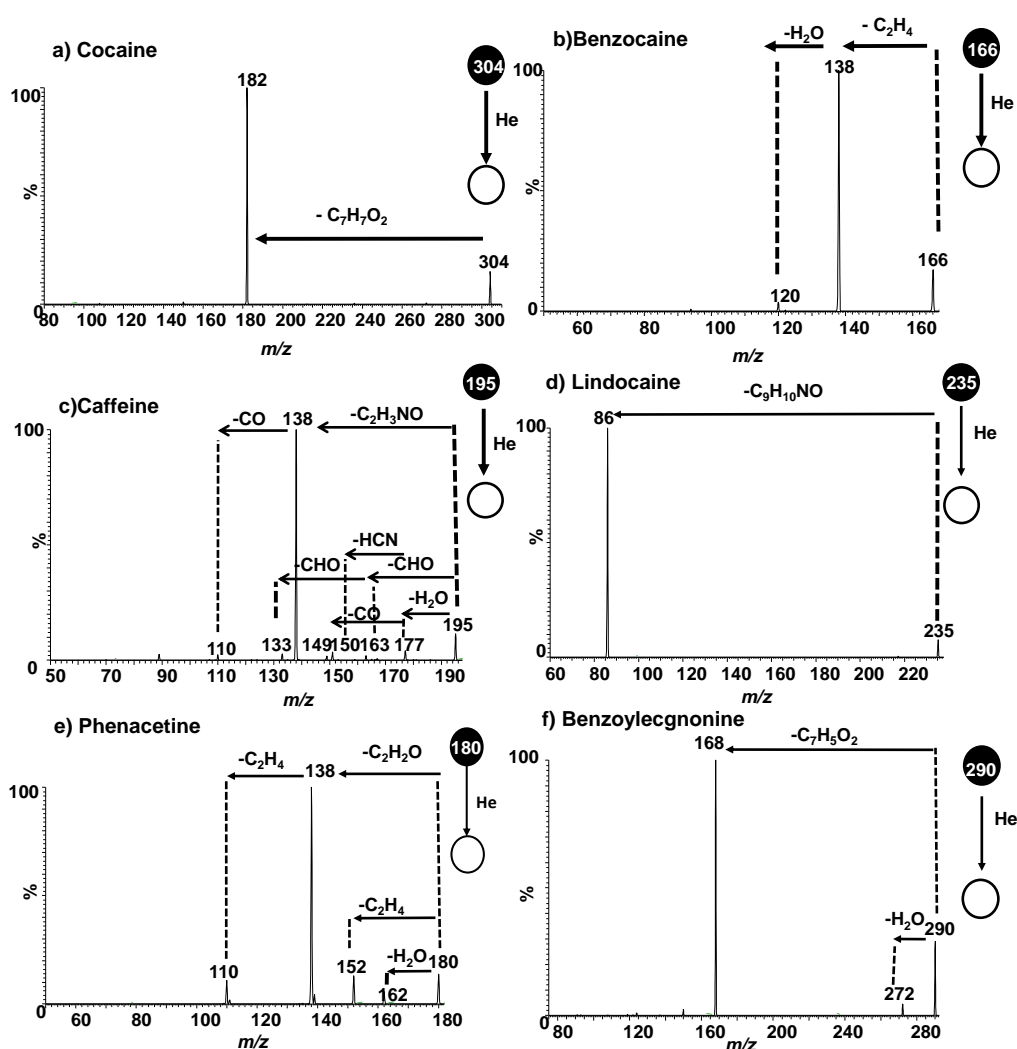


Figura 16. PS(+)-MS/MS para os padrões de (a) benzocaína, (b) cafeína, (c) lidocaína, (d) fenacetina e (e) cocaína.

A habilidade da técnica de PS(+)-MS para quantificar cocaína e seus adulterantes foi avaliado partir da construção de curvas em função da concentração

do analito, onde a linearidade e o LOD foram reportados, **Figura 16 e Tabela 5**. As curvas de calibração construídas para as amostras mostra excelente linearidade (cocaína ($R^2 = 0,9989$), benzocaína, ($R^2 = 0,9934$), a cafeína ($R^2 = 0,9988$), a fenacetina ($R^2 = 0,9966$), e a lidocaína ($R^2 = 0,9987$)) e LOD inferior ao da técnica de CCD. A técnica de PS(+)-MS pode ser usado também para a identificação e quantificação de ingredientes ativos presentes em spots de CCD de amostras de cocaína e crack apreendidas pela polícia forense, eliminando assim, resultados falso-positivos. Além disso, devido a sua enorme simplicidade, a técnica de PS(+)-MS pode ser acoplado diretamente a outras técnicas de separação como a cromatografia em papel e para análise de selos de LSD e drogas sintéticas.

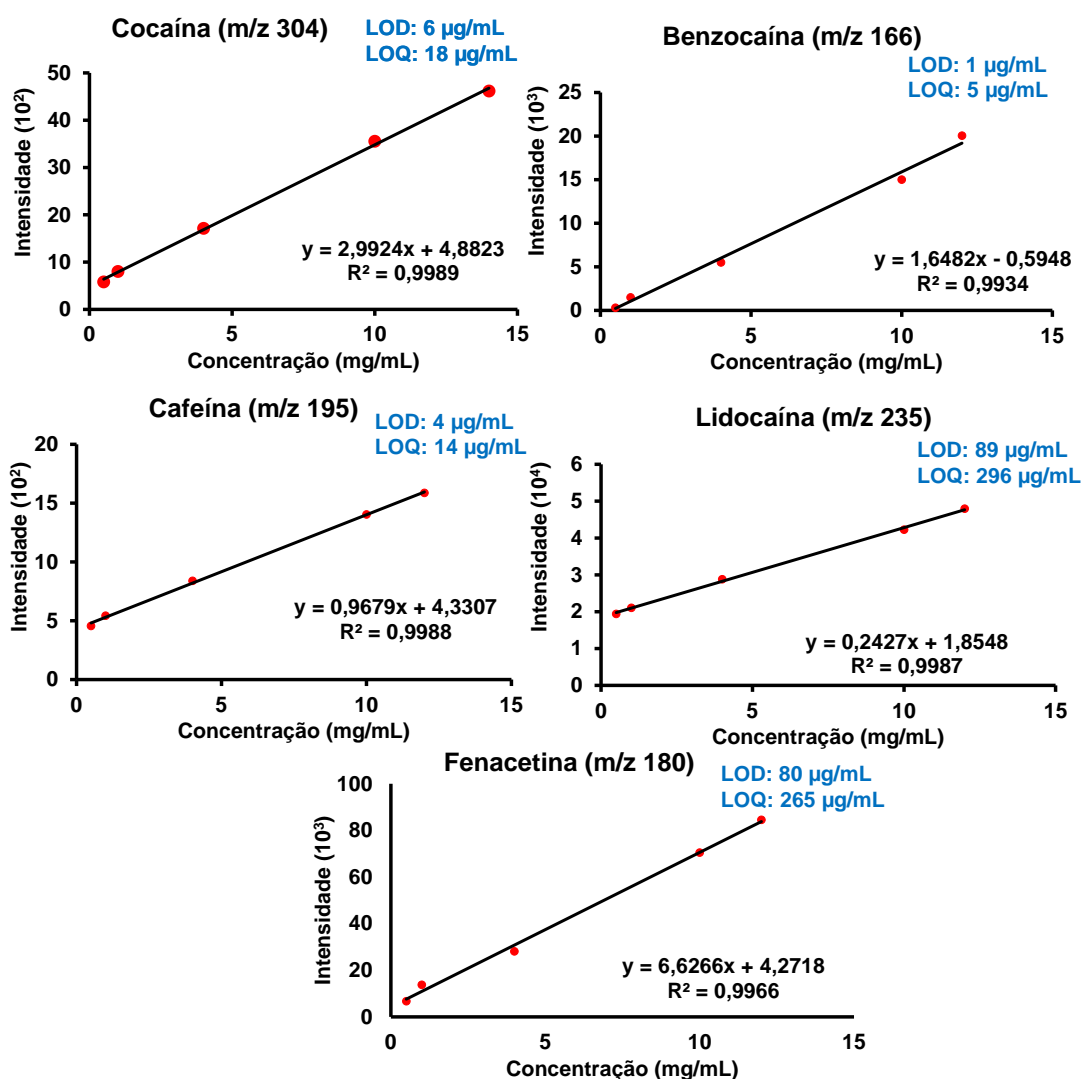


Figura 17. Curvas de calibração para a cocaína, benzocaína, cafeína, lidocaína e fenacetina.

Tabela 4. LOD observada na CCD e calculada para o PS(+)-MS para cada padrão

Amostra	TLC (mg.mL ⁻¹)	PS(+)-MS (µg.mL)
Cocaína	0.5	6.0
Cafeína	0.5	4.0
Fenacetina	0.5	80.0
Benzocaína	0.5	1.0
Lidocaína	4.0	90.0

Para monitorar a precisão do método, consideramos a razão da intensidade relativa de cocaína/benzoilecgonina (m/z 304/290) detectado nas nove análises. A **Tabela 6** ilustra esses valores, onde o valor estimado do padrão de repetibilidade. A **Tabela 7** descreve os testes de variancia realizados no Excel. Nota que, se a variância dos resultados nos cinco dias é pequena, uma alteração insignificante em resultados entre análise é feita no mesmo dia. Portanto, a técnica PS(+)-MS mostra uma boa repetibilidade. A variancia mede a variação total de um dado sistema e compara-a com a variação total para determinar se tal medição é viável.

Tabela 5. Valores de sinais proporção de m / z 304/290 correspondente à cocaína / benzoilecgonina obtido por PS (+) análise por MS de nove repetições de cinco dias diferentes

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

Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA) dos resultados individuais obtidos em cinco dias diferentes por PS (+) MS da relação de cocaína / benzoilecgonina.

Dia	n	Soma	Média	Variância
1	9	0.44	0.05	0.0006
2	9	2.24	0.25	0.0306
3	9	0.94	0.10	0.0060
4	9	0.42	0.05	0.0018
5	9	0.34	0.04	0.0005
Fonte	SQ ^a	DF ^b	MQ ^c	
Entre os grupos	0.28	4	0.07	
Dentro dos grupos	0.32	40	0.008	
Total	0.6	44		

^aSQ = soma dos quadrados. ^bDF = graus de liberdade, ^cMQ = mean square.

2.8 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 2

As análises de CCD acoplada ao PS-MS permitiram a detecção de cocaína e seus adulterantes obtendo ótimas linearidades (cocaína ($R^2 = 0,9989$), benzocaína, ($R^2 = 0,9934$), a cafeína ($R^2 = 0,9988$), a fenacetina ($R^2 = 0,9966$), e a lidocaína ($R^2 = 0,9987$)) e LOD inferior ao da técnica de CCD. O método desenvolvido neste trabalho abre perspectivas de aumentar a confiabilidade da CCD tradicional e rotina de análises empregados nas unidades de perícia penal, eliminando, assim, resultados falsos positivos. Maior sensibilidade, selectividade e rapidez pode ser fornecida no relatório forense, além de permitir a análise quantitativa. Devido à sua grande simplicidade, o PS(+)-MS técnica também pode ser acoplado diretamente a outras técnicas de separação, tais como cromatografia em papel, e ser usado para as análises em outras matrizes, auxiliando ainda mais o trabalho de rotina pericial.

3 CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE WHISKIE E CERVEJA POR PS-MS.

3.1 Bebidas alcóolicas

O Art. 12 da Lei nº 8.918, em seu segundo inciso diz que bebida alcoólica é a bebida com graduação alcoólica acima de 0,5 à 24 % v/v a 20°C e as classifica em:

a) bebida alcoólica fermentada: é a bebida alcoólica obtida por processo de fermentação alcoólica; **b) bebida alcoólica destilada:** é a bebida alcoólica obtida por processo de fermento-destilação, pelo rebaixamento do teor alcoólico de destilado alcoólico simples, pelo rebaixamento do teor alcoólico do álcool etílico potável de origem agrícola ou pela padronização da própria bebida alcoólica destilada; **c) bebida alcoólica retificada:** é a bebida alcoólica obtida por processo de retificação do destilado alcoólico, pelo rebaixamento do teor alcoólico do álcool etílico potável de origem agrícola ou pela padronização da própria bebida alcoólica retificada; **d) bebida alcoólica por mistura:** é a bebida alcoólica obtida pela mistura de destilado alcoólico simples de origem agrícola, álcool etílico potável de origem agrícola e bebida alcoólica, separadas ou em conjunto, com outra bebida não-alcoólica, ingrediente não-alcoólico ou sua mistura.⁶⁸(BRASIL, 2009)(BRASIL, 2009)

Aquarone; Lima e Borzani (1983) definem bebida alcóolica como bebida refrescante, coquetel (mistura de bebidas), substância líquida, sem fins medicinais e que possui acima de meio grau de etanol.⁶⁹

Segundo Passagli (2013) devem ser levados em consideração quatro pontos para se realizar o estudo do álcool: a) a disponibilidade da droga, visto que a principal fonte de obtenção é natural, sendo de fácil produção em qualquer lugar do mundo b) de ser uma substância lícita, mesmo que tenha leis próprias que regem consumo e produção, os usuários dessa droga tem um livre acesso ao consumo; c) fornecimento de energia (um grama de álcool equivale a aproximadamente oito quilocalorias); e d) ampla divulgação da mídia, que não classifica a bebida alcóolica como uma droga de fato.^{Erro! Indicador não definido.} Dentre as bebidas alcóolicas mais consumidas está aquelas que possuem menor valor agregado, como cerveja, cachaça e algumas marcas de *whisky*.⁷⁰

3.1.1 Cerveja

O Art. 36. da Lei nº 8.918, juntamente com a Normativa 54 de cinco de novembro de 2001, definem cerveja como a fermentação alcoólica do mosto

cervejeiro proveniente de malte de cevada e água, mediante a ação de levedura, acrescido de lúpulo.

Além disso, a cerveja deve ser classificada quanto ao extrato primitivo (cerveja leve, comum, extra e forte) quanto à cor (clara e escura), quanto ao teor alcoólico (sem álcool e com álcool) quanto à proporção de malte de cevada (cerveja puro malte, cerveja, cerveja proveniente de algum vegetal) e quanto à fermentação (baixa e alta fermentação).^{68,71}

De acordo com a legislação brasileira cerveja também é dividida em tipos como é descrito no Art. 39 do Decreto Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009.

Art. 39. De acordo com o seu tipo, a cerveja poderá ser denominada: Pilsen, Export, Lager, Dortmunder, Munchen, Bock, Malzbier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, Alt e outras denominações internacionalmente reconhecidas que vierem a ser criadas, observadas as características do produto original.⁶⁸

Ainda que a produção seja feita a partir de matéria prima semelhante, o produto final (cerveja) pode possuir gostos diferentes. Essa diferença vem principalmente da constituição das substâncias presentes na produção, como água mineral, as variações dos ingredientes e distintos métodos que dão origem a subtipos de cervejas.⁷²

Neste trabalho, apenas as cervejas do tipo *lager* e *pilsen* serão utilizadas. Araujo (2005) define a cerveja *lager* como aquela de “baixa fermentação” onde as leveduras formam flocos que permanecem na parte de baixo do tanque fermentador; e a cerveja *pilsen* como aquela de coloração mais claras, possuindo um teor alcoólico médio, e com um sabor mais amargo.⁷³

3.1.2 Cachaça – água ardente

No Brasil, a cachaça é o destilado mais consumido e ocupa o segundo lugar entre as bebidas alcoólicas, estando atrás apenas da cerveja.⁷⁴

A aguardente, do Art. 51. Da Lei nº 8.918, é definida como a bebida com graduação alcoólica entre 38 e 54% em volume, a 20 °C, adquirida do rebaixamento do teor alcoólico do destilado alcoólico simples, ou pela destilação do mosto fermentado. O art. Art. 53. relata que a cachaça é a designação característica e

específica da aguardente de cana produzida no Brasil, podendo ser acrescentada açúcares com até seis gramas por litro, expressos em sacarose.⁶⁸

A cachaça vem se tornando um importante produto do agronegócio brasileiro devido a maior qualificação da cadeia produtiva da bebida nos últimos anos.⁷⁴

3.1.3 Whisky

No Art. 94 da Lei nº 8.918 traz que Uísque, "whisky ou whiskey" é a bebida com teor alcoólico de 38 a 54% em volume, a 20 °C, adquirida do destilado alcoólico simples de cereais envelhecido. A sua produção pode ser completa ou com porcentagens maltadas, além de ter a possibilidade de adicionar álcool etílico agrícola, ou destilado alcoólico simples de cereais, assim como, de água para diminuição do teor alcoólico e de caramelo (o último é usado para acertar a cor).⁶⁸

O processo de fabricação de whisky envolve as etapas de: maltagem, moagem, maceração, destilação, fermentação e envelhecimento. Os quatro últimos estágios são os mais importantes, pois ocorre a conversão do amido do cereal em açúcar, e logo depois, a transformação em álcool, denominado de "mosto fermentado de cereais". O mosto passa por até três destilações simples sucessivas até originar um líquido transparente. A destilação do mosto produz um tipo de destilado alcoólico de cereais (maltado, se o cereal for à cevada) que é encaminhado para o envelhecimento em barris de carvalho, etapa final da produção.⁷⁵

Além disso, a legislação brasileira classifica o whisky nas seguintes denominações: I. whisky puro de malte: whisky feito, exclusivamente, com destilado de malte envelhecido com o coeficiente de congêneres não inferior a trezentos e cinquenta miligramas por cem mililitros em álcool anidro; II. blended whisky ou whisky cortado: é a bebida resultante da mistura de 30% de destilado de malte envelhecido com destilados alcoólicos de outros cereais, envelhecido ou não com o coeficiente de congêneres não inferior a cem miligramas por cem mililitros, em álcool anidro; III. grain whisky ou whisky de cereais: a partir de cereais reconhecidos internacionais, sacarificados, total ou parcialmente, por diástases (enzimas que atuam sobre o amido) da cevada maltada, adicionada ou não de outras enzimas

naturais e destilada em alambique ou coluna, envelhecido por um período mínimo de dois anos com o coeficiente de congêneres não inferior a cem miligramas por cem mililitros, em álcool anidro; e **IV. *bourbon whisky***: quando o uísque for produzido nos Estados Unidos da América de acordo com a sua legislação.⁷¹

3.2 Quimiometria

A quimiometria utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para extrair maior informação de dados químicos. Uma das principais aplicações desta área, é a calibração multivariada de dados que normalmente envolve o uso de um tipo de medida instrumental para predizer o valor de um parâmetro de base ou propriedade.⁷⁶

Atualmente, regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) tem sido um dos métodos mais aplicado para calibração multivariada em química analítica. Essa ferramenta matemática utiliza uma matriz de dados, onde a matriz X tem os resultados das análises e em Y as variáveis.⁷⁷

Além disso, outra ferramenta muito utilizada é análise de componentes principais (PCA), que consiste em uma transposição da matriz de dados com objetivo diminuir as variações presentes na matriz original, em um menor número de componentes.⁷⁸

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo Geral

Aplicar a técnica de PS-MS para análises de whiskies e cervejas.

3.3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar a falsificação controlada de *whisky* com cachaça a partir do volume de cachaça adicionado na blenda por PS-MS e avaliar quantitativamente essa adulteração usando regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).
- ✓ Utilizar a fonte ambiente PS-MS para discriminar 10 marcas de cervejas nas classificações entre o tipo *pilsen* e *lager* a partir de análise de componentes principais (PCA);

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Materiais e reagentes

Foram utilizadas para as análises de drogas lícitas: dez marcas de cervejas, uma marca de whisky e uma de cachaça. Todas as bebidas foram adquiridas em mercado local. Para as amostras de cerveja foi feito um fracionamento produzindo quatro distintas frações. Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) da marca Chromabond® C18ec (6 mL, 500 mg) foram obtidos da Macherey-Nagel (Duren, Germany), largura do poro 60 Å, tamanho de partícula 45 µm.

Os reagentes utilizados nas análises de SPE e PS-MS foram metanol grau HPLC (JTBaker), água Milli-Q, acetonitrila (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro).

3.4.2 Análise de bebidas por SPE e PS(±)-MS

Foram analisadas 10 marcas de cerveja e suas descrições são mostradas na **Tabela 2**. Em geral, 20 mL de cada amostra foi adicionada a um béquer de 100 mL e degaseificada usando um banho de ultrassom durante 5 min, para eliminar o CO₂. Após a degaseificação, as amostras foram armazenadas em vidro âmbar na geladeira.

Tabela 7. Marcas de cervejas exploradas no trabalho bem como o teor alcoólico e classificação entre *Pilsen* e *Lager*.

Código da amostra	Cerveja	Característica*	Teor alcoólico
Marca 1	Skol®	Pilsen	4,7%
Marca 2	Itaipava®	Pilsen	4,5%
Marca 3	Bohemia®	Pilsen	5,0%
Marca 4	Serramalte®	Pilsen	5,5%
Marca 5	Original®	Pilsen	5,0%
Marca 6	Brahma®	Pilsen	4,8%
Marca 7	Proibida®	Pilsen	4,0%
Marca 8	Budweiser®	Lager	5,0%
Marca 9	Kaiser®	Lager	4,5%
Marca 10	Devassa®	Lager	4,8%

*Informação oriunda do rótulo

Inicialmente, o cartucho de SPE foi previamente ativado usando 5 mL de metanol e posteriormente, 5 mL de água destilada. O cartucho foi carregado com 5 mL de cerveja degaseificada e o primeiro extrato coletado. Depois, o cartucho foi recarregado com 5 mL de água destilada e o 2º extrato foi coletado. Para a produção do 3º extrato, o cartucho foi preenchido com 2 mL de uma solução contendo água:metanol (75:25 %v) e, finalmente, para a produção do quarto extrato, 2 mL de metanol foi usado para eluir o cartucho. A **Figura 17** ilustra o procedimento realizado na extração das frações, sendo a metodologia usada adaptada de DENG et al.⁷⁹

Com objetivo de aumentar a concentração dos metabólitos presentes no último extrato, **Figura 17d**, 500 µL da solução foram pipetados e o solvente evaporado por aproximadamente 15 dias a temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 250 µL de ACN ao extrato restante. Todos os quatro extratos foram analisados no PS-MS em modo positivo de ionização, PS(+)-MS.

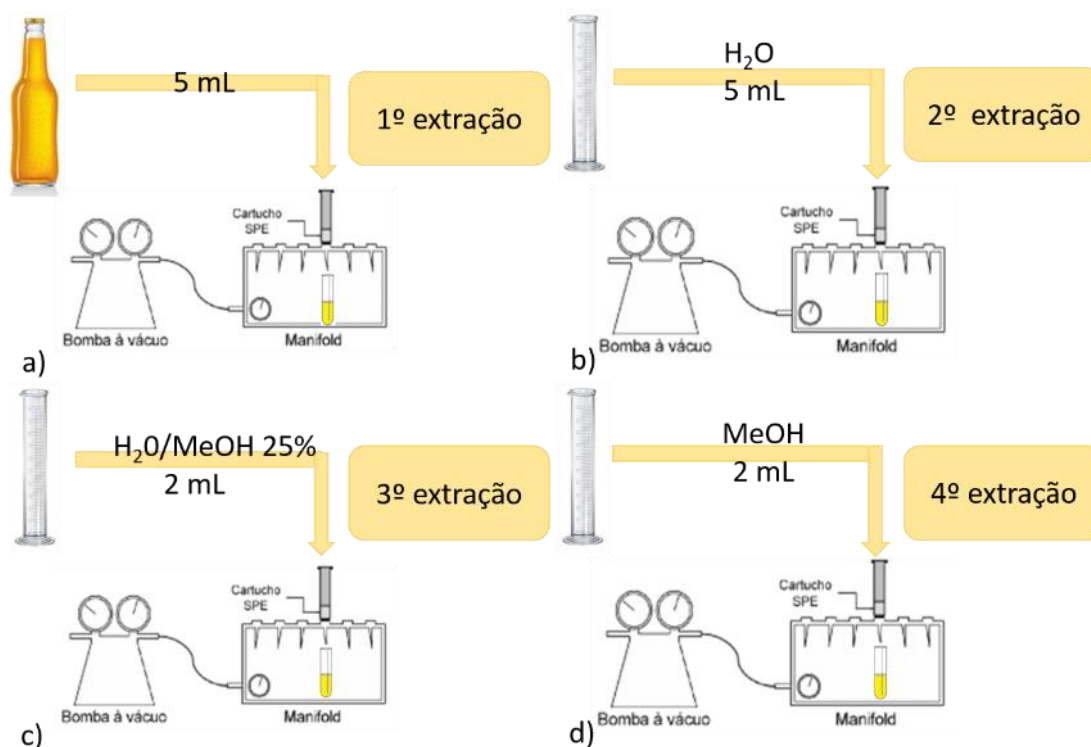


Figura 18. Extração de cerveja utilizando Chromabond® C18ec cartucho de SPE com água/metanol.

Além das análises de cervejas, misturas binárias de whisky/cachaça foram avaliados por PS-MS em ambos os modos de ionização, PS(±)-MS. A formulação das misturas binárias contendo whisky-cachaça foram preparadas usando 19 concentrações (0; 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 95; 97; 99; 99,5 e 100 wt % de cachaça), atingindo uma massa final de 1 g.

Para as blends de whisky e cachaça foi aplicado 10 µL da solução em papel cromatográfico para a análise de PS(±)-MS, conforme demonstrado na **Figura 18b**. Em seguida foi aplicada um modelo de regressão linear (PLS) para uma quantificação de adulteração com cachaça.

Para PS(±)-MS, a análise dos extratos de cerveja foram aplicados sobre a superfície de um papel (Whatman Grade 1, GE Healthcare, EUA) no formato triangular com as dimensões 7 mm x 12 mm. O papel foi fixado a um clipe de metal, ligado a um fio de 3-5 mm ligada à entrada de MS. Foi aplicado uma tensão elevada (-3,8 kV). O *ion time accumulation* foi 0,060 s e os espectros de PS-MS foram adquiridas utilizando 16 scans no domínio do tempo em 512k. Um poder de

resolução, $m/\Delta m_{50\%} = 62\ 762$ (em que $m_{50\%}$ é a largura do pico integral na meia-altura máxima de pico de m/z 318) e uma precisão massa de < 2 ppm.

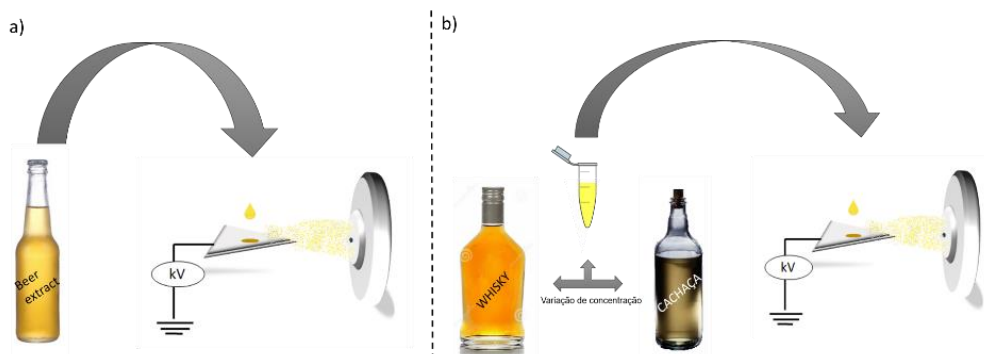


Figura 19. Ilustração da metodologia experimental. a) Foram aplicados 20 μL de cada extrato das cervejas no papel triangular e submetidos a ionização no PS-MS. b) Após as variações de concentração com whisky e cachaça a solução resultante foi aplicada a 10 μL no papel triangular e feita a ionização no PS-MS.

Para classificar as amostras de cerveja, após a obtenção do perfil químico por PS(+)MS, foi utilizado a Análise de Componentes Principais (PCA). As matrizes de dados foram construídas utilizando apenas os dados dos espectros PS(+)MS do último extrato (extrato 4). Para a construção de cada matriz foram considerados os sinais com intensidade relativa maior que 10% obtendo um total de 845 variáveis (valores de m/z). Uma matriz 20 X 845 foi construída e foi utilizado o MATLAB 7.0 (R2013a) para realizar o pré-tratamento de dados (centrando os valores na média) bem como a PCA.

Para a criação do modelo de quantificação de cachaça em *whisky* foi utilizada a regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) com a utilização de *repeated double cross validation*. As matrizes de dados foram construídas utilizando os dados dos espectros PS(\pm)MS. Para a construção de cada matriz foram considerados os sinais com intensidade relativa maior que 1%. Os dados foram obtidos em triplicata obtendo uma matriz de 19 X 2793 para o PS(+)MS e 19 X 11789 para o PS(-)MS. As linhas da matriz foram preenchidas pelas concentrações de cachaça em *whisky* e suas respectivas intensidades referente a cada coluna. Foi utilizado o MATLAB 7.0 (R2013a) para realizar a curva foi escolhido 7 e 8 variáveis latentes para positivo e negativo respectivamente.

3.5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Para a análise de cerveja, inicialmente, foi analisado a amostra *in natura* via PS(+)-MS, **Figura 19**. Em geral, o perfil químico dos espectros de PS(+)-MS para as amostras de marcas diferentes são similares. Os principais íons identificados foram: oligossacarídeos com aduto de potássio (m/z 381, 543 e 705 $[M + K]^+$) correspondendo a maltose, maltotriose e maltotetrose, respectivamente. Essas espécies estão naturalmente presentes no malte da bebida e também são reportados por Araujo *et al* (2005) e Pereira *et al.* via ESI(+)-MS e PS(+)-MS/MS, respectivamente.^{80,81}

As amostras também foram exploradas no modo negativo de ionização, PS(-)-MS. Entretanto, devido a baixa e instável corrente iônica observada, não houve reprodutibilidade nos resultados. Um similar comportamento foi observado por Pereira *et al* (2016)⁸¹. Logo, o modo positivo de ionização foi o único explorado para análise de cerveja.

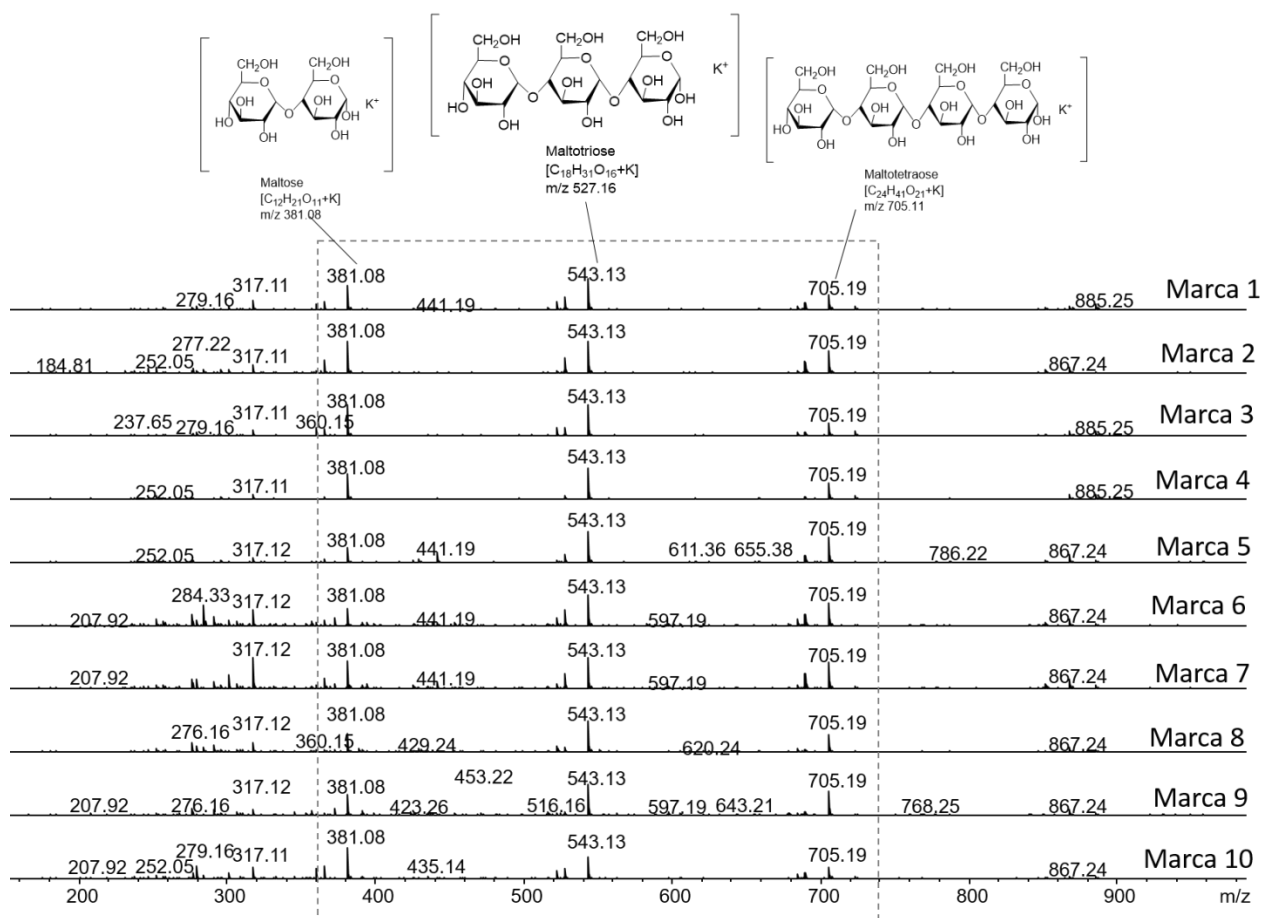


Figura 20. Espectros de PS(+)-MS relacionados à para análise das amostras brutas das 10 marcas de cerveja.

A **Figura 20** mostra espectros de PS(+)-MS para as quatro frações produzidas para duas típicas marcas de cerveja *Pilsen* e *Lager* (marca 4 e marca 8). Nota-se a redução dos sinais de m/z 381, 543, 867, 885, e 1047 em função da extração. Em contrapartida, sinais de m/z 279, 293, 301, 307 e 317 são preferencialmente ionizados além de outros na região de $m/z < 800$ ($IR <$), que são agora detectados, principalmente no extrato 4 e devem corresponder as espécies fenólicas.

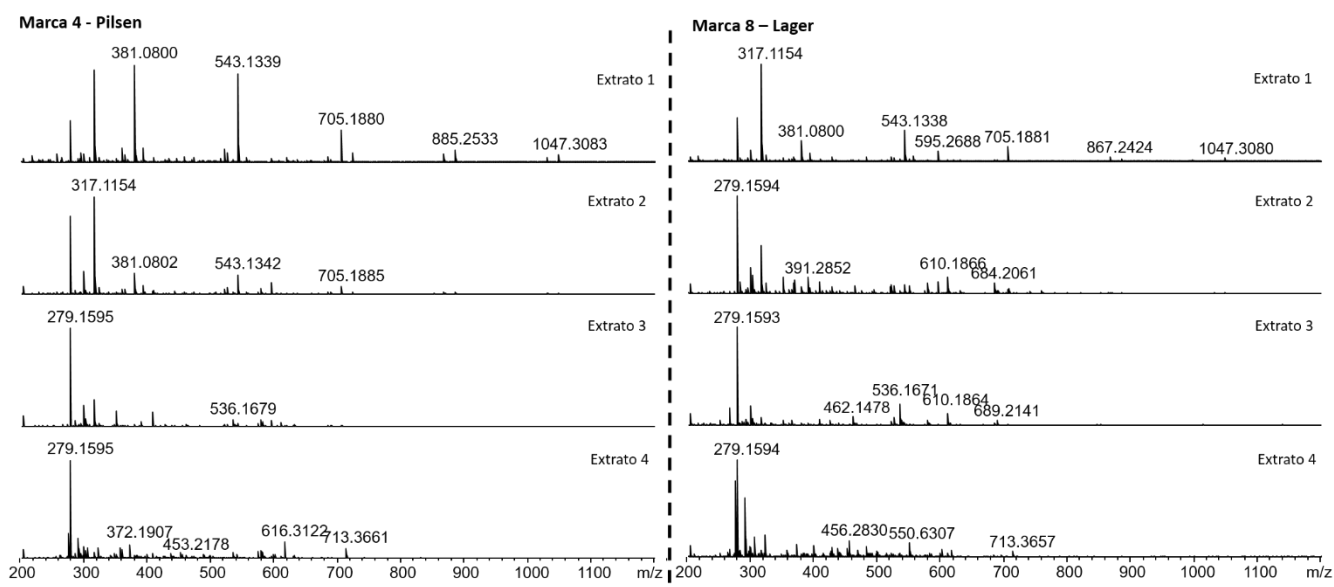


Figura 21. Espectros de PS(+)-MS para as quatro frações produzidas para duas típicas marcas de cerveja *Pilsen* e *Lager* (marca 4 e marca 8).

Embora as extrações tenham retirados os açúcares ou diminuído a intensidade deles para a maioria das amostras, os polifenóis, metabólitos secundários presentes continuam sendo minoritariamente detectados. Além disso, não houve discriminação das cervejas (por marcas ou tipo de processo de produção, *pilsen/lager*) ao longo de todas as frações produzidas a partir do modelo PCA previamente construído.

Para contornar esse problema, as amostras referentes ao extrato 4 foram pre-concentradas e resuspendidas em acetonitrila e analisadas novamente por PS(+)-MS. A **Figura 21** destaca íons intenso na região de m/z de 200 a 400, em que se repetem em todas as amostras de cervejas.

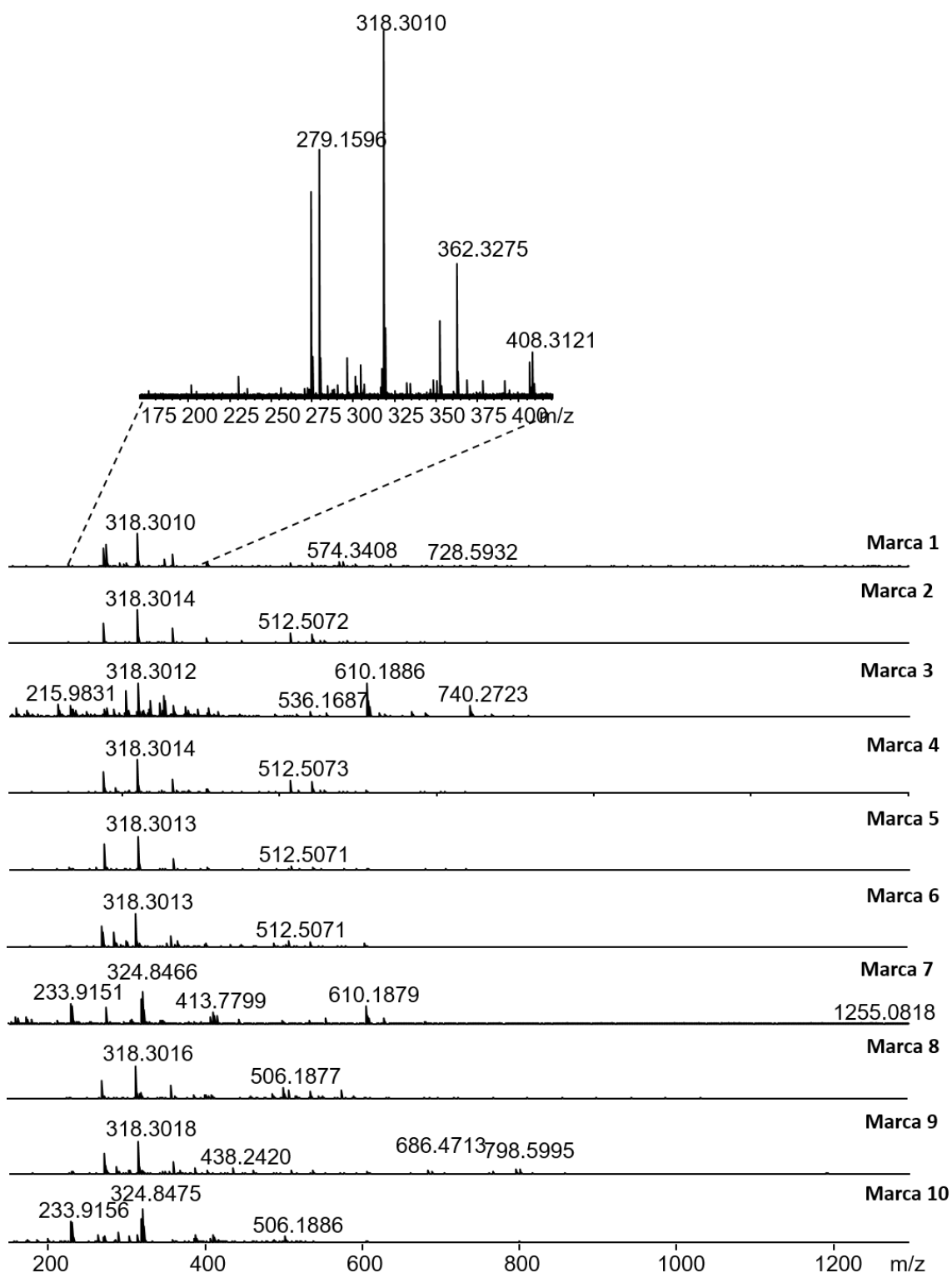


Figura 22. Espectros de PS(+)-MS das 10 amostras de cerveja (extrato 4) após a evaporação do solvente.

Um modelo de PCA foi construído a partir da matriz 20 X 845 a partir dos espectros de PS(+)-MS para o extrato 4. Para a construção do modelo, as cervejas

foram identificadas em classes, *pilsen* (círculo azul) e *lager* (círculo vermelho), conforme suas classificações comerciais (identificação no rótulo).

Quatro componentes principais foram necessárias para descrever 50,0% da variância dos dados de PS(+)-MS (PC1 = 16,24%, PC2 = 13,95%, PC3 = 10,90% e PC4 = 9,01%). Apesar do baixo valor de variância explicada, o gráfico 3D de scores da PC1 x PC2 x PC4 mostra a formação de dois grupos, classificados de *pilsen* e *lager*. Essa distinção é realizada ao longo dos quadrantes da PC4, onde para $PC4 > 0$ temos as amostras do grupo *lager* e para $PC4 \leq 0$, as amostras do grupo *pilsen*, **Figura 22.**

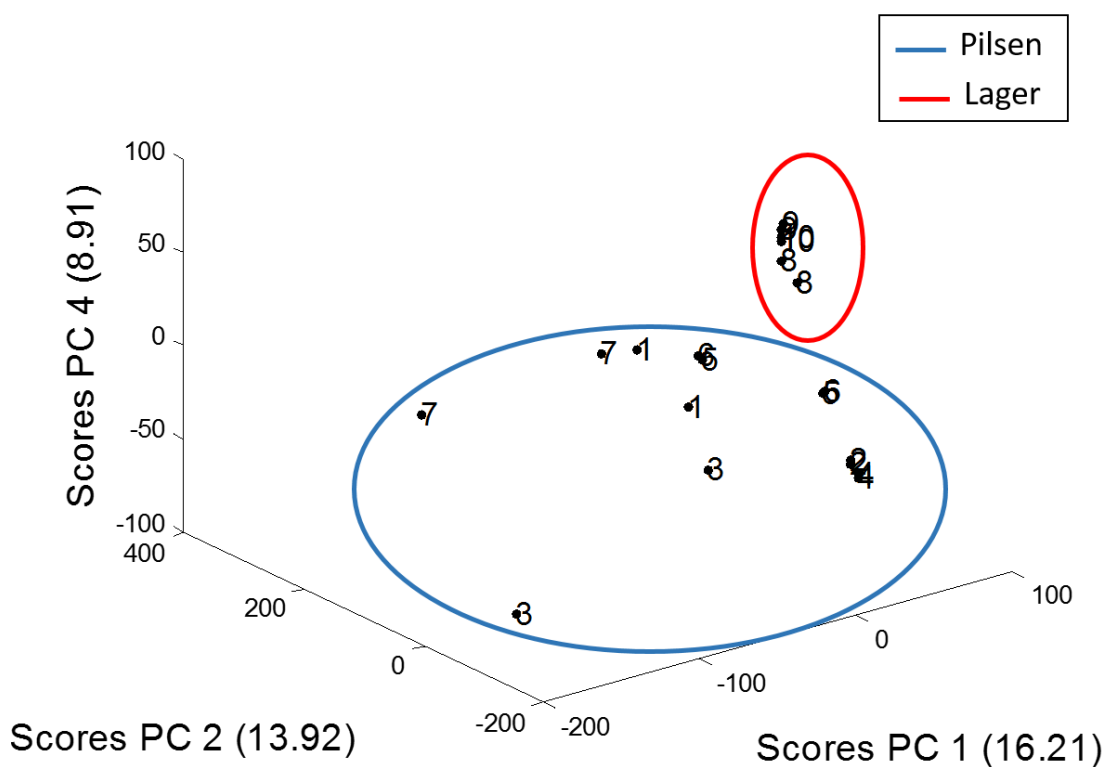


Figura 23. Gráfico de SCORES-3D obtido dos dados dos espectros adquiridos no modo PS(+)-MS. PC1 = 16,24%, PC2 = 13,95% e PC4 = 9,01%.

A Análise de Componentes Principais fornece também o gráfico de *Loadings*, o qual revela, quais as variáveis que tiveram maior influência na construção desse novo sistema de coordenadas. A **Figura 23** mostra o gráfico de *Loadings* obtido da matriz de dados no modo PS(+)-MS onde pode ser observado maior destaque para os cátions de m/z 318, 274, 233, 235, 610 e 302.

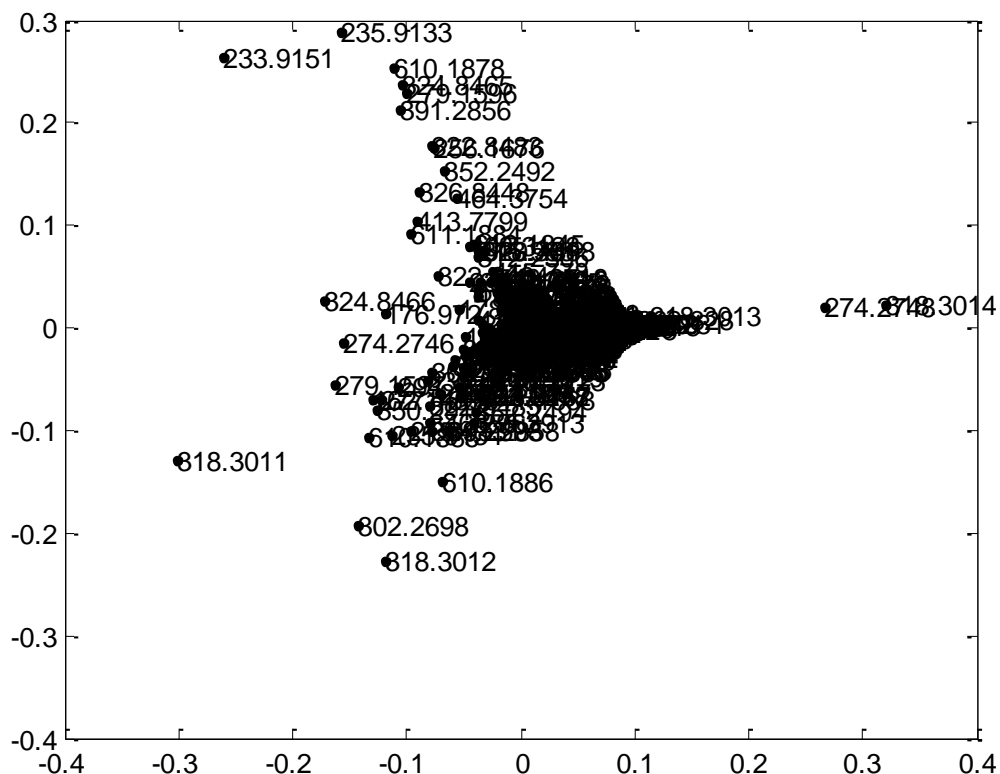


Figura 24. Gráfico de *Loadings* gerado a partir dos dados dos espectros obtidos no modo PS(+)-MS para o quarto extrato após a evaporação do solvente.

Amostras de *whisky* “batizadas” com diferentes proporções de cachaça foram analisadas por PS(\pm)MS, **Figura 24 e Figura 26.**

Para o modo PS(+)-MS, observa-se que com o aumento da concentração de cachaça, os sinais de açúcares (m/z 365, 381, 533 e 707) suprimem a ionização dos marcadores presentes na amostra de *whisky* ($m/z < 320$), **Figura 24.**

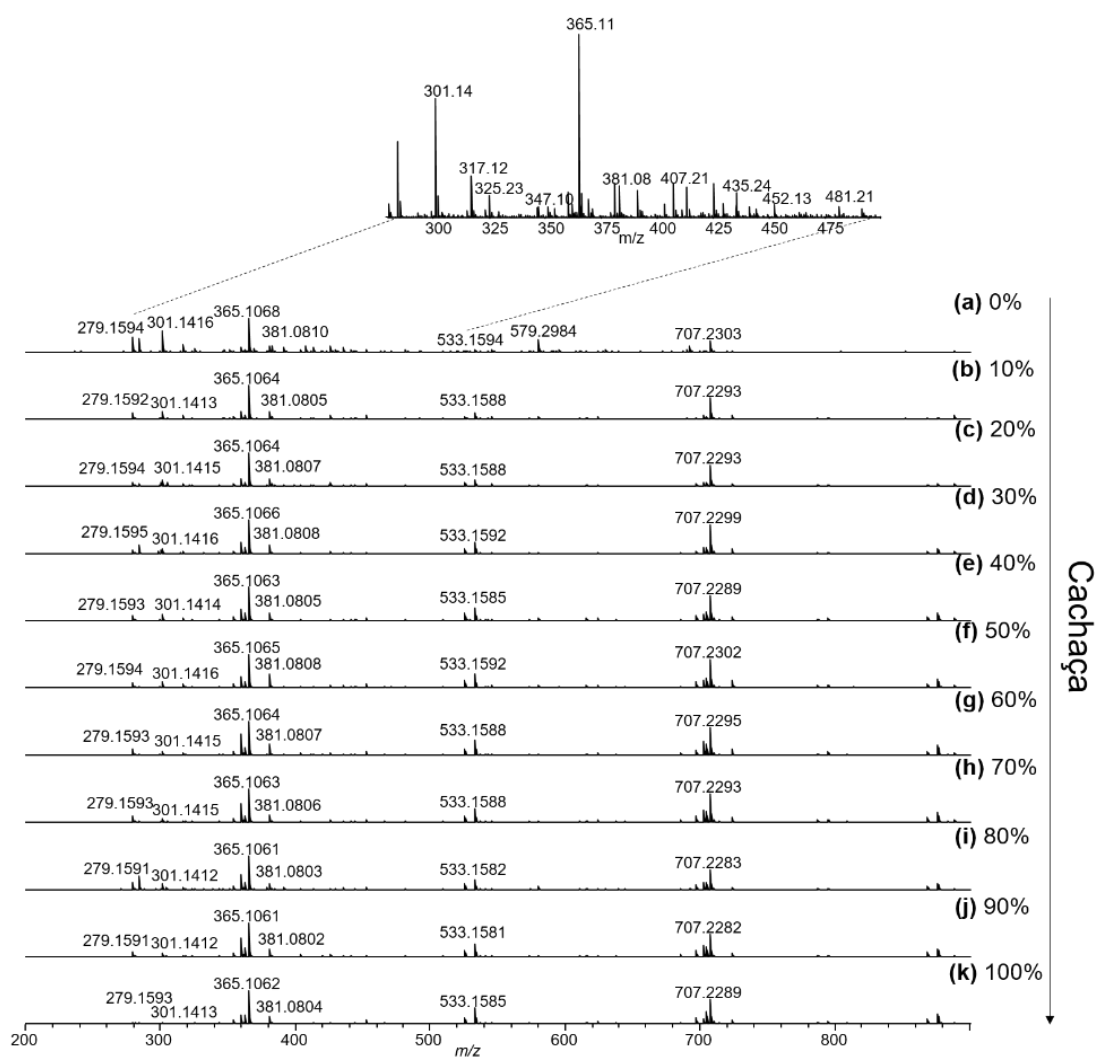


Figura 25. Espectros das blendas de *whisky* e cachaça por PS(+)-MS. A partir da letra (a) a (k) é demonstrado o aumento da porcentagem de cachaça na mistura binária.

O modelo PLS com seleção de variáveis, foi construído com 7 variáveis latentes, além disso, os coeficientes de regressão do modelo PLS mostram relevância na região de aproximadamente de m/z de 200 a 350 (**Figura 25**).

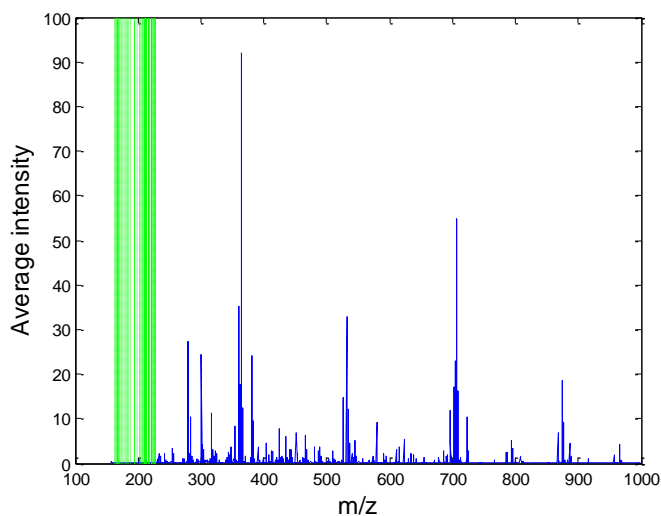


Figura 26. Região de maior interesse nos conjuntos de espectros de *whisky* e cachaça, adquiridos no PS(+)-MS na construção do modelo PLS.

O modelo PLS apresentou erro médio de previsão (RMSEP) de 10,9 %v/v, com coeficientes de determinação para previsão de 0.9249. A **Figura 26** demonstra a curva de calibração adquirida pelo modelo PLS bem como os valores de LOD, LOQ e coeficiente de linearidade. Estes parâmetros mostram boa relação entre os valores previstos pelo modelo PLS (**Figura 26**). Os valores de LOD e LOQ foram de 12,5 %v/v e 41,7 %v/v, respectivamente.

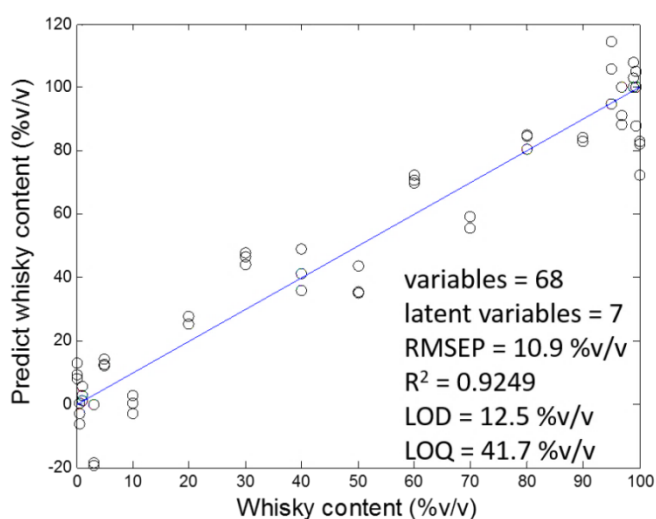


Figura 27. Curva de calibração para as blendas de *whisky* e cachaça a partir dos espectros obtidos no PS-MS no modo positivo.

Para a análise das blends de whisky/cachaça no PS(-)-MS. De maneira similar ao PS(+)-MS, os espectros de PS(-)-MS das misturas binárias mostram um da diminuição dos sinais de m/z 200-350 em função da concentração de cachaça, **Figura 27**.

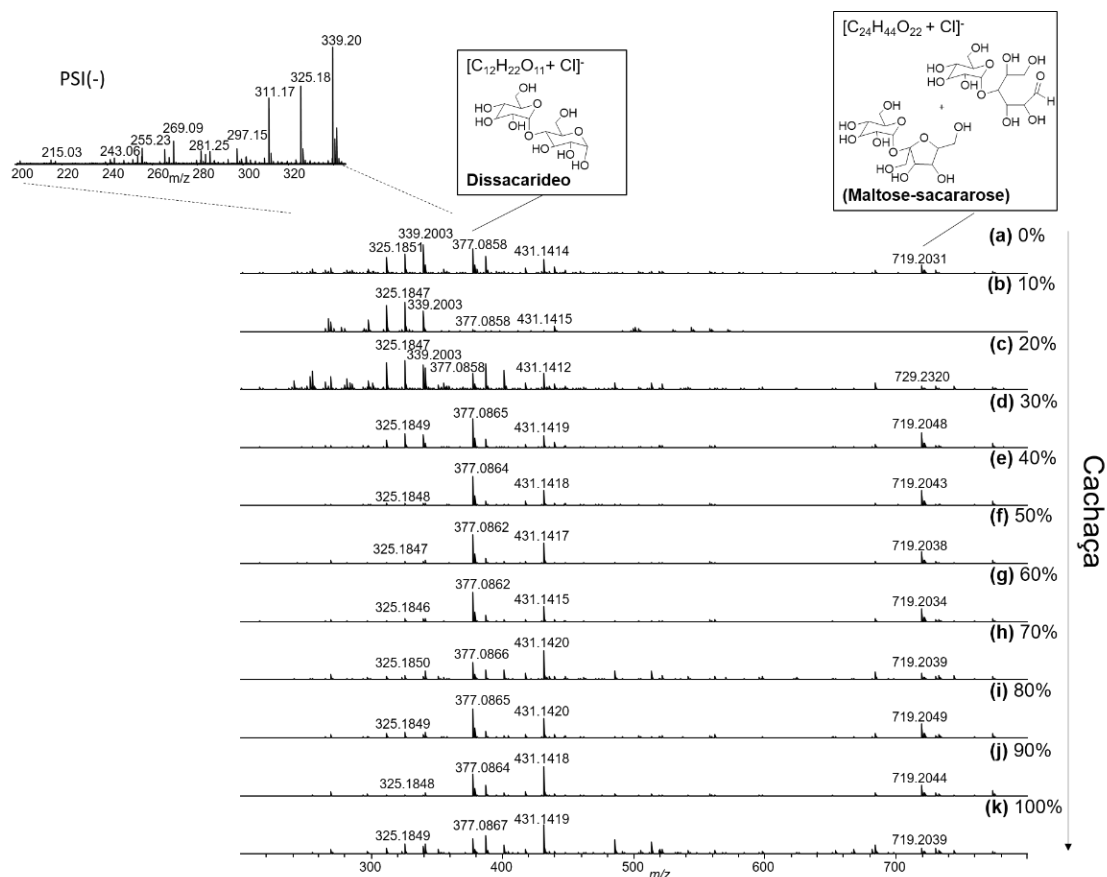


Figura 28. Espectros de PS(-)-MS das blends de *whisky/cachaça*.

O modelo PLS foi construído com 8 variáveis latentes, além disso, os coeficientes de regressão do modelo PLS mostram relevância em diversos valores de m/z ao longo da faixa de 200 a 900 Da (**Figura 28**). Esse comportamento é diferente ao observado para o modelo PLS construído no modo positivo, onde se concentraram na região de m/z 200, **Figura 27**.

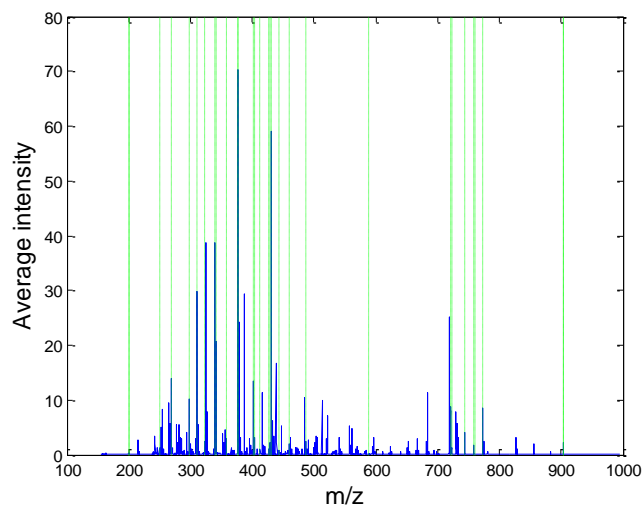


Figura 29. Região de maior interesse nos conjuntos de espectros de *whisky* e cachaça, adquiridos no PS(-)-MS na construção do modelo PLS.

O modelo PLS apresentou erro médio de previsão (RMSEP) de 7,97 %v/v, com coeficientes de determinação para previsão de 0.9592. A **Figura 29** demonstra a curva de calibração adquirida pelo modelo, os parâmetros mostram boa relação entre os valores previstos pelo modelo PLS. Os valores de LD e LQ foram de 12,6 %v/v e 41,9 %v/v, respectivamente, que são semelhantes ao obtidos no modo PS(+)-MS. Por outro lado, erro de previsão para o PS(-)MS é menor do que o PS(+)-MS. Este resultado está relacionado ao maior número de variáveis presentes no modo negativo (11789) em relação ao positivo (2793), discriminando assim, melhor o comportamento o modelo PLS construído no modo PS(-).

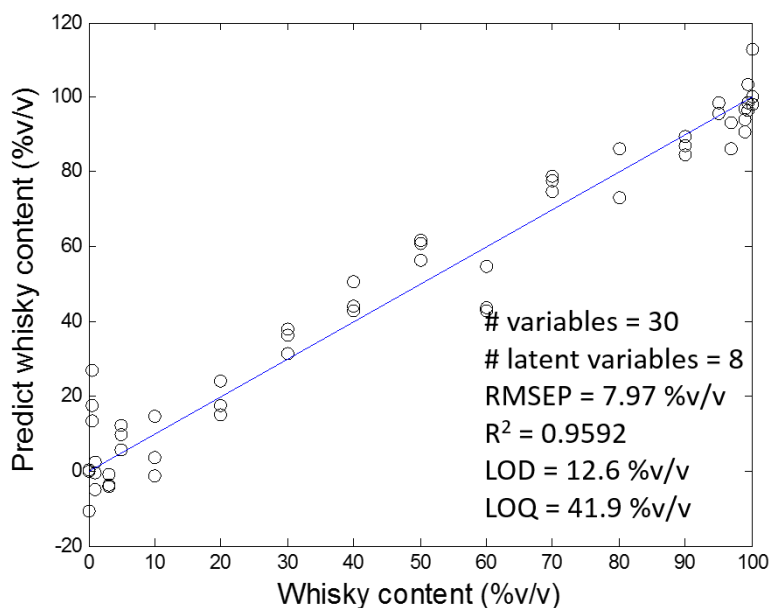


Figura 30. Curva de calibração e parâmetros medidos a partir da blenda de *whisky* e cachaça no PS-MS no modo negativo.

Os valores de LD detectado a partir do modelo PLS proposto, ~13%, são satisfatórios para o produto comercial estudado, visto que o *whisky* é uma bebida de alto valor comercial. Levando em consideração essa característica de mercado nacional, é de se esperar um maior nível de adulteração da bebida (wt % de cachaça > 10 %). Nagato (2001) relata que um grau de adulteração de 70% para um total de 110 amostras de *whisky* comerciais analisadas.⁷⁰

Os resultados de PS(+)-MS em cerveja possibilitaram a construção de um modelo qualitativo, utilizando a análise de componentes principais. Esse modelo possibilitou a separação das amostras de cerveja em *pilsen* e *lager* como descritas nos rótulos de cada uma. As análises iniciadas irão prosseguir com a identificação dos sinais de cada extrato, para melhor caracterizar as cervejas.

Com a adulteração controlada de cachaça em *whisky*, por PS(+/-)-MS em ambos os métodos de ionização foi possível estimar os valores de LD (~13%,) e levar a discussão da proporção de adulteração que vem ocorrendo para o comércio.

A utilização dos resultados instrumentais em conjunto da quimiometria possibilitou extrair informações, como variáveis importantes que muitas vezes não são observadas sem o auxílio dessas ferramentas matemáticas.

3.6 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 3

Os resultados de PS(+)-MS em cerveja possibilitaram a construção de um modelo qualitativo, utilizando a análise de componentes principais. Esse modelo possibilitou a separação das amostras de cerveja em *pilsen* e *lager* como descritas nos rótulos de cada uma. As análises iniciadas irão prosseguir com a identificação dos sinais de cada extrato, para melhor caracterizar as cervejas.

Com a adulteração controlada de cachaça em *whisky*, por PS(+/-)-MS em ambos os métodos de ionização foi possível estimar os valores de LD (~13%,) e levar a discussão da proporção de adulteração que vem ocorrendo para o comércio.

A utilização dos resultados instrumentais em conjunto da quimiometria possibilitou extrair informações, como variáveis importantes que muitas vezes não são observadas sem o auxílio dessas ferramentas matemáticas.

4 CONCLUSÃO

Através das matrizes utilizadas neste trabalho, foi possível comprovar que a fonte ambiente *Paper Spray Ionization* é de grande valia para as análises químicas, visto as diversas vantagens que oferece a técnica.

Por fim, conclui-se que a utilização e estudos de fonte ambiente, como o paper spray, permite a análise de diversas matrizes. A técnica destaca-se devido a rapidez nas análises e aliado ao menor custo quando comparado outras fontes para a espectrometria de massas, auxiliando a rotina laboratorial e a aplicação das ciências forense.

5 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ¹ SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: Ltc, p. 508, 2007.
- ²Ham BM. Even electron mass spectrometry with bimolecular applications, Hoboken, **Jonh Wiley& Sons**: 2008.
- ³DINIZ, Maria Elisa Romanelli. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Programa de Pós Graduação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- ⁴Romão W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense**. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- ⁵GHISLAIN, T.; FAURE, P.; MICHELS, R. Detection and Monitoring of PAH and Oxy-PAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, 23, 530-536. 2012. 39
- ⁶HUANG, Min-zonget al. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 702, n. 1, p.1-15, set. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.aca.2011.06.017.
- ⁷COOKS, R. G. Ambient Mass Spectrometry. *Science*, 311, 1566-1570, 2006.
- ⁸ HUANG, M. Z. et al. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 1, p. 1–15, 2011.
- ⁹ ALBERICI, R. M. et al. Ambient mass spectrometry: Bringing MS into the “real world”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265–294, 2010.
- ¹⁰CAJKA, T. et al. Ambient mass spectrometry employing a DART ion source for metabolomic fingerprinting/profiling: A powerful tool for beer origin recognition. **Metabolomics**, v. 7, n. 4, p. 500–508, 2011.
- ¹¹DI STEFANO, V. et al. Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 74–85, out. 2012.
- ¹² VENTER, A.; NEFLIU, M.; COOKS, G. R. Ambient desorption ionization mass spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 284–290, 2008.

-
- ¹³ LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N.E.; LIN, J-M.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. **Analytical Chemistry**, 82: 2463–2471, 2010.
- ¹⁴ YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J.D.; CHAPPELL, W.J.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, 312: 201–207, 2012.
- ¹⁵ ESPY, R. D. et al. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, 2012.
- ¹⁶ WANG, H.; LIU, L.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Paper Spray for Direct Analysis of Complexes Using Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie**, 122: 889-892, 2010.
- ¹⁷ CARVALHO, T. C. DE. **Paper spray ionization : análise direta de licores do processo de etanol 2G por espectrometria de massas** . Dissertação (Mestrado), Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2015.
- ¹⁸ MONGE, M. E.; FERNÁNDEZ, F. M. Chapter 1. An Introduction to Ambient Ionization Mass Spectrometry. In: [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2015. p. 1–22.
- ¹⁹ LIU, J. et al. Application of Paper Spray Ionization Development , Characterization , and Application of Paper Spray Ionization. **Anal. Chem.**, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 2010.
- ²⁰ MANICKE, N. E. et al. Assessment of paper spray ionization for quantitation of pharmaceuticals in blood spots. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 300, n. 2–3, p. 123–129, 2011a
- ²¹ LI, A. et al. Paper spray ionization of polar analytes using non-polar solvents. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 47, n. c, p. 2811–3, 2011.
- ²² ZHANG, Z. et al. Silica Coated Paper Substrate for Paper-Spray Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 931–938, 2011.
- ²³ MANICKE, N. E. et al. Quantitative analysis of therapeutic drugs in dried blood spot samples by paper spray mass spectrometry: An avenue to therapeutic

drug monitoring. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, n. 9, p. 1501–1507, 2011b.

²⁴ ZHANG, J. et al. Graphite-coated paper as substrate for high sensitivity analysis in ambient surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 7, p. 3296–3301, 2012.

²⁵ YANG, Q. et al. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 312, p. 201–207, 2012.

²⁶ LEE, H. et al. Rapid screening and determination of designer drugs in saliva by a nib-assisted paper spray-mass spectrometry and separation technique. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 20, p. 2822–2825, 2012.

²⁷ ZHANG, Z.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs. **The Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2556–8, 2012.

²⁸ JJUNJU, F. P. M. et al. In situ analysis of corrosion inhibitors using a portable mass spectrometer with paper spray ionization. **The Analyst**, v. 138, n. 13, p. 3740–8, 2013.

²⁹ CODY, R. B.; DANE, A. J. Paper spray ionization for ambient inorganic analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 8, p. 893–898, 2014.

³⁰ZHOU, X.; PEI, J.; HUANG, G. Reactive paper spray mass spectrometry for in situ identification of quinones. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 1, p. 100–106, 2014.

³¹MOTOYAMA, A.; KIHARA, K. Zero volt paper spray ionization mass spectrometry for direct analysis of samples on filter paper substrate. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 20, p. 1905–1916, 2015.

³² EVARD, H. et al. Paper spray ionization mass spectrometry: Study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 221–225, 2015.

³³ DA SILVA FERREIRA, P. et al. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. **The Analyst**, v. 140, n. 3, p. 811–819, 2015.

³⁴ CARVALHO, T. C. et al. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray ionisation mass spectrometry (PSI-MS). **Anal. Methods**, v. 8, n. 3, p. 614–620, 2016.

³⁵ PEREIRA, H. V. et al. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. **Analytica Chimica Acta**, 2016.

³⁶ HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3^a ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Bruxelas, Bélgica, 2007.

³⁷ LANÇAS, F. M. HPLC -LC/MS A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente " compatíveis " ? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.

³⁸ DOUGLAS, D. J.; FRANK, A. J.; MAO, D. Linear Ion traps in mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, 24: 1–29, 2005.

³⁹ BERGO, P. L. D. S. **Desenvolvimento de um método de screening para anfetaminas em urina empregando ESI-MS com confirmação por GC-MS**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 120, 2007.

⁴⁰ THERMO SCIENTIFIC. LTQ XL hardware manual. 2006. 180p.

⁴¹ KRAJ, A.; DESIDERO, D. M.; NIBBERING, N. M.; EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A. M. **Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications**. John Wiley & Sons, Bruxellas, Bélgica, 2008.

⁴² MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 215, 59-75, 2002.

⁴³ Marshall AG, Hendrickson CL, Ernmetta MR, Rodgers RP, Blakney GT, Nilsson CL. Fourier transform ion cyclotron resonance: state of the art. *European Journal of Mass Spectrometry*, 13:57-9, 2007.

⁴⁴ **Mass Spectrometry Facility | FTICRMS**. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/fticrms.xhtml>>. acesso em 20 de outubro de 2016.

⁴⁵ Deng W, Gomez A. Influence of space charge on the scale-up of multiplexed electrospray. *Aerosol Science*, 38:1062-78, 2007.

⁴⁶Ministério da Justiça. 2011. <<http://portal.mj.gov.br/data/Pages/MJD0D73EAFPTBRNN.htm>>Acesso em: 10 de julho de 2016.

⁴⁷Bernardo, M.E.P.B., Siqueira, M.J.N., De Paiva, P.P., Maia, Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil, **The International Journal on Drug Policy** 14 (2003) 331–334.

⁴⁸Souza, Lindamara Maria de. **Fingerprinting de Cocaína: Um Estudo do Perfil Químico no Estado do Espírito Santo**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

⁴⁹Carlini, E.A., Nappo S.A., Galduroz J.C.F., Noto AR. Drogas pisciotrópicas: o que são e como agem. **Rev IMESC**. 2001;(3):9-35.

⁵⁰NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (Org.). **Pubchem**.

⁵¹EVARD, I. LEGLEYE, S. CADET-TAÏROU, A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. **International Journal of Drug Policy**. v. 21 (2010). p.399–406.

⁵²THOMPSON, Judith E. **A PRACTICAL GUIDE TO CONTEMPORARY PHARMACY PRACTICE**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. 438 p.

⁵³DEGANI, Ana Luíza G. et al. *Cromatografia Um Breve Ensaio*. Atualidades em Química - **Química Nova na Escola**. nº 7. 1998.

⁵⁴Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

⁵⁵MOTA, Leandro; VITTA, Patrícia Buskodi. QUÍMICA FORENSE: UTILIZANDO MÉTODOS ANALÍTICOS EM FAVOR DO PODER JUDICIÁRIO. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 1, n. 1, p.1-11, jan. 2014. Trimestral. ISSN 2357-81873. Disponível em: <<http://www.revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/LeandroMOTA.pdf>>. Acesso em: 15 julho de 2016.

⁵⁶TAO, Jing; YANG, Jin-feng. Thin-layer chromatography as a method for separating aniline oligomers. **Polymer Testing**, [s.l.], v. 40, p.1-3, dez. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2014.07.020. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0142941814001779?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 15 julho de 2016.

⁵⁷**World Drug Report**, 2012. Disponível em: www.unodc.org. Acesso em: 15 julho de 2016.

⁵⁸ANVISA. **Resolução - RE nº 129, de 12 de fevereiro de 2016**, 2016

⁵⁹INMETRO. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**, Agosto/2016.

⁶⁰RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

⁶¹RIBEIRO, F. A.L et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito. **Química Nova**. v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

⁶²PEREIRA, A., SCHESHOWITSCH, K., CRUZ, A. SILVA, M. A. S., STULZER, H. K. Validação de metodologia analítica para quantificação de piroxicam em cápsulas de gelatina por espectrofotometria ultravioleta (UV). **Visão Acadêmica**, Curitiba, 8(2), 29-37, 2007.

⁶³ United Nations Office on Drugs and Crimes, World Drug Report 2014. United Nations, 2014 (100 pp.).

⁶⁴ T.C. Carvalho, I.F. Oliveira, L.V. Tose, G. Vanini, L.M. Souza, A.C. Neto, L.F. Machado, J.C.L. Ambrosio, V. Lacerda Jr., B.G. Vaz, W. Romão, Qualitative Analysis of Designer Drugs by Direct Blotter Paper Spray Ionisation Mass Spectrometry (PSI-MS), *Analytical Methods*, submitted, 2015.

⁶⁵ R. C. L. Pereira, R. C. Simas, Y. E. Corilo, B. G. Vaz, C. F. Klitzke, E. M. Schmidt, M. A. Pudenzi, R. M. C. F. Silva, E. T. Moraes, W. L. Bastos, M. N. Eberlin, H. D. L. Nascimento, Precision in Petroleomics via Ultrahigh Resolution Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, **Energy Fuels**, 27 (2013), 7208-7216.

⁶⁶ SABINO, B. D. et al. Analysis of Cocaine and Crack Cocaine via Thin Layer Chromatography Coupled to Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 02, n. 06, p. 658–664, 2011.

⁶⁷ A. J. Nicola, A.I. Gusev, D.M. Hercules, Direct Quantitative Analysis from Thin-Layer Chromatography Plates Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Applied Spectroscopy*, 50 (1996) 1479-1482.

⁶⁸BRASIL. **Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre**

a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Revogado pelo Decreto 6871/2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2009.

⁶⁹AQUARONE, E.; LIMA, U. DE A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. 5. ed.

⁷⁰NAGATO, L. A. F. et al. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 39–42, 2001

⁷¹BRASIL. **Instrução normativa nº 54, de 5 de novembro de 2001**, 2001.

⁷²H. D. Berlitz, W. Grosch and P. Schieberle, **Food Chemistry**, 3rd. edn., Springer-Verlag, Germany, 2004.

⁷³ARAUJO, A. S. Análise e tipificação de diferentes amostras de cervejas através de espectrometria de massas por ionização electrospray. p. 76, 2005.

⁷⁴VERDI, A. R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. **Informações Econômicas**, v. 36, p. 93–98, 2006.

⁷⁵VAN BEEK, S.; PRIEST, F. G. Evolution of the lactic acid bacteria community during malk whisky fermentation: a polyphasic study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 297–305, 2002.

⁷⁶FILGUEIRAS, P. R. Determinação da composição de blends de petróleos utilizando FTIR-ATR e calibração multivariada. Universidade Federal do Espírito Santo. 113 f. Tese de mestrado, 2011.

⁷⁷PORTELA, N. A. et al. Quantification of biodiesel in petroleum diesel by ¹H NMR: Evaluation of univariate and multivariate approaches. **Fuel**, v. 166, p. 12–18, 2016

⁷⁸ ARAUJO, A. S. **Análise e tipificação de diferentes amostras de cervejas através de espectrometria de massas por ionização electrospray**. p. 76, 2005.

⁷⁹ DENG, Z. et al. On-cartridge derivatisation using a calixarene solid-phase extraction sorbent for facile, sensitive and fast determination of formaldehyde in beer. **Food Chemistry**, v. 211, p. 314–319, 2016

⁸⁰ ARAÚJO, A. S. et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **The Analyst**, v. 130, n. 6, p. 884–889, 2005.

⁸¹ PEREIRA, H. V. et al. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. **Analytica Chimica Acta**, 2016.