

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

**Espectrometria de massas ambiente e *tandem* na
quantificação de drogas de abuso.**

Quantification of drugs of abuse by ambient and tandem mass spectrometry.

Heloá Santos

Tese de Doutorado em Química

**Vitória
2018**

Heloa Santos

Espectrometria de massas ambiente e *tandem* na quantificação de drogas de abuso.

Tese 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 Doutora em Química

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa:

Síntese e Caracterização de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

Espectrometria de massas ambiente e *tandem* na quantificação de
drogas de abuso

Heloa Santos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a
obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovado em 10/09/2018 por:



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



Prof. Dr. Hildégardo Seibert França
Instituto Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz
Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, setembro de 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Santos, Heloa, 1989-
S237e Espectrometria de massas ambiente e tandem na
quantificação de drogas de abuso / Heloa Santos. – 2018.
170 f. : il.

Orientador: Wanderson Romão.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Espectrometria de massa. 2. Cromatografia em papel. 3.
Polímeros condutores. 4. Cromatografia a líquido. I. Romão,
Wanderson. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 54

Elaborado por Perla Rodrigues Lôbo – CRB-6 ES-527/O

Aos meus pilares que me ensinaram o dom do AMOR e da PERSEVERANÇA,
Dirceu Santos Júnior e Rosângela Santos

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu rochedo e fortaleza, o maior apoio em meio às diversas situações. “Ao Deus único, que nos salva por meio de Jesus Cristo, nosso Senhor...” (Jd 1,25).

Aos meus pais por cada momento de incentivo contínuo à sabedoria e à minha irmã, Heloana Santos, pela solidariedade e força.

Aos meus afilhados Lilian, Helena e Emanuel, que com amor tornaram a minha vida mais doce. E a toda a minha família que sempre se fez presente.

Ao professor Wanderson Romão pela orientação e paciência, obrigada pela confiança e pelo conhecimento.

Ao professor Dr Luiz E-Arroyo e o departamento de forense da WVU pelos treinamentos e experimentos no doutorado sanduíche. Ao Joe e ao Tyler.

Aos amigos de Laboratório de Petroleômica e Forense: Fernanda, Eliane, Lindamara, Vitor, Caline, Jandira, Mara, Dani, Gabriela, Thalles, Nayara, Rayana, Larissa, João, Flávia, Eloilson, Elizângela, Bruno, Jade, Heloísa, Radigya... Ao LABPETRO por toda assistência aos experimentos e aos amigos: Bárbara, Carlão, Júlia, Samantha, Ediléia e Suzy. E ao LaCEM-UFG, em especial Verônica e Géssica.

Aos professores que contribuíram com os meus experimentos: Boniek, Glória Maria, Keyller e Hildegardo.

Ao corpo docente do PPGQUI-UFES, em particular aos que eu vivenciei em aulas e auxiliaram na pesquisa: Valdemar, Álvaro, Warley, Geisamanda, Sandro e Ricardo.

A CAPES, FAPES e CNPq pelo apoio financeiro durante meu doutorado. E a PC-ES, PF-DF, PF-RS e INCT por valiosas contribuições.

Aos amigos especiais, Brígida, Allisson, Amanda, Natwrie, Sofia, Ewerton, Izabela, Luan, e aos amigos que o sanduíche me deu, em especial, Izabela, Marjorie, Amir, Iuri e Alex. A todos aqueles que acreditaram na minha perseverança e que de alguma forma se dedicaram a contribuir para a realização de mais um sonho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ^9 -THC – Δ^9 -Tetrahydrocanabinol

[Poli (Py-co-Ani)] – Polipirrol com Polianilina

CBD – Canabidiol

CBN – Canabinol

DART - *Direct Analysis in Real Time* (análise direta em tempo real)

DBE – *Double Bond Equivalent* (Valor para o número de anéis e insaturações)

DMRM – *Dynamic Multiple Reaction Monitoring method* (monitoramento dinâmico de múltiplas reações)

DRX – Difração de Raios-X

E1 – Experimento de SPE 1

ESI - *Electrospray Ionization* (ionização por *electrospray*)

FT-ICR MS – *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (espectrômetro de massas de ressonância ciclotrônica de íons com tratamento dos dados pela transformada de Fourier)

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (análises de infravermelho com transformada de Fourier)

GC - *Gas Chromatography* (cromatografia gasosa)

ISTD – *Internal Standard* (padrão interno)

LC – *Liquid Chromatography* (cromatografia líquida)

LLE – *Liquid-Liquid Extraction* (extração líquido-líquido)

LOD – *Limit of Detection* (Limite de detecção)

LOQ – *Limit of Quantification* (Limite de quantificação)

MDMA – Metilenodioximetanfetamina

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

NPS – *New Psychoactive Substances* (novas substâncias psicoativas)

PAni – Polianilina

PC – Polímeros Condutores

PC-ES – Polícia Civil do Espírito Santo

PEG – Polietilenoglicol

PPy – Polipirrol

PS – Fonte de ionização em spray com papel (*Paper Spray ionization*)

QC – *Quality control* (amostras de controle de qualidade)

RSD – Relative Standard Deviation (desvio padrão relativo)

SCX - *Strong Cation eXchanger* (forte trocador de cátions)

SD – Standard Deviation (desvio padrão)

SPE – *Solid-Phase Extraction* (extração na fase sólida)

SWCNTs – *Single-Walled Carbonnanotubes* (nanotubos de carbono em parede única)

TIC – *Total Ion Chromatogram* (cromatogramas de íons totais)

TLC - *Thin Layer Chromatography* (cromatografia em camada fina)

UNODC – *United Nations Office on Drugs and Crime* (nações unidas sobre drogas e crime)

APS – *Ammonium Peroxy Disulphate* (Persulfato de amônio)

R_F – fator de retenção, do inglês, Retardation Factor (R_F)

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Comparação dos LODs obtidos para os analitos cocaína, lidocaína e levamisol usando uma cromatografia em papel revelada por três diferentes detectores (lâmpada UV-Vis, Dragendorff e PS (+)-MS) com métodos analíticos múltiplos reportados na literatura.....	61
Tabela 2.2 Porcentagem (%) de cocaína em 10 amostras de apreensão de crack....	64
Tabela 2.3 Comparação entre CG-FID e PS-MS para cocaína, usando o teste t para amostras pareadas com o intervalo de confiança de 95 %.....	64
Tabela 3.1 Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para avermectinas e bupropiona e seus metabólitos.....	78
Tabela 3.2-A Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para adulterantes, anestésicos, ansiolíticos e drogas abusivas.....	81
Tabela 3.2-B. Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para adulterantes, anestésicos, ansiolíticos e drogas abusivas.....	82
Tabela 3.3 Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para hormônios e meloxicam.....	84
Tabela 4.1 Nome sistemático de 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	98
Tabela 4.2-A Estrutura Química e classificação de 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	99
Tabela 4.2-B Estrutura Química e classificação de 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	100

Tabela 4.3-A Parâmetros utilizados nas análises de DART-MS/MS e LC-MS/MS....	108
Tabela 4.3-B Parâmetros utilizados nas análises de DART-MS/MS e LC-MS/MS....	109
Tabela 4.4 Dados de regressão, faixa dinâmica analítica e limite de detecção para analitos.....	119
Tabela 4.5 Dados de recuperação com desvio padrão e desvio padrão relativo para cada fração coletada.....	129
Tabela 4.6 Dados de efeito de matriz e eficiência do processo para cada fração coletada.....	130
Tabela 4.7 Dados de efeito de matriz e eficiência do processo para cada fração coletada.....	131
Tabela A1 Metodologias aplicadas na extração na fase sólida (SPE).....	152
Tabela A2 Resultados de recuperação para os experimentos 1-4.....	160
Tabela A3 Resultados de recuperação para os experimentos 5 e 6.....	161
Tabela A4 Resultados de recuperação para os experimentos 6 e 7.....	162
Tabela A5 Resultados de recuperação para os experimentos 8 e 9.....	163
Tabela A6 Resultados de recuperação para os experimentos 9 e 10.....	164
Tabela A7 Resultados de recuperação para os experimentos 11 e 12 com coleta de frações em diferentes vials.....	165
Tabela A8 Resultados de recuperação para os experimentos 11 e 12 com coleta de frações em diferentes vials.....	166

Tabela A9 Resultados de recuperação para os experimentos 13-15 com coleta de frações em diferentes vials e diferentes cartuchos de SPE.....	167
--	-----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1.1 a) Análise de uma mancha de sangue seco sobre o papel. b) Estrutura molecular do imatinib (Gleevec, Glivec) e análise PS-MS de 0,4 μ L de sangue contendo 4 μ g/mL de imatinib identificado e quantificado por MS/MS na transição de m/z 494 a m/z 394. c) Análise quantitativa de sangue total enriquecido com imatinib (62,5 ng/mL a 4 μ g/mL) e [D ₈] imatinib (1 μ g/mL).....	28
Figura 1.2 Procedimento para combinar biópsia de tecido com PS-MS.....	29
Figura 1.3 Comparação de limite de quantificação (LOQ) e da faixa linear para verapamil em sangue (m/z 303): (a) papel revestido com sílica, (b) papel cromatográfico de grau 4 e (c) papel de cromatográfico de grau ET31.....	29
Figura 1.4 Diagrama esquemático de papel modificado com nanotubos de carbono para análises de proteínas em gel por PS-MS.....	31
Figura 1.5 Número de publicações desde 1991 pesquisadas com o termo “conductive polymers”. *primeiro semestre de 2018 – Fonte: <i>Web of Science</i>	32
Figura 1.6. Estrutura de monômeros condutores não dopados: (A) Polipirrol, (B) Polianilina, (C) Poliacetileno, (D) Politiofeno, (E) Polifurano e (F) Poli-iso-tianafeno....	32
Figura 1.7. Esquema da copolimerização do PPy com a quitina.....	36
Figura 1.8 Polipirrol bipolaron.....	37
Figura 1.9 Publicações até agosto de 2018 com os termos “ <i>Polypyrrole</i> ”, “ <i>Polyaniline</i> ”, “ <i>Polyacetylene</i> ”, “ <i>Polythiophene</i> ”, “ <i>Polyfuran</i> ” e “ <i>Polyisothianaphthene</i> ”.....	37
Figura 1.10. Sal de esmeraldina.....	39

Figura 1.11. Recuperação em função do pH da solução de eluição das amostras reais de fluido oral misturadas com 20 % de metanol.....	43
Figura 1.12. Comparação das concentrações de levamisol no tecido pulmonar (preto), sangue do coração (cinza pontilhado branco) e sangue da veia femoral (cinza claro) e as proporções de sangue do coração para sangue da veia femoral (números cinza acima das colunas) e tecido pulmonar para veia femoral sangue (números pretos acima das colunas) em 11 mortes relacionadas à droga (escala logarítmica).....	44
Figura 2.1 Estrutura Química de (a) Cocaina (base livre), (b) Levamisol, (c) Lidocaína, (d) Cafeína, (e) Benzocaína, e (f) Fenacetina.....	46
Figura 2.2 Fluxograma do procedimento aplicado à cromatografia em papel para identificação e quantificação de cocaína e seus adulterantes (levamisol e lidocaína).....	52
Figura 2.3 Ilustração da cromatografia em papel preliminarmente aplicada ao PS-MS na quantificação de cocaína.....	54
Figura 2.4 Cromatografia em papel <i>office</i> com padrões usando a fase móvel CH ₃ OH:NH ₄ OH (99.5:0.5 % v/v) e espectro de PS(+)-MS: (a) Lidocaína, (b) Cocaína e (c) Levamisol.....	56
Figura 2.5 Reações da cocaína e do levamisol com o Dragendorff.....	57
Figura 2.6 Cromatografia em papel do tipo <i>Office</i> com variação de concentração dos padrões de: (a) Lidocaína (1 a 40 mg/mL), (b) Cocaína (0,5 a 16 mg/mL) e (c) Levamisol (1 a 40 mg/mL).....	58

Figura 2.7 Espectros de massas PS(+) (a) Levamisol (5,0 a 30,0 mg/mL), (b) Lidocaína (10,0 a 35,0 mg/mL) e (c) Cocaína (1,0 a 10,0 mg/mL).....	59
Figura 2.8 Curvas de calibração: (a) Lidocaína, (b) Cocaína e (c) Levamisol.....	61
Figura 2.9 Análises de cromatografia em papel para 10 amostras de apreensão de crack (a) Revelação em câmara sob luz ultravioleta (UV) no comprimento de 254 nm e (b) Revelação com reagente Dragendorff.....	63
Figura 3.1 Ilustração esquemática da polimerização <i>in situ</i> de [Poli(Py-co-Ani)] no papel cromatográfico.....	71
Figura 3.2 Análises de PS(+)-FT-ICR MS com papéis polimerizados com PPy e/ou PAni.....	73
Figura 3.3 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de eprinomectina e moxidectina: (A) Papel cromatográfico (Whatman); (B) Papel com PPy; (C) Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; (D) Papel com PAni.....	76
Figura 3.4 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de avermectinas com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPy, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PAni.....	76
Figura 3.5 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de bupropiona: (A) Papel cromatográfico (Whatman); (B) Papel com PPy; (C) Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; (D) Papel com PAni.....	77
Figura 3.6 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de bupropiona com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPy, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PAni.....	77

Figura 3.7 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de Δ^9 -THC e cocaína: **(A)** Papel cromatográfico (Whatman); **(B)** Papel com PPy; **(C)** Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; **(D)** Papel com PANi.....79

Figura 3.8 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de cafeína: **(A)** Papel cromatográfico (Whatman); **(B)** Papel com PPy; **(C)** Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; **(D)** Papel com PANi.....80

Figura 3.9 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de Canabidiol (CBD) e Canabinol (CBN): **(A)** Papel cromatográfico (Whatman); **(B)** Papel com PPy; **(C)** Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; **(D)** Papel com PANi.....80

Figura 3.10 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de drogas e adulterantes com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPy, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PANi.....81

Figura 3.11 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de progesterona e valerato de estradiol: **(A)** Papel cromatográfico (Whatman); **(B)** Papel com PPy; **(C)** Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; **(D)** Papel com PANi.....83

Figura 3.12 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de meloxicam: **(A)** Papel cromatográfico (Whatman); **(B)** Papel com PPy; **(C)** Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; **(D)** Papel com PANi.....83

Figura 3.13 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de hormônios e meloxicam com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPy, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PANi.....84

Figura 3.14 Curvas de calibração com [Poli(Py-co-Ani)] com Orbitrap para: (A) Δ^9 -THC; (B) cafeína; (C) CBD – Canabidiol; (D) CBN – Canabinol; (E) Cocaína; (F) Progesterona; (G) Medroxyprogesterona e (H) Valerato de estradiol.....	86
Figura 3.15 Cromatogramas de íons totais (TIC) e espectro de análises de PS(+)-MS no Orbitrap com papel cromatográfico e amostras de urina enriquecida com: (A) Δ^9 -THC; (B) Cafeína; (C) Cocaína.....	88
Figura 3.16 Cromatogramas de íons totais (TIC) e espectro de análises de PS(+)-MS no Orbitrap com papel parafinado e amostras de urina enriquecida com: (A) Δ^9 -THC; (B) Cafeína; (C) Cocaína.....	89
Figura 3.17 Cromatogramas de íons totais (TIC) e espectro de análises de PS(+)-MS no Orbitrap com papel com [Poli (Py-co-Ani)] e amostras de urina enriquecida com: (A) Δ^9 -THC; (B) Cafeína; (C) Cocaina.....	90
Figure 4.1 Número de novas substâncias psicoativas reportadas anualmente, 2009-2016.....	93
Figure 4.2 Alterações nas quantidades de drogas apreendidas e prisões por causa de drogas de 2005-06 para 2015-16.....	94
Figure 4.3 Fonte DART com análise com capilar de vidro.....	97
Figure 4.4 Fonte DART-MS.....	97
Figura 4.5 Análises DART-QqQ para BZP. (A) Padrão de BZP em metanol (B) Fluido oral enriquecido com BZP (cromatograma dos íons totais e espectro de massas DART(+)).....	111

Figure 4.6-A Análises por DART-MS em fluido oral enriquecido com as 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	112
Figure 4.6-B Análises por DART-MS em fluido oral enriquecido com as 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	113
Figure 4.6-C Análises por DART-MS em fluido oral enriquecido com as 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	114
Figura 4.7 Análises de DART-MS para folha de Damiana enriquecida com os mais comuns canabinóides sintéticos encontrados em amostras de apreensão (reais tipo <i>spice</i>).....	115
Figura 4.8 Cromatograma do Monitoramento Dinâmico de Reações Múltiplas (DMRM) das transições de quantificação para as 25 NPS apresentando aceitável separação.....	117
Figura 4.9 Gráfico com os resultados preliminares de recuperação com os experimentos E1-E12 para extração na fase sólida (SPE) para as 25 NPS.....	123
Figura 4.10 Gráfico com os resultados preliminares de desvio padrão relativo com os experimentos E1-E12 para extração na fase sólida (SPE) para as 25 NPS.....	124
Figura 4.11 Gráfico com os resultados preliminares de desvio padrão relativo com os experimentos E11 e E12 para extração na fase sólida (SPE) para as 25 NPS.....	125
Figura A1 Cromatografia em papel <i>office</i> e papel almaço usando eluição com CH ₃ OH:NH ₄ OH 100.0:0.0; 99.0:1.0; 98.0:2.0 or 97.0:3.0 v % e revelação com câmera com luz ultravioleta (UV) no comprimento de 254 nm.....	149

Figura A2 Cromatografia em papel do tipo Canson com variação de concentração dos padrões de: (a) Lidocaína (1 a 40 mg/mL), (b) Cocaína (0,5 a 16 mg/mL) e (c) Levamisol (1 a 40 mg/mL).....	150
Figura A3 Cromatografia em papel do tipo Almaco com variação de concentração dos padrões de: (a) Lidocaína (1 a 40 mg/mL), (b) Cocaína (0,5 a 16 mg/mL) e (c) Levamisol (1 a 40 mg/mL).....	151
Figura A4 Otimização dos parâmetros para análises DART-QqQ para JWH-018. (a) Otimização da temperatura do gás, (b) Otimização do fluxo do gás, (c) Otimização da tensão elétrica no eletrodo em grade, (d) Otimização da tensão elétrica na agulha e (e) Volume de amostra aplicado ao capilar.....	155
Figura A5 Otimização dos parâmetros para análises DART-QqQ para PB-22. (a) Tensão elétrica no eletrodo em grade, (b) Temperatura do capilar, (c) Compensação capilar, (d) Deslocamento Skimmer.....	156
Figura A6-A. Curvas de calibração, n = 7, das 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	157
Figura A6-B. Curvas de calibração, n = 7, das 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	158
Figura A6-C. Curvas de calibração, n = 7, das 25 novas substâncias psicoativas (NPS).....	159

RESUMO

A espectrometria de massas (do inglês *Mass Spectrometry*, MS) é uma poderosa ferramenta para caracterização química de moléculas devido à sua alta resolução e especificidade. Inicialmente foi aplicada a cromatografia em papel com revelação por reagente Dragendorff e posterior quantificação por espectrometria de massas por ionização em spray com papel (PS-MS). Em seguida, devido à alta tensão aplicada na PS-MS para formação de micro-gotas carregadas, foram utilizados materiais promissores, os polímeros com condutividade elétrica (PC). Além disso, a adsorção da superfície do papel revestido por PC pode ser determinante para análises de diversos analitos, tais como: avermectinas, bupropiona e seus metabólitos, anestésicos, ansiolíticos, hormônios, meloxicam, adulterantes e drogas de abuso. Dentre as drogas, o surgimento de novas substâncias psicoativas (NPS) é mundial e alarmante. Levando em conta esse crescente mercado para a síntese de NPS, a última parte deste estudo apresenta um método simples de análise direta em tempo real (DART) para examinar rapidamente as NPS. No capítulo 2, o método apresentou linearidade maior que 0,98 e LODs de 6,51 µg/mL, 13,53 µg/mL e 0,35 mg/mL para cocaína, levamisol e lidocaína, respectivamente. Dez amostras de apreensão foram quantificadas por PS(+)-MS e não houve diferença estatisticamente significativa com a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) a um nível de significância 5 %. No capítulo 3, os PCs sintetizados foram Polipirrol (PPy), Polianilina (PAni) ou ambos os polímeros [Poli (Py-co-Ani)]. Todos os analitos foram testados por PS(+)-FT-ICR e, na maioria dos casos, os papéis revestidos apresentaram um sinal superior de intensidade absoluta em comparação com o papel cromatográfico convencional. O papel com [Poli (Py-co-Ani)] mostrou melhores resultados e a linearidade da resposta foi avaliada no Orbitrap ($r^2 > 0,9851$). Submeteu-se o papel com [Poli (Py-co-Ani)] ao teste de viabilidade e, comparado ao tradicional papel cromatográfico, seus resultados são promissores para utilização na análise qualitativa e quantitativa com PS-MS, além de ser passível de reutilização. No capítulo 4, a triagem preliminar com DART-MS acelera o processo de detecção e o método apresentado engloba 25 compostos entre as classes mais proeminentes de drogas psicoativas, incluindo canabinóides sintéticos e derivados de catinona. Foram estudados extratos metanólicos de fluidos orais e de folha de Damiana em DART(+)-MS/MS e o método foi eficiente para triagem rápida e detecção de NPS em fluidos orais e material à base de plantas (*Turnera diffusa*). A LC-MS foi capaz de gerar espectros MS/MS com linearidade e sensibilidade adequadas. O método foi totalmente validado na faixa de 0,01 a 100 ppb. O resultado preliminar do protocolo SPE off-line proposto mostrou recuperações aceitáveis para a maioria das drogas. Amostras de controle de qualidade foram utilizadas durante o processo de validação do método, e todos os analitos mostraram RSD abaixo de 20 %.

Palavras-chave: Espectrometria de massa, Cromatografia em papel, Polímeros condutores, Cromatografia a líquido.

ABSTRACT

Mass spectrometry (MS) is a powerful tool because has high resolution and specificity for molecules chemical characterization. Initially, paper chromatography was developed using Dragendorff reagent and paper spray ionization mass spectrometry (PS-MS) for quantification. Then, polymers with electrical conductivity (PC) were studied because they are promising in high voltage applied in PS-MS and charging drops formation. Furthermore, PC-coated paper surface can be determinant for analyzes of various analytes, such as: avermectins, bupropion and its metabolites, anesthetics, anxiolytics, hormones, meloxicam, adulterants and drugs of abuse. The emergence of new psychoactive substances (NPS) is worldwide and alarming. Considering this growing market for NPS synthesis, the last part of this study presents a simple direct analysis in real time (DART) method. In Chapter 2, The method presented linearity greater than 0.98 and LODs of 6.51 $\mu\text{g/mL}$, 13.53 $\mu\text{g/mL}$ and 0.35 mg/mL for Cocaína, levamisole and Lidocaína, respectively. Ten samples were quantified by PS(+)-MS and there was not statistically significant difference between PS(+)-MS and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) at a significance level of 5 %. In Chapter 3, Polypyrrole (PPy), Polyaniline (PAni) or both polymers [Poly (Py-co-Ani)] were synthesized on paper by in situ polymerization. All the analytes were tested by PS (+)-FT-ICR and, in most cases, coated papers showed a higher absolute intensity signal compared to conventional chromatographic paper. The [Poly (Py-co-Ani)] paper showed better results and the linearity of the response was evaluated in Orbitrap ($r^2 > 0.9851$). The [Poly (Py-co-Ani)] paper was subjected to the reuse test and, compared to the traditional chromatographic paper, its results are promising for qualitative and quantitative PS-MS analysis. In Chapter 4, preliminary screening with DART-MS accelerates the detection process for 25 compounds among the most prominent classes of NPS, including synthetic cannabinoids and cathinone derivatives. Methanolic extracts were studied by DART(+)-MS/MS and it was efficient for rapid screening and detection of NPS in oral fluid and the herbal material (*Turnera diffusa*). LC-MS was able to generate MS/MS spectra with adequate linearity and sensitivity. The method was fully validated in the range of 0.01 to 100 ppb. Preliminary result of proposed off-line SPE protocol showed acceptable recoveries for the majority of drugs. Quality control samples were used during the method validation process, and all analytes showed RSD below 20 %.

Keywords: Mass spectrometry, Paper chromatography, Conducting polymers, Liquid chromatography.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	25
1.1 PAPER SPRAY IONIZATION (PS): UMA NOVA ABORDAGEM NA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	27
1.2 POLÍMEROS CONDUTORES: DO DESCOBRIMENTO À APLICAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE COMPÓSITOS.....	33
1.3 OS DESAFIOS E A IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE APREENSÃO NAS CIÊNCIAS FORENSES	40
2. CROMATOGRAFIA DELGADA EM PAPEL E REVELAÇÃO COM REAGENTE DRAGENDORFF NA QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E SEUS ADULTERANTES POR PS-MS	45
2.1 INTRODUÇÃO	45
2.2 OBJETIVOS	49
2.2.1 Objetivo Geral	49
2.2.2 Objetivos Específicos.....	49
2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	50
2.3.1 Reagentes.....	50
2.3.2 Reagente Dragendorff	50
2.3.3 Cromatografia em papel.....	51
2.3.4 PS-MS.....	52

2.3.5	Cromatografia Gasosa - Detector de Ionização por Chamas (GC-FID)	53
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
2.5	CONCLUSÃO	65
3.	O USO DE POLÍMEROS CONDUTORES COMO SUBSTRATO EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO EM SPRAY DE PAPEL	66
3.1	INTRODUÇÃO	66
3.2	OBJETIVOS	68
3.2.1	Objetivo Geral	68
3.2.2	Objetivos Específicos.....	68
3.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	69
3.3.1	Materiais e reagentes	69
3.3.1	Síntese dos polímeros condutores.....	70
3.3.2	Polianilina (PAni).....	70
3.3.3	Polipirrol (PPy)	70
3.3.4	Polipirrol e Polianilina [Poli (Py-co-Ani)]	71
3.3.5	Preparo das soluções padrão	72
3.3.6	PS(+)-FT-ICR MS	72
3.3.7	Orbitrap	73
3.3.7.1	Curvas de calibração	73
3.3.7.2	Viabilidade do papel com [Poli (Py-co-Ani)]	74
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	75
3.4.1	Otimização das análises com Paper Spray.....	75
3.4.2	Construção de curvas de calibração com espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap de alta resolução QExactive™	85
3.4.3	Avaliação da viabilidade do papel com [Poli(Py-co-Ani)]	87

3.5 CONCLUSÕES	91
4. POTENCIAIS APLICAÇÕES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM FLUIDO ORAL E FOLHA DE DAMIANA (<i>Turnera diffusa</i>) POR DART-MS/MS E LC-MS/MS.....	92
4.1 INTRODUÇÃO	92
4.2 OBJETIVOS	100
4.2.1 Objetivo Geral	101
4.2.2 Objetivos Específicos.....	101
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	101
4.3.1 Reagentes.....	102
4.3.2 Preparo de soluções estoque	102
4.3.3 Preparação de soluções de trabalho	102
4.3.4 Fluido oral humano	103
4.3.5 Preparo de amostra	103
4.3.6 Condições do DART-QqQ-MS	104
4.3.7 Condições de LC-QqQ-MS	104
4.3.8 Validação do método	105
4.3.8.1 Linearidade e carryover	105
4.3.8.2 Precisão e sensibilidade	106
4.3.8.3 Recuperação, efeito de matriz e eficiência do processo.....	106
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	110
4.4.1 DART-MS.....	110
4.4.2 LC-MS.....	116
4.5 CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS.....	133

APÊNDICE.....	149
ANEXOS.....	168

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espectrometria de massas (do inglês *Mass Spectrometry*, MS) é uma poderosa ferramenta para caracterização química de moléculas devido à sua alta resolução e especificidade. Inúmeros estudos têm sido realizados para facilitar a análise direta de amostras sob vácuo, como a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization*)^{1,2}, e sob condições ambiente, como a ionização com dessorção por *electrospray* (DESI)³, ionização com dessorção por *electrospray* assistida por laser (ELDI ou ionização por *electrospray* com ablação a laser LAESI, do inglês, *Laser ablation electrospray ionization*)⁴ e ionização ambiente por pulverização sônica (EASI, do inglês, *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization*)⁵. Recentemente, alguns trabalhos relatam fontes ambiente em análises direta de drogas e no uso de matrizes complexas como fluido oral, urina e sangue.^{6,7}

Desde 2010, a ionização com spray em papel (do inglês, *Paper Spray ionization*, PS) tem recebido grande atenção como método de ionização ambiente para análise em MS. Esta técnica de ionização demonstra ser um método promissor para análise direta de amostras complexas por causa de sua simplicidade.¹² Nas análises de PS-MS a amostra é aplicada sobre um papel triangular e, ao ser umedecido com solvente, ocorre a pulverização de microgotas carregadas na entrada do espectrômetro de massas. Uma alta voltagem (~3,5 kV) é aplicada no papel para a pulverização direta da amostra e, a dessolvatação ocorre sem o auxílio de gás.⁷

Embora a fonte de PS possua operação fácil, análise rápida e baixo custo, o seu desempenho é altamente dependente das propriedades da superfície do substrato devido as fortes interações do papel (ligação de hidrogênio e van de Waals) com

analitos contendo grupos funcionais polares.⁸ Existem limitados tipos de substratos de papel comercialmente disponíveis, por isso estudos são desenvolvidos para expandir as aplicações e as vantagens do PS-MS. Em Química Forense destacam-se as pesquisas no rastreio de drogas de abuso.⁹⁻¹¹

Pesquisas de identificação e quantificação de analitos e de impurezas são relevantes para os mais diversos processos investigativos, como por exemplo na avaliação de avermectinas em leite, em investigações de hormônios presentes em água, ou ainda, na investigação de anestésicos, ansiolíticos, fármacos, drogas de abuso (incluindo as novas substâncias psicoativas, do inglês, *New Psychoactive Substances*, NPS) e metabólitos em plasma, urina e sangue. É importante ressaltar que em amostras mais complexas, como matrizes biológicas, métodos cromatográficos são aplicados preliminarmente na separação e concentração amostral, tais como cromatografia líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*, LC), afim de minimizar efeitos de supressão iônica.

Por estas razões, este trabalho propõe análises de fármacos, metabólitos, drogas de abuso e adulterantes como uma alternativa eficiente para melhorar a detecção de diferentes compostos, desde estudos de reação com reagente Dragendorff e modificação da superfície do papel por polimerização *in situ* com PPy e/ou PANi em análises de PS-MS, até triagem por análise direta em tempo real (do inglês, *Direct Analysis in Real Time*, DART) e quantificação com LC-MS em fluido oral.

1.1 PAPER SPRAY IONIZATION (PS): UMA NOVA ABORDAGEM NA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A fonte PS foi apresentada pela primeira vez por Wang *et al.*¹², como um método de ionização de análise direta, rápida e de baixo custo para análise qualitativa e quantitativa de amostras complexas em MS. Este estudo relata que a fonte ambiente tem semelhanças com a fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e o desenvolvimento da ionização do analito ocorre pela condução de um alto campo elétrico aplicado a um material de suporte poroso, conforme a **Figura 1.1**. Na **Figura 1.1a**, uma gota de uma matriz complexa (0,4 μL de sangue) é aplicado diretamente ao papel cromatográfico de formato triangular, onde uma alta tensão de 4,5 kV é aplicada diretamente ao papel umedecido com 10 μL de metanol:água (1:1 v/v). A **Figura 1.1b** mostra o espectro de detecção por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) do m/z 494 a m/z 394. A **Figura 1.1c** apresenta as curvas de calibração para as triplicatas, nas quais as barras representam o desvio padrão das análises. Pela equação da reta verifica-se que a inclinação é de 1,0286 e a intercessão é de 0,0338 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente, pesquisas foram desenvolvidas na ampliação e na verificação da sensibilidade da técnica. Wang *et al.*¹³ exploraram o PS-MS para análise direta em tecidos, com pré-tratamento mínimo ou com pedaço da amostra do tecido sobre o papel, como mostrado na **Figura 1.2**. Essa técnica permitiu a detecção de hormônios, lipídios e fármacos com aquisição em um tempo inferior a 1 minuto e com um pequeno volume de amostra de tecido (tipicamente 1 mm^3 ou menos). As amostras de tecido podem ser adquiridas por biópsia (coleta de um pedaço do tecido) ou pelo contato do tecido fino com o papel utilizado. Esta pesquisa é promissora para aplicação de PS-

MS em conjunto com o procedimento tradicional de biópsia do tecido para o diagnóstico clínico.¹³

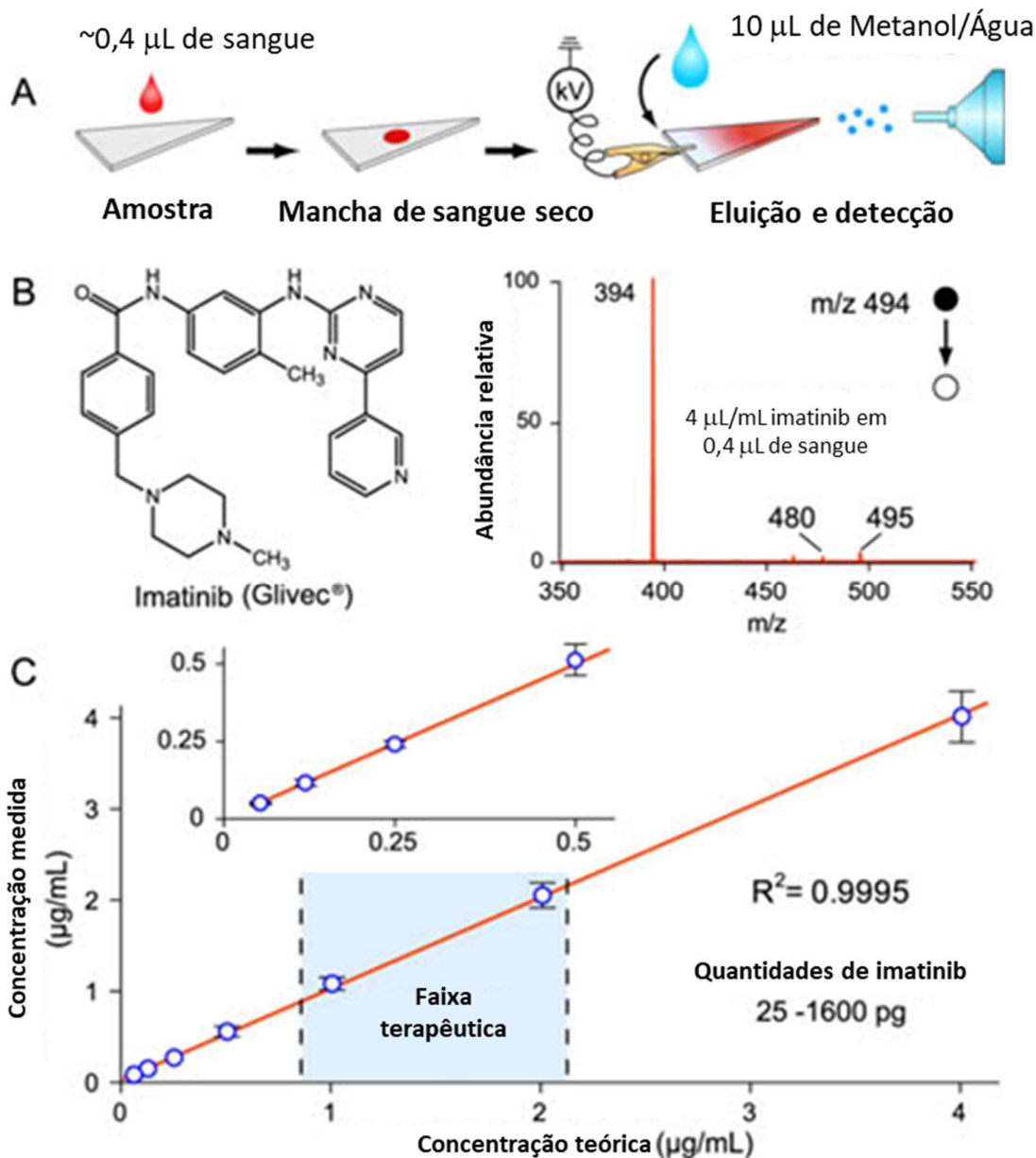


Figura 1.1 a) Análise de uma mancha de sangue seco sobre o papel. b) Estrutura molecular do imatinib (Gleevec, Glivec) e análise PS-MS de 0,4 μL de sangue contendo 4 $\mu\text{g/mL}$ de imatinib identificado e quantificado por MS/MS na transição de m/z 494 a m/z 394. c) Análise quantitativa de sangue total enriquecido com imatinib (62,5 ng/mL a 4 $\mu\text{g/mL}$) e $[D_8]$ imatinib (1 $\mu\text{g/mL}$).¹²

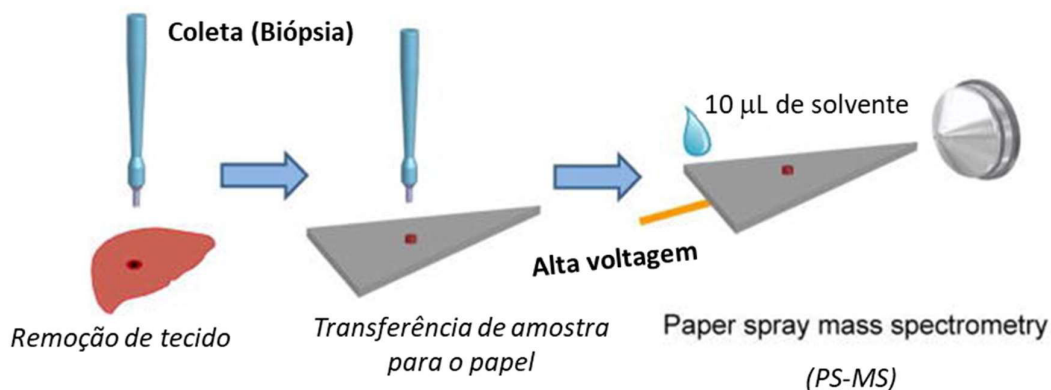


Figura 1.2 Procedimento para combinar biópsia de tecido com PS-MS.¹³

Com a aplicação do PS-MS as propriedades do papel se tornam essenciais, consequentemente, existem inúmeros estudos acerca dos tipos de papéis modificados para expandir as aplicações da técnica. Zhang *et al.*¹⁴ utilizaram papel revestido com sílica comercialmente disponível na análise de manchas de sangue seco e observaram uma melhoria de sensibilidade de 5 à 50 vezes em comparação com o papel cromatográfico tradicionalmente utilizado para análises de verapamil. Na **Figura 1.3a** verifica-se que o limite de quantificação (LOQ) foi de 0,1 ng/mL para o papel revestido por sílica e muito inferior ao LOQ de 100 ng/mL apresentado para os papéis cromatográficos de grau 4 (**Figura 1.3b**) e de grau ET31 (**Figura 1.3c**).

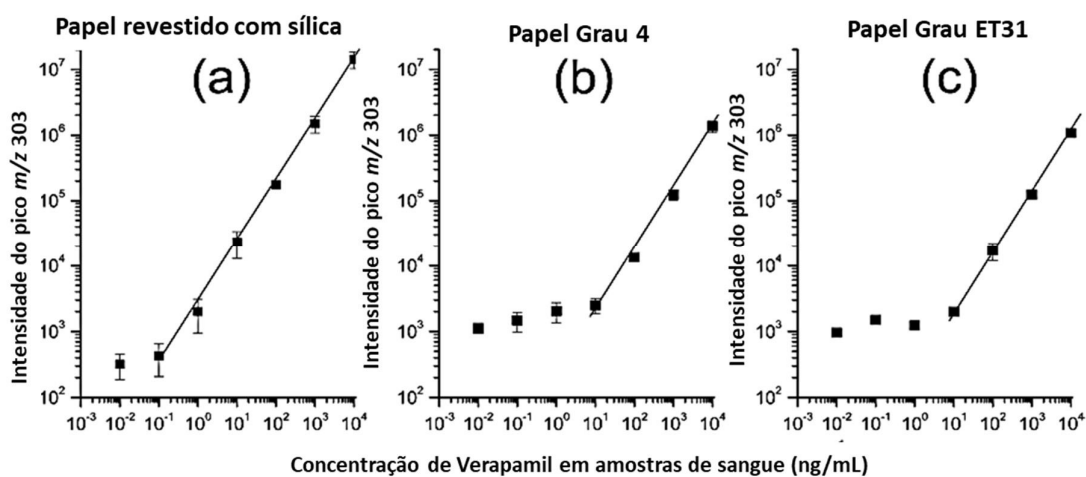


Figura 1.3 Comparação de limite de quantificação (LOQ) e da faixa linear para verapamil em sangue (m/z 303): (a) papel revestido com sílica, (b) papel cromatográfico de grau 4 e (c) papel de cromatográfico de grau ET31.¹⁴

Zhang *et al.*¹⁴ aplicaram uma alta tensão de 3,5 kV para a pulverização dos analitos. Evidenciando esta condição de análise, Narayanan *et al.*¹⁵ atingiram a ionização ambiente utilizando papel revestido com nanotubos de carbono sob a influência de um potencial de apenas alguns volts (até 3 V). As características nanométricas na superfície do papel são responsáveis pelos campos elétricos elevados, e, o uso com as moléculas orgânicas, resultou em espectros de massas de alta qualidade sem fragmentação nos modos de íons positivo e negativo. O desempenho deste método analítico tem sido demonstrado para uma série de compostos voláteis e não voláteis e em uma variedade de matrizes.¹⁵

Para análises de pesticidas em leite, Wang *et al.*¹⁶ desenvolveram um novo papel revestido por uma camada de sílica usando um método de filtração a vácuo e resultando no total recobrimento das fibras celulósicas na superfície superior do papel. Após a aplicação do substrato, devido a ausência da adsorção do analito por entre as fibras celulósicas e as melhores interações superficiais, foi observado um melhor desempenho deste papel comparado aos tradicionais papéis: papel cromatográfico não revestido e o papel SG81.¹⁶ Zheng *et al.*¹⁷ descreveram a preparação de diferentes materiais comercialmente disponíveis sobre a superfície do papel cromatográfico tradicional por meio de uma filtração à vácuo e observaram que a sensibilidade e a precisão foram atestadas no PS-MS para diversos analitos, tais como, fármacos, proteínas e compostos voláteis.

Um dos grandes desafios na espectrometria de massas consiste na análise de informações características aos peptídeos para o reconhecimento de proteínas em um banco de dados. Para o desenvolvimento do PS na proteômica, Hang *et al.*¹⁸ cortaram tiras do gel contendo as proteínas (separadas por eletroforese) e as colocaram sobre um papel modificado com nanotubos de carbono (CNTs), conforme

a **Figura 1.4** Por PS-MS alcançaram a extração direta e *in situ*, dessorção e ionização de proteínas intactas em condições ambiente. Essa técnica adotada com papel modificado apresentou uma estratégia para detecção direta de proteínas intactas em gel sem quaisquer pré-tratamento (por exemplo, digestão, extração química e dessalinização).

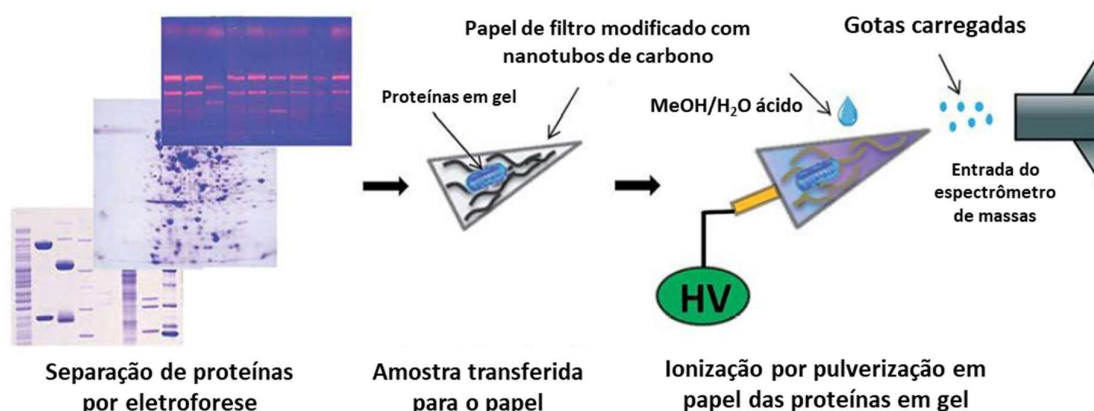


Figura 1.4 Diagrama esquemático de papel modificado com nanotubos de carbono para análises de proteínas em gel por PS-MS.¹⁸

Collettes *et al.*¹⁹ realizaram uma modificação na superfície do papel com barreiras de parafina (PS-PB). Este trabalho apresentou melhor desempenho em relação a uma gama de analitos típicos quando comparado com o PS-MS convencional e, o PS-PB, apresentou promissores resultados para a quantificação de glicose em licores de bagaço de cana-de-açúcar com boa linearidade ($r^2 = 0,99$).¹⁹ Para análises de anfetaminas em fluido oral, Ji *et al.*²⁰ modificaram a superfície do papel com grafenos mesoporosos o que atribuiu ao papel uma boa condutividade elétrica e, consequentemente, a diminuição da voltagem aplicada ao PS-MS. Além disso, este papel apresentou melhor separação e eficiência devido à sua maior área superficial.²⁰

Para a obtenção de análises com manchas de sangue seco, Zheng *et al.*⁸ revestiram o papel cromatográfico com diferentes óxidos metálicos, tais como MgO, Al₂O₃, TiO₂,

ZnO e ZrO₂, pelo método de filtração a vácuo e foram criados canais microfluídicos no papel a partir da impressão de cera sólida. Estas alterações foram realizadas com o intuito de minimizar as interações entre os grupos funcionais polares e facilitar a eluição para análise de fármacos. Os melhores resultados foram obtidos com o substrato de papel revestido com ZrO₂ devido às suas propriedades físico-químicas. Estes resultados foram melhores de 43 a 189 vezes no LLOQ para os fármacos testados em mancha de sangue seco, em comparação com o papel original.⁸ Com estes estudos, verifica-se que várias pesquisas são desenvolvidas para a técnica PS-MS mais eficiente e viável em relação à técnica tradicionalmente aplicada com papel de celulose não revestido.

1.2 POLÍMEROS CONDUTORES: DO DESCOBRIMENTO À APLICAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE COMPÓSITOS

Desde 1977, com Hideki Shirakawa *et al.*²¹, os Polímeros Condutores (PC) foram descobertos e investigados intensamente devido a sua possibilidade de reaproveitamento e a simples metodologia de preparo. Estes estudos envolviam a dopagem do poliacetileno com agentes oxidantes, aumentando sua condutividade elétrica de $10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ (na forma isolante) a 10^5 S cm^{-1} (como condutor intrínseco).²¹ Os PCs têm sido amplamente utilizados como biossensores²², sensores²³, eletrodos²⁴ e supercapacitores²⁵, devido à sua condutividade elétrica e boa estabilidade em condição ambiente.²¹

Poucos estudos foram publicados sobre PCs por 13 anos (desde 1977 a 1990) e de 1990 a 1991 os estudos aumentaram de 38 para 147 publicações, respectivamente. Desde então, despertou-se interesse em explorar as propriedades deste material que, de acordo com Macdiarmid²⁶, possui combinações das propriedades elétricas, óticas e magnéticas de um metal com propriedades comumente associadas aos polímeros, como as propriedades mecânicas. A partir de 2011 os estudos com polímeros condutores ultrapassaram a 1 mil publicações, e, em 2017 quase alcançaram a marca de 2 mil (1973 publicações), conforme a **Figura 1.5**. Este ano (2018) a marca já é superior, equivalente ao mesmo período, ao ano anterior e a perspectiva é que ultrapasse a marca de 2 mil publicações.

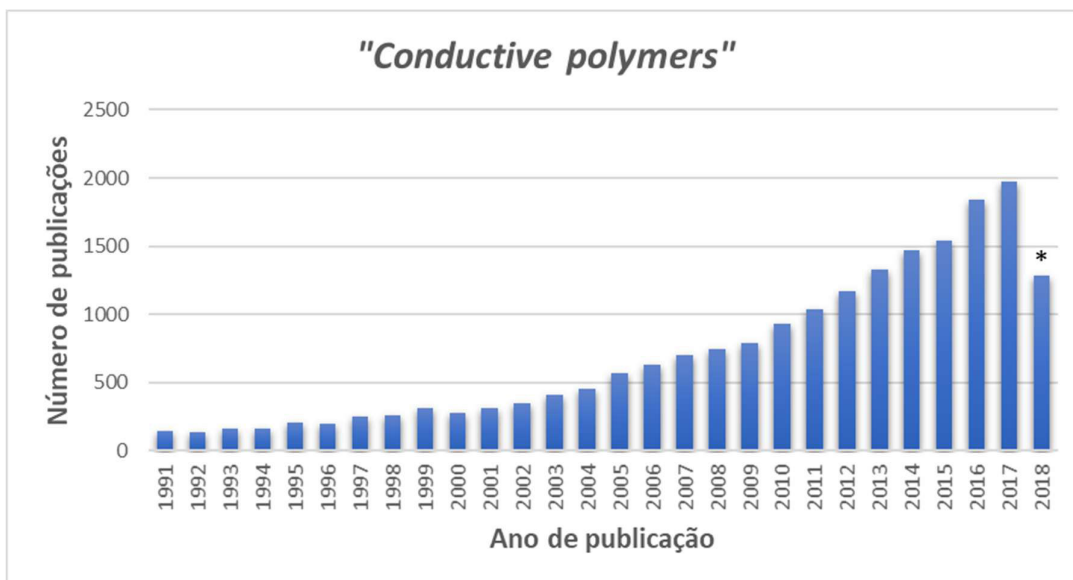


Figura 1.5 Número de publicações desde 1991 pesquisadas com o termo “conductive polymers”. *primeiro semestre de 2018 – Fonte: *Web of Science*.

Dentre os PCs destacam-se o Polipirrol (PPy, **Figura 1.6-A**) e a Polianilina (PAni, **Figura 1.6-B**). Na **Figura 1.6** observa-se que os monômeros dos PCs possuem ligações conjugadas que permite a deslocalização eletrônica e, conseqüentemente, as propriedades elétricas específicas.^{27,28}

Figura 1.6. Estrutura de monômeros condutores não dopados: **(A)** Polipirrol, **(B)** Polianilina, **(C)** Poliacetileno, **(D)** Politiofeno, **(E)** Polifurano e **(F)** Poli-iso-tianafteno.

Desde 1916 o PPy é estudado devido às suas propriedades, tais como estabilidade química, disponibilidade comercial, baixa toxicidade, capacidade de troca-iônica, caráter hidrofóbico e a condutividade elétrica que pode ser controlada através dos agentes dopantes.²⁹⁻³³

O primeiro método utilizado para síntese de PPy foi o eletroquímico com eletrodos de platina e pirrol em ácido sulfúrico, mas, dentre as metodologias aplicadas para se obter um revestimento polimérico em fibras de celulose, a mais empregada é a polimerização *in situ* que possibilita o preparo de materiais mais homogêneos.³⁴⁻³⁶

Para a polimerização *in situ*, Raghunathana *et al.*³⁷ sintetizaram filmes de PPy no revestimento de celulose regenerada com persulfato de amônio (APS, do inglês, *Ammonium Peroxy Disulphate*) como agente oxidante. Com isto, são insaturadas novas possibilidades no reaproveitamento de materiais na produção de compósitos para aplicação de capacitores com alto desempenho mecânico. Neste estudo foram realizadas análises de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS, do inglês, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) e difração de raios-X (DRX) que constataram a forte interação entre PPy e a celulose regenerada, permanecendo íntegra a estrutura cristalina das fibras de celulose com melhores propriedades elétricas e com condutividade elétrica aumentada sete vezes em relação à celulose regenerada sem PPy.³⁷

É importante ressaltar que, as propriedades metálicas são intrínsecas ao polímero dopado e a condutividade elétrica é aumentada com a exposição do polímero aos agentes oxidantes, como APS e cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). A

dopagem é um processo que promove carga (positiva ou negativa deslocalizada) a cadeia polimérica e os dopantes atuam como neutralizadores.²⁶

Embora o PPy possua inúmeras características vantajosas à sua aplicação, o seu filme é um material duro e quebradiço, por isso Ramaprasad *et al.*³⁸ estudaram o PPy com outro polissacarídeo promissor, a quitina, com o objetivo de desenvolver suas propriedades mecânicas. Com base nas análises de FTIR, Análise térmica simultânea (Análise termogravimétrica e Derivada termogravimétrica ATG/DTG), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM) foi proposto o mecanismo apresentado na **Figura 1.7**, em que o APS promove a polimerização do pirrol e o seu excesso reage com a cadeia principal da quitina, formando radicais. O filme de coloração preta, presente em todas as amostras preparadas, confirmaram a síntese do PPy na quitina.³⁸

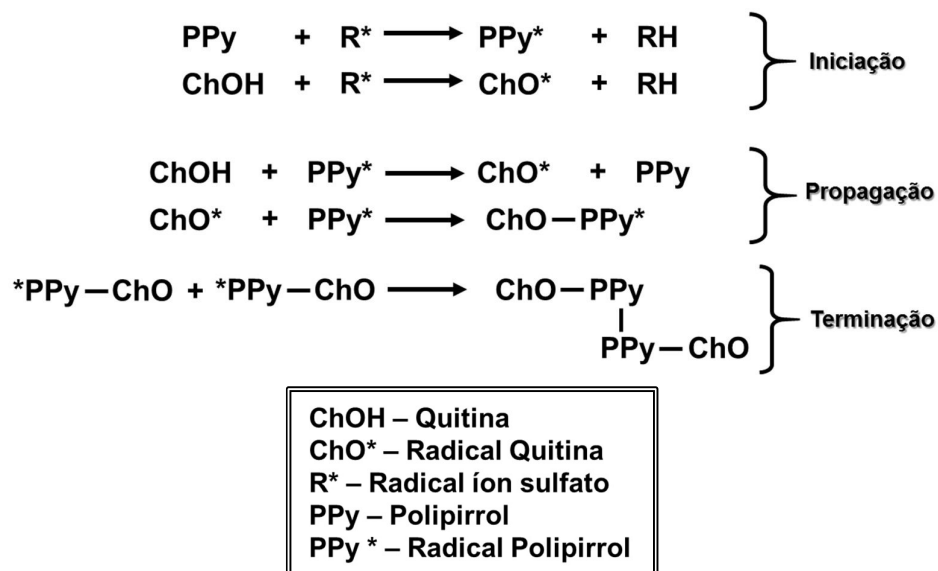


Figura 1.7. Esquema da copolimerização do PPy com a quitina.³⁸

O PPy na sua forma completamente oxidada (formação do bipolaron, **Figura 1.8** são retirados dois elétrons e há inserção de contra-íons (dopantes) no balanceamento de cargas.³⁹

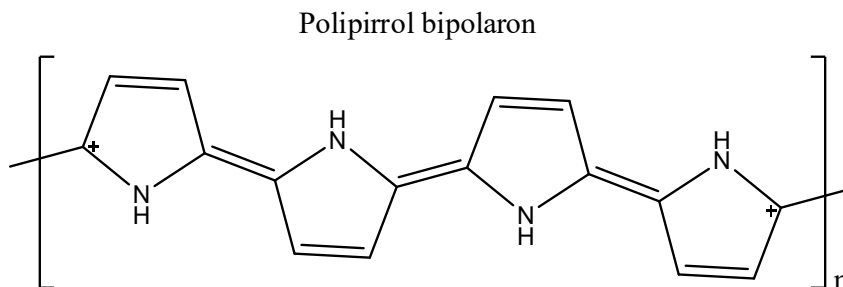


Figura 1.8 Polipirrol bipolaron.³⁹

Outro PC muito empregado é a PANi conforme observou-se na pesquisa ao *Web of Science* com o termo “*Polyaniline*” (**Figura 1.9**). Dos polímeros mais pesquisados, a PANi corresponde a 45 % das publicações e juntamente com PPy (termo utilizado “*Polypyrrole*”) ocupam 76 % das publicações até agosto de 2018.

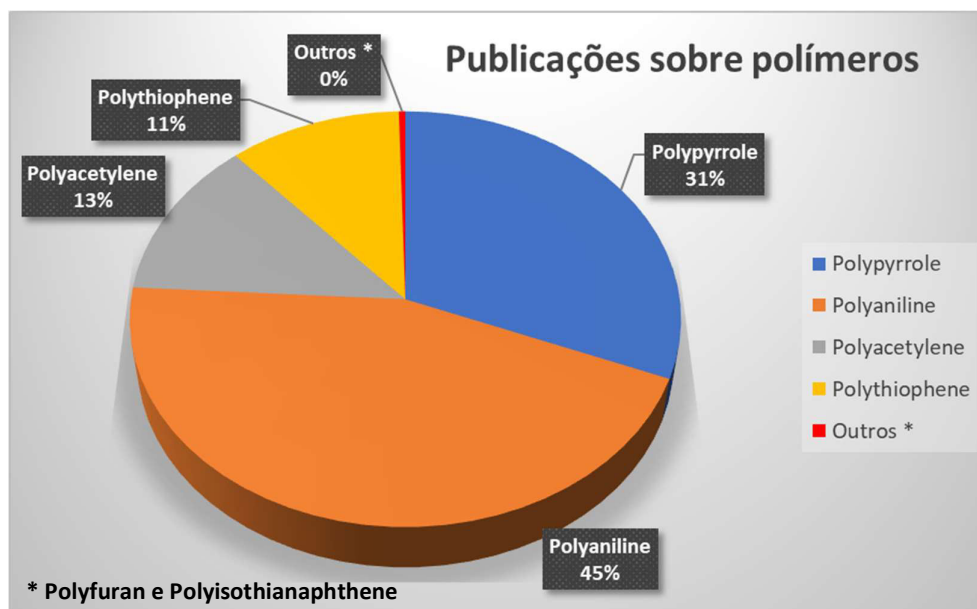


Figura 1.9 Publicações até agosto de 2018 com os termos “*Polypyrrole*”, “*Polyaniline*”, “*Polyacetylene*”, “*Polythiophene*”, “*Polyfuran*” e “*Polyisothianaphthene*” na base *Web of Science*.

Fonte: Do autor.

A PANi é estudada desde 1862 quando foi sintetizada por uma oxidação anódica da anilina com o ácido sulfúrico e destaca-se pela estabilidade química no seu estado dopado, fácil polimerização e baixo custo em relação aos PCs. ⁴⁰⁻⁴³

Mo *et al.*²⁸ sintetizaram compósitos por polimerização oxidativa da anilina variando os tipos de ácidos na ativação da celulose, ou seja, no bloqueio das interações intermoleculares de hidrogênio presentes na celulose. Foram testados ácidos monobásicos e dibásicos, nos quais os compósitos preparados com ácidos dibásicos apresentaram melhores condutividades enquanto que, o aumento de PANi e do tempo de ativação diminuíram a condutividade devido a presença de agregados sólidos. É importante ressaltar que os ácidos podem ser utilizados como dopantes para reagir com a PANi e aumentar a condutividade dos compósitos.²⁸

A PANi também pode ser sintetizada em superfícies de celulose bacteriana, como estudado por Jasim *et al.*⁴⁴. Estas membranas poliméricas compostas por PANi, celulose bacteriana e nanotubos de carbono em parede única (SWCNTs, do inglês, *single-walled carbonnanotubes*), são eletricamente condutoras e promissoras como membrana eletroquímica e como biossensores. O método empregado foi a polimerização oxidativa *in situ* e sua síntese ao longo das fibras de celulose foi confirmada por análises superficiais, tais como MEV, FTIR e DRX. As aplicações comerciais são altamente dependentes da estabilidade térmica a altas temperaturas, por isto, Jasim *et al.*⁴⁴ analisaram as propriedades térmicas por TGA e verificaram que a estrutura conjugada com SWCNTs auxiliou no aumento da temperatura de degradação dos compósitos, de 232 °C (celulose bacteriana) para 260 °C (compósito celulose-PAni), 302 °C (compósito celulose-PAni/ SWCNTs 0,05 mg/mL) e 310 °C (compósito celulose-PAni/ SWCNTs 0,1 mg/mL). Além disso, a condutividade elétrica aumentou de $1,04 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ (celulose bacteriana) para $4,64 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ e $1,41 \times 10^{-2} \text{ S cm}^{-1}$ para compósitos celulose-PAni/ SWCNTs em concentrações de 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente.

A condutividade elétrica da PANi é dependente ao grau de polimerização, morfologia das partículas, cristalinidade, interações internas intra-cadeia e, dentre outras características, destaca-se o estado de oxidação.⁴⁴ Na sua forma completamente reduzida (**Figura 1.6-B**), a PANi apresenta coloração amarela e denomina-se Leucoesmeraldina, já como condutora parcialmente oxidada (**Figura 1.10**), a PANi possui coloração esverdeada e denomina-se sal de esmeraldina. O sal de esmeraldina é estabilizado pela formação de dois polarons deslocalizados e por isso, possui condutividade elétrica.⁴⁵

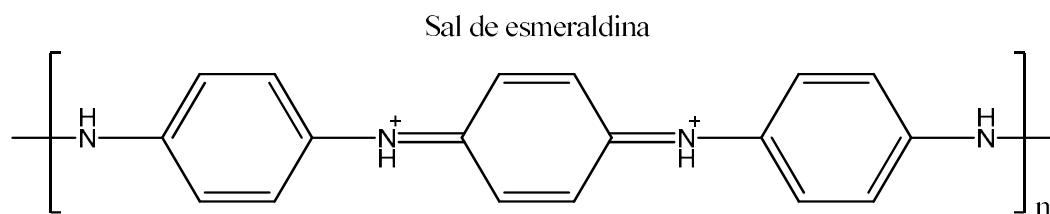


Figura 1.10. Sal de esmeraldina.⁴⁵

A utilização de apenas um polímero pode agregar desvantagens como fragilidade e baixo nível de processabilidade que dificultam a formação de fase com propriedades metálicas.^{29, 46} Afim de ampliar tais propriedades, misturas de materiais são promissores para melhorias estruturais e físicas. Enquanto um polímero colabora com as propriedades mecânicas o outro contribui como condutor.³⁸ Por isso, PPy e PANi são bons substratos de revestimento no papel cromatográfico devido à presença de grupos imina e amina que permitem interações com compostos orgânicos e inorgânicos presentes em diferentes matrizes. Além disso, a utilização de ambos os polímeros possibilita uma elevada área superficial, estabilidade, capacidade de extração para diferentes analitos e a manifestação de propriedades multifuncionais, tais como hidrofobicidade, caráter ácido-base, interações π - π , grupos funcionais polares, propriedades de troca iônica, ligação de hidrogênio e eletroatividade.²⁷

1.3 OS DESAFIOS E A IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE APREENSÃO NAS CIÊNCIAS FORENSES

Segundo o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime*, UNODC) aproximadamente 275 milhões de pessoas em todo o mundo (5,6 % da população mundial entre 15 e 64 anos) usaram drogas pelo menos uma vez em 2016. Cerca de 11 % (31 milhões de pessoas) sofrem de transtornos por uso de drogas. Estes números são cada vez mais alarmantes e pesquisas estimaram que 13,8 milhões de jovens (5,6 %) entre 15 e 16 anos usaram *cannabis* no ano passado (2017).⁴⁷

Inúmeras mortes pelo uso de drogas são relatados pelo mundo e essas mortes são atribuídas diretamente a transtornos por uso de drogas (principalmente overdoses) e indiretamente ao uso de drogas, onde incluem mortes relacionadas ao HIV e à hepatite C adquiridas por meio de práticas injetáveis inseguras.⁴⁷

A quantidade de usuários de drogas apresentara mínima mudança no decorrer dos anos, todavia, estes resultados mascaram as mudanças nos mercados de drogas, tais como a coexistência de NPS com drogas mais antigas. A prática do uso de incensos herbais contendo canabinóides sintéticos se tornou comum em consequência da distribuição legal de incensos e das muitas substâncias químicas (utilizadas em conjunto) ainda serem desconhecidas ou legalmente permitidas no mercado. Identificação desses produtos se tornou um enorme problema aos departamentos de investigação devido à variedade e ao número de apreensões. Marino *et al.*⁴⁸ empregou análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN) e de DART-MS no rastreio dos canabinóides sintéticos para uma detecção rápida, mais precisa, com maior potencial de detecção e complementar a

técnicas tradicionais, como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *Gas Chromatography mas spectrometry*, GC-MS) e LC-MS. Nestes estudos foram descobertos 10 canabinóides sintéticos em quinze incensos herbais e até uma mistura de três componentes da amostra herbal da *spice* foi detectada com as identificações isoméricas corretas. *Spice* são misturas de ervas e extratos de plantas aromáticas, comercializados como similares aos incensos.⁴⁹

Inúmeras iniciativas para obtenção de sensibilidade e precisão são constantemente apresentadas na espectrometria de massas em análises de moléculas orgânicas polares de grande interesse na medicina e de cunho social, como as drogas de abuso. Coulter, Garnier e Moore⁵⁰ publicaram o primeiro procedimento analítico para a determinação simultânea de canabinóides sintéticos (JWH-250, HU-210, JWH-018, JWH-073, JWH-200, CP-47497 e CP-47497 C8) em fluido oral usando extração na fase sólida (do inglês, *solid-phase extraction*, SPE) e LC-MS. O método foi validado e resultados de recuperações foram superiores a 60 % em duas concentrações (4 e 40 mg/L). Após o uso uma única vez, o JWH-018 foi detectado no fluido oral em 20 min após o uso (35 µg/L em “Blueberry Posh” e 5 µg/L em “Black Mamba”) e foi detectado até 12h após o consumo.

Dentre as matrizes biológicas utilizadas em análises toxicológicas, a coleta de fluido oral é um procedimento não invasivo e fornece boas informações sobre a concentração plasmática, diante disso, o fluido oral é muito utilizado para ensaios periciais para suspeita do uso de drogas em motoristas. Montesano *et al.*⁵¹ estudaram a miniaturização da SPE para análises de 20 drogas ilícitas, (cocaína, anfetaminas, opioides naturais e sintéticos e alucinógenos) em fluido oral seguida de análise por LC-MS/MS e o método foi validado de acordo com as diretrizes do grupo de trabalho

científico para a toxicologia forense (do inglês, *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*, SWGTOX). Com estes resultados, a técnica de microextração se apresentou adequada para o manuseio de fluido oral em um volume amostral pequeno (120 μ L) com baixa supressão iônica em ESI-MS/MS (abaixo de 15 % para todos os analitos) sem perda de desempenho em cerca de 100 ciclos de extração. Constatou-se o pH da solução de eluição corroborou consideravelmente nas recuperações (**Figura 1.11**), e, em meio alcalino a recuperação foi significativamente maior para as substâncias alcalinas por causa da maior interação solução de eluição/analito. Nestas condições, Montesano *et al.*⁵¹ alcançaram resultados de recuperação superiores a 60 % para todos os analitos, exceto para éster metílico de ecgonina (do inglês, *ecgonine methyl ester*, EME) e benzoilecgonina (do inglês, *Benzoylecgonine*, BEG). Os resultados ruins de recuperação para esses analitos não foi um problema, porque mesmo assim, o método se mostrou suficiente para a determinação qualitativa e quantitativa dessas substâncias.

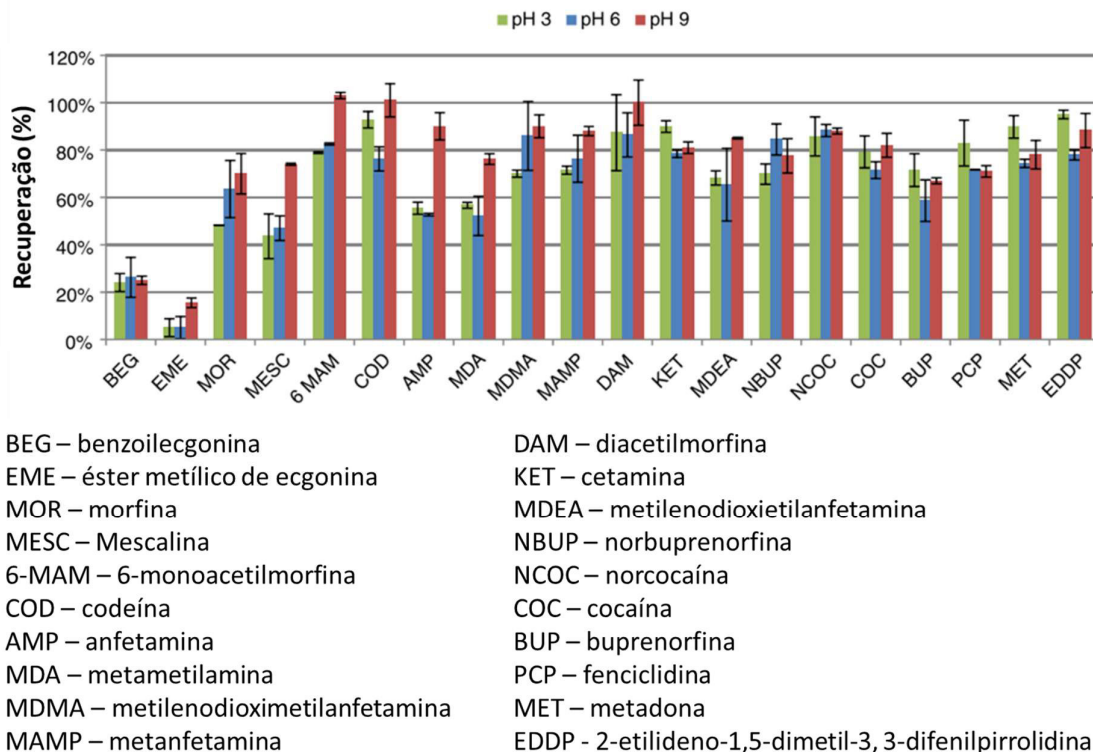


Figura 1.11. Recuperação em função do pH da solução de eluição das amostras reais de OF misturadas com 20 % de metanol.⁵¹

Além da identificação e quantificação de novas substâncias, estudos de substâncias que estão no tráfico há mais tempo, como cocaína e heroína, ainda são de suma importância. Segundo Botelho *et al.*⁵² os perfis químicos (pureza média, grau de oxidação e a relação cis/trans-cinamoilcocaína e cocaína) são essenciais para a elaboração das rotas do tráfico, por exemplo, a maioria das amostras de cocaína não oxidadas são oriundas de estados de fronteira com países produtores.

Apesar da toxicidade da cocaína no corpo humano ser bem estudada, os efeitos sinérgicos com os seus adulterantes ainda não são muito estudados. Pawlik *et al.*⁵³ quantificaram cocaína e adulterantes por SPE ou extração líquida-líquida (do inglês, *liquid-liquid extraction*, LLE) seguida por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com analisador do tipo tempo de voo (do inglês, *high-pressure-liquid-chromatography-time-of-flight-mass spectrometry*, LC/TOF-MS)

em amostras de sangue do coração, sangue da veia femoral e do tecido pulmonar para 11 casos. Com esses resultados Pawlik *et al.*⁵³ atestaram que nos pulmões há concentrações mais altas de adulterantes comumente encontrados em cocaína (diltiazem, hidroxizina, levamisol, lidocaína, fenacetina), como verifica-se para o levamisol na **Figura 1.12**, e que pode haver a redistribuição destes após a morte para o sangue do coração. Desta forma, deve considerar-se a análise do pulmão antes do sangue do coração, urina ou tecido cerebral na determinação da causa de morte.

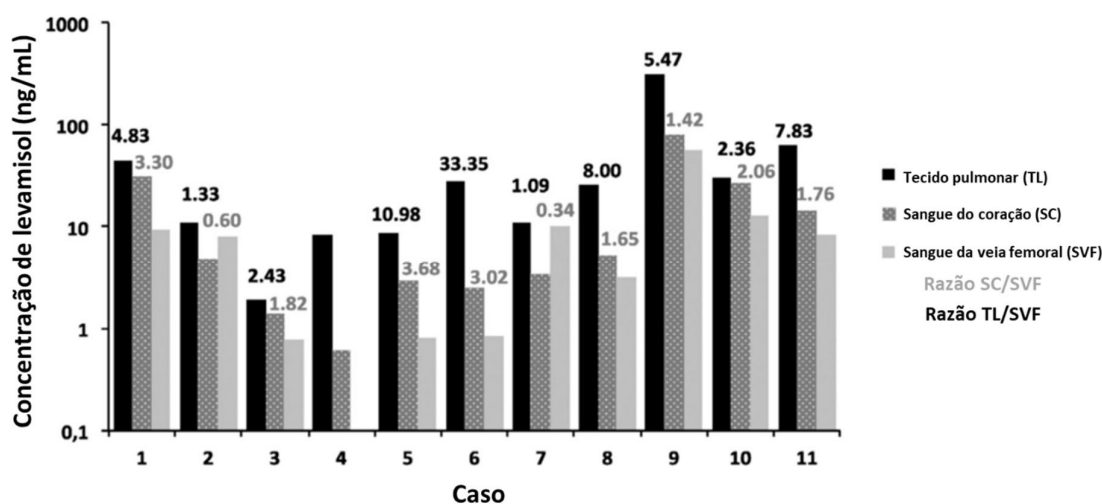


Figura 1.12. Comparação das concentrações de levamisol no tecido pulmonar (preto), sangue do coração (cinza pontilhado branco) e sangue da veia femoral (cinza claro) e as proporções de sangue do coração para sangue da veia femoral (números cinza acima das colunas) e tecido pulmonar para veia femoral sangue (números pretos acima das colunas) em 11 mortes relacionadas à droga (escala logarítmica).

Com estes estudos nota-se a importância do desenvolvimento de procedimentos de análise rápida para agilizar os processos judiciais, concisa para laudos mais precisos e acessíveis aos departamentos responsáveis em processos investigativos.

2. CROMATOGRAFIA DELGADA EM PAPEL E REVELAÇÃO COM REAGENTE DRAGENDORFF NA QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E SEUS ADULTERANTES POR PS-MS

2.1 INTRODUÇÃO

Segundo o relatório do UNODC (2016), o consumo de cocaína no Brasil é o mais proeminente na América do Sul, responsável por 51 % do tráfico ilícito de cocaína para a África, a Colômbia é responsável por 18 %, o Peru por 13 % e o Chile por 9 %.⁵⁴ O Brasil revela ser um dos maiores mercados ilegais de cocaína devido às suas grandes fronteiras com os países produtores, bem como à sua localização costeira. As taxas de consumo brasileiras são semelhantes às da América do Norte, Europa Central e Oriental.⁵⁵

A Cocaína (**Figura 2.1a**) é consumida principalmente como sal (cloridrato de cocaína) ou em forma de base livre (crack). O cloridrato de cocaína é um sal solúvel em água obtido como um pó, e pode ser administrado por aspiração ou por via intravenosa. O crack, no entanto, aparece como uma pedra e é ligeiramente solúvel, mas é facilmente volatilizado quando aquecido devido ao seu baixo ponto de fusão (aproximadamente 95 °C) e pode ser administrado via respiratória.⁵⁶ De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a cocaína é o [1R- (exo,exo)]-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-éster metílico de ácido carboxílico. Sua fórmula molecular é $C_{17}H_{21}NO_4$, e sua massa molar é 303,4 g/mol. O intervalo do ponto de fusão da cocaína é de 96–98 °C, e seu $pK_b = 5.4$.^{57,9}

Geralmente, as amostras de apreensões de cocaína da polícia civil do Brasil são compostas por adulterantes, nos quais são utilizados durante a sua comercialização com o objetivo de aumentar lucros e mitigar os efeitos da cocaína. Muitos dos adulterantes tiveram seus usos controlados através da Lei nº 10.357 de 27 de dezembro de 2001.⁹ A **Figura 2.1b-f** mostra as estruturas químicas de alguns adulterantes encontrados em amostras de cocaína apreendidas no mercado ilícito brasileiro. Eles são: levamisol, lidocaína, cafeína, benzocaína e fenacetina.^{58,59}

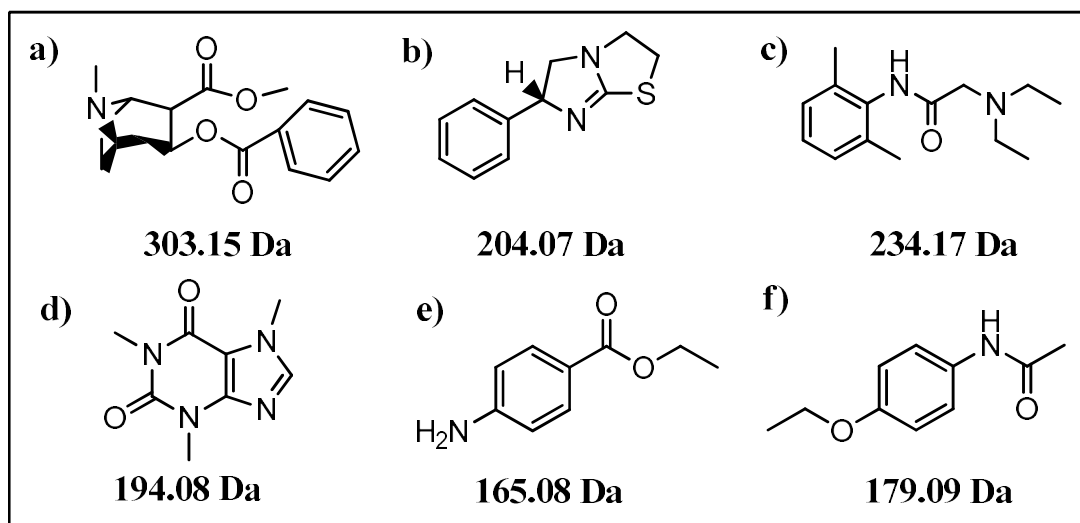


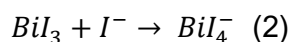
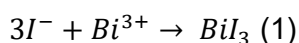
Figura 2.1 Estrutura Química de (a) Cocaína (base livre), (b) Levamisol, (c) Lidocaína, (d) Cafeína, (e) Benzocaína, e (f) Fenacetina.

As metodologias analíticas empregadas para análise de cocaína são principalmente qualitativas. Pelo menos dois exames são realizados: um teste preliminar usando via úmida e um teste analítico com maior seletividade. Testes colorimétricos ou pré-testes possuem as vantagens de rapidez, baixo custo e facilidade de execução e interpretação. No entanto, eles apresentam baixa especificidade. Entre os testes colorimétricos usados para determinar a presença de anel tropano, o teste que usa uma solução de tiocianato de cobalto é usualmente empregado.^{60,61} No entanto, resultados positivos podem ser encontrados quando alguns adulterantes ou diluentes

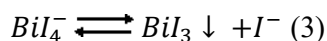
estão presentes, como lidocaína, leite em pó e prometazina.⁶¹

Um outro teste colorimétrico que pode ser utilizado, é o reagente de Dragendorff que é aplicado na identificação de alcalóides, sais de amónio quaternário, lactamas e fenotiazinas. Para a análise de cocaína, um resultado positivo é encontrado, quando manchas laranja-avermelhadas são reveladas.⁶²

O reagente de Dragendorff é comumente preparado a partir da mistura aquosa de subnitrato de bismuto ($\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9(\text{NO}_3)_4$) e iodeto de potássio,⁶³ formando uma solução homogênea de coloração amarela (reação química é mostrada nas **equações 1 e 2**). Jia e Tian (2009)⁶³ apresentaram análise quantitativa de polietilenoglicol (PEG) com reagente Dragendorff modificado para evitar a hidrólise do Dragendorff que resulta em uma curva não-linear e insatisfeita reprodutibilidade. O espectro de absorção da solução de subnitrato de bismuto não possui uma faixa de absorção de 300 nm a 800 nm e a solução de KI mostra a absorbância abaixo de 340 nm. Quando as soluções são misturadas, reage com I^- e Bi^{3+} e precipita BiI_3 . O excesso de KI reage com BiI_3 e forma o complexo BiI_4^- , de acordo com a eq. (1) e (2).⁶³



Quando utilizada a água para obter o reagente de Dragendorff, a mistura torna-se turva e dourada. A hidrólise de BiI_4^- ocorre e a formação de precipitados pretos (BiI_3) e laranjas (BiOI), de acordo com as **equações (3) e (4)**. Para evitar a hidrólise, Jia e Tian (2009)⁶³ prepararam a mistura de PEG e o reagente de Dragendorff com solução de HAc para a curva de calibração.



Uma das primeiras metodologias utilizando reagente Dragendorff foi em 1970. Tyihak e Vagujfalvi⁶⁴ utilizaram o reagente Dragendorff para alguns aminoácidos e seus derivados em cromatografia em papel e em cromatografia em camada delgada (do inglês, *Thin Layer Chromatography*, TLC) e relatam que a seletividade e a especificidade do reagente de Dragendorff quando diluído com ácido sulfúrico podem ser aumentadas em sistemas cromatográficos como à cromatografia em papel e TLC. Neste caso, após a eluição cromatográfica, o reagente de Drangendorff foi pulverizado sobre a superfície da placa cromatográfica. Em 1987, Mal e Biswas⁶² compararam a revelação de sulfonas, sulfóxidos e sulfetos com reagente de Dragendorff e reagente ácido crômico-ácido acético. Eles viram que o reagente de Dragendorff parece ser igual ou mais sensível que a revelação em lâmpada ultravioleta (UV) e produz um contraste de cor claro e estável no TLC.

Neste trabalho, a cocaína e seus adulterantes (cocaína, levamisol, lidocaína, cafeína, benzocaína e fenacetina) foram analisados utilizando a cromatografia em papel revelada pelo reagente de Dragendorff. No entanto, forneceu resultados falso-positivos para alguns aditivos de cocaína, como lidocaína e levamisol. Portanto, sua sensibilidade e a seletividade foram melhoradas a partir do acoplamento de cromatografia em papel com a técnica de PS-MS, onde um modelo de quantificação foi construído, e as figuras de mérito como linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e exatidão foram obtidos. Além disso, determinou-se a concentração de cocaína em dez amostras de rua apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo (PC-ES), e os valores obtidos foram comparados a um método validado, normalmente empregado pela Polícia Federal Brasileira, a cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Elaborar um procedimento operacional padrão para triagem por cromatografia em papel assistida por revelação com reagente Dragendorff e quantificação por PS-MS em amostras de cocaína e adulterantes.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Aprimorar o sistema de eluição para cromatografia em papel.
- Comparar a cromatografia em papel com três diferentes tipos papéis: Almaco, Canson e Office.
- Correlacionar revelação por câmara com luz UV (254 nm) e reagente Dragendorff.
- Elaborar curvas de calibração nas análises de PS(+)-FT-ICR MS para os principais padrões cocaína, levamisol e lidocaína) com o papel que apresentou maior eficiência na cromatografia em papel.
- Averiguar diferenças estatísticas entre o método tradicionalmente aplicado (GC-MS) ao procedimento proposto (PS-MS).

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 Reagentes

Uma amostra padrão de referência de cocaína foi fornecida pela Polícia Federal (FP, Porto Alegre, RS, Brasil) e foi utilizada para preparar soluções estoque de 0,5 a 20 mg/mL. As amostras apreendidas foram fornecidas pela Polícia Civil (Vitória, ES, Brasil) e foram preparadas soluções de 10 mg/mL. Os padrões de levamisol (≥ 98 %, fornecidos pela Sigma-Aldrich, São Paulo) e lidocaína (99,0 %, fornecidos pela Vetec Química Fina Ltda, no Rio de Janeiro) foram utilizados para preparar soluções estoque de 1 a 40 mg/mL. Utilizou-se cafeína anidra (98,5 %, fornecida pela Feneire) e benzocaína (98,0 %, fornecida pela Sigma-Aldrich, São Paulo) para preparar soluções estoque de 20 mg/mL.

Os reagentes utilizados na cromatografia em papel e PS-MS foram metanol (99,9 %, grau HPLC, por JTBaker), hidróxido de amônio (28 % NH_3 em H_2O , por Sigma Aldrich), água Milli-Q, clorofórmio (≥ 99 %, por Sigma Aldrich), ácido acético glacial e éter etílico (99,5 %, por Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro), iodeto de potássio (99,4 %, Cromatografia Produtos Químicos LTDA) e subnitrato de bismuto (III) (79,0 %, por Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro).

2.3.2 Reagente Dragendorff

O reagente Dragendorff foi preparado com a adição de 1 mL de solução aquosa saturada de subnitrato de bismuto ($\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9(\text{NO}_3)_4$) com 2 mL de ácido acético e 10 mL de água destilada. Em seguida, foram acrescentados 13 mL de iodeto de potássio 40 % (m/v).

2.3.3 Cromatografia em papel

Inicialmente, três diferentes tipos de papéis foram empregados e otimizados para análise de cromatografia em papel: almaço, canson e *office* que, quando comparados ao papel cromatográfico (*Whatman* Grade 1, 11 μm pores, GE Healthcare, USA), reportam uma análise de baixo custo para a cromatografia em papel. Os papéis foram cortados com dimensões de 20x20 cm^2 . As aplicações de cocaína e seus adulterantes foram de 10 μL de soluções 20 mg/mL . Três sistemas de eluição são recomendados pelas diretrizes do UNODC⁶⁵ para a TLC: (1) $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}$ glacial 75:20:5 v%; (2) $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}:\text{CHCl}_3$ 50:50 v%; e (3) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 100:1.5 v%. Os sistemas foram testados e, após a secagem, o papel foi revelado em câmara com luz UV de comprimento de 254 nm e reagente Dragendorff. Similar a Carvalho *et al.*⁹ o sistema de eluição ótimo foi o de 99.5:0.5 v% de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$.

A sensibilidade e o LOD para a análise cocaína e seus adulterantes usando cromatografia em papel foi testada variando a concentração de 1 a 40 mg/mL para os adulterantes e de 0,5 a 16 mg/mL para cocaína. O LOD foi visualmente determinado para cocaína, levamisol e lidocaína usando dois tipos de reveladores: a câmara com lâmpada UV (254 nm) e o revelador Dragendorff. As amostras foram aplicadas com um volume constante de 10 μL utilizando uma microseringa. A **Figura 2.2** sumariza o procedimento experimental desenvolvido. O RF (fator de retenção, do inglês, Retardation Factor (R_F)) foi determinado a partir da eq. (5):

$$R_F = \frac{\text{Distância percorrida pelo analito (DA)}}{\text{Distância percorrida pelo solvente (DS)}} \quad (5)$$

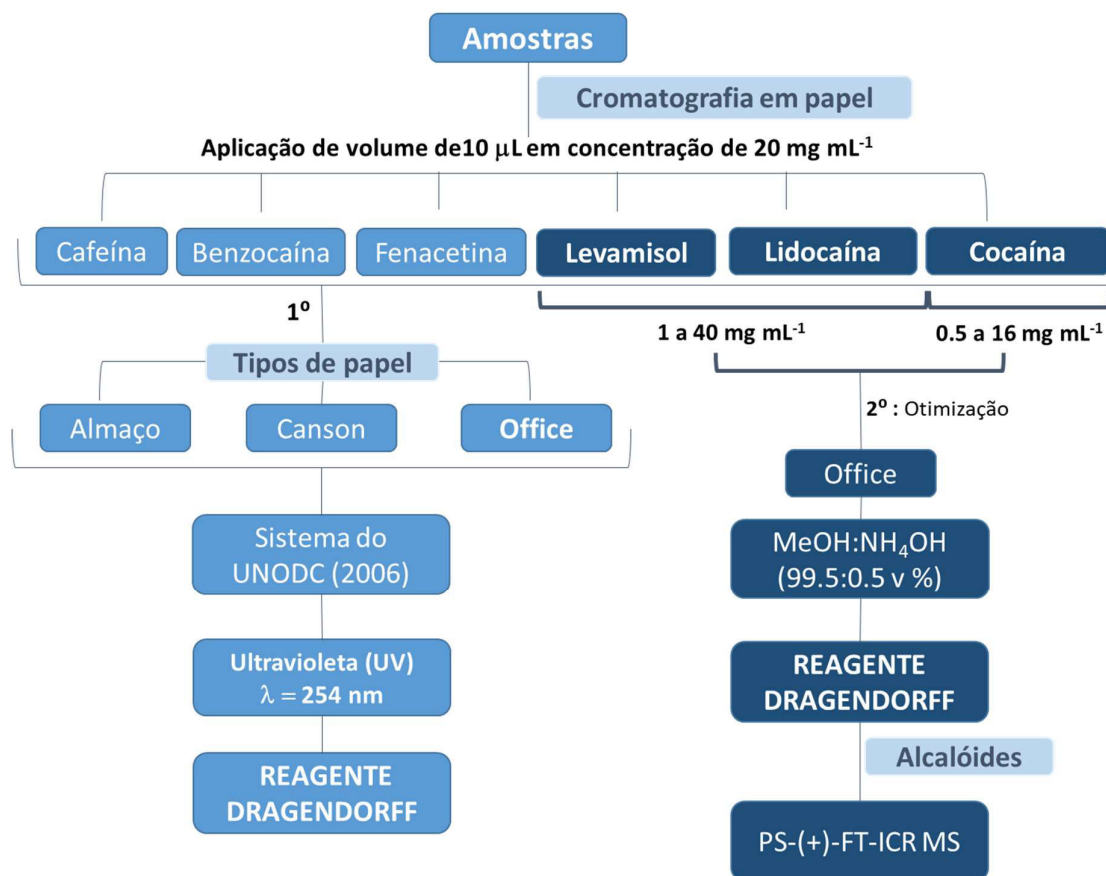


Figura 2.2 Fluxograma do procedimento aplicado à cromatografia em papel para identificação e quantificação de cocaína e seus adulterantes (levamisol e lidocaína)

2.3.4 PS-MS

Os experimentos com PS-MS foram realizados em modo positivo de ionização (PS(+)) usando espectrômetro de massas com ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, FT-ICR MS, model 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics Bremen).

Os pontos revelados foram então cortados em triângulos de papel (1,2 x 7 mm) e fixados por um clipe jacaré de metal a 5-7 mm da entrada do espectrômetro de massas. Aproximadamente 10 µL de metanol e uma alta voltagem de 3,8 kV fornecida pelo espectrômetro de massas foram aplicados ao papel para gerar o espectro de

massas. O acúmulo de tempo de íons foi de 0,040 s. Os espectros de massas PS (+) FT-ICR foram adquiridos acumulando 16 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo em 512k conjuntos de dados no domínio do tempo. Todos os espectros de massas foram calibrados externamente usando NaTFA (m/z de 200 a 2000). Um poder médio de resolução, $m/\Delta m_{50\%} = 66.000$ a m/z 304. Devido à resolução ultra-alta da técnica FT-ICR MS, o grau de insaturação para cada molécula foi deduzido diretamente de seu valor para o número de anéis e insaturações (do inglês, *Double Bond Equivalent*, DBE) pela **equação (6)**.

$$\text{DBE} = \text{C} - \text{H}/2 + \text{N}/2 + 1 \quad (6)$$

Onde C, H, e N correspondem ao número de carbonos, hidrogênios e nitrogênios, respectivamente, na fórmula molecular.⁶⁶

Curvas de calibração foram geradas para cocaína, levamisol e lidocaína e as figuras de mérito determinadas (LOD, LOQ, coeficiente de linearidade, r^2). Em seguida, o método de quantificação desenvolvido foi empregado para estimar a concentração de cocaína (%) em 10 amostras de crack apreendidas pela PC-ES. A exatidão da técnica de PS(+)FT-ICR-MS foi comparada com a técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID).

2.3.5 Cromatografia Gasosa - Detector de Ionização por Chamas (GC-FID)

Simultaneamente, cocaína e seus adulterantes foram quantificados em amostras de crack apreendidas por GC-FID e comparados com experimentos de PS-MS. Aproximadamente 12,5 mg de crack foram preparados em clorofórmio com a adição de um padrão interno (do inglês, *internal standard*, ISTD) e quantificados em um

cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6890N com um detector de ionização de chama, usando um amostrador automático da série Agilent Technologies 7683B, de acordo com as seguintes condições. Volume de injeção: 1,0 μL ; razão de divisão = 50: 1; coluna: Rxi-1MS metil siloxano, 35 m x 200 μm (i. d.) x 0,33 μm de espessura do filme; programa de temperatura do forno: 150 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, 40 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a 315 $^{\circ}\text{C}$ por 4 min; temperatura da porta de injeção: 280 $^{\circ}\text{C}$; Temperatura do FID: 320 $^{\circ}\text{C}$; taxa de fluxo do gás de arraste: 1,0 mL min^{-1} (hélio).^{61, 67}

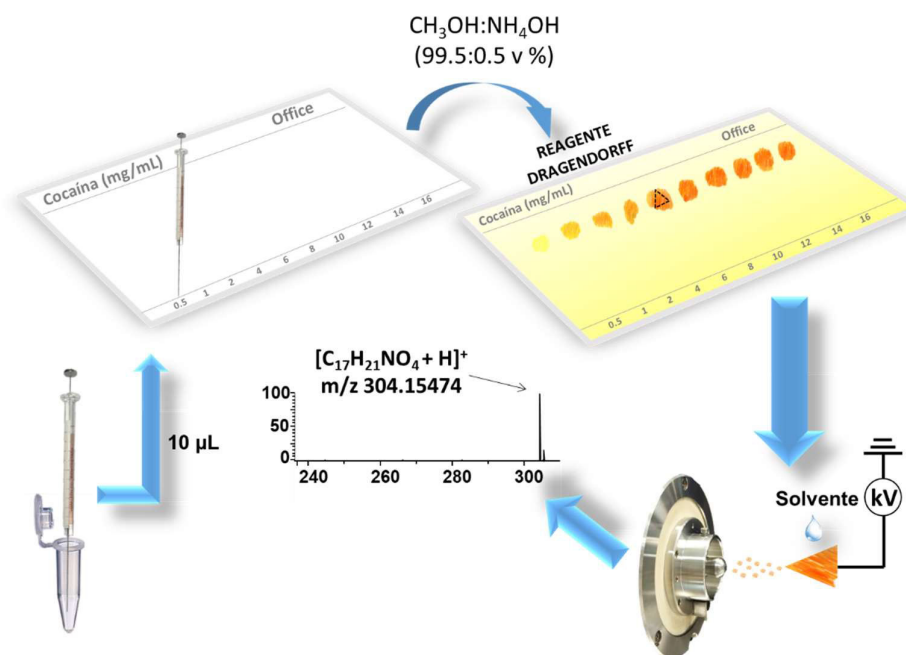


Figura 2.3 Ilustração da cromatografia em papel preliminarmente aplicada ao PS-MS na quantificação de cocaína

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, três eluentes foram avaliados para análise de cocaína e seus adulterantes. Entre eles, o sistema 3 ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ a 99,05:0,5 v%) apresentou melhores resoluções cromatográficas e diferentes valores de R_f entre os analitos (ver apêndice, **Figura A1**).⁹ A **Figura 2.4a** mostra o sistema cromatográfico composto pelo papel do tipo *Office* e da fase móvel, $\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ a 99,05:0,5 v%), revelado em câmara com lâmpada UV a 254 nm. Nota-se que a cocaína e todos os seus adulterantes (lidocaína, cafeína, fenacetina, benzocaína e levamisol) são revelados na concentração de 20 mg/mL, com valores de R_F semelhantes aos relatados na literatura.⁹ Quando o sistema cromatográfico é subsequentelemente revelado usando o reagente de Dragendorff, uma mancha alaranjada intensa é claramente observada para cocaína, lidocaína e levamisol, **Figura 2.4b**. Uma explicação para a seletividade do reagente de Dragendorff para esses três analitos é a disponibilidade dos pares de elétrons do grupo amino ($-\text{NH}-$), que atua como base de Lewis, sendo facilmente protonado em meio ácido. A cocaína compõe o cátion do complexo com tetraiodobismutato (III), **Figura 2.5**. Esse resultado corrobora com os altos valores de pK_a relatados para a maioria dos analitos (cocaína = 8,6, lidocaína e levamisol = 8,0, cafeína = 14, benzocaína = 2,8 e fenacetina = 2,2).⁹ Em contraste com o valor de pK_a da cafeína, a reação é eficaz para os analitos que possuem $\text{pK}_a \geq 8$. Assim, os adulterantes fenacetina e benzocaína (**Figura 2.1 e-f**) mostraram resultados negativos para o reagente de Dragendorff. Isso ocorre porque os pares de elétrons do grupo $-\text{NH}-$ contribuem para a estabilização da ressonância do anel aromático, diminuindo assim seu caráter básico. Por outro lado, a lidocaína (**Figura 2.1c**) possui dois grupos amina, onde sua amina secundária estabiliza o anel aromático e a amina terciária tem

menor reatividade e participa da reação com o reagente de Dragendorff. Como consequência, a revelação apresentou coloração menos intensa, **Figura 2.4b**.

Na **Figura 2.4c** está o espectro de massas PS (+) para manchas correspondentes a lidocaína, cocaína e levamisol. A lidocaína e a cocaína são detectadas na forma protonada, $[M + H]^+$, de m/z 235,1808 e 304,1544, onde $M = C_{14}H_{22}N_2O$ e $C_{17}H_{21}NO_4$, e DBEs de 5 e 8, respectivamente. O erro de massa foi inferior a 2 ppm. O levamisol é encontrado em três formas de protonação: $[M + H]^+$, $[2M + H]^+$ e $[2M + Na]^+$, onde $M = C_{11}H_{12}N_2S_1$.

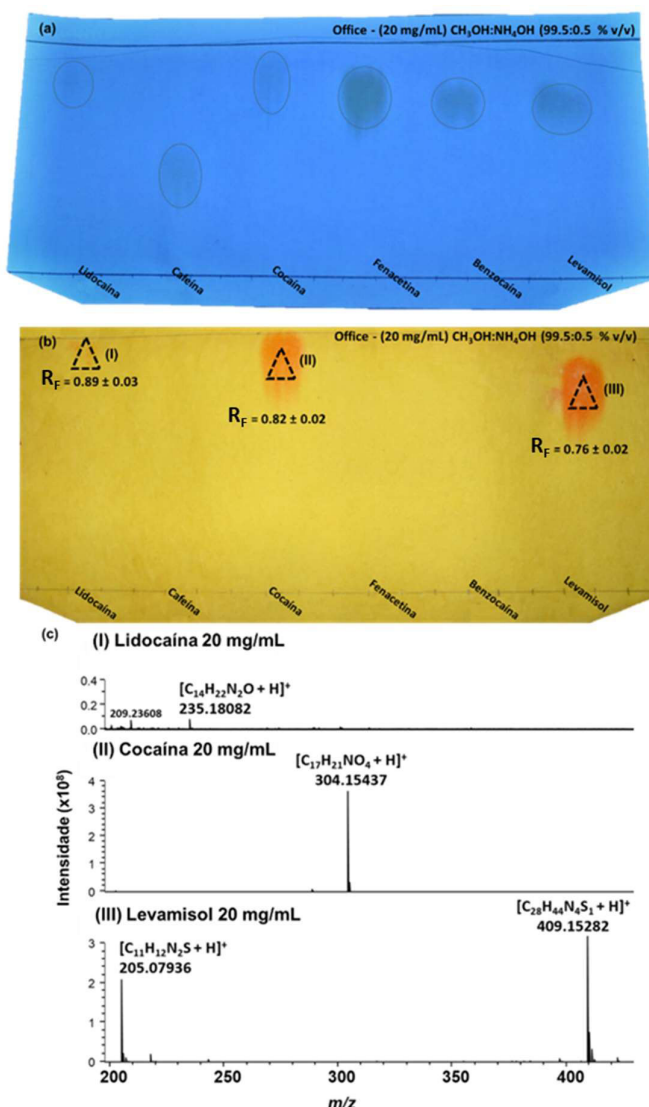


Figura 2.4 Cromatografia em papel *office* com padrões usando a fase móvel $CH_3OH:NH_4OH$ (99.5:0.5 % v/v) e espectro de PS(+)-MS: (a) Lidocaína, (b) Cocaína e (c) Levamisol

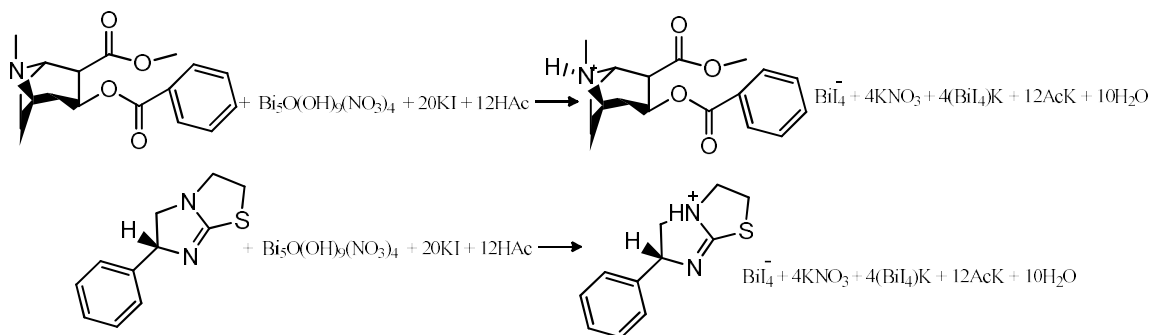


Figura 2.5 Reações da cocaína e do levamisol com o Dragendorff

Os cromatogramas (papel *Office*) da cocaína (de 0,5 a 16 mg/mL para a cocaína, **Figura 2.6a**) e seus adulterantes em função de sua concentração (de 1 a 40 mg/mL, **Figura 2.6b-c**) foram revelados pelo reagente de Dragendorff. Os valores de LODs e R_F para cada analito foram: LOD = 1 mg/mL e R_F = 0,82 para cocaína, LOD = 5 mg/mL e R_F = 0,76 para levamisol e LOD = 10 mg/mL e R_F = 0,89 para a lidocaína. Um procedimento análogo foi realizado variando a fase estacionária com os papéis do tipo almaço e canson (**Figuras A2 e A3**). Para essas outras matrizes, os valores de R_F para os três analitos (cocaína, lidocaína e levamisol) foram próximos.

No escopo de prosperar melhores resultados com melhores seletividades e sensibilidades nas análises da cocaína com a técnica de cromatografia em papel, as manchas de revelação foram cortadas em formato triangular (destacado na **Figura 2.6**) para identificação e quantificação de cocaína, levamisol e lidocaína através da análise PS(+)-FT-ICR MS. A **Figura 2.7** exhibe os espectros de PS(+)-MS resultantes dos padrões de lidocaína, cocaína e levamisol em função da concentração onde foram identificados na forma protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 235, 304 e 205, respectivamente.

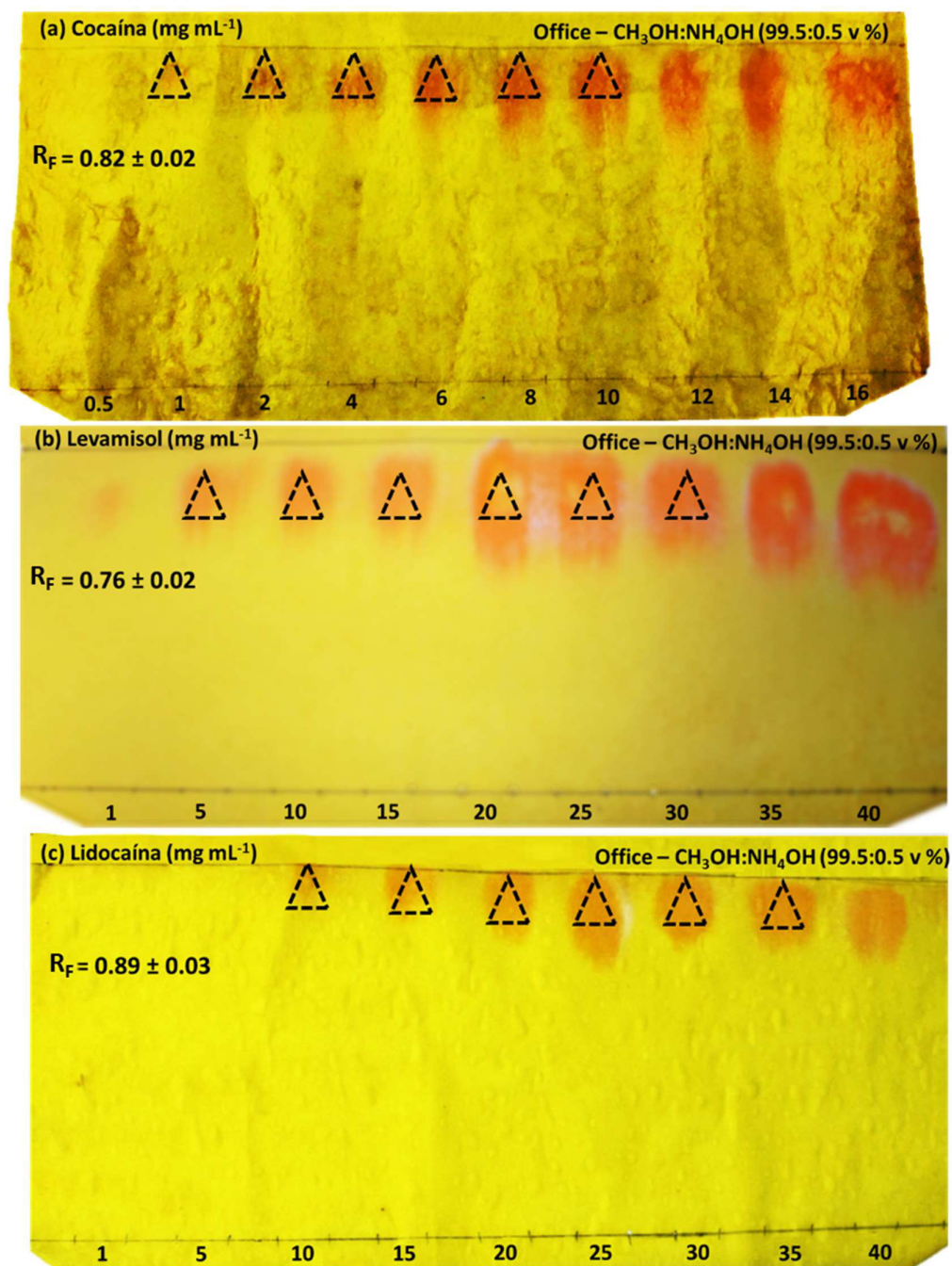


Figura 2.6 Cromatografia em papel do tipo *Office* com variação de concentração dos padrões de: (a) Lidocaína (1 a 40 mg/mL), (b) Cocaína (0,5 a 16 mg/mL) e (c) Levamisol (1 a 40 mg/mL)

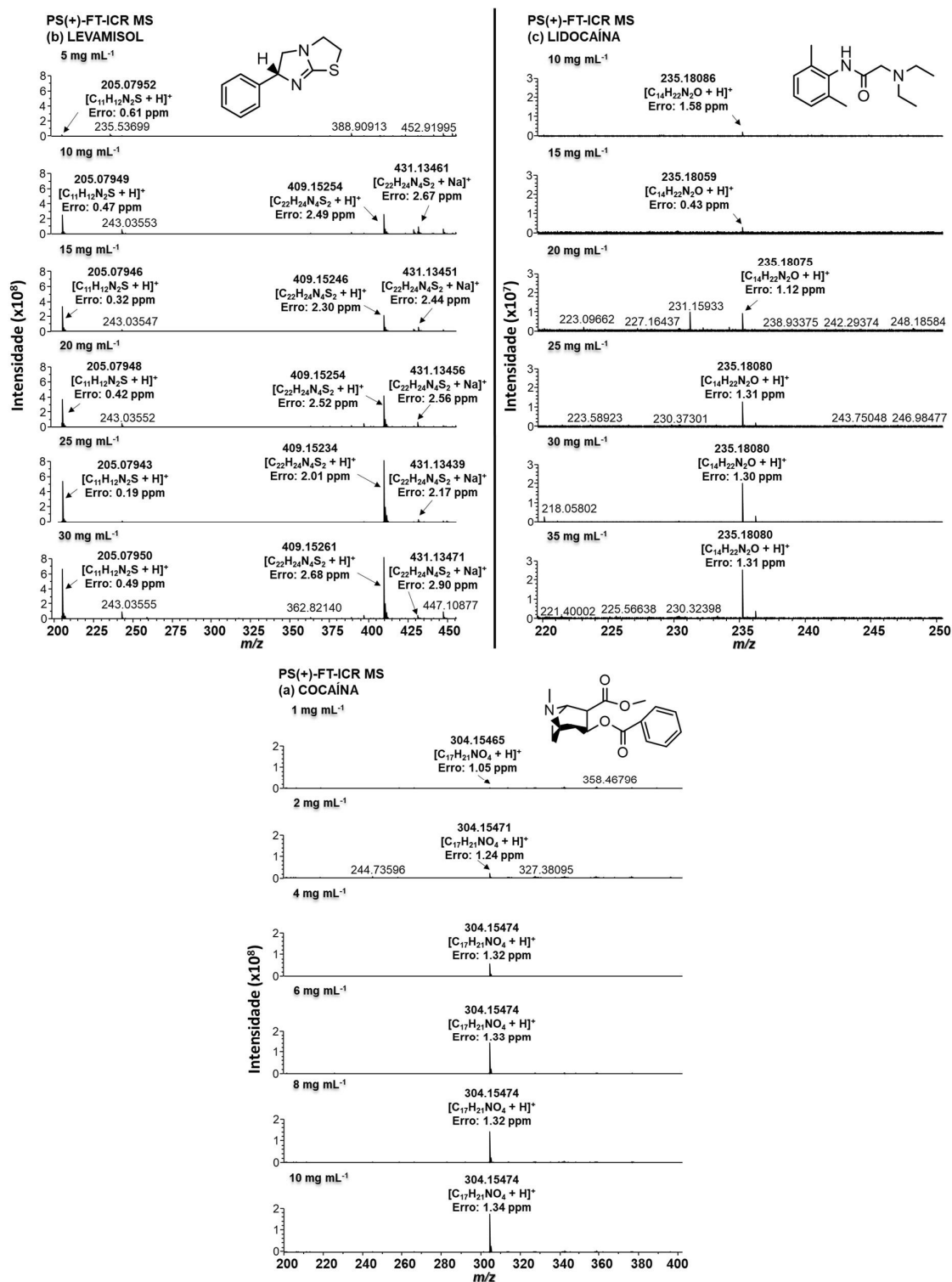


Figura 2.7 Espectros de massas PS(+) (a) Levamisol (5,0 a 30,0 mg/mL), (b) Lidocaína (10,0 a 35,0 mg/mL) e (c) Cocaína (1,0 a 10,0 mg/mL).

Usando os dados adquiridos na **Figura 2.7 a-c**, curvas de calibração foram construídas para os três analitos, **Figura 2.8 a-c**, e valores de coeficiente de correlação (r^2) maior que 0,98 foram obtidos em todos os casos ($r^2 = 0,9838$, $0,9912$ e $0,9855$ para cocaína, levamisol e lidocaína, respectivamente). Os valores de LOD e LOQ obtidos obedecem à seguinte ordem de grandeza: cocaína < levamisol < lidocaína. Uma das possíveis razões para a baixa sensibilidade da lidocaína em relação a outros analitos (LODs de $\mu\text{g/mL}$ versus mg/mL) é a baixa reatividade da molécula na formação do complexo $[\text{MH}^+]\text{Bil}^{4-}$, onde $\text{M}=\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$. Os LODs para lidocaína utilizando ambos os métodos analíticos (PS(+)-MS ou a cromatografia em papel revelada pelo teste de triagem) foram de 10 e $0,35 \text{ mg/mL}$, respectivamente.

A **Tabela 2.1** mostra uma comparação entre os LODs obtidos para a cocaína, levamisol e lidocaína utilizando cromatografia em papel revelada por três diferentes detectores (UV-Vis, Dragendorff e PS(+)-MS) em relação aos métodos analíticos clássicos relatados na literatura (TLC, RMN, GC-MS, LC-MS). Comparando os dados de cromatografia em papel em função de diferentes detectores, sua sensibilidade é aprimorada na seguinte ordem: lâmpada UV < Dragendorff < PS(+)-MS. A última técnica, PS (+) MS, aumenta a sensibilidade na ordem de 1000 vezes, sendo ainda superior a técnicas como RMN, **Tabela 2.1**. Para análise de cocaína, por exemplo, um LOD de $6,51 \mu\text{g/mL}$ foi atingido. O LOD obtido usando o PS(+)-MS é inferior aos métodos GC-MS^{68,69,70}, e LC-MS^{71,72}, que são comumente usados para a análise de cocaína em laboratórios forenses.

Tabela 2.1 Comparação dos LODs obtidos para os analitos cocaína, lidocaína e levamisol usando uma cromatografia em papel revelada por três diferentes detectores (lâmpada UV-Vis, Dragendorff e PS (+)-MS) com métodos analíticos múltiplos reportados na literatura

		Cromatografia em papel			Outros métodos analíticos				
	Papel	UV-Vis ^o (µg/mL)	Drag ^{oo} (µg/mL)	PS(+)-MS (µg/mL)	TLC ^{ooo} 9, 61 (µg/mL)	TLC-PS-MS ⁹ (µg/mL)	RM ⁷³ (µg/mL)	GC-MS ^{68-70,74} (µg/mL)	LC-MS ^{71,72 75,76} (µg/mL)
Cocaína	Office	4	1	6.51					
	Canson	-	1	-	< 0.5	6.0	2	1.4 to 6	0.5
	Almaço	1	1	-					
Levamisol	Office	10	1	27.05					
	Canson	-	5	-	0.5	-	-	-	0.51
	Almaço	10	5	-					
Lidocaína	Office	20	10	351.08					
	Canson	-	5	-	0.5 to 4.0	90.0	-	10	0.35-36.5
	Almaço	15	10	-					

* O papel Canson não foi revelado no ultravioleta (UV) ** O Reagente Dragendorff *** TLC foi revelado na câmara ultravioleta (UV) a 254 nm

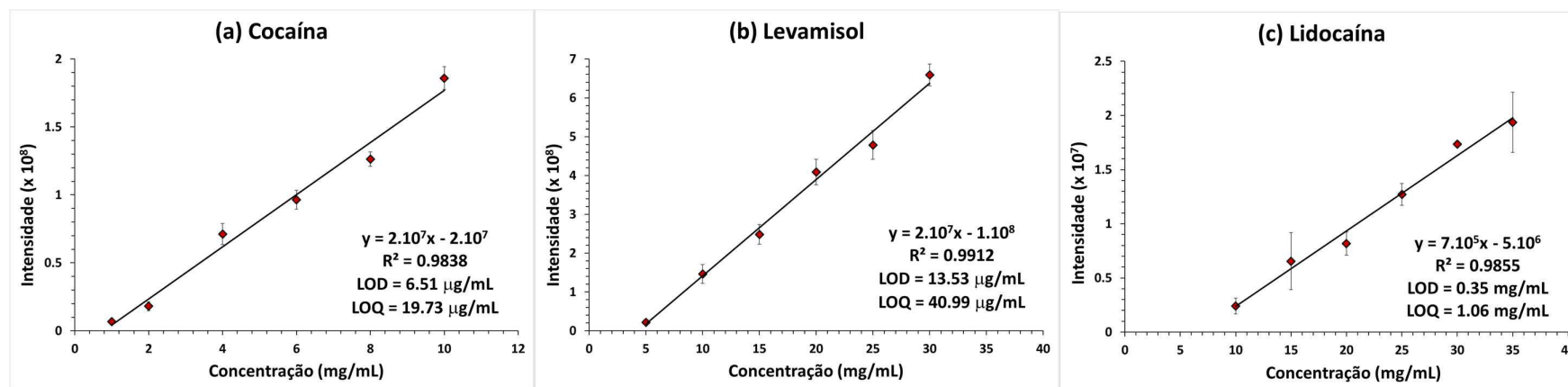


Figura 2.8 Curvas de calibração: (a) Lidocaína, (b) Cocaína e (c) Levamisol

A técnica PS(+)MS associada ao reagente Drangendorff aplicou-se para estudos do perfil químico de dez amostras de crack apreendidas pela Polícia Civil do Espírito Santo (PC-ES). A **Figura 2.9 a-b** mostra os cromatogramas correspondentes a amostras de crack reveladas utilizando a lâmpada de UV (**Figura 2.9a**) e o reagente de Drangendorff (**Figura 2.9b**). Em ambos os casos, basicamente, identifica-se um único ponto, com R_F de 0,85, correspondente à molécula de cocaína. Esta hipótese é comprovada analisando o espectro de massas de PS(+), **Figura 2.9c**, onde um íon $[M + H]^+$ de m/z 304.1559 é mais intenso.

A quantificação de cocaína em amostras de crack foi realizada utilizando PS(+)MS e GC-FID e os resultados estão apresentados na **Tabela 2.2**, sendo expressos em porcentagem em massa (wt %). O valor médio encontrado foi de 53,04 e 53.65 wt%, respectivamente. Esses valores estão abaixo dos relatados por Maldaner *et al.*,^{67,77} e Botelho *et al.*⁵² (66-71 wt%) para apreensões de cocaína de 2009 a 2014. Maldaner *et al.*⁷⁷ observaram que a diminuição da pureza ao longo dos anos é proporcional ao aumento de casos de apreensão. Por outro lado, Magalhães *et al.*⁷⁸ e Silva *et al.*⁷⁹ relataram maior variação na pureza de cocaína de 6,4 a 98 % e de 32 a 85 % em amostras de cocaína apreendidas nos estados de Minas Gerais e Amazonas. Em relação aos adulterantes de levamisol e lidocaína, eles não foram identificados e quantificados nas dez amostras de crack estudadas neste trabalho.

A precisão do método PS(+)MS foi comparada com GC-FID pelo teste t de amostras pareadas (**Tabela 2.3**). O valor de t-calculado foi de 1,68, sendo menor que o valor t crítico de 2,26 ($\alpha = 0,05$, $v = 9$), com valor p de 12,7 %. Os resultados indicaram que não há diferenças estatisticamente entre os resultados do método proposto, PS (+) MS, método validado pela Polícia Federal do Distrito Federal, GC-FID, a um nível de

significância de 5 %, por isso, os dois métodos podem ser considerados semelhantes para determinação de cocaína.

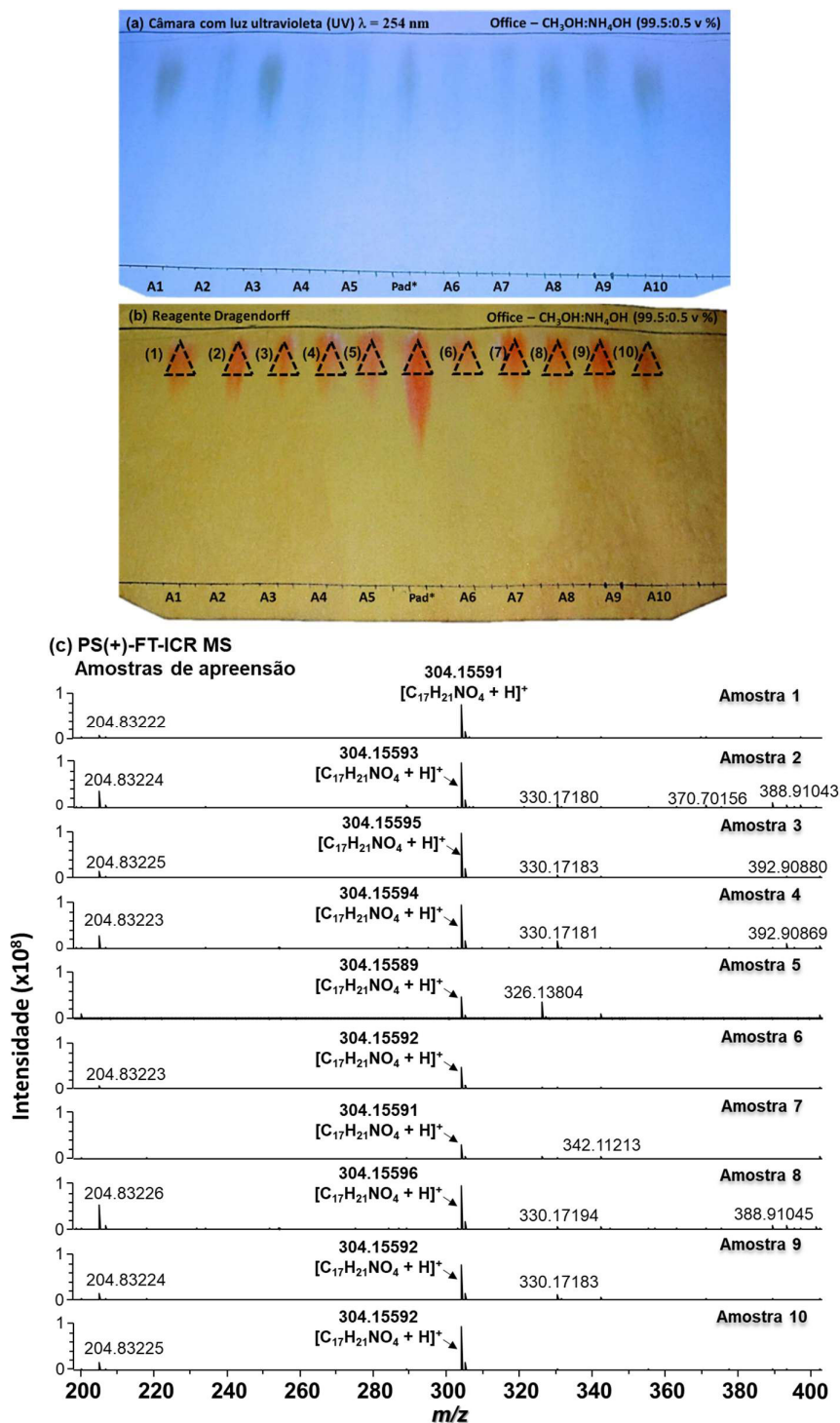


Figura 2.9 Análises de cromatografia em papel para 10 amostras de apreensão de crack (a) Revelação em câmara sob luz ultravioleta (UV) no comprimento de 254 nm e (b) Revelação com reagente Dragendorff

Tabela 2.2 Porcentagem (%) de cocaína em 10 amostras de apreensão de crack

Cocaína		
A¹	CG-FID	PS(+)-MS
1	50,40	51,85
2	75,20	76,72
3	75,10	76,16
4	67,40	67,48
5	46,20	48,92
6	39,90	39,91
7	29,50	29,29
8	51,90	52,18
9	41,70	42,36
10	53,10	51,64

¹Amostra de apreensão**Tabela 2.3** Comparação entre CG-FID e PS-MS para cocaína, usando o teste t para amostras pareadas com o intervalo de confiança de 95 %

Cocaína					
	Xm¹ (%)	Xmd² (%)	Sd³ (%)	t_{cal}	t_{tab}
GC-FID	53,04	0,611	1,15	1,68	1,83
PS-MS	53,65				

¹Média amostral; ²Diferença entre as médias; ³Desvio padrão entre as médias

2.5 CONCLUSÃO

A utilização do Papel designa menores custos a técnica e permite a separação e identificação de compostos polares, como a cocaína e seus adulterantes. Esta técnica foi eficiente na triagem para identificação de cocaína e seus adulterantes com LOD de 1 mg/mL. O papel tipo *office* e a mistura CH₃OH:NH₄OH a 99,05:0,5 v%, que compuseram as fases estacionária e móvel, respectivamente, de cromatografia em papel, apresentaram melhores resultados.

A combinação de cromatografia de papel com PS(+)MS, que exige a preparação da amostra mínima (apenas algumas gotas de metanol durante a ionização) fornece uma metodologia analítica para quantificar cocaína, lidocaína e levamisol com linearidade ($r^2 > 0,98$) e de detecção de limites em ordem de µg/mL. Além disso, a técnica é promissora para quantificação da cocaína em amostras de crack apreendidas pela polícia brasileira, uma vez que a técnica não apresenta uma diferença estatisticamente significativa com o método GC-FID a um nível de significância de 5 %. Portanto, a cromatografia em papel aliada ao PS(+)MS é um método analítico mais fácil, rápido e barato em relação às técnicas analíticas tradicionais, como TLC, GC-MS e LC-MS.

3. O USO DE POLÍMEROS CONDUTORES COMO SUBSTRATO EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO EM SPRAY DE PAPEL

3.1 INTRODUÇÃO

O método por PS foi explorado desde 2010 para ionização ambiente em Espectrometria de Massas. Embora a fonte de PS possua operação fácil, análise rápida e baixo custo, o seu desempenho é altamente dependente das propriedades da superfície do substrato devido as fortes interações do papel (ligação de hidrogênio e van der Waals) com analitos contendo grupos funcionais polares.⁸ Em 2014, Espy *et al.*⁸⁰ quantificaram 8 drogas de abuso em apenas uma mancha de sangue (1-(2H-1,3-Benzodioxol-5-il)-propan-2-amina (MDA), (RS)-1-(1,3-Benzodioxol-5-il)-N-metilpropan-2-amina (metilenodioximetanfetamina, MDMA), 1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-N-etilpropan-2-amine (MDEA), morfina, cocaína e Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)) utilizando o PS-MS com o mínimo de preparo de amostra e com o tempo de pulverização de 2 min.

Em 2015, Ma *et al.*⁸¹ analisaram cinco canabinóides sintéticos (JWH-018, JWH-081, AM-2201, RCS-4 e XLR-11), atingindo o limite de detecção (LOD) de 2 ng para análise direta do sólido e de 10 ng/mL para análises sob o efeito de matriz (em sangue e urina). Em 2016, Carvalho *et al.*¹¹ usaram o próprio papel secante como substrato para analisar drogas sintéticas como 1-(4-Cloro-2,5-dimetoxifenil)-propan-2-amina (DOC), 1-(4-Bromo-2,5-dimetoxifenil)-propan-2-amina (DOB), 25C-NBOMe (2-(4-cloro-2,5-dimetoxifenil)-N-[(2 metoxifenil)metil]etanamina), 25B-NBOMe (2-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-N-[(2 metoxifenil)metil]etanamina) e 25I-NBOMe (2-(4-iodo-2,5-dimetoxifenil)-N-[(2 metoxifenil)metil]etanamina). Os resultados foram consoante com

a técnica ESI (+)-MS. No mesmo ano, Carvalho *et al.*⁹ utilizaram Cromatografia em Camada Delgada (CCD) acoplada ao PS-MS para analisar a cocaína e seus adulterantes, melhorando os valores das figuras de mérito e atingindo valores de LOD superiores a 1,0 µg/mL.

Os PCs, como a PANi e o PPy, são considerados materiais promissores para potenciais aplicações em PS-MS devido à sua condutividade elétrica, boa estabilidade em condições ambiente, fácil preparação e baixo custo. Além disso, como substrato de revestimento no papel, o PPy e a PANi apresentam grupos imina e amina que permitem interações com compostos presentes em diferentes matrizes.

Inúmeros respostas à processos investigativos retardam devido aos demorados métodos de identificação e quantificação de analitos e de impurezas, diante disso, este capítulo visa a modificação do papel por polimerização *in situ* com PPy e/ou PANi para análises de fármacos, metabólitos, drogas de abuso e adulterantes análises de PS-MS como uma alternativa eficiente para melhorar a detecção de diferentes compostos.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Aprimorar análises de PS-MS por meio de modificações na superfície do papel cromatográfico com polimerização *in situ* de PPy e/ou PAni para aplicação em avermectinas, bupropiona e seus metabólitos, anestésicos, ansiolíticos, hormônios, meloxicam, drogas de abuso e adulterantes.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar papéis revestidos com PPy, PAni ou ambos os polímeros [Poli (Py-co-Ani)] por polimerização *in situ*.
- Analisar os padrões de avermectinas, bupropiona e seus metabólitos, anestésicos, ansiolíticos, hormônios, meloxicam, drogas de abuso e seus adulterantes por PS(+)-FT-ICR MS (PS no modo de ionização positivo com um espectrômetro de massas de ressonância ciclotrônica de íons com tratamento dos dados pela transformada de Fourier, do inglês, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) com os três tipos de papéis revestidos.
- Comparar os papéis revestidos com o tradicionalmente utilizado (Whatman categoria 1) nas análises de PS(+)-FT-ICR MS.
- Elaborar curvas de calibração no Orbitrap para os principais padrões (Δ^9 THC, cafeína, CBD, CBN, cocaína, progesterona, medroxyprogesterona e valerato de estradiol) com o papel que apresentou melhores resultados no PS(+)-FT-ICR MS.
- Testar a viabilidade da reutilização do papel que apresentou melhores resultados no PS(+)-FT-ICR MS.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Materiais e reagentes

Na síntese dos PCs foram utilizados pirrol e anilina (98 % e 99,5 % respectivamente, ambos fornecidos Sigma-Aldrich, São Paulo) e foram purificados por destilação a vácuo e armazenados sob refrigeração antes do uso. O ácido clorídrico (37 %, da Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro), APS (98 %, obtido de Synth, São Paulo), cloreto férrico hexahidratado (98 %, fornecido pela Dinâmica, São Paulo), tetraclorometano (99 %, adquirido da Êxodo Científica, São Paulo), o tolueno (fornecido por Qhemis - Hexis, São Paulo) foram utilizados na síntese de PCs. Os solventes de grau HPLC utilizados na síntese polimérica (clorofórmio, 99,8 %), na fase móvel da cromatografia líquida (metanol e etanol, 99,9 %) e na extração (acetonitrila, 99,5 %) foram obtidos da J. T. Baker (México).

Foi utilizada uma amostra padrão de referência de cocaína fornecida pela Polícia Federal Brasileira de Porto Alegre (pureza > 99,0 %). Foram utilizados: cafeína (Bandeirante Brazmo Industria e Comercio Ltda, São Paulo) fenacetina e lidocaína (98,0 %, 98,0 %, respectivamente, obtidos da Sigma Aldrich, São Paulo), canabidiol (CBD), canabinol (CBN) e Δ^9 -THC (100 mg/L em metanol da Cerillant, Austin, TX, EUA). Foram utilizados padrões de abamectina (98,60 %, fornecida pelo Chem. Service), doramectina (fornecida por Smart), eprinomectina e moxidectina (adquirida por Zhejiang Hisun Pharmed.), ivermectina (por Hebei Veyong), midazolam (por Cristália), procaina (por Chongqing) Tramadol (por Argon Drugs), valerato de estradiol (por National China C), bupropiona, eritro-hidrobupropiona, hidroxibupropiona e treohidrobupropiona (fornecidos por HLW CMPD MGMT), progesterona, medroxiprogesterona, meloxicam e meloxicam C (obtidos pela U.S. Pharmacopeial

Conventional, USP). A água foi destilada e purificada usando um sistema Millipore Milli-Q Plus (Bedford, MA, EUA).

3.3.2 Síntese dos polímeros condutores

Todos os papéis revestidos com PCs foram obtidos por polimerização *in situ*.

3.3.3 Polianilina (PAni)

Inicialmente o monômero de anilina foi submetido à destilação à vácuo para purificação. Em um béquer foram colocados 80 mL de ácido clorídrico (1 mol L^{-1}), o papel cromatográfico (Whatman, 20 μm poros, GE Healthcare, EUA) e 2 mL de anilina destilada, em seguida foram agitados vigorosamente durante 30 min. Adicionou-se gota a gota 120 mL de uma solução de APS em água ($0,33 \text{ mol L}^{-1}$) e deixou-se em agitação durante 5 h. Esta síntese foi realizada num banho de gelo de modo que a temperatura permaneceu em aproximadamente 5°C . Após agitação, formou-se um papel revestido de coloração preto esverdeado. Lavou-se o papel cuidadosamente com água Milli-Q, ácido clorídrico (1 mol L^{-1}) e metanol e foi seco a 60°C durante 24 h em estufa.

3.3.4 Polipirrol (PPy)

O papel cromatográfico foi imerso em 150 mL de água purificada contendo 50 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Em seguida, adicionou-se gota a gota de 1,75 mL de pirrol monomérico sob agitação constante. Deixou-se o sistema reacional sob agitação durante 3 h. O papel PPy revestido foi lavado com água:metanol (1:1) e foi seco a 60°C durante 24 h em estufa.

3.3.5 Polipirrol e Polianilina [Poli (Py-co-Ani)]

O papel com [Poli (Py-co-Ani)] foi preparado por um sistema trifásico a uma temperatura de 0-5 °C. No fundo do béquer, a fase orgânica foi obtida por dissolução de 14,9 mmol de pirrol em 75 mL de CCl₄. Em seguida, foram adicionados 600 ml de HCl (1,0 mol L⁻¹) contendo 40 mmol de APS e depois o papel cromatográfico foi adicionado. Finalmente, preparou-se outra fase orgânica na parte superior do béquer, dissolvendo 14,9 mmol de anilina em 75 mL de tolueno. A proporção molar de monômeros de pirrol e anilina foi de 1:1. Subsequentemente, o sistema reacional foi mantido a temperatura abaixo de 5 °C durante 24 h. O papel revestido com [Poli (Py-co-Ani)] foi lavado com água destilada e seco a 60 °C. Uma ilustração esquemática para a síntese do composto [Poli (Py-co-Ani)] por um método interfacial trifásico é apresentado na **Figura 3.1**.

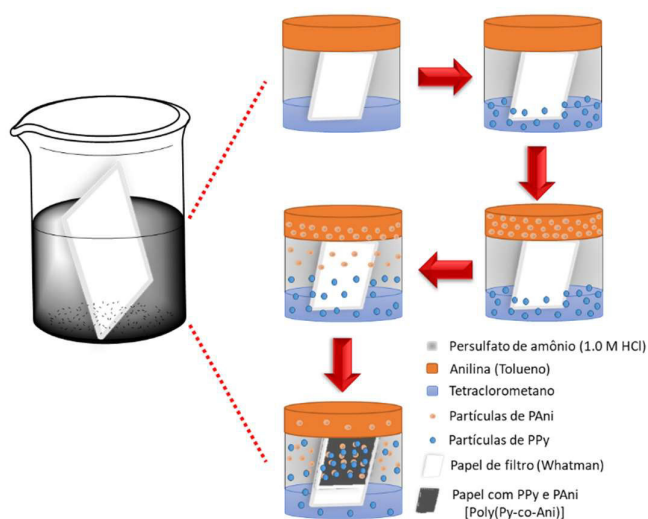


Figura 3.1 Ilustração esquemática da polimerização *in situ* de [Poli(Py-co-Ani)] no papel cromatográfico.

3.3.6 Preparo das soluções padrão

A solução estoque foi preparada pesando 50 mg do respectivo padrão (abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina, moxidectina, bupropiona, eritro-hidrobupropiona, hidroxi-bupropiona, treó-hidrobupropiona, cafeína, cocaína, fenacetina, lidocaína, midazolam, procaína, tramadol, progesterona, medroxiprogesterona, valerato de estradiol, meloxicam ou meloxicam C) e depois diluída a 5 mL com metanol para se obter uma concentração de solução de 10 mg/mL. A solução estoque dos padrões CBD, CBN e Δ^9 -THC foi com uma concentração de 1 mg/mL. Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C e protegidas da luz. Para as curvas de calibração, utilizaram-se as soluções estoque em sucessivas diluições para obter as concentrações de 10 a 100 ng/mL (para Δ^9 -THC, cafeína, CBD, CBN, cocaína e progesterona), 1 a 10 µg/mL (para medroxiprogesterona) e 1 a 3,5 mg/mL (para valerato de estradiol).

3.3.7 PS(+)-FT-ICR MS

O esquema das análises com PS-MS está na **Figura 3.2**. Para as análises foram aplicados 10 µL de solução do padrão na superfície de um papel triangular. O papel cromatográfico triangular foi preparado como descrito por Colletes *et al.*¹⁹ e os papéis revestidos por PCs foram cortados nas dimensões 1,2 mm de altura e 7 mm de base. O papel triangular foi fixado com um clip de jacaré metálico, conectado a um fio e a uma distância de 5-7 mm da entrada do espectrômetro de massas. Depois, foram aplicados 20 µL de metanol com uma alta tensão (3,8 kV) no papel triangular para gerar os espectros de massas. As análises com PS-MS foram realizadas no modo positivo de ionização (PS(+)) com um espectrômetro de massas FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics Bremen, Alemanha). O tempo de acumulação dos íons

foi de 0,040 s. Os espectros de massas de PS(+) FT-ICR foram adquiridos a partir da acumulação de 16 varreduras de sinais transientes no domínio do tempo em conjuntos de dados de 512 k. Todos os espectros de massas foram calibrados externamente utilizando trifluoroacetato de sódio, NaTFA (m/z de 150 a 1200). O grau de insaturação para cada molécula pode ser deduzido diretamente a partir do seu valor equivalente de número de anéis e insaturações (do inglês, *double bond equivalente* - DBE) de acordo com a equação $DBE = C - H/2 + N/2 + 1$, em que C, H, e N são os números de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente, na fórmula molecular.⁶⁶

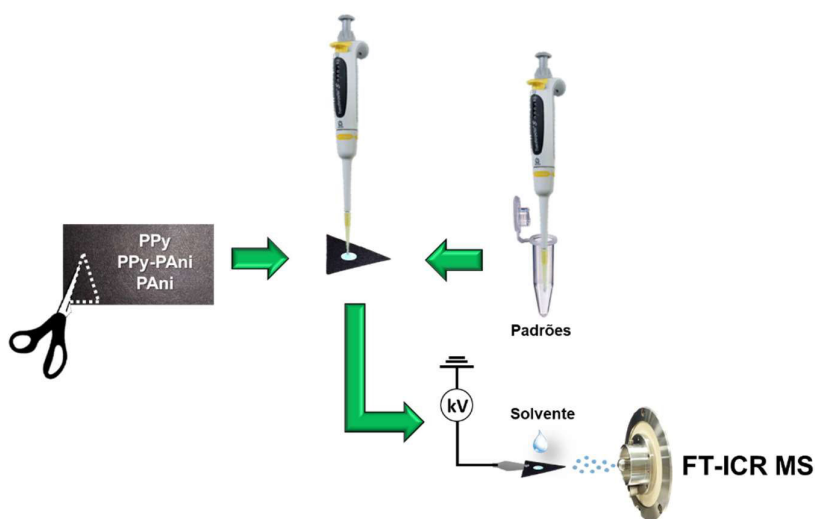


Figura 3.2 Análises de PS(+)-FT-ICR MS com papéis polimerizados com PPy e/ou PAni.

3.3.8 Orbitrap

3.3.8.1 Curvas de calibração

As curvas de calibração foram geradas usando papel de [Poli (Py-co-Ani)] com oito analitos diferentes: Δ^9 -THC, cafeína, CBD, CBN, cocaína, progesterona, medroxiprogesterona e valerato de estradiol. Um volume de 10 μ L de cada amostra foi aplicado no papel polimerizado. Depois disso, adicionou-se ao papel 10 μ L de metanol com ácido fórmico a 0,1 %. Os dados foram obtidos no modo positivo em um

espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap de alta resolução QExactive™. Os parâmetros utilizados foram: resolução: 70.000; Tensão de pulverização: 3,5 kV; Temperatura capilar: 275 °C. Os espectros foram processados usando o software *Xcalibur Analysis* (v. 2,0, Thermo Scientific Corporation).

3.3.8.2 Viabilidade do papel com [Poli (Py-co-Ani)]

Verificou-se a viabilidade da reutilização do papel com [Poli (Py-co-Ani)] para diferentes amostras. Para atingir esse objetivo, foram utilizados três papéis diferentes para obter os cromatogramas de íons totais (TIC, do inglês, *Total Ion Chromatogram*), que é um cromatograma da soma de todas as intensidades do sinal de um determinado íon numa série de cromatogramas observados em função do tempo. O papel parafínico (O microcanal parafínico foi preparado como descrito por Colletes *et al.*¹⁹), o papel [Poli (Py-co-Ani)] e o papel cromatográfico (cortado em altura de triângulo 1,2 mm e 7 mm de base) foram testados usando urina sintética enriquecida com Δ^9 -THC, cafeína ou cocaína. Os analitos foram adicionados separadamente à urina a uma concentração de 100 ppm. Cada tipo de papel foi testado como se segue: 10 μ L de urina enriquecida foi aplicada (*spike*) no papel seguido pela adição de 10 μ L de metanol com ácido fórmico a 0,1 v%. Para papel cromatográfico e papel parafinado, aplicações (*spikes*) usando solvente foram feitos a cada 30 segundos. Nas análises com o papel de [Poly (Py-co-Ani)], foram feitos novos *spikes* utilizando a amostra em vez do solvente. Uma gota é formada quando em contato com o papel polimerizado e, quando uma alta tensão é aplicada, a gota é completamente pulverizada. Os testes foram realizados no espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap de alta resolução QExactive™ e as condições utilizadas foram semelhantes às descritas para as curvas de calibração. A fórmula molecular dos analitos escolhidos foi confirmada pelas diferenças médias entre massas teóricas e experimentais.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Otimização das análises com Paper Spray

Estudos sistemáticos dos parâmetros foram realizados para obter melhores sinais no modo de ionização positivo na espectrometria de massas. Para se obterem os espectros de massas com sinais reprodutíveis mais intensos, estáveis e aceitáveis com o mínimo de ruído, avaliou-se a tensão de pulverização e a distância entre a ponta de papel revestido e a entrada do espectrômetro de massas. O papel revestido com PC foi colocado diretamente na plataforma e as soluções padrão foram aplicadas. Após alguns estudos e de acordo com Espy *et al.*⁸⁰, foi verificado que a melhor voltagem para todos os analitos era de cerca de 3,8 kV. Os analitos foram percolados através do papel revestido e ionizados por aplicação de metanol, que mostrou ser o melhor solvente. O potencial elétrico aplicado, entre o papel revestido e a entrada do espectrômetro de massas, gera um campo elétrico mais elevado do que o papel cromatográfico convencional. Tal como ocorre na fonte por ESI, a força coulombiana quebra o líquido para formar algumas gotículas carregadas que se dessolvatam para gerar íons secos.

As **Figuras 3.3 a 3.9** apresentam os espectros de massas PS(+)-FT-ICR para os principais analitos nas classes, nos quais foram detectados como moléculas protonadas $[M+H]^+$ ou $[M+NH_4]^+$, como indicado nas tabelas. As **Tabelas 3.1 a 3.3** mostram a intensidade, os valores m/z medidos, o erro de massa (ppm), a resolução, a fórmula molecular, o DBE e a fórmula molecular protonada com o valor de m/z padrão, onde os resultados confirmam as características estruturais de todos os padrões. Em comparação com o tradicional papel cromatográfico (Whatman), são verificados melhores resultados para a cocaína com o papel [Poly (Py-co-Ani)]. Os espectros de massas PS(+)-FT-ICR na **Figura 3.3** e **Figura 3.4** indicam que o papel

com PPy apresentou intensidades mais elevadas e melhor pulverização para as avermectinas. O papel [Poli (Py-co-Ani)] mostrou melhores resultados do que o papel cromatográfico, onde este papel apresentou alta estabilidade na pulverização. Em geral, os espectros de massas PS(+)-FT-ICR mostraram a ionização de moléculas complexas, tais como as avermectinas, sem fragmentação e com boa precisão. Com a eprinomectina não houve ionização com papel revestido com PAni.

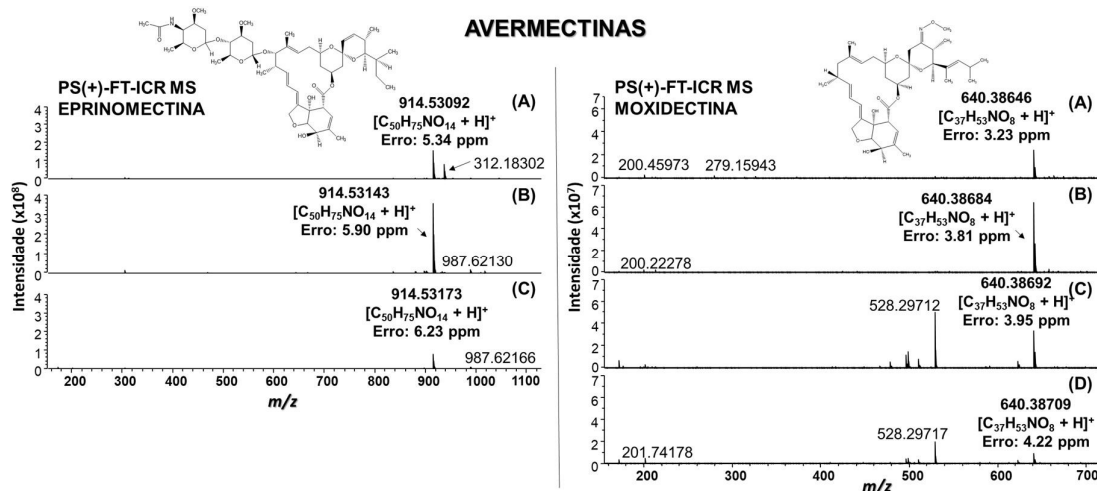


Figura 3.3 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de eprinomectina e moxidectina: (A) Papel cromatográfico (Whatman); (B) Papel com PPy; (C) Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; (D) Papel com PAni.

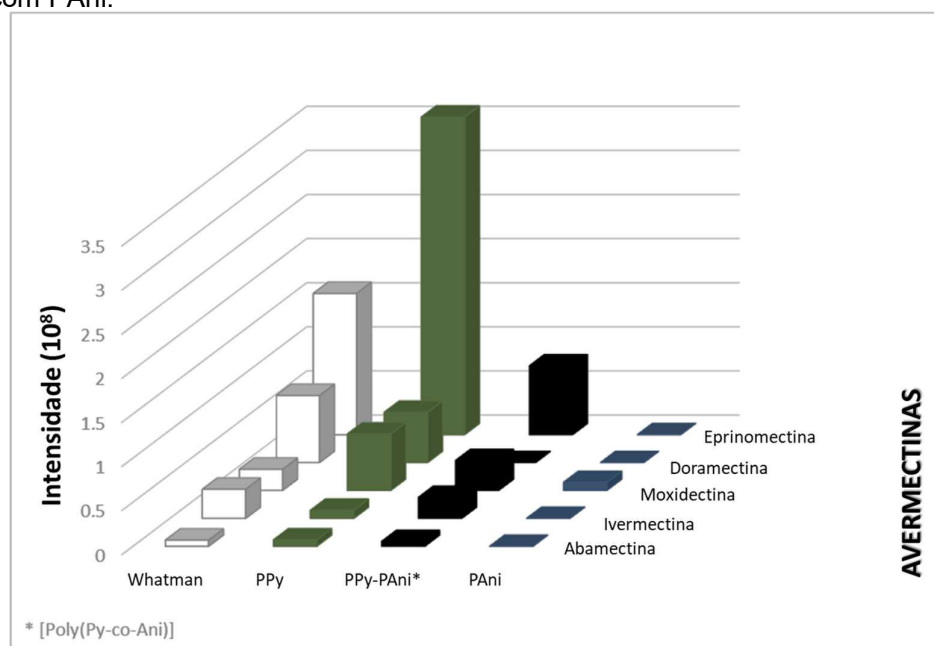


Figura 3.4 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de avermectinas com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPy, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PAni.

Em contrapartida, a utilização dos papéis polymerizados não atingiu bons resultados, comparados com o papel cromatográfico, frente a ionização do bupropiona e não houve alterações significativas nos erros, como mostra na **Figura 3.5** e **Figura 3.6**. Esta informação foi reportada na **Tabela 3.1** e a resolução varia desde 2015 (para doramectina) até 83254 (para bupropiona).

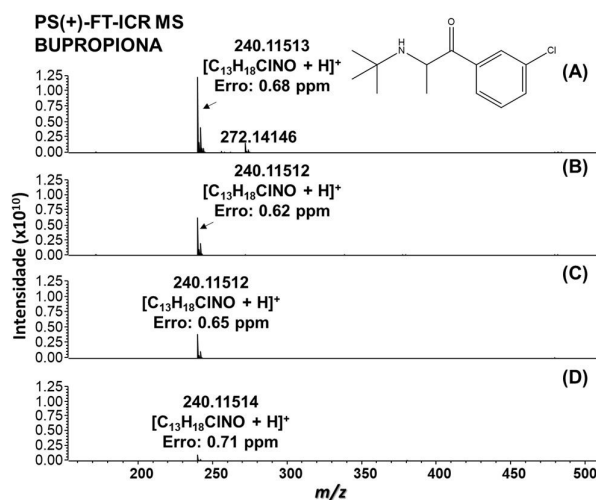


Figura 3.5 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de bupropiona: **(A)** Papel cromatográfico (Whatman); **(B)** Papel com PPY; **(C)** Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; **(D)** Papel com PAni.

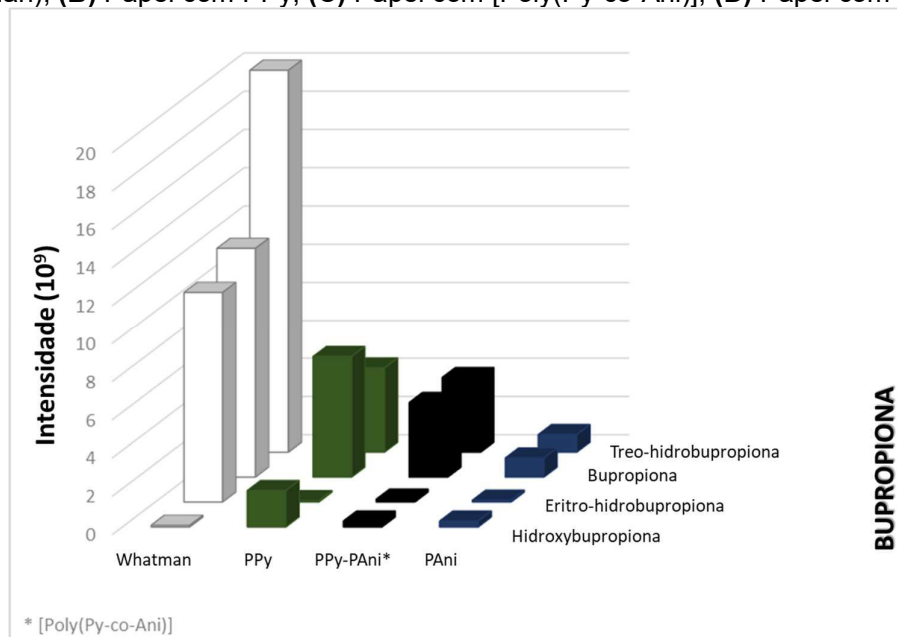


Figura 3.6 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de bupropiona com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPY, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PAni.

Tabela 3.1 Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para avermectinas e bupropiona e seus metabólitos

		Intensidade		m/z medida	Erro (ppm)	Res. ^a	DBE ^b	m/z padrão
AVERMECTINAS	ABAMECTINA	Whatman	7.0 x10 ⁷	890.53056	5.09	22693	12	[C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄ + NH ₄] ⁺ 890.52603
		PPy	7.3 x10 ⁷	890.53111	5.70	22686		
		PPy-PAni ^c	5.6 x10 ⁷	890.53134	5.96	22907		
		PAni	-	-	-	-		
	DORAMECTINA	Whatman	7.6 x10 ⁷	916.54654	5.30	22015	13	[C ₅₀ H ₇₄ O ₁₄ + NH ₄] ⁺ 916.54168
		PPy	5.7 x10 ⁷	916.54683	5.61	22219		
		PPy-PAni ^c	-	-	-	-		
		PAni	-	-	-	-		
	EPRINOMECTINA	Whatman	1.6 x10 ⁸	914.53092	5.34	22019	14	[C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₄ + H] ⁺ 914.52603
		PPy	3.6 x10 ⁸	914.53143	5.90	22052		
		PPy-PAni ^c	7.8 x10 ⁷	914.53173	6.23	22073		
		PAni	-	-	-	-		
	IVERMECTINA	Whatman	3.3 x10 ⁷	892.54644	5.33	22741	12	[C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄ + NH ₄] ⁺ 892.54756
		PPy	9.2 x10 ⁶	892.54681	5.75	23868		
		PPy-PAni ^c	2.4 x10 ⁷	892.54699	5.94	24687		
		PAni	-	-	-	-		
	MOXIDECTINA	Whatman	2.4 x10 ⁷	640.38646	3.23	31495	12	[C ₃₇ H ₅₃ NO ₈ + H] ⁺ 640.38439
		PPy	6.4 x10 ⁷	640.38684	3.81	31544		
		PPy-PAni ^c	3.4 x10 ⁷	640.38692	3.95	31710		
		PAni	9.2 x10 ⁶	640.38709	4.22	31554		
BUPROPIONA e METABÓLITOS	BUPROPIONA	Whatman	1.2 x10 ¹⁰	240.11513	0.68	82907	5	[C ₁₃ H ₁₈ CINO + H] ⁺ 240.11497
		PPy	6.3 x10 ⁹	240.11512	0.62	83254		
		PPy-PAni ^c	3.9 x10 ⁹	240.11512	0.65	83135		
		PAni	1.0 x10 ⁹	240.11514	0.71	83199		
	ERYTHRO-HYDROBUPROPIONA	Whatman	1.1 x10 ¹⁰	242.13083	0.87	82713	4	[C ₁₃ H ₂₀ CINO + H] ⁺ 242.13062
		PPy	7.2 x10 ⁷	242.13080	0.74	82762		
		PPy-PAni ^c	1.5 x10 ⁸	242.13080	0.73	82900		
		PAni	1.0 x10 ⁸	242.13076	0.60	82353		
	HIDROXYBUPROPIONA	Whatman	8.7 x10 ⁷	256.11004	0.59	78311	5	[C ₁₃ H ₁₈ CINO ₂ + H] ⁺ 256.10988
		PPy	1.9 x10 ⁹	256.11005	0.67	78446		
		PPy-PAni ^c	3.1 x10 ⁸	256.11001	0.49	76604		
		PAni	3.1 x10 ⁸	256.11008	0.78	78278		
	THREO-HYDROBUPROPIONA	Whatman	2.0 x10 ¹⁰	242.13083	0.86	82415	4	[C ₁₃ H ₂₀ CINO + H] ⁺ 242.13062
		PPy	4.4 x10 ⁹	242.13080	0.73	82254		
		PPy-PAni ^c	3.9 x10 ⁹	242.13079	0.71	82322		
		PAni	9.2 x10 ⁸	242.13080	0.76	82519		

^a Resolução; ^b Double Bond Equivalent; ^c [Poli(Py-co-Ani)]

Na **Figura 3.7** e **Figura 3.10** observa-se que o papel [Poli (Py-co-Ani)] mostrou maiores intensidades para Δ^9 -THC e cocaína, com erros inferiores a 3 ppm para os papéis polimerizados. A resolução média para estes analitos é 64811,5, como apresentado na **Tabela 3.2** (A e B). Um resultado promissor foi para a cafeína, pois sua ionização não é satisfatória para papel cromatográfico tradicionalmente utilizado e, com o revestimento, a pulverização ocorreu de forma contínua. Dentre os papéis polimerizados, o papel com PPy apresentou melhores resultados para a cafeína, conforme a **Figura 3.8** e **Figura 3.10**. Estes dados foram registrados na **Tabela 3.2-A**. Da mesma maneira que as outras drogas, CBD e CBN apresentaram melhores resultados com papéis polimerizados. Na **Figura 3.9** e **Figura 3.10**, CBN e CBD exibiram melhores resultados com o papel PPy e os erros estavam abaixo de 5 ppm.

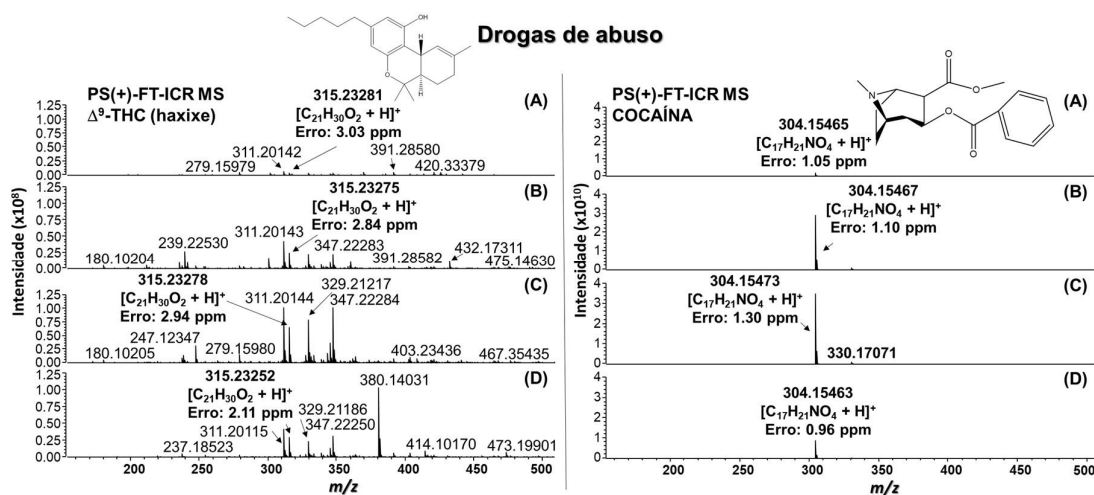


Figura 3.7 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de Δ^9 -THC e cocaína: **(A)** Papel cromatográfico (Whatman); **(B)** Papel com PPy; **(C)** Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; **(D)** Papel com PANi.

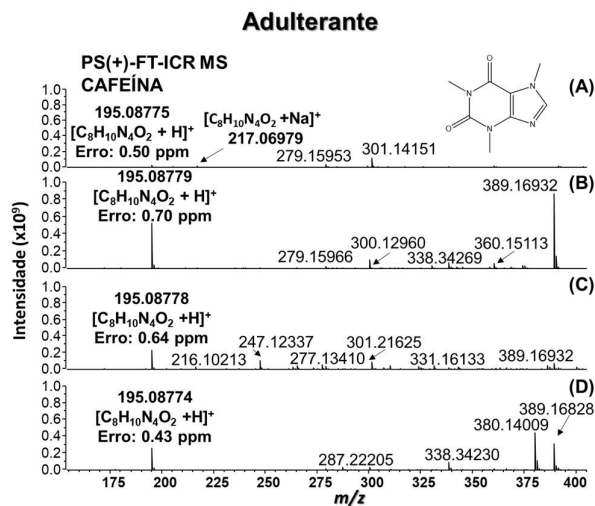
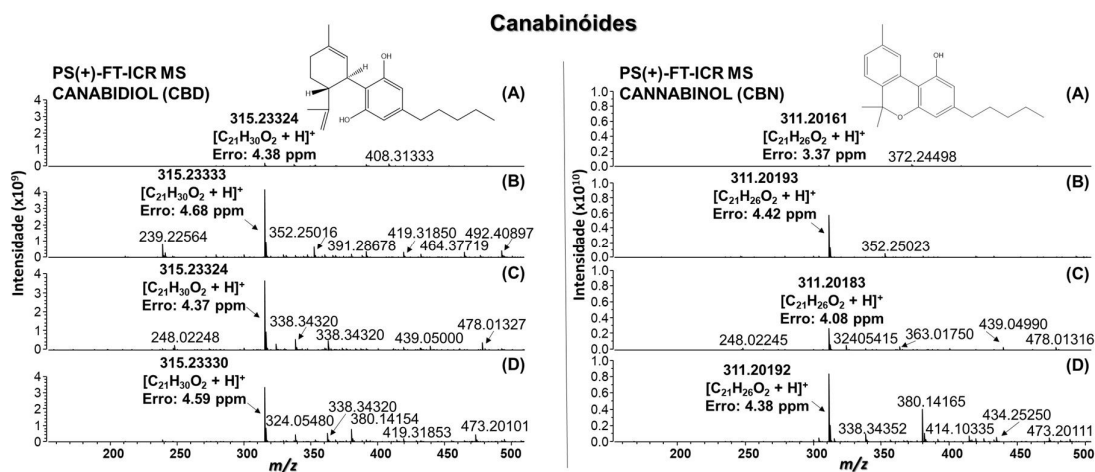


Figura 3.8 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de cafeína: (A) Papel cromatográfico (Whatman); (B) Papel com PPy; (C) Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; (D) Papel com PAni.



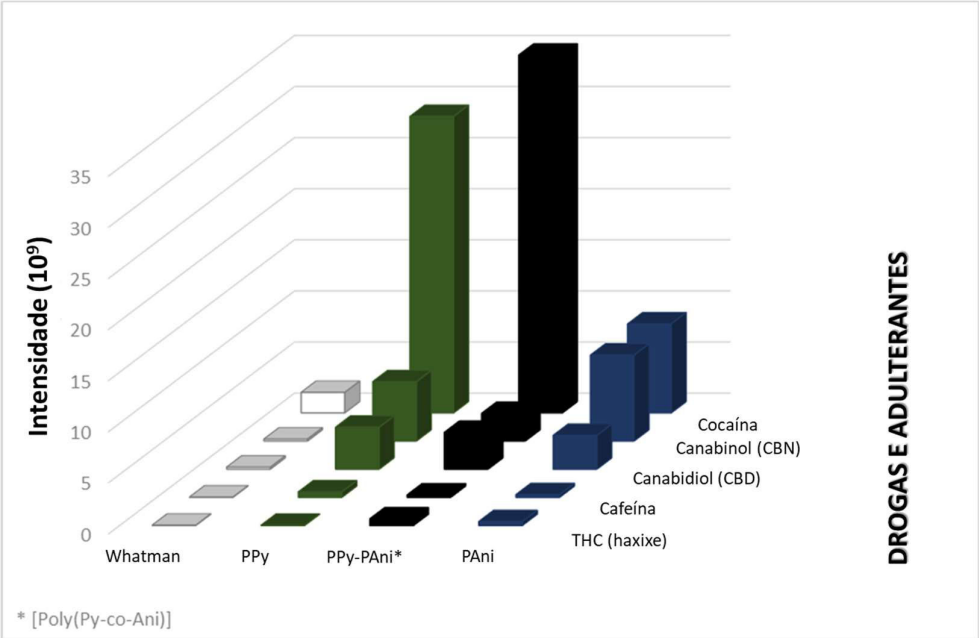


Figura 3.10 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de drogas e adulterantes com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPy, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PAni.

Tabela 3.2-A Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para adulterantes, anestésicos, ansiolíticos e drogas abusivas.

		Intensidade	m/z medida	Erro (ppm)	Res. ^a	DBE ^b	m/z
ADULTERANTES, ANESTÉSICOS, ANSIOLÍTICOS e DROGAS DE ABUSO	Δ^9 -THC (haxixe)	Whatman	3.2×10^7	315.23281	3.03	63785	$[C_{21}H_{30}O_2 + H]^+$ 315.23186
		PPy	2.5×10^7	315.23275	2.84	63480	
		PPy-PAni ^c	6.5×10^8	315.23278	2.94	63577	
		PAni	3.8×10^8	315.23252	2.11	63809	
	CAFEÍNA	Whatman	2.7×10^7	195.08775	0.50	102093	$[C_8H_{10}N_4O_2 + H]^+$ 195.08765
		PPy	5.3×10^8	195.08779	0.70	101562	
		PPy-PAni ^c	2.3×10^8	195.08778	0.64	101708	
		PAni	2.6×10^8	195.08774	0.43	102374	
	CANABIDIOL (CBD)	Whatman	2.0×10^8	315.23324	4.38	63565	$[C_{21}H_{30}O_2 + H]^+$ 315.23186
		PPy	4.1×10^9	315.23333	4.68	63338	
		PPy-PAni ^c	3.6×10^9	315.23324	4.37	63483	
		PAni	3.3×10^9	315.23330	4.59	63187	

^a Resolução; ^b Double Bond Equivalent; ^c [Poli(Py-co-Ani)]

Tabela 3.2-B. Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para adulterantes, anestésicos, ansiolíticos e drogas abusivas.

		Intensidade	m/z medida	Erro (ppm)	Res. ^a	DBE ^b	m/z
ADULTERANTES, ANESTÉSICOS, ANSIOLÍTICOS e DROGAS DE ABUSO	CANABINOL (CBN)	Whatman	1.9 x10 ⁸	311.20161	3.37	63880	[C₂₁H₂₆O₂ + H]⁺ 311.20056
		PPy	5.8 x10 ⁹	311.20193	4.42	63695	
		PPy-PAni ^c	2.7 x10 ⁹	311.20183	4.08	64146	
		PAni	8.4 x10 ⁹	311.20192	4.38	63448	
	COCAÍNA	Whatman	2.0 x10 ⁹	304.15465	1.05	65974	[C₁₇H₂₁NO₄ + H]⁺ 304.15433
		PPy	2.9x10 ¹⁰	304.15467	1.10	65913	
		PPy-PAni ^c	3.5x10 ¹⁰	304.15473	1.30	65965	
		PAni	8.7 x10 ⁹	304.15463	0.96	65989	
	FENACETINA	Whatman	1.7 x10 ⁸	180.10204	0.73	110760	[C₁₀H₁₃NO₂ + H]⁺ 180.10191
		PPy	6.6 x10 ⁸	180.10199	0.46	110201	
		PPy-PAni ^c	1.8 x10 ⁹	180.10200	0.55	110239	
		PAni	2.6 x10 ⁹	180.10199	0.47	110767	
	LIDOCAÍNA	Whatman	1.4 x10 ¹⁰	235.18049	0.01	84289	[C₁₄H₂₂N₂O + H]⁺ 235.18049
		PPy	1.2x10 ¹⁰	235.18071	0.93	83508	
		PPy-PAni ^c	2.9 x10 ⁹	235.18078	1.25	84314	
		PAni	1.0x10 ¹⁰	235.18061	0.52	85387	
	MIDAZOLAM	Whatman	2.4 x10 ¹⁰	326.08592	1.35	61233	[C₁₈H₁₃ClFN₃ + H]⁺ 326.08548
		PPy	1.4x10 ¹⁰	326.08593	1.37	61627	
		PPy-PAni ^c	1.3 x10 ⁹	326.08586	1.16	61729	
		PAni	6.6 x10 ⁹	326.08605	1.74	61651	
	PROCAÍNA	Whatman	4.1 x10 ⁸	237.15988	0.52	84315	[C₁₃H₂₀N₂O₂ + H]⁺ 237.15975
		PPy	4.6 x10 ⁹	237.1599	0.60	84160	
		PPy-PAni ^c	2.2 x10 ⁷	237.15991	0.66	85036	
		PAni	8.9 x10 ⁷	237.1599	0.63	84424	
	TRAMADOL	Whatman	1.5 x10 ¹⁰	264.19586	0.19	76045	[C₁₆H₂₅NO₂ + H]⁺ 264.19581
		PPy	1.0x10 ¹⁰	264.19599	0.68	75231	
		PPy-PAni ^c	2.9 x10 ⁸	264.19605	0.93	75839	
		PAni	1.4 x10 ⁹	264.19603	0.86	75770	

^a Resolução; ^b Double Bond Equivalent; ^c [Poli(Py-co-Ani)]

Os papéis polimerizados apresentaram melhores resultados para análises com hormônios e meloxicam, e destacam-se com o papel [Poli (Py-co-Ani)], de acordo com as **Figuras 3.11-3.13**. Os erros foram inferiores a 2,1 ppm. A Resolução média foi 59807,75, como mostra na **Tabela 3.3**.

Hormônios

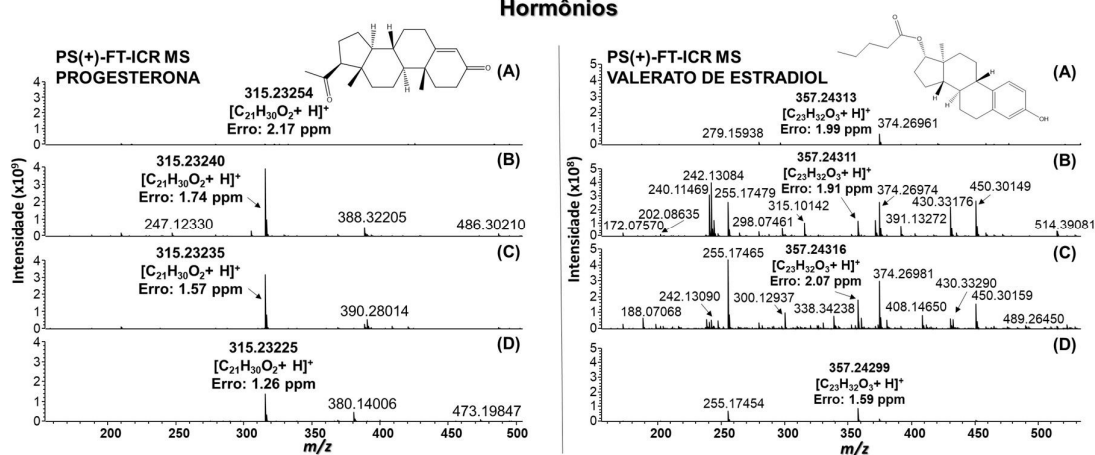


Figura 3.11 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de progesterona e valerato de estradiol: (A) Papel cromatográfico (Whatman); (B) Papel com PPy; (C) Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; (D) Papel com PAni.

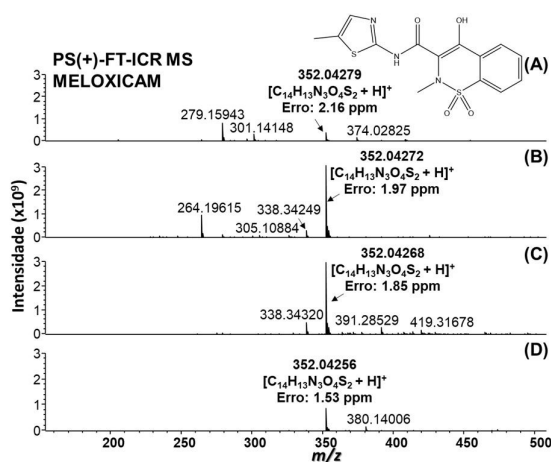


Figura 3.12 Espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de meloxicam: (A) Papel cromatográfico (Whatman); (B) Papel com PPy; (C) Papel com [Poly(Py-co-Ani)]; (D) Papel com PAni.

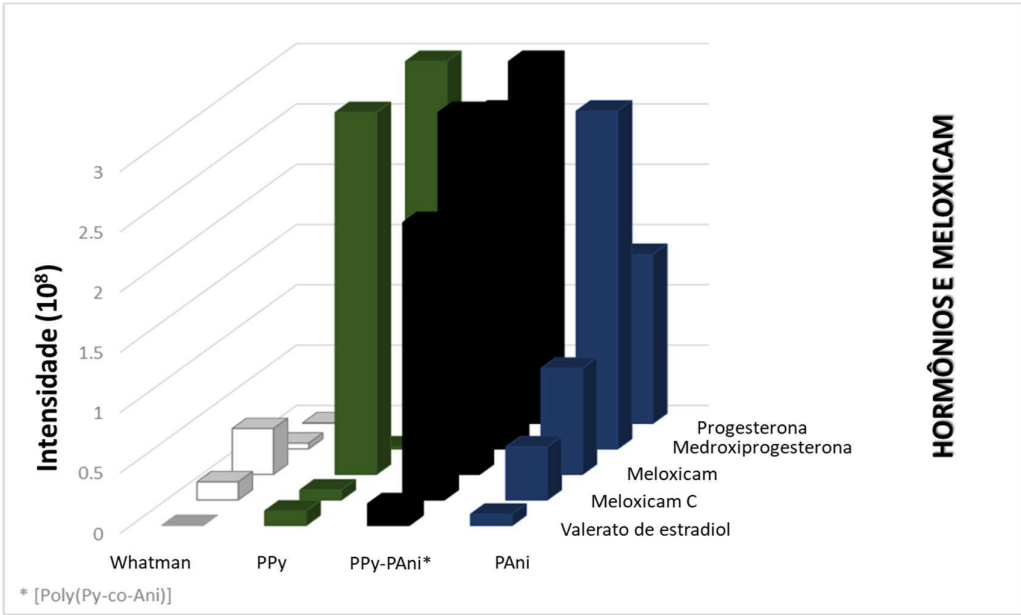


Figura 3.13 Dados de intensidade absoluta no espectros de PS(+)-FT-ICR para análises de hormônios e meloxicam com papel cromatográfico (Whatman), papel com PPy, papel com [Poly(Py-co-Ani)] e papel com PAni.

Tabela 3.3 Dados das análises de PS(+)-FT-ICR para hormônios e meloxicam.

		Intensidade	m/z medida	Erro (ppm)	Res. ^a	DBE ^b	m/z
HORMÔNIOS	PROGESTERONA	Whatman	3.4 x10 ⁶	315.23254	2.17	63193	[C ₂₁ H ₃₀ O ₂ + H] ⁺ 315.23186
		PPy	3.9 x10 ⁹	315.23240	1.74	63741	
		PPy-PAni ^c	3.2 x10 ⁹	315.23235	1.57	63546	
		PAni	1.4 x10 ⁹	315.23225	1.26	63635	
HORMÔNIOS	MEDROXYPROGESTERONA	Whatman	4.7 x10 ⁷	387.25393	2.43	52498	[C ₂₄ H ₃₄ O ₄ + H] ⁺ 387.25299
		PPy	1.7 x10 ⁷	387.25371	1.88	51562	
		PPy-PAni ^c	2.8 x10 ⁹	387.25377	2.02	51900	
		PAni	2.8 x10 ⁹	387.25374	1.94	51893	
HORMÔNIOS	VALERATO DE ESTRADIOL	Whatman	8.3 x10 ⁵	357.24313	1.99	67170	[C ₂₃ H ₃₂ O ₃ + H] ⁺ 357.24242
		PPy	1.2 x10 ⁸	357.24311	1.91	56432	
		PPy-PAni ^c	1.8 x10 ⁸	357.24316	2.07	56306	
		PAni	9.3 x10 ⁷	357.24299	1.59	56352	
HORMÔNIOS	MELOXICAM	Whatman	3.8 x10 ⁸	352.04279	2.16	57120	[C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂ + H] ⁺ 352.04202
		PPy	3.0 x10 ⁹	352.04272	1.97	57115	
		PPy-PAni ^c	3.0 x10 ⁹	352.04268	1.85	57049	
		PAni	8.8 x10 ⁸	352.04256	1.53	57027	
	MELOXICAM C ^d	Whatman	1.5x10 ⁸	298.07524	2.91	67461	[C ₁₃ H ₁₅ NO ₅ S + H] ⁺ 298.07437
		PPy	8.2x10 ⁷	298.07478	1.39	67530	
		PPy-PAni ^c	2.3 x10 ⁹	298.07480	1.45	67286	
		PAni	4.4 x10 ⁸	298.07474	1.24	67339	

^a Resolução; ^b Double Bond Equivalent; ^c [Poli(Py-co-Ani)]

3.4.2 Construção de curvas de calibração com espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap de alta resolução QExactive™

O papel revestido com [Poli (Py-co-Ani)] apresentou melhores resultados, quando considerado no aspecto geral em todas as classes de analitos, portanto foi avaliada a linearidade de sua resposta no Orbitrap com alguns padrões. Foram construídas curvas de quantificação em função da concentração de analito com 8 analitos diferentes (Δ^9 -THC, cafeína, CBD, CBN, cocaína, progesterona, medroxiprogesterona e valerato de estradiol), onde foram avaliados a linearidade (r^2), LOD e LOQ, conforme a **Figura 3.10**. As curvas de calibração exibiram boa linearidade com valores de $r^2 > 0,985$. Os limites de detecção e quantificação foram reportados na **Fig. 29**, onde medroxiprogesterona e valerato de estradiol apresentaram os piores limites devido à pior ionização. Com estes resultados observa-se que a técnica PS(+)-MS também pode ser utilizada para identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes amostras. Além disso, devido à grande simplicidade, a técnica PS(+)-MS pode ser acoplada diretamente a outras técnicas.

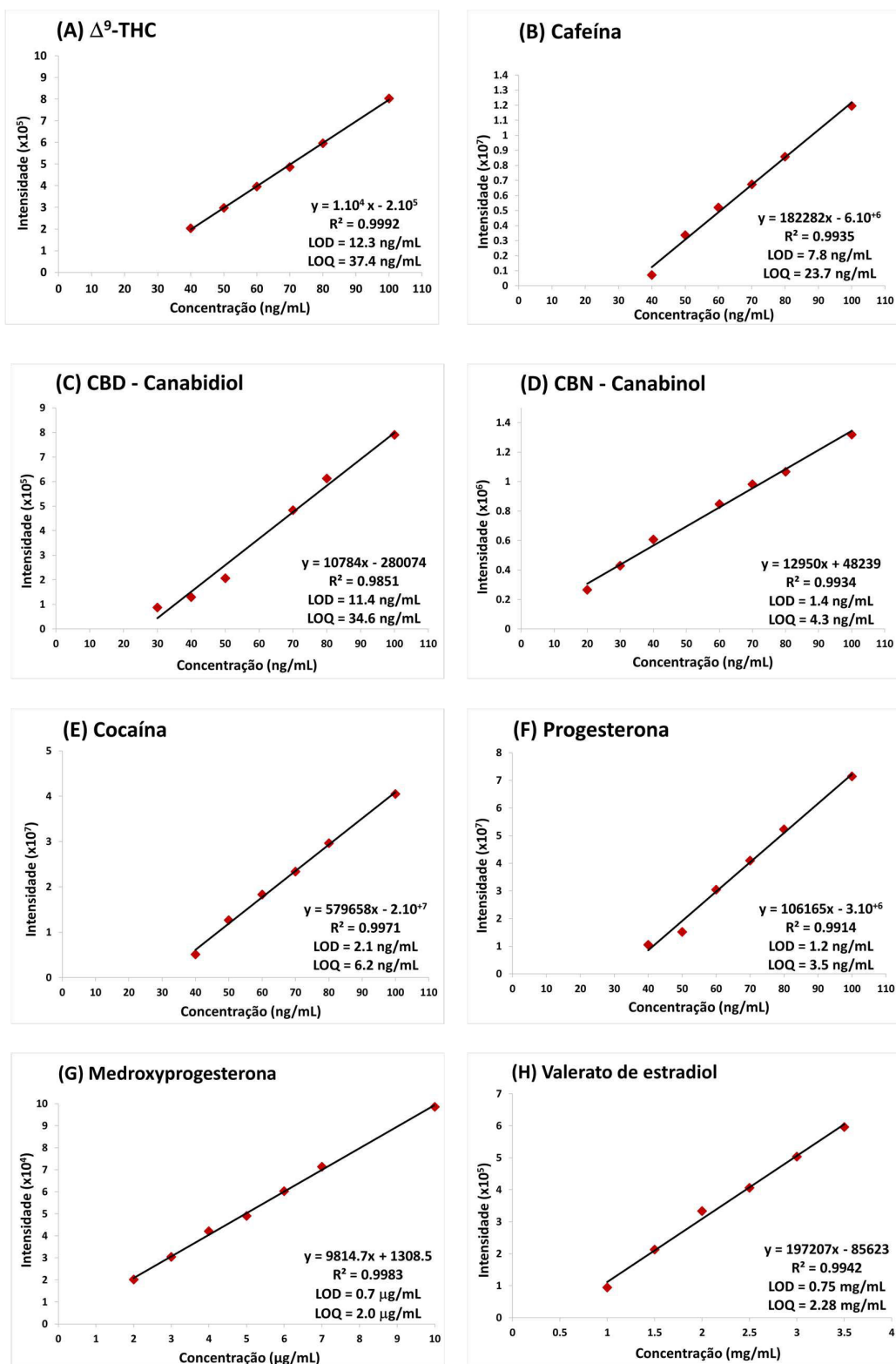


Figura 3.14 Curvas de calibração com [Poli(Py-co-Ani)] com Orbitrap para: **(A)** Δ^9 -THC; **(B)** cafeína; **(C)** CBD – Canabidiol; **(D)** CBN – Canabinol; **(E)** Cocaína; **(F)** Progesterona; **(G)** Medroxyprogesterona e **(H)** Valerato de estradiol

3.4.3 Avaliação da viabilidade do papel com [Poli(Py-co-Ani)]

A viabilidade da reutilização do papel com [Poli (Py-co-Ani)] com diferentes amostras foi comparada ao papel cromatográfico parafinado. Inicialmente, o papel cromatográfico foi testado com amostras de urina sintética enriquecidas com Δ^9 -THC, cafeína e cocaína, e os TICs e os espectro PS(+) estão na **Figura 3.11**. Todas as análises para reutilização do papel [Poli (Py-co-Ani)] estavam em modo positivo de ionização e foram identificadas moléculas protonadas $[M+H]^+$.

O papel cromatográfico parafinado tinha o mesmo comportamento que o papel cromatográfico sem a parafina, conforme a **Figura 3.12**. Na aplicação de amostras de urina sintética enriquecidas com os analitos não houve formação de gota e as amostras permaneceram adsorvidas nas fibras de papel, de modo que a contagem total de íons, nos TICs, foi mantida constante.

No papel polimerizado há formação de gotas e não há adsorção de amostras no papel polimerizado. Isto porque, o processo de polimerização recobriu as fibras de celulose com o polímero. Com estas análises, os analitos são dessorvidos rapidamente e o papel é capaz de ser reutilizado, como mostrado na **Figura 3.13**.

As amostras foram aplicadas duas vezes como destacado na **Figura 3.13**, isto confirma a observação de que o papel [Poly (Py-co-Ani)] funciona como um suporte que a amostra desorva facilmente na pulverização e ionização dos analitos.

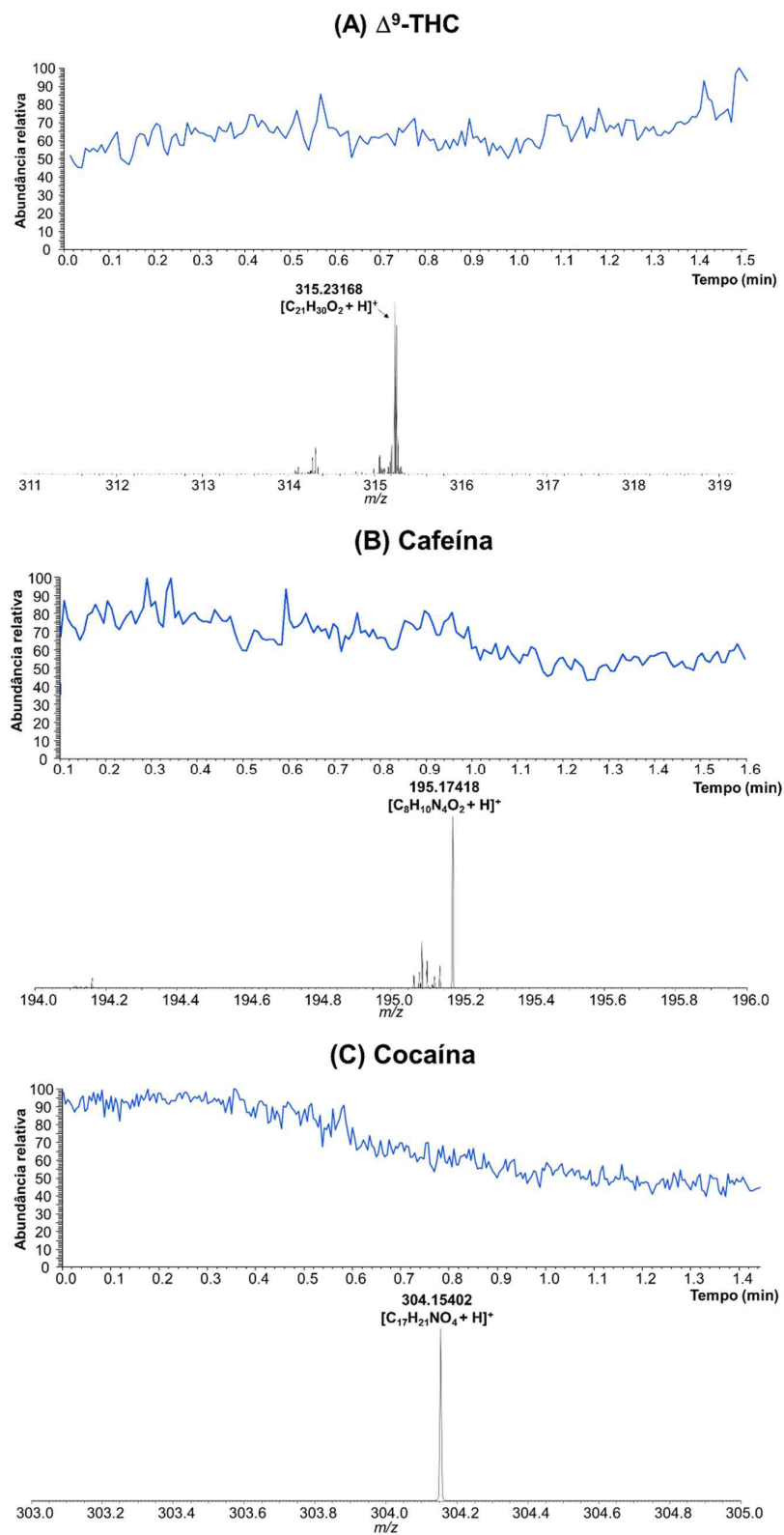


Figura 3.15 Cromatogramas de íons totais (TIC) e espectro de análises de PS(+)-MS no Orbitrap com papel cromatográfico e amostras de urina enriquecida com: (A) Δ^9 -THC; (B) Cafeína; (C) Cocaína

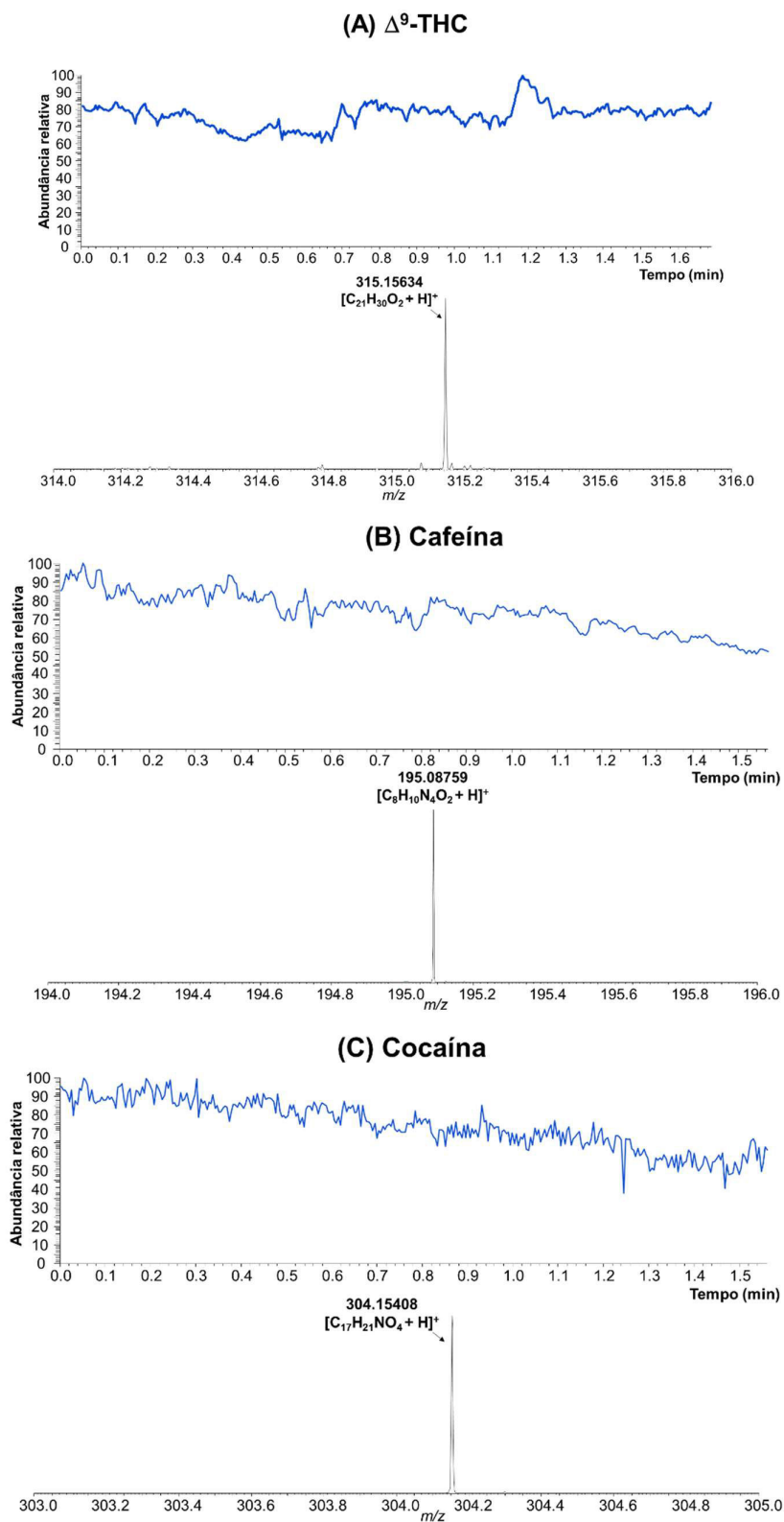


Figura 3.16 Cromatogramas de íons totais (TIC) e espectro de análises de PS(+)-MS no Orbitrap com papel parafinado e amostras de urina enriquecida com: (A) Δ^9 -THC; (B) Cafeína; (C) Cocaína

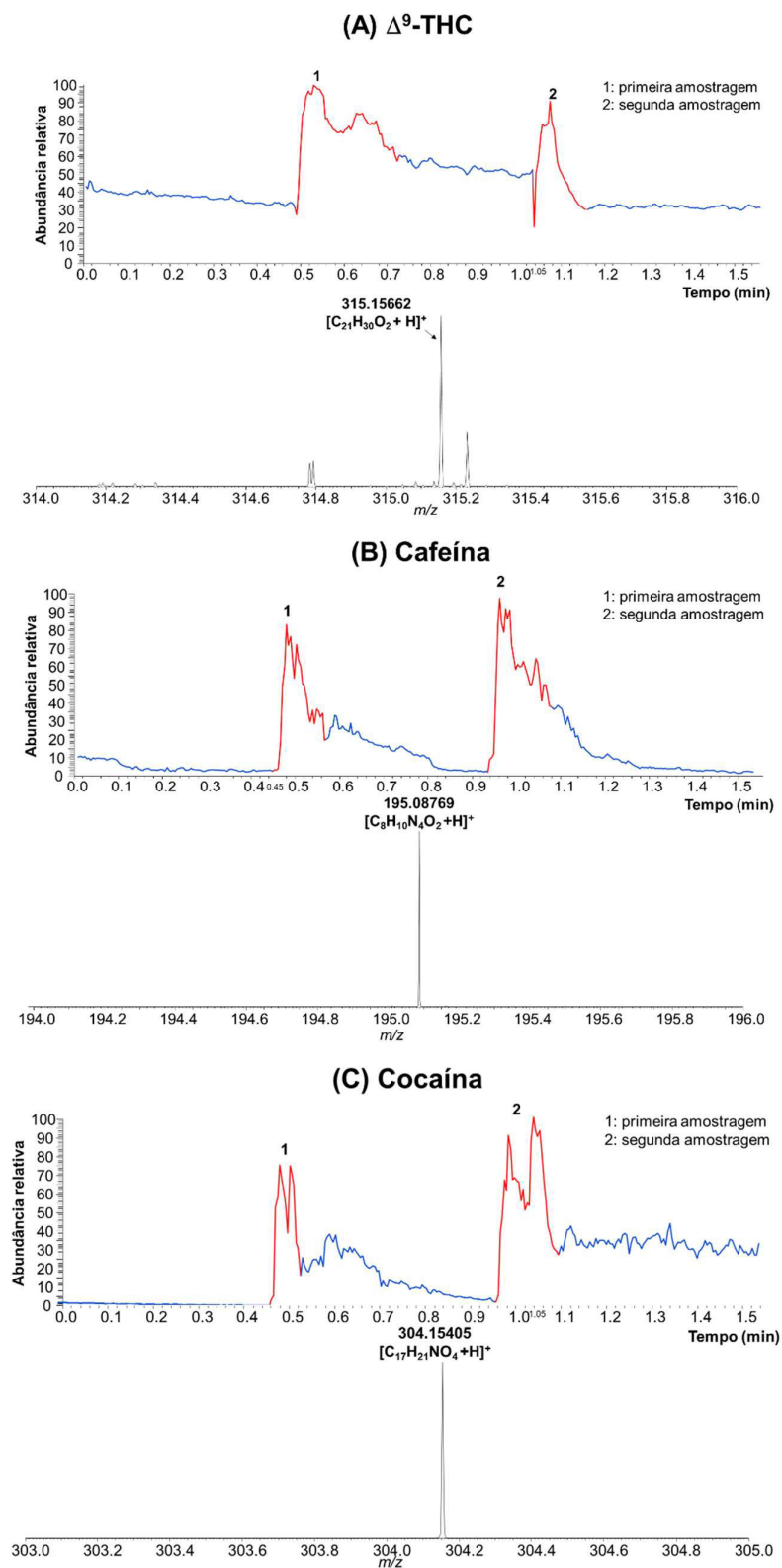


Figura 3.17 Cromatogramas de íons totais (TIC) e espectro de análises de PS(+)-MS no Orbitrap com papel com [Poli (Py-co-Ani)] e amostras de urina enriquecida com: **(A)** Δ^9 -THC; **(B)** Cafeína; **(C)** Cocaína

3.5 CONCLUSÕES

A polimerização *in situ* foi uma metodologia simples para papéis revestidos com PCs. Com este trabalho, verificou-se que o revestimento com PCs é uma alternativa eficiente para melhorar a sensibilidade, eficiência e estabilidade de pulverização usando PS(+)-FT-ICR MS. Além disso, os PCs podem ainda ser utilizados em análises qualitativas e quantitativas de maneira rápida para inúmeros compostos em diferentes matrizes.

O papel com ambos os polímeros mostrou bons resultados para a maioria das classes de compostos testados. O papel modificado foi mais eficiente devido à menor interação da cafeína, canabinóides (Δ^9 -THC, CBD e CBN) e cocaína com a estrutura polimérica, onde o papel cromatográfico apresentou alta interação devido às propriedades físicas e químicas das fibras de celulose.

Por fim, no teste de viabilidade verificou-se que o papel com [Poli (Py-co-Ani)] é promissor ao uso em análises qualitativas e quantitativas por PS-MS, assim como na sua reutilização. Além disso, o uso de PCs aumenta a eficiência na ionização de moléculas complexas sem fragmentação e com boa precisão por PS-MS.

4. POTENCIAIS APLICAÇÕES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM FLUIDO ORAL E FOLHA DE DAMIANA (*Turnera diffusa*) POR DART-MS/MS E LC-MS/MS

4.1 INTRODUÇÃO

As novas substâncias psicoativas (NPS) são substâncias de abuso não controladas pela convenção única sobre drogas narcóticas (1961⁸² ou convenção de 1971⁸³), são também conhecidas como *designer drugs*, que são substâncias controladas com pequenas modificações da estrutura química que favorecem sua fabricação e sua distribuição. Em consequência, o NPS imita os efeitos psicoativos das drogas ilícitas e elas têm uma legislação fácil sobre o desvio de medicamentos. Por causa disso, constantemente muitos países atualizam seu controle com essas NPS.

O aumento do uso de NPS está alterando o panorama das drogas em todo o mundo a um ritmo alarmante.⁸⁴ O UNODC informou o surgimento de 803 NPS de 2009 a 2017.⁴⁷

Os canabinóides sintéticos são um termo popular usado para compostos análogos ao Δ^9 -THC porque esses fármacos foram descritos pelos usuários como tendo efeitos semelhantes à *Cannabis*, e alguns desses compostos apresentam forte ligação a receptores de canabinoides, sistema endocanabinoide e, portanto, exibem intensos efeitos psicoterapêuticos. Os canabinóides sintéticos são drogas que ganharam popularidade por imitar efeitos do Δ^9 -THC que é uma das drogas mais consumidas no mundo.^{50,85-89} Existem dois tipos de receptores canabinóides das células cerebrais (CB1 e CB2). Os CB1 são receptores responsáveis pela cognição, memória e humor,

e o CB2 foi encontrado em células do sistema imunológico e é responsável por sua modulação.⁹⁰

O primeiro canabinóide sintético a ser identificado em um produto "*legal high*" foi o JWH-018 (2008).⁹¹ A forte afinidade do JWH-018 (classe dos naftoilindóis) com os receptores canabinóides gera efeitos potencialmente prejudiciais à saúde, em comparação com o THC.^{92,93} O último relatório do Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (2017)⁸⁹ mostrou 14 famílias químicas reconhecíveis de canabinóides sintéticos e 169 são agonistas sintéticos dos receptores de canabinóides, no total de 620 NPS.⁴⁷

Os canabinóides sintéticos são o maior grupo de NPS em termos do número de substâncias diferentes relatadas e as catinonas sintéticas são o segundo maior grupo (**Figura 4.1**).⁴⁷ Os efeitos das catinonas sintéticas são similares a outros estimulantes e drogas alucinógenas, como anfetamina e ecstasy (MDMA) e podem causar mortes, muitas das quais ocorreram na Europa.⁸⁹⁻⁹⁶

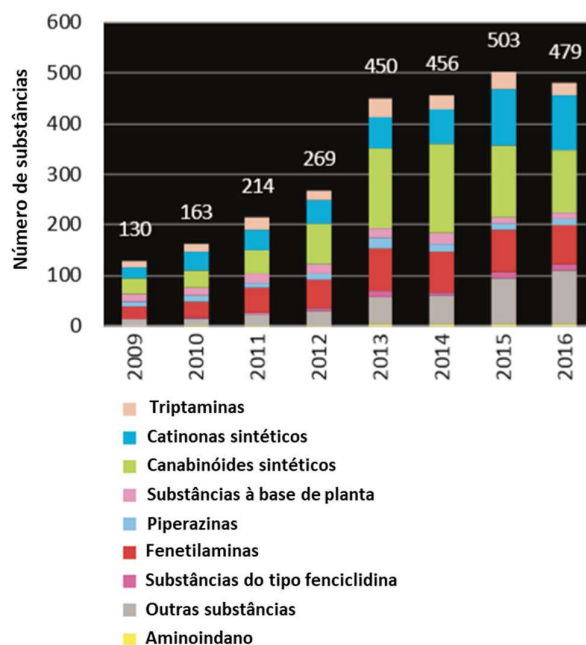


Figure 4.1 Número de novas substâncias psicoativas reportadas anualmente, 2009-2016.
Fonte: UNODC.⁴⁷

O número de catinonas sintéticas tem aumentado ao longo dos anos, como mostra a **Figura 4.2**, e as modificações ocorrem constantemente na estrutura básica da catinona (aminocetonas). Como os canabinóides sintéticos, as catinonas sintéticas produzem elevações nos níveis dos neurotransmissores do SNC para as várias catecolaminas e, por isso, ocorre a estimulação do SNC e os efeitos psicoativos.⁹⁷ Observa-se no último relatório do UNODC⁴⁷ que há um acréscimo acentuado, em 71 países, de apreensões de drogas e casos de apreensões oriundos de anfetaminas (em destaque a metanfetamina), as NPS (em destaque as sintéticas) e outras como LSD e matakualona (**Figura 34**).

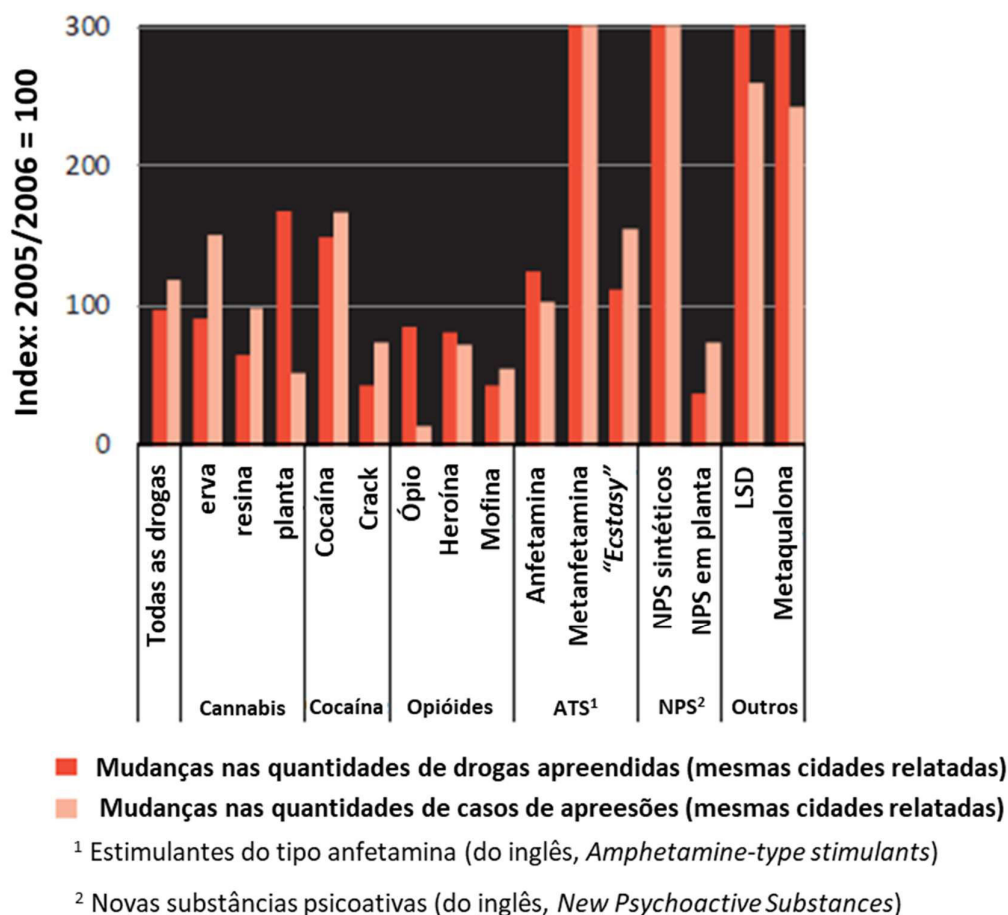


Figure 4.2 Alterações nas quantidades de drogas apreendidas e prisões por causa de drogas de 2005-06 para 2015-16.

Fonte: UNODC.⁴⁷

Nota: Cálculo baseado nos dados de 71 países (index: 2005-2006 = 100)

O 3,4-MDPV (análogo da alfa-PVP) tem um perfil seletivo, como cocaína e metanfetamina, porque inibe os sistemas de transporte de recaptação de monoamina e mostra alta afinidade pelo transportador de dopamina.⁹⁸ O nome sistemático de 25 NPS aplicado neste relatório pode ser encontrado na **Tabela 4.1** e canabinóides sintéticos e catinonas sintéticas compreendem várias classes estruturais (**Tabela 4.2-A e 4.2-B**).

As NPS são adquiridas como "*spice*" ou "K2" (canabinóides sintéticos) e "sais de banho" ou "plantas" (catinonas sintéticas) como uma maneira de facilitar o mercado de drogas. Damiana (*Turnera diffusa*) similarmente *Melissa*, *Mentha*, ervas da família *Lamiaceae* e *Thymus* são materiais vegetais utilizados nas misturas com canabinóides sintéticos em metanol ou acetona para o consumo.^{89,99} Em geral, o material vegetal é seco após o depósito de canabinóides sintéticos por pulverização, imersão e/ou mistura com soluções e produtos à base de plantas, e, variam em composição e concentração. Os principais canabinóides sintéticos encontrados no material vegetal são JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122, AB-FUBINACA, AM-2201, UR-144, XLR-11.^{100,48}

A ciência forense tem como objetivo identificar a causa da origem de uma morte ou crime, ou avaliar o comportamento humano, geralmente aplicado à segurança no trânsito e ao funcionamento de um veículo automotor, ao doping no esporte ou para demonstrar uma análise de fluidos corporais, tais como urina, sangue e fluido oral (fluido oral). A toxicologia forense tem sido aplicada na elucidação de questões que ocorrem em processos judiciais relacionados a intoxicações.^{101,102}

É importante a escolha do tipo de matriz para cada tipo de caso de investigação que envolve drogas de abuso. Nos últimos 10 anos, é crescente o interesse em usar o

fluido oral para o teste de detecção de drogas como uma alternativa à urina. O fluido oral está sendo avaliado em motoristas por estarem sob a influência de drogas nas estradas e em testes no local de trabalho. O fluido oral inclui coleta fácil e não invasiva, possível uso como indicador de consumo recente de drogas e relação mais próxima com as concentrações plasmáticas do que a urina, e os procedimentos de coleta podem ser feitos no local sob supervisão rigorosa.⁵⁰ O teste do fluido oral pode detectar drogas imediatamente após o uso mais recente e até 4 dias depois. O teste convencional de drogas com urina é incapaz de detectar o uso nas primeiras quatro horas após o uso.¹⁰³⁻¹⁰⁵

A correta identificação dessa classe de drogas é um desafio devido às rápidas modificações químicas e à comercialização, juntamente com a identificação adequada. A maioria desses compostos não possui metodologias específicas para a realização de triagens utilizadas na rotina laboratorial.¹⁰⁶

Várias publicações relataram a triagem de várias drogas usando DART. A DART-MS tem a finalidade de eliminar o longo tempo de cromatografia e a da aquisição de espectros com alta precisão instantaneamente. Moore *et al.*¹⁰⁷ demonstraram DART-TOF-MS para rastreio rápido de canabinóides sintéticos em plantas.^{48,108,109} Na fonte DART, ocorre a entrada de gás (geralmente hélio ou nitrogênio) e, com a aplicação de um potencial elétrico, o gás é transformado em plasma, que é então impactado na superfície de uma amostra colocada entre a fonte de ionização e a entrada do analisador (espectrômetro de massas), como pode ser verificado com o uso do capilar de vidro como suporte para amostra, na **Figura 4.3**. Isso converte átomos e moléculas na superfície em íons, que são direcionados para o espectrômetro de massas. Como o DART é capaz de ionizar amostras ao ar livre, reduzindo ou eliminando a

necessidade de qualquer preparação especial de amostra ou solventes (**Figura 4.4**).¹¹⁰

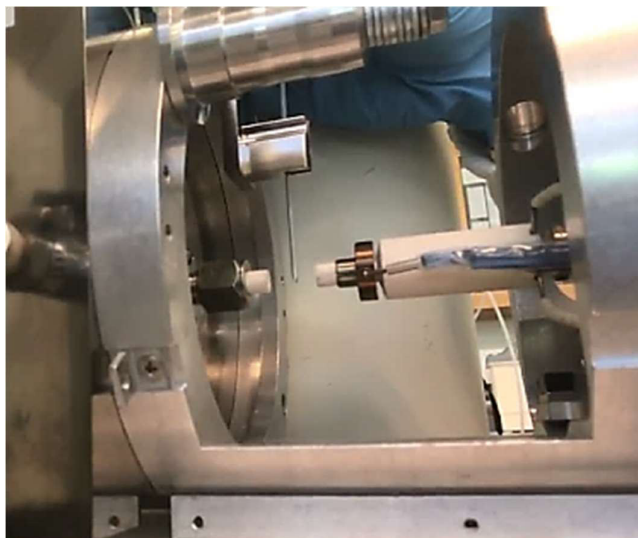


Figure 4.3 Fonte DART com análise com capilar de vidro.
Fonte: Do autor



Figure 4.4 Fonte DART-MS.
Fonte: Steiner, R.¹¹⁰

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS) é comum para identificação e quantificação de canabinóides sintéticos em amostras biológicas, especialmente para fluido oral. Levando em conta esse crescente mercado de síntese de NPS, este estudo tem como objetivo combinar um método simples de DART-MS para examinar rapidamente a NPS e fornecer uma alternativa conveniente para a análise de LC-MS. A análise de triagem preliminar com o DART-MS acelera o processo de detecção e também pode ser usada para triagem de fluido oral e plantas sem métodos de extração extensiva, enquanto a LC-MS / MS maximiza o potencial de detecção

eficiente e poder de separação de sinais. Os métodos apresentados aqui englobam vinte e cinco compostos entre as classes mais proeminentes de drogas sintéticas, incluindo canabinóides sintéticos e derivados da catinona.^{51,111-113}

Tabela 4.1 Nome sistemático de 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

	Nome sistemático	Nome comum	Fórmula molecular
1	1-benzylpiperazine	BZP	C ₁₁ H ₁₆ N ₂
2	1-(3-chlorophenyl)piperazine	mCbp	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂
3	1-phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)-1-pentanone	α-PVP	C ₁₅ H ₂₁ NO
4	1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(1-pyrrolidinyl)-1-pentanone	3,4-MDPV	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃
5	(2-Iodophenyl)[1-[(1-methyl-2-piperidinyl)methyl]-1H-indol-3-yl]methanone	AM-2233	C ₂₂ H ₂₃ IN ₂ O
6	1-phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)-1-heptanone	PV8	C ₁₇ H ₂₅ NO
7	N-[(2S)-1-Amino-3-methyl-1-oxo-2-butanyl]-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide	AB-FUBINACA	C ₂₀ H ₂₁ FN ₄ O ₂
8	N-[(2S)-1-Amino-3-methyl-1-oxo-2-butanyl]-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide	AB-PINACA	C ₁₈ H ₂₆ N ₄ O ₂
9	Methyl N-[[1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazol-3-yl]carbonyl]-L-valinate	MMB-FUBINACA	C ₂₁ H ₂₂ FN ₃ O ₃
10	8-Quinoliny 1-(4-fluorobenzyl)-1H-indole-3-carboxylate	FUB-PB-22	C ₂₅ H ₁₇ FN ₂ O ₂
11	[1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl](1-naphthyl)methanone	AM-2201	C ₂₄ H ₂₂ FNO
12	N-[(2S)-1-Amino-3-methyl-1-oxo-2-butanyl]-1-(cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide	AB-CHMINACA	C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₂
13	N-Benzyl-1-pentyl-1H-indole-3-carboxamide	SDB-006	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O
14	8-Quinoliny 1-pentyl-1H-indazole-3-carboxylate	NPB-22	C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₂
15	[1-(5-Fluoropentyl)-1H-indol-3-yl](4-methyl-1-naphthyl)methanone	MAM-2201	C ₂₅ H ₂₄ FNO
16	8-Quinoliny 1-pentyl-1H-indole-3-carboxylate	PB-22	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₂
17	[1-(5-Fluoropentyl)-1H-indazol-3-yl](1-naphthyl)methanone	THJ2201	C ₂₃ H ₂₁ FN ₂ O
18	(1-Butyl-1H-indol-3-yl)(1-naphthyl)methanone	JWH-073	C ₂₃ H ₂₁ NO
19	(1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl)(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanone	XLR-11	C ₂₁ H ₂₈ FNO
20	1-Naphthyl(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone	JWH-018	C ₂₄ H ₂₃ NO
21	(4-Methoxy-1-naphthyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone	JWH-081	C ₂₅ H ₂₅ NO ₂
22	(4-Methyl-1-naphthyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone	JWH-122	C ₂₅ H ₂₅ NO
23	N-(1-Naphthyl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide	MN-18	C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O
24	(1-pentyl-1H-indol-3-yl)(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanone	UR-144	C ₂₁ H ₂₉ NO
25	Methyl N-[[9-(cyclohexylmethyl)-9H-carbazol-3-yl]carbonyl]-3-methyl-L-valinate	MDMB-CHMCZCA	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₃

Tabela 4.2-A Estrutura Química e classificação de 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

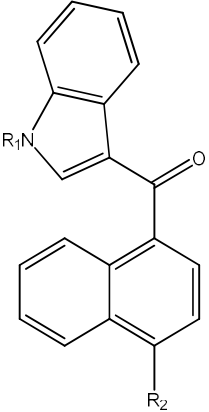
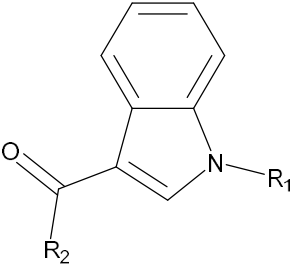
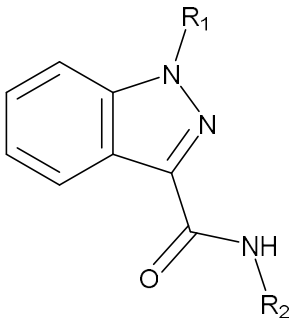
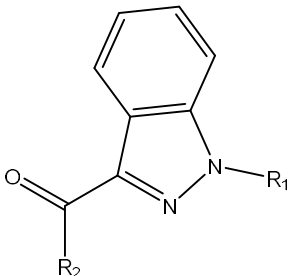
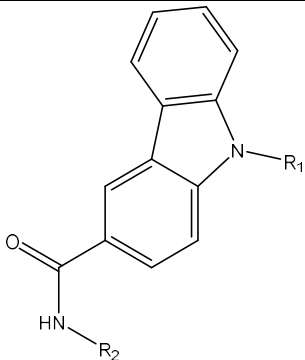
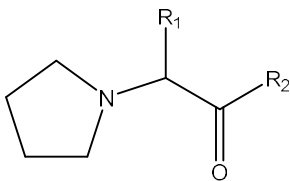
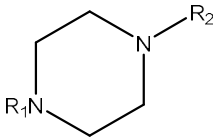
CLASSE	ESTRUTURA BÁSICA	COMPONENTES	NOME
Naphthoylindoles Canabinóides sintéticos		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = H$	JWH-018
		$R_1 = n\text{-Butyl}$ $R_2 = H$	JWH-073
		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = \text{Methoxy}$	JWH-081
		$R_1 = n\text{-pentyl}$ $R_2 = \text{Methyl}$	JWH-122
		$R_1 = 5\text{-Fluoro-}n\text{-pentyl}$ $R_2 = \text{Methyl}$	MAM-2201
		$R_1 = 5\text{-Fluoro-}n\text{-pentyl}$ $R_2 = H$	AM-2201
Tetramethylcyclopropylindoles Canabinóides sintéticos		$R_1 = 5\text{-Fluoro-}n\text{-pentyl}$ $R_2 = 2,2,3,3\text{tetramethylcyclopropyl}$	XLR-11
		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = 2,2,3,3\text{tetramethylcyclopropyl}$	UR-144
		$R_1 = 1\text{-methyl-2 piperidinyl}$ $R_2 = 2\text{-Iodophenyl}$	AM-2233
		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = 8\text{-Quinoliny}$	PB-22
		$R_1 = 4\text{-fluorobenzyl}$ $R_2 = 8\text{-Quinoliny}$	FUB-PB-22
		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = 8\text{-Quinoliny}$	NPB-22
		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = 1\text{-aminophenyl}$	SDB-006

Tabela 4.2-B Estrutura Química e classificação de 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

Indazol-3-carboxamides Canabinóides sintéticos		$R_1 = 4\text{-fluorobenzyl}$ $R_2 = 1\text{-Amino-3-methyl-1-oxo-2-butanyl}$	AB-FUBINACA
		$R_1 = 4\text{-fluorobenzyl}$ $R_2 = 1\text{-Methoxy-3-methyl-1-oxo-2-butanyl}$	MMB-FUBINACA
		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = 1\text{-Amino-3-methyl-1-oxo-2-butanyl}$	AB-PINACA
		$R_1 = \text{Cyclohexylmethyl}$ $R_2 = 1\text{-Amino-3-methyl-1-oxo-2-butanyl}$	AB-CHMINACA
Indazole-3-carboxamides Canabinóides sintéticos		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = 1\text{-Naphthyl}$	MN-18
		$R_1 = 5\text{-Fluoro-}n\text{-pentyl}$ $R_2 = 1\text{-Naphthyl}$	THJ-2201
MDMB-CHMCA Canabinóides sintéticos		$R_1 = \text{cyclohexylmethyl}$ $R_2 = 1\text{-Amino-3-methyl-1-oxo-2-butanyl}$	MDMB-CHMCZCA
Pyrolidin-2-carboxamides Catinonas sintéticas		$R_1 = n\text{-Propyl}$ $R_2 = 1,3\text{-benzodioxol-5-yl}$	3,4-MDPV
		$R_1 = n\text{-Propyl}$ $R_2 = \text{Phenyl}$	α-PVP
		$R_1 = n\text{-Pentyl}$ $R_2 = \text{Phenyl}$	PV8
Piperazine Catinonas sintéticas		$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{Benzyl}$	BZP
		$R_1 = \text{H}$ $R_2 = 3\text{-chlorophenyl}$	mCpp

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo Geral

Detectar novas substâncias psicoativas (NPS) em fluido oral e em folha de Damiana (*Turnera diffusa*) por DART-MS/MS e caracterização quantitativa via LC-MS/MS.

4.2.2 Objetivos Específicos

- 4.2.2.1 Identificar a NPS no fluido oral pela análise DART-MS no modo de *fullscan* e no modo *SRM* (Selected reaction monitoring).
- 4.2.2.2 Identificar sete dos principais canabinóides sintéticos (AM-2201, JWH-073, XLR-11, JWH-018, JWH-081, JWH-122 e UR-144) na folha de damiana enriquecida por análises em DART-MS em modo de varredura total e SRM.
- 4.2.2.3 Desenvolver um método de extração para NPS em fluido oral.
- 4.2.2.4 Identificar e quantificar as amostras de fluido oral enriquecidas com drogas sintéticas por análises em LC-MS.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Reagentes

Todos os solventes e substâncias eram pelo menos de grau analítico ou HPLC. Metanol, ácido acético glacial, ácido fórmico, formiato de amônio, 1-butanol e cloreto de metileno foram obtidos na Fisher Scientific (Fairlawn, NJ, EUA). BZP, mCpP, JWH-018, JWH-073, XLR-11, AB-FUBINACA, AB-PINACA, MAM-2201, BZP-d7, mCpP-d8 foram fornecidos pela Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, EUA). MMB-FUBINACA, AM-2233, PV8, α -PVP, JWH-081, PB-22, 3,4-MDPV, JWH-122, AM-2201, AB-CHMINACA, UR-144, AB-PINACA-d9, AB-FUBINACA-d4, 3,4-MDPV-d8, AM-2201-d5, XLR11-d5, MAM-2201-d5, JWH-018-d9, NPB-22, SDB-006, FUB-PB-22, THJ2201, MDMB-CHMCZCA, MN-18 e α -PVP-d8 foram adquiridos à Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EUA).

4.3.2 Preparo de soluções estoque

Soluções estoque em 500 μ g/mL (MMB-FUBINACA, AM2233, PV8, α -PVP, JWH-081, PB-22, 3,4-MDPV, JWH-122, AM2201, AB-CHMINACA, UR-144, AB-PINACA-d9), 100 μ g/mL (BZP, mCpP, AB-FUBINACA-d4, 3,4-MDPV-d8, AM2201-d5, XLR11-d5, MAM2201-d5, JWH-018-d9, NPB-22, SDB-006, FUB-PB-22, THJ2201, MDMB-CHMCZCA e MN-18) e 10 μ g/mL (JWH-018, JWH-073, XLR-11, AB-FUBINACA, AB-PINACA, MAM 2201, BZP-d7, mCpP-d8 e α -PVP-d8) de cada analito ou ISTD foram preparados em metanol.

4.3.3 Preparação de soluções de trabalho

Duas soluções de trabalho intermitentes com padrões foram preparadas em metanol. Solução de trabalho intermitente A, IWS A, (BZP, MPCP, NPB-22, SDB-006, FUB-PB-22, THJ2201, MDMB-CHMCZCA e MN-18) e solução de trabalho intermitente B, IWS

B, (MMB-FUBINACA, AM2233, PV8, α -PVP, JWH-081, PB-22, 3,4-MDPV, JWH-122, AM2201, AB-CHMINACA e UR-144) em 10 $\mu\text{g/mL}$. A solução de trabalho C (JWH-018, JWH-073, XLR-11, AB-FUBINACA, AB-PINACA, MAM 2201, IWS A e IWS B) foi preparada em 1 $\mu\text{g/mL}$. Uma solução de trabalho intermitente (IWS D) com ISTD foi preparada em metanol em 10 $\mu\text{g/mL}$ (AB-PINACA-d9, AB-FUBINACA-d4, JWH-073-d7, 3,4-MDPV-d8, AM2201-d5, XLR11-d5, MAM2201-d5 e JWH-018-d9) e uma solução de trabalho ISTD (BZP-d7, mCpP-d8, α -PVP-d8 e IWS D).

4.3.4 Fluido oral humano

Coletou-se o fluido oral humano por expectoração (método da cuspidela) em 2 homens e 2 mulheres voluntárias. As amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes do uso.

4.3.5 Preparo de amostra

O fluido oral (50 μL) ou folha de Damiana (20 mg) foi combinado com 200 μL de metanol (contendo padrão). A amostra foi sujeita a agitação mecânica (20 min), centrifugação (4 min, 10 000 rpm). O sobrenadante foi coletado para a análise DART-MS.

Para LC-MS, a amostra de fluido oral (100 μL) foi combinada com 1 mL de metanol gelado (contendo padrão). A amostra foi sujeita a agitação mecânica (5 min), centrifugação (4 min, 10 000 rpm). A SPE foi realizada usando os cartuchos Bond Elut Certify e o coletor de pressão positiva UCT. O cartucho de SPE foi previamente condicionado com 2 mL de metanol e 2 mL de ácido acético 0,1 M. Todas as metodologias aplicadas ao sistema SPE antes do melhor procedimento adotado, encontram-se na **Tabela A1**. Para o sistema mais favorável (**Tabela A1, E12**), após o carregamento, os cartuchos foram sequencialmente lavados com 2 mL de ácido

acético 20 % em água e depois com 2 mL de água: metanol (50:50, v/v). Os analitos foram eluídos utilizando 1-butanol: cloreto de metileno: ácido acético (24,5:75:0,5, v/v/v) e CH₃OH: NH₄OH (49:1, v/v). Depois de seco (a 30 °C), o resíduo foi reconstituído em 100 mL de fase móvel (0,1 % de ácido fórmico em 5 mM de formiato de amônio (A) e 0,1 % de ácido fórmico em metanol (B)) e injetado no sistema LC-MS/MS.

4.3.6 Condições do DART-QqQ-MS

Soluções estoque padrão individuais de drogas sintéticas foram medidas para determinar íons precursores e transições específicas. Os dois íons produtos mais abundantes para cada composto foram selecionados e a otimização dos parâmetros incluindo controle de potência (tensão da agulha e tensão do eletrodo), controle de gás (hélio), controle do aquecedor (ajuste de temperatura) e fonte de íons ESI (temperatura e deslocamento capilar). Os parâmetros DART foram: tensão da agulha de 3500 V, tensão do eletrodo de grade de 600 V, gás de hélio com vazão de 2 L/min, temperatura do aquecedor de 300 °C, temperatura do capilar 300 °C, desvio do capilar de 35 V e deslocamento do skimmer de 0 V. O sobrenadante (2 µL) foi aplicado na extremidade fechada de um tubo de ponto de fusão e colocado no DART-MS/MS (Ion Sense-TSQ Quantum). A aquisição de dados foi realizada em duplicata (duas soluções diferentes por dia) em dois dias diferentes, nos modos de varredura completa (m/z 50-500) e SRM no modo de íon positivo.

4.3.7 Condições de LC-QqQ-MS

Os dados espectrométricos de massa foram adquiridos em um LC Agilent 1290 Infinity Binary Pump acoplado a um MS/MS do tipo triplo quadrupolo Agilent 6470 com tecnologia Jet Streaming e fonte ESI operada em modo positivo de ionização usando

o software Agilent Mass Hunter. A aquisição de dados foi realizada por meio de monitoramento dinâmico de múltiplas reações (do inglês, *Dynamic Multiple Reaction Monitoring method*, DMRM) com duas transições MRM para cada composto, e o íon produto mais abundante foi selecionado como íon para quantificação. A separação cromatográfica dos analitos alvo foi realizada com uma coluna analítica Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (3,0 mm × 50 mm, 1,8 µm) com gradiente de eluição a um fluxo de 0,5 mL/min usando 0,1 % de ácido fórmico em formiato de amônio 5 mM (A) e 0,1 % de ácido fórmico em metanol (B). O gradiente foi o seguinte: 5 % de B constante até 1 minuto, seguido por uma rampa até 95 % de B em 8,50 minutos e depois 1,50 minutos de espera a 95 % de B para limpeza antes de 2 minutos de reequilíbrio a 5 % de B. O método LC/ESI-MS/MS foi validado para a quantificação dos 25 NPS em amostras fluido oral de acordo com as diretrizes das Práticas Padrão para Validação de Métodos em Forensic Toxicology, Academy Standard Board (ASB) WGTOxs.¹¹⁴ Seletividade, linearidade, limite de detecção, o limite inferior de quantificação, precisão e imprecisão, efeitos de matriz, recuperação e eficiência do processo, a estabilidade do amostrador automático, bem como efeitos carry-over foram examinados.

4.3.8 Validação do método

4.3.8.1 Linearidade e carryover

Sete padrões de calibração foram preparados nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL para todos os analitos, e, ISTD foram adicionados a 100 ng/mL para o validação na análise em LC-MS. Para avaliação estatística, as linhas de regressão foram calculadas no software Agilent MassHunter Quantitative Analysis, versão B.08.00, operando um modelo ponderado (1/x), a fim de considerar a heterocedasticidade das amostras. As razões de área de pico (isto é, NPS vs ISTD) foram representadas em função das concentrações dentro do software.

Os parâmetros MS de todos os analitos e ISTDs estão listados na **Tabela 4.3-A e 10-B**. As amostras de controle de qualidade (do inglês, *Quality control*, QC) foram utilizadas em três concentrações diferentes: 1 ng/mL (BAIXA) 10 ng/mL (MÉDIA) e 100 ng/mL (ALTA). Novas curvas de calibração e amostras de CQ nas mesmas concentrações foram preparadas diariamente e analisadas com cada lote. A avaliação dos efeitos de transição foi realizada por três amostras em branco imediatamente após uma amostra de alta concentração ou material de referência e examinadas para cada sinal de analito.

4.3.8.2 Precisão e sensibilidade

A precisão e a imprecisão intradiária e interdiária do método foram investigadas com cinco repetições do QC baixo (10 ng/mL) e alto (100 ng/mL) diariamente em cinco dias consecutivos. O critério de aceitação para exatidão e precisão foi que % R_{erro} e % CV devem ser $\leq 15\%$ para amostras de QC ($\leq 20\%$ no limite baixo de quantificação, LLOQ). O LLOQ foi definido como o ponto mais baixo da curva de calibração que apresentava uma relação sinal-ruído de ≥ 10 e que passava pelos critérios de aceitação de dados para detecção, identificação, viés e precisão. O LLOD foi estimado a partir do desvio padrão do intercepto y (S_y) e do declive médio (Avgm) como $\text{LOD} = (3,3 S_y) / \text{Avgm}$.

4.3.8.3 Recuperação, efeito de matriz e eficiência do processo

A eficiência de extração/recuperação (RE), efeito de matriz (EM) e eficiência do processo (EP) foram avaliadas quantitativamente de acordo com o método descrito por Matuszewski *et al.*¹¹⁵. Três conjuntos de amostras (Conjuntos A, B e C, $n = 7$ para cada concentração), cada um em duas concentrações diferentes (10 e 100 ng / mL), foram analisados com o método. O conjunto A era padrão perfeito. O Conjunto B e o

conjunto C foram preparados usando sete amostras de fluido oral coletadas de quatro voluntários sem drogas. Amostras de fluido oral com água no conjunto B foram enriquecidas após a extração. No conjunto C, amostras de fluido oral foram adicionadas antes da extração (sem água). A RE foi calculada com a concentração medida, enquanto que para EM e PE foram utilizadas as áreas absolutas dos picos. Para a determinação do RE, a concentração medida do Conjunto C foi dividida pelas do Conjunto B e depois multiplicada por 100 para determinar uma porcentagem. As taxas de áreas de pico absolutas entre o Conjunto B e o Conjunto A (multiplicado por 100) determinaram o EM. O aumento de ionização ocorre quando os valores de EM são maiores que 100 % e a supressão de ionização quando os valores de EM são menores que 100 %. A EP foi calculada com a razão entre a área do pico do Conjunto C e as do Conjunto A e depois multiplicada por 100. Os RSDs da RE foram calculados para avaliar as variações entre as amostras de diferentes fontes e os valores de RSDs inferiores a 20 % foram considerados aceitáveis.

Tabela 4.3-A Parâmetros utilizados nas análises de DART-MS/MS e LC-MS/MS

			DART-MS/MS				LC-MS/MS				
		Fórmula química	Ion prec (m/z)	Ion prod (m/z)	EC ¹ (eV)	Padrão interno (ISTD)	Ion prec (m/z)	Ion prod (m/z)	EC ¹ (eV)	Frag ² (eV)	TR ³ (min)
1	BZP	C ₁₁ H ₁₆ N ₂	177.12	85 91	15 15	BZP-d7 184.2→98	177.1	91.0 ^Q 65.0	30 54	92	2.125
2	mCbp	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂	197.20	119 154	25 20	mCbp-d8 205.1→158	197.1	153.9 ^Q 118.0	20 36	120	4.814
3	α-PVP	C ₁₅ H ₂₁ NO	232.13	91 126	35 20	α-PVP-d8 240.2→134.1	232.2	77.0 ^Q 126.0	58 30	134	4.893
4	3,4-MDPV	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	276.02	135 175	30 25	3,4-MDPV-d8 284.2→134.5	276.2	126.1 ^Q 135.0	30 30	129	5.035
5	AM-2233	C ₂₂ H ₂₃ IN ₂ O	459.14	98 362	35 15	AM-2201-d5 365.2→155.0	459.1	98.0 ^Q 112.0	44 24	100	6.154
6	PV8	C ₁₇ H ₂₅ NO	260.06	91 154	40 30	3,4-MDPV-d8 284.16→134.5	260.2	77.0 ^Q 154.1	32 64	82	6.179
7	AB-FUBINACA	C ₂₀ H ₂₁ FN ₄ O ₂	369.47	253 324	25 20	AB-FUBINACA-d4 373.2→328.0	369.2	109.0 ^Q 324.0	54 10	101	7.591
8	AB-PINACA	C ₁₈ H ₂₆ N ₄ O ₂	331.11	215 286	30 15	AB-PINACA-d9 340.3→224.1	331.2	286.1 ^Q 215.0	2610	101	8.067
9	MMB-FUBINACA	C ₂₁ H ₂₂ FN ₃ O ₃	384.10	109 253	35 20	AB-PINACA-d9 340.3→224.1	384.2	109.0 ^Q 252.9	44 20	100	8.200
10	FUB-PB-22	C ₂₅ H ₁₇ FN ₂ O ₂	397.12	109 252	40 15	AB-FUBINACA-d4 373.2→328.0	397.1	252.0 ^Q 109.0	10 46	106	8.297
11	AM-2201	C ₂₄ H ₂₂ FNO	360.30	127 155	35 25	AM-2201-d5 365.2→155.0	360.2	127.0 ^Q 154.9	62 30	162	8.394
12	AB-CHMINACA	C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₂	357.15	241 312	25 15	AB-PINACA-d9 340.3→224.1	357.2	340.1 ^Q 241.0	10 30	101	8.411
13	SDB-006	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O	321.10	91 214	40 20	AM-2201-d5 365.2→155.0	321.2	91.0 ^Q 214.0	50 22	167	8.411

¹ Energia de colisão. ² Tensão do fragmentador. ³ Tempo de retenção. ^Q Íon de quantificação.

Tabela 4.3-B Parâmetros utilizados nas análises de DART-MS/MS e LC-MS/MS

		DART-MS/MS					LC-MS/MS				
		Fórmula química	Ion prec (m/z)	Ion prod (m/z)	EC ¹ (eV)	Padrão interno (ISTD)	Ion prec (m/z)	Ion prod (m/z)	EC ¹ (eV)	Frag ² (eV)	TR ³ (min)
14	NPB-22	C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₂	360.02	145 215	40 15	AM-2201-d5 365.2→155.0	360.2	215.0 ^Q 145.0	18 42	119	8.447
15	MAM-2201	C ₂₅ H ₂₄ FNO	374.37	141 169	35 25	MAM 2201-d5 379.2→169.0	374.2	169.0 ^Q 141.0	28 56	100	8.640
16	PB-22	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₂	358.97	144 214	50 10	MAM 2201-d5 379.2→169.0	359.2	214.0 ^Q 144.0	10 46	91	8.658
17	THJ2201	C ₂₃ H ₂₁ FN ₂ O	361.28	145 213	40 20	JWH 018-d9 351.2→155.0	361.2	233.0 ^Q 145.0	18 42	134	8.693
18	JWH-073	C ₂₃ H ₂₁ NO	328.17	155 200	30 20	JWH 018-d9 351.2→155.0	328.2	155.0 ^Q 200.0	26 25	152	8.693
19	XLR-11	C ₂₁ H ₂₈ FNO	330.27	125 232	30 25	XLR-11-d5 335.3→149.0	330.2	125.0 ^Q 232.1	32 24	100	8.697
20	JWH-018	C ₂₄ H ₂₃ NO	342.17	127 214	35 20	JWH 018-d9 351.2→155.0	342.2	155.0 ^Q 127.0	26 54	147	8.940
21	JWH-081	C ₂₅ H ₂₅ NO ₂	372.27	157 185	45 25	JWH 018-d9 351.2→155.0	372.2	184.9 ^Q 157.0	30 40	172	9.046
22	JWH-122	C ₂₅ H ₂₅ NO	356.31	141 169	45 25	JWH 018-d9 351.2→155.0	356.2	169.0 ^Q 141.0	30 50	172	9.143
23	MN-18	C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O	358.20	145 215	40 15	JWH 018-d9 351.2→155.0	358.2	215.0 ^Q 145.0	18 42	119	9.161
24	UR-144	C ₂₁ H ₂₉ NO	312.07	125 214	25 25	XLR-11-d5 335.3→149.0	312.2	125.0 ^Q 214.0	30 22	147	9.176
25	MDMB-CHMCZCA	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₃	435.27	194 290	40 15	JWH 018-d9 351.2→155.0	435.3	290.0 ^Q 166.0	10 70	114	9.372

1 Energia de colisão. ² Tensão do fragmentador. ³ Tempo de retenção. ^Q Íon de quantificação.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 DART-MS

Vinte e cinco drogas foram otimizadas nas análises por DART-MS/MS: BZP, mCpP, α -PVP, 3,4-MDPV, AM-2233, PV8, AB-FUBINACA, AB-PINACA, MMB-FUBINACA, FUB-PB-22, AM-2201, AB-CHMINACA, SDB-006, NPB-22, MAM-2201, PB22, THJ2201, JWH-073, XLR-11, JWH-018, JWH-081, JWH-122, MN-18, UR-144 e MDMB-CHMCZCA. Os limites de detecção para o DART-MS no modo de exame completo variaram de 1 a 10 mg/L. Os limites inferiores ($<0,5$ mg/L) foram obtidos no modo SRM, otimizados para pelo menos duas transições para cada analito alvo.

A otimização dos parâmetros foi realizada em duas etapas, a primeira foi realizada com o JWH-018 para temperatura do gás de arraste, Hélio, em 200, 250, 300, 350 e 400 °C, e com a **Figura A4a**, verifica-se que na temperatura de 400 °C, o espectro apresentou intensidade absoluta maior ($1,73 \times 10^7$). Em sequência, testou-se o fluxo do gás em 1,2,3 e 4 L/min e com 2 L/min de fluxo com intensidade de $2,40 \times 10^7$ (**Figura A4b**). Para avaliar o desempenho no eletrodo, aplicou-se tensão elétrica de 100, 200 e 300V e para 300V a intensidade absoluta foi mais intensa ($1,32 \times 10^7$), **Figura A4c**. A tensão elétrica aplicada na agulha foi variada entre 2500, 3000 e 3500 V, em que 3500 V apresentou intensidade absoluta mais intensa ($3,64 \times 10^7$), **Figura A4d**. Para o volume de amostra aplicada no capilar de vidro, utilizaram-se os volumes de 2,3,4 e 5 μ L, constata-se que em 5 μ L a intensidade absoluta é mais intensa, contudo foi verificado um excesso de amostra na fonte de ionização e uma contaminação (*carryover*), por causa disso, os menores volumes seriam utilizados. Entre 2 e 3 μ L não há diferença ampla, $3,64 \times 10^7$ e $3,78 \times 10^7$ de intensidade absoluta, respectivamente. Logo foi utilizado o menor volume de amostra aplicado ao capilar de

vidro, **Figura A4e**. Foram testadas todas as 25 NPS para os parâmetros otimizados acima e para AB-FUBINACA e AB-CHMINACA a temperatura do gás de arraste foi melhor em 300 °C e PB-22 não apresentou baixa intensidade absoluta ($6,4 \times 10^7$). Diante disso, novos parâmetros foram reconsiderados para uma melhor otimização a esse grupo com propriedades tão distintas. PB-22 foi testada novamente a tensão elétrica aplicada no eletrodo de grade (**Figura A5a**) com melhor resultado para 600 V (intensidade absoluta de $7,58 \times 10^6$), além disso, a melhor temperatura do capilar foi de 300 °C (**Figura A5b**), o deslocamento capilar (compensação capilar, (**Figura A5c**) foi de 35V e deslocamento skimmer de 0V(**Figura A5d**).

Com a otimização dos parâmetros e todos os ensaios com os padrões para otimização dos íons produtos e suas respectivas energia de colisão, todas os analitos foram identificadas, posteriormente, em amostras de fluidos orais com S/N de pelo menos 5 (varredura completa e modo SRM), na **Figuras 4.3, 4.4-A, 4.4-B e 4.4-C**.

(A) Íons produtos de fragmentação no modo de varredura completa e SRM

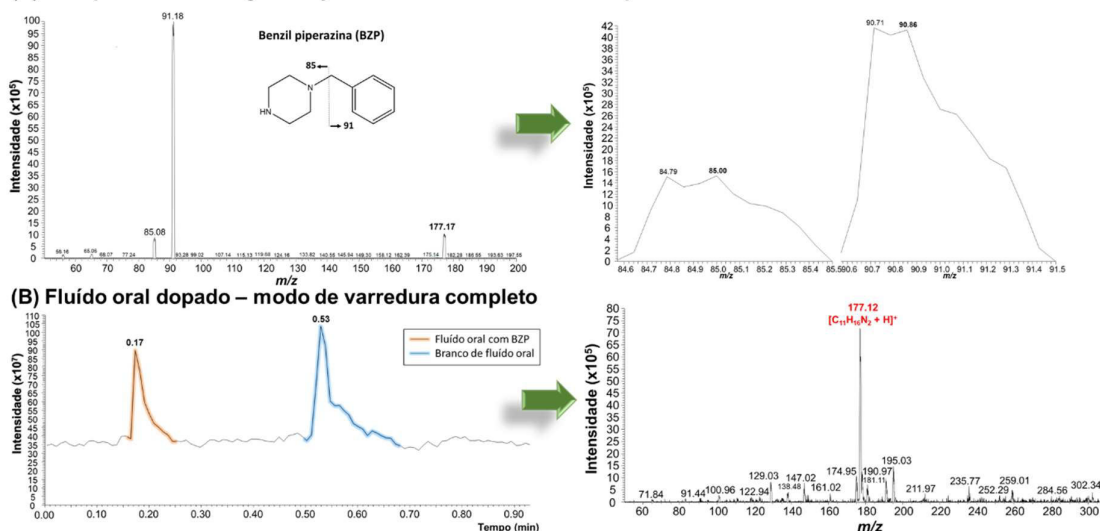


Figura 4.5 Análises DART-QqQ para BZP. (A) Padrão de BZP em metanol (B) Fluido oral enriquecido com BZP (cromatograma dos íons totais e espectro de massas DART(+))

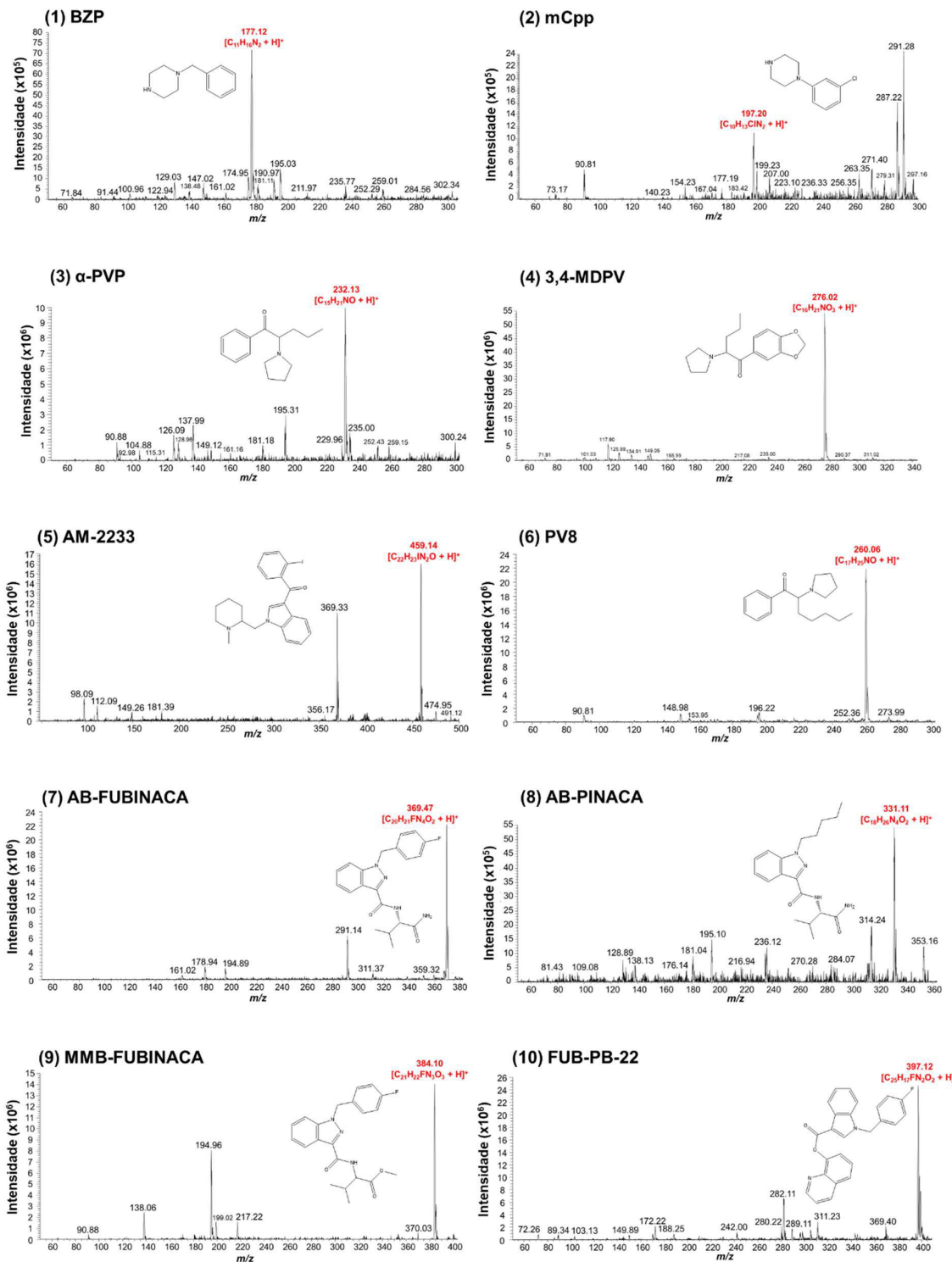


Figure 4.6-A Análises por DART-MS em fluido oral enriquecido com as 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

Figure 4.6-B Análises por DART-MS em fluido oral enriquecido com as 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

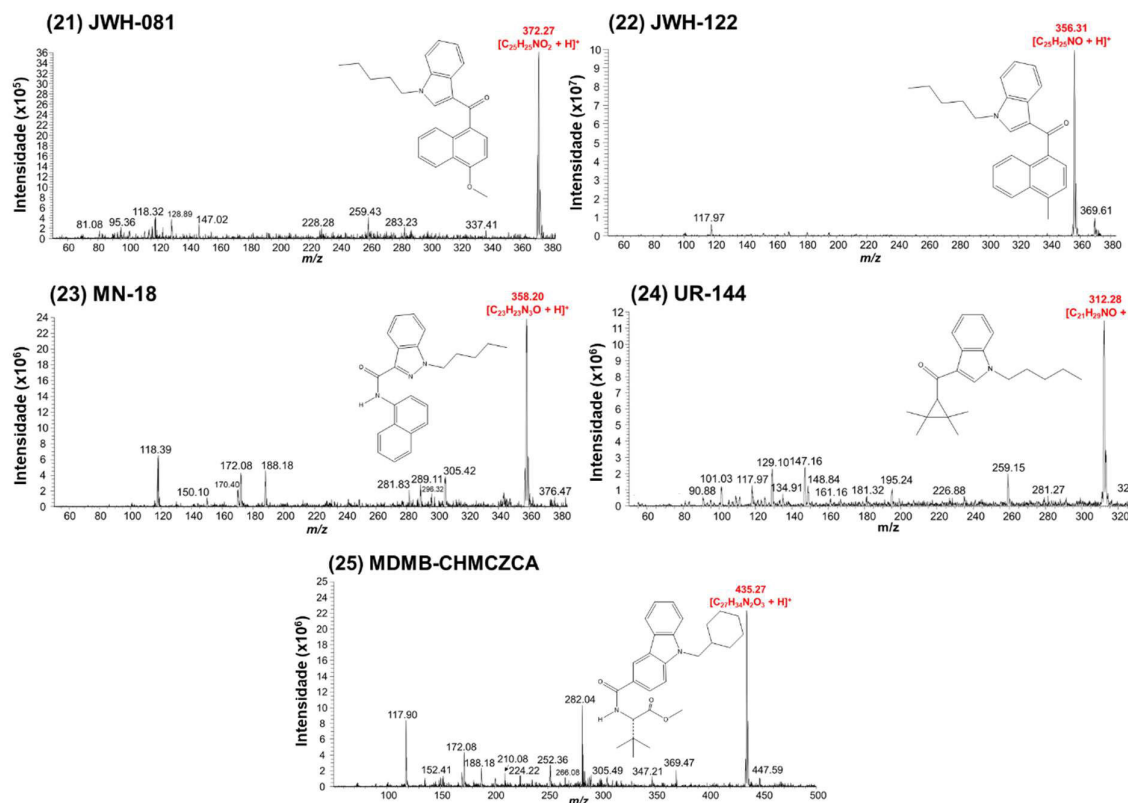


Figure 4.6-C Análises por DART-MS em fluido oral enriquecido com as 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

Foi adquirida uma das formas da Damiana (*Turnera diffusa*) que é utilizada para preparo de spice principalmente com JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122, AB-FUBINACA, AM-2201, UR-144, XLR-11. As amostras de extrato de Damiana foram enriquecidas e testadas diretamente com a fonte DART, e espectros de massas foram relatados com S/N melhor que 5. As amostras foram analisadas em duplicata em dois dias diferentes (**Figura 4.5**). Foram utilizadas amostras não enriquecidas com cannabinóides como branco. Devido à matriz utilizada, constata-se o efeito de matriz pelos inúmeros sinais juntamente com o analito de interesse.

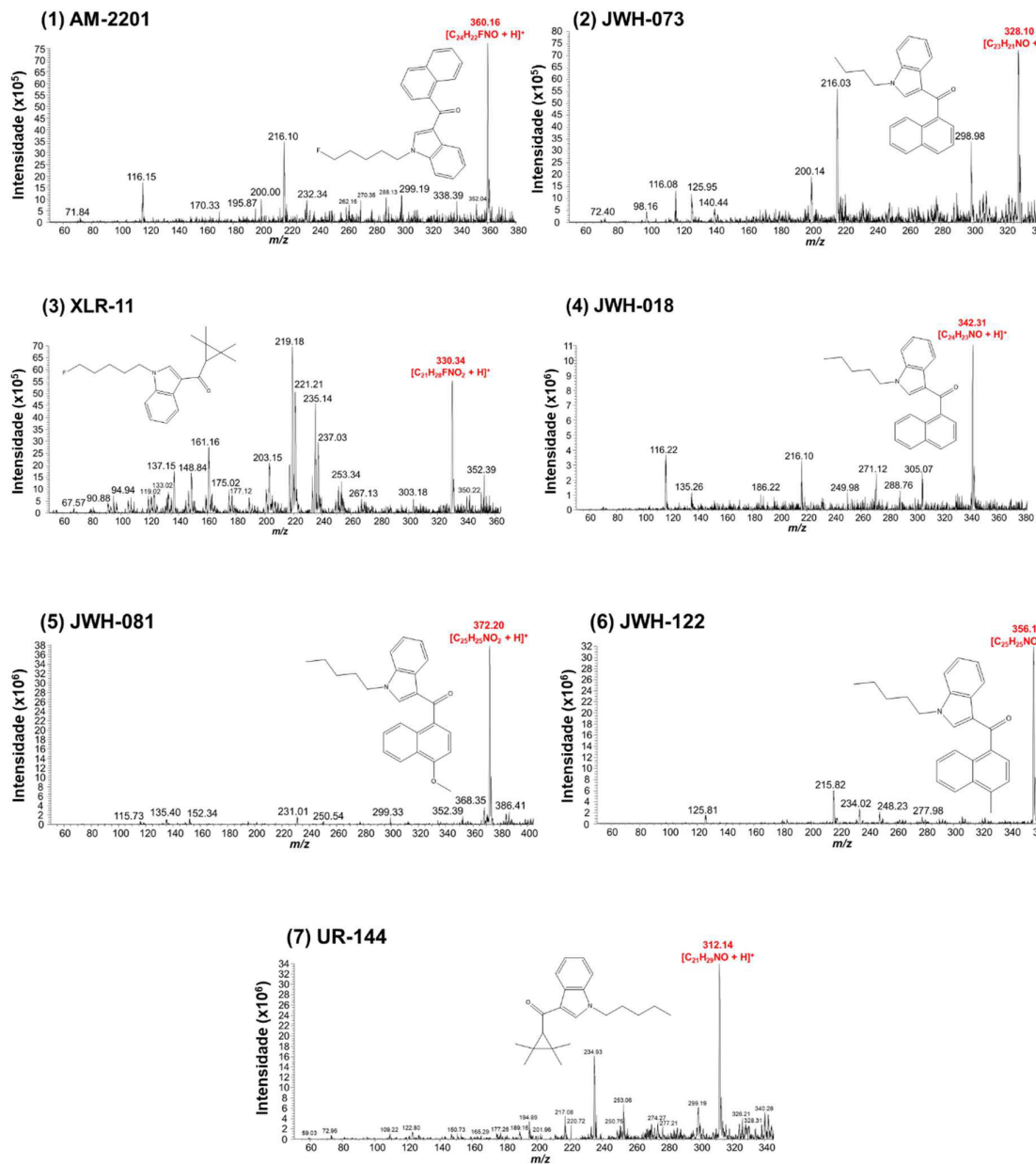


Figura 4.7 Análises de DART-MS para folha de Damiana enriquecida com os mais comuns canabinóides sintéticos encontrados em amostras de apreensão (reais tipo *spice*)

4.4.2 LC-MS

O software Agilent MassHunter Optimizer foi eficiente na identificação dos dois íons produtos mais comuns, que foram usados para as transições de quantificação (mais intenso) e qualificação, a energia de colisão e a tensão do fragmentador (**Tabela 4.3**). A eluição gradiente permitiu a separação dos 25 NPS em 10 minutos e nenhum pico interferente foi detectado no DMRM (**Figura 4.6**). O sistema DMRM aumentou a sensibilidade e a especificidade utilizando o tempo de retenção esperado de cada analito. Ao determinar o tempo de retenção, o método foi capaz de diferenciar entre compostos com fragmentos similares (como MMB-FUBINACA e FUB-PB-22). DMRM é um método muito útil para grupos grandes de analitos com similaridade na estrutura química, como este, e que exista a possibilidade de coeluição, uma vez que, íons produtos são identificados individualmente, sem interferências. É importante ressaltar que o pH da fase móvel foi estável entre 2,79 e 2,85. Nesta situação, percebe-se que as coeluições ocorreram em três regiões destacadas na **Figura 4.6**. Na região A (**Figura 4.6a**) o BZP possui maior interação com a fase móvel mais polar, em maior composição por água, por possuir maior interação de hidrogênio com a água. Em seguida, mCpP pelas mesmas justificativas anteriores, essa catinona sintética se encontra logo no início da região B (**Figura 4.6b**) juntamente com as outras catinonas sintéticas α -PVP, 3,4-MDPV e PV8. O último analito na região B é o AM2233, um canabinóide sintético com polaridade mais alta em relação ao grande grupo de canabinóides em virtude do grupo halogênico composto por oxigênio e iodo. Na região C (**Figura 4.6c**) estão os canabinóides sintéticos, que além de possuírem maiores massas moleculares, se diferenciam em polaridade pela presença dos halogênios.

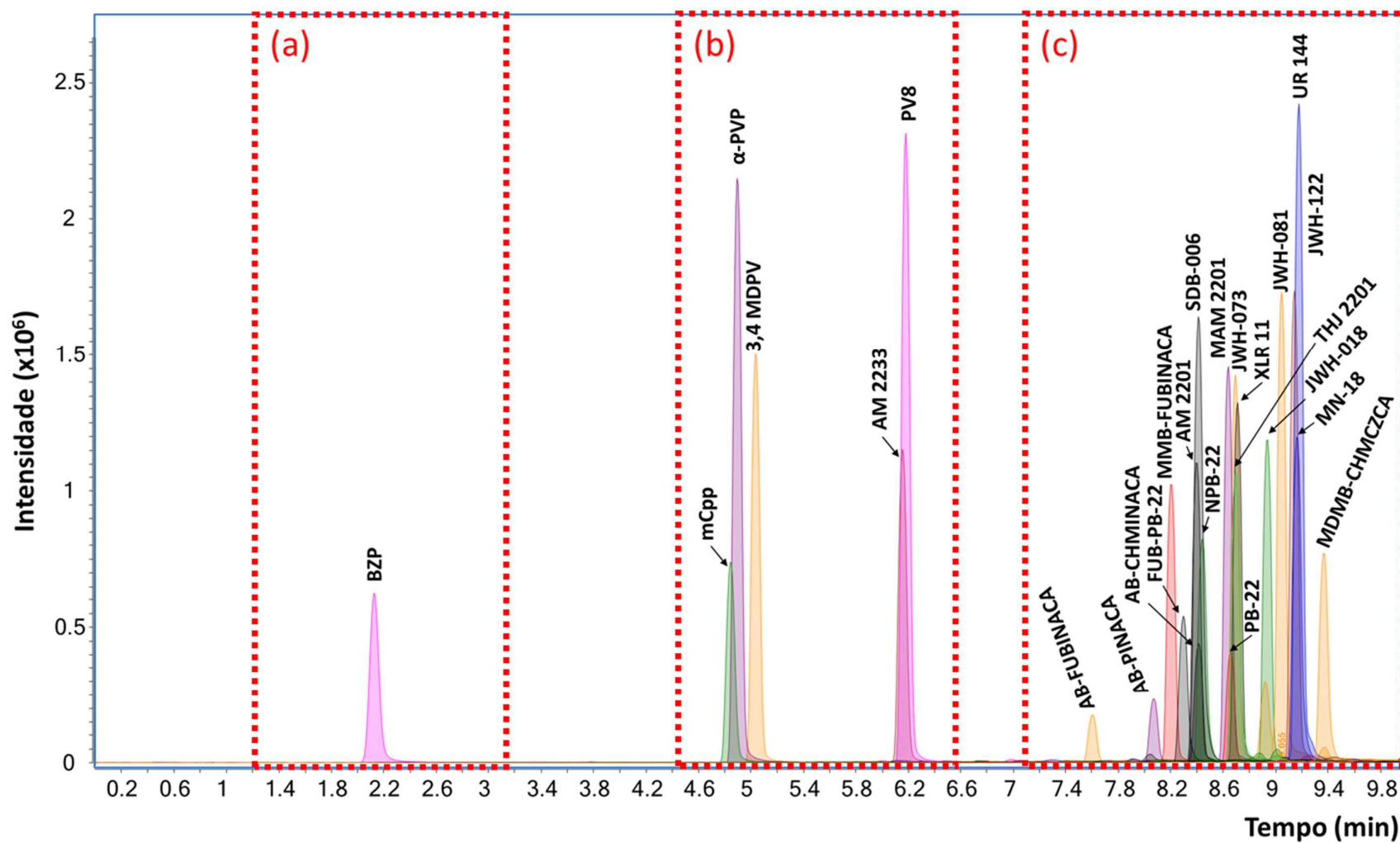


Figura 4.8 Cromatograma do Monitoramento Dinâmico de Reações Múltiplas (DMRM) das transições de quantificação para as 25 NPS apresentando aceitável separação.

No escopo de validar um método para quantificação de NPS em fluido oral, utilizou-se analitos deuterados, ISTD, para comparação de resposta com soluções padrão de trabalho (analitos) e, por conseguinte, averiguar supressão ou o aumento na ionização. Para isso, procurou-se utilizar pelo menos um ISTD por área destacada. Região A: BZP-d7 (**Figura 4.6a**), Região B: mCpp-d8, α -PVP-d8 e 3,4-MDPV-d8 (**Figura 4.6b**) e Região C: AB-FUBINACA-d4, AB-PINACA-d9, AM2201-d5, MAM2201-d5, JWH-073-d7, XLR11-d5 e JWH-018-d9 (**Figura 4.6c**).

O software Agilent MassHunter Quantitative Analysis foi usado para determinar linhas de regressão, bem como para verificar precisão, exatidão, área de resposta dos íons e tempo de retenção. A linearidade foi avaliada em treze concentrações calibrantes (0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL), com 7 curvas de calibração ($n = 7$) e o modo de calibração (ponderação de $1/x$) mostrou linearidade aceitável com $r^2 > 0,9962$ para todos os analitos (**Figura A6**). Em todos os dias de análise as amostras QC são analisadas em triplicatas e em três níveis de concentração (1ng/mL na baixa, 10 ng/mL na média e 100 ng/mL na alta). Foi preservado o critério de viés e precisão dentro de $\pm 20\%$ para todas as medidas utilizadas na validação. Os dados que apresentaram linearidade constam na faixa de medição analítica (faixa linear), na **Tabela 4.4**. Os valores de LLOQ e LLOD foram aceitáveis para todos os analitos. O LLOQ no mínimo de 0,15 ng/mL e o LLOD foi de 0,01 ng/mL para a maioria dos analitos. Um resumo desses valores pode ser encontrado na **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4 Dados de regressão, faixa dinâmica analítica e limite de detecção para analitos.

	Equação de regressão	Coefficiente de correlação (r^2)	FMA* (ng/mL)	LLOD** (ng/mL)
BZP	$y = 0,0149x + 0,0023$	0,9976	0,25-100	0,01
mCpp	$y = 0,0261x + 0,0015$	0,9982	0,15-100	0,01
α -PVP	$y = 0,0504x + 0,0042$	0,9962	0,15-100	0,01
3,4-MDPV	$y = 0,0285x + 0,0039$	0,9963	0,25-100	0,01
AM-2233	$y = 0,0318x + 0,0070$	0,9968	0,15-100	0,01
PV8	$y = 0,0283x + 0,0026$	0,9966	0,15-100	0,05
AB-FUBINACA	$y = 0,0178x + 0,0027$	0,9966	0,25-100	0,05
AB-PINACA	$y = 0,0154x + 0,0065$	0,9969	0,25-100	0,01
MMB-FUBINACA	$y = 0,0238x + 0,0062$	0,9963	0,50-100	0,01
FUB-PB-22	$y = 0,0554x + 0,0015$	0,9982	0,25-100	0,01
AM-2201	$y = 0,0225x + 0,0050$	0,9966	0,15-100	0,01
AB-CHMINACA	$y = 0,0135x + 0,0043$	0,9975	0,50-100	0,05
SDB-006	$y = 0,0111x + 0,0017$	0,9967	0,25-100	0,10
NPB-22	$y = 0,0121x + 0,0024$	0,9953	0,50-100	0,15
MAM-2201	$y = 0,0272x + 0,0050$	0,9969	0,25-100	0,01
PB-22	$y = 0,0368x + 0,0060$	0,9967	0,25-100	0,01
THJ2201	$y = 0,0122x + 0,0036$	0,9976	0,50-100	0,05
JWH-073	$y = 0,0149x + 0,0041$	0,9971	0,50-100	0,01
XLR-11	$y = 0,0180x + 0,0025$	0,9959	0,25-100	0,01
JWH-018	$y = 0,0228x + 0,0047$	0,9963	0,25-100	0,01
JWH-081	$y = 0,0175x + 0,0052$	0,9965	0,50-100	0,01
JWH-122	$y = 0,0176x + 0,0049$	0,9973	0,50-100	0,01
MN-18	$y = 0,0187x + 0,0056$	0,9979	0,50-100	0,01
UR-144	$y = 0,0091x + 6,2891E-05$	0,9962	0,15-100	0,10
MDMB-CHMCZCA	$y = 0,0097x + 0,0026$	0,9966	0,25-100	0,01

*Faixa de medição analítica (faixa linear) ** Limite baixo de detecção

As características ácidas e a polaridade dos analitos foram investigadas para iniciar um estudo do método de extração a partir da estrutura química dos analitos e, com artigos que utilizaram extrações na fase sólida com os mesmos analitos. Os compostos majoritários neste relatório são básicos ou neutros, por isso, o sorvente polimérico funcionalizado de fase reversa tem apresentado aumento na interação entre o sorvente/analito e melhorado a extração da amostra e a sua concentração. A troca catiônica é um processo seletivo aplicado para a extração de compostos básicos. Amostras eluídas contendo os analitos foram coletadas com solvente ácido, assim como Castro *et al.*¹¹⁶ recomendaram. Neste primeiro grupo de SPEs, a precipitação de proteína não foi aplicada. Muitos estudos mostraram a extração por SPE com o mesmo sorvente e analitos iguais ou semelhantes.^{96,105, 117-121}

Para a otimização da metodologia para SPE foram calculadas a precisão, exatidão e precisão intermediária na concentração de 100 ng/mL (QC Alto) e foram considerados viés e precisão de $\pm 20\%$. Esses resultados podem ser encontrados nas **Tabelas A2-A9**. Os resultados de recuperação foram plotados na **Figura 4.7**, o desvio padrão dos dados na **Figura 4.8** e os desvios padrão relativo dos experimentos E11 e E12, na **Figura 4.9**.

Neste primeiro grupo, o E1 apresentou melhores resultados para os canabinóides sintéticos com 16 bons resultados de recuperação (superiores a 60 %) e de desvio padrão relativo (do inglês, Relative Standard Deviation, RSD). Grupos mais básicos não apareceram na eluição ácida, como BZP e mCpP (**Figuras 4.7 e 4.8**). Com isto, o solvente 2-propanol: CH₂Cl: HAc (24,5:75:0,5 v/v/v) foi mantido no segundo grupo (E5, E6 e E7) por apresentar melhores resultados de recuperação e RSD.

A precipitação de proteína foi aplicada no segundo grupo (E5-E7) para diminuir a interação das proteínas com o sorvente e aumentar a eficiência de extração. A fração de lavagem foi analisada no primeiro grupo e não há presença de analitos, à vista disso, a fração de lavagem não foi mais analisada. A fração básica do E6 apresentou melhores recuperações e reprodutibilidade com as 5 catinonas sintéticas e boa recuperação com o PB-22 (23,3 % do RSD). O 1-butanol exibiu melhores resultados que o 2-propanol e os resultados não foram os mesmos no primeiro grupo (E1) sem a precipitação de proteínas. A fração ácida da E7 foi melhor com 9 bons resultados de recuperação e reprodutibilidade e 3 bons resultados de recuperação, contudo com má reprodutibilidade.

O grupo de teste 3 (experimentos E8, E9 e E10) foram verificadas quanto à diferença na precipitação de proteínas pelo metanol e o solvente tradicionalmente utilizado (acetonitrila) antes do método SPE. É importante ressaltar que foram utilizados solventes a baixas temperaturas para evitar a desnaturação pelo rompimento das interações do tipo ligação de hidrogênio que são relevantes para a configuração proteica. Antes da etapa de precipitação de proteínas, há interações entre a água (constituente do fluido oral) e as proteínas que impedem a separação eficiente entre as mesmas (solvatação). Para isso, utiliza-se um solvente orgânico de cadeia curta para atingir interações mais fortes com a água e, como resultado, interações proteína-proteína (precipitação de proteínas). Com isso, foi aplicado inicialmente o metanol por apresentar momento dipolar mais próximo do da água, logo, apresentaria maior interação com as moléculas de água. Além disso, a eficiência da aplicação da etapa de lavagem foi avaliada. Por fim, neste grupo o E9, com metanol e sem lavagem, apresentou melhores resultados neste grupo.

Problemas de reprodutibilidade foram encontrados ao aplicar diferentes eluições ácidas, nos experimentos E11 (2-propanol) e E12 (1-butanol). Desse modo, verificou-se que a precipitação de proteínas se tornou uma etapa experimental de baixa reprodutibilidade, pois a separação é realizada de forma visual, isto é, foram detectados erros randômicos ou aleatórios à análise. Além disso, quanto mais etapas de extrações são realizadas, mais possibilidades de perda de analitos são prováveis. Isto posto, a etapa de precipitação de proteínas foi dispensada e retornamos à acidificação da amostra de análise com ácido acético 0,1 M. Ao averiguar os resultados para o experimento E12 (**Tabela A7**), o solvente 1-Butanol: diclorometano: ácido acético apresentou melhores resultados para os canabinóides sintéticos com 12 bons resultados para recuperação e reprodutibilidade na fração ácida e 3 bons resultados de recuperação e reprodutibilidade em uma fração básica.

Até este momento, todos os experimentos tiveram coletas separadas das frações. Ainda no Grupo 4, os experimentos E11 e E12 foram repetidos com o agrupamento das frações ácida e básica antes da secagem e reconstituição com fase móvel. Os resultados com o agrupamento de eluições em um mesmo vial não exibiu bons resultados, diferentemente da eluição separada. O experimento E11 apresentou melhores resultados para as catinonas sintéticas e PB-22, assim como o E6 (fração básica). Ao verificar a **Figura 4.7**, constata-se melhores resultados de recuperação nos experimentos E11 e E12, entretanto, é de suma importância a repetibilidade, avaliada aqui pelos resultados de RSD. Dessa forma, ao considerar a **Figura 4.8**, pondera-se que este grupo com melhores resultados para recuperação, também apresentam resultados aceitáveis para desvio padrão relativo (< 20 %). Ao isolar resultados de RSD E11 e E12, **Figura 4.9**, constata-se que o E12 apresenta mais compostos com resultados aceitáveis e, por isso será investigada na validação.

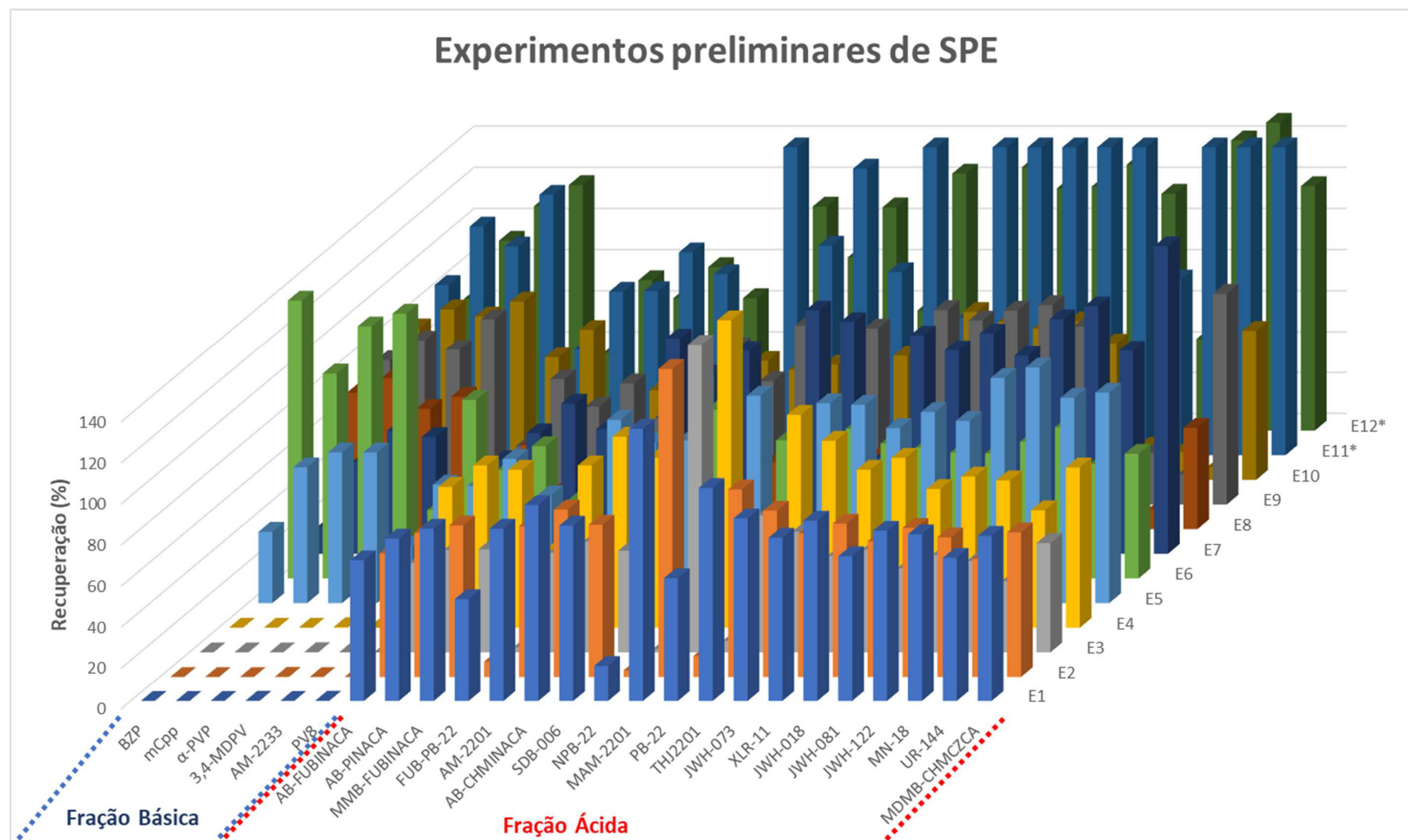


Figura 4.9 Gráfico com os resultados preliminares de recuperação com os experimentos E1-E12 para extração na fase sólida (SPE) para as 25 NPS.

* Para coleta em conjunto (fração ácida + básica) em uma única análise os dados não estão agrupados na Figura.

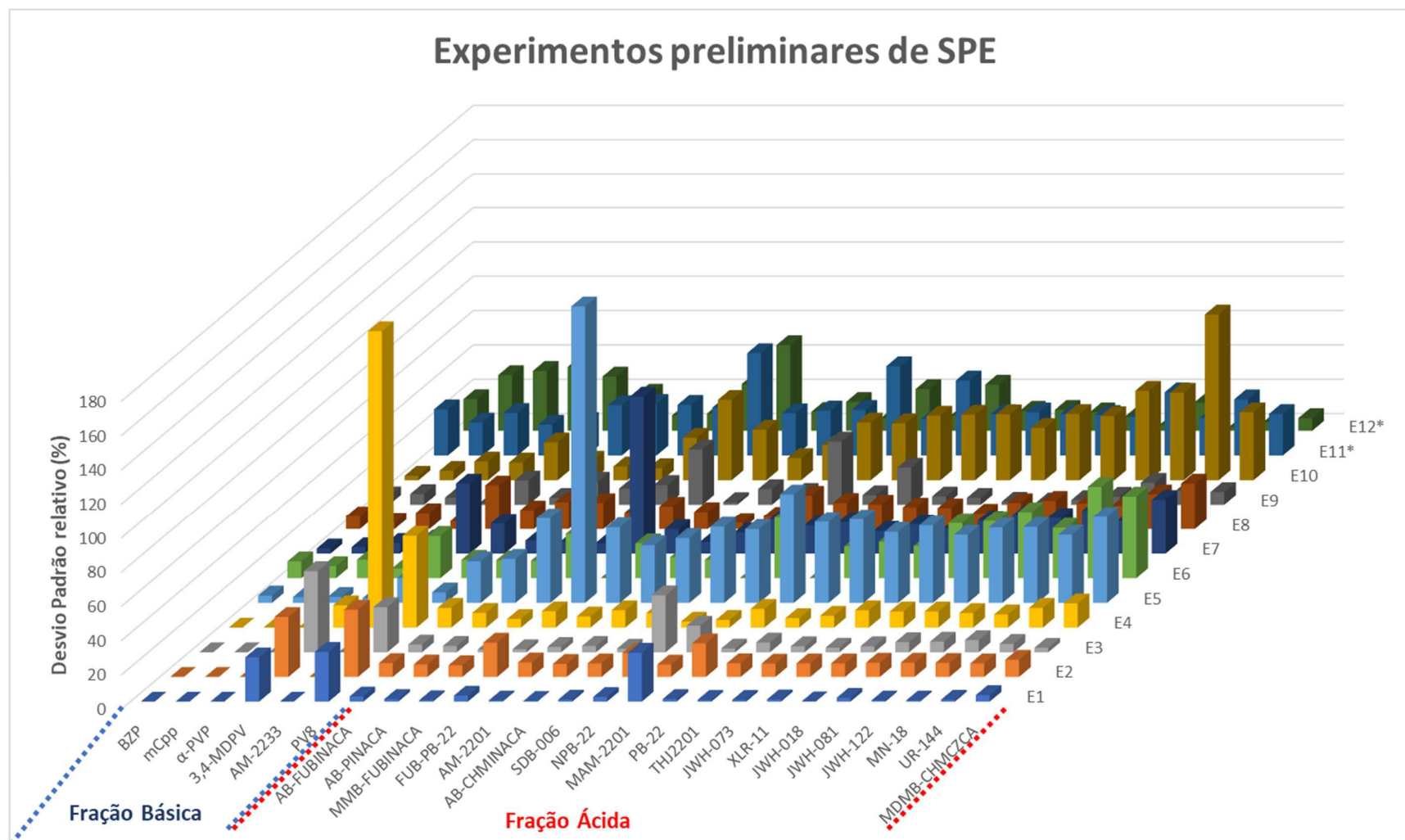


Figura 4.10 Gráfico com os resultados preliminares de desvio padrão relativo com os experimentos E1-E12 para extração na fase sólida (SPE) para as 25 NPS.

* Para coleta em conjunto (fração ácida + básica) em uma única análise os dados não estão agrupados na Figura.

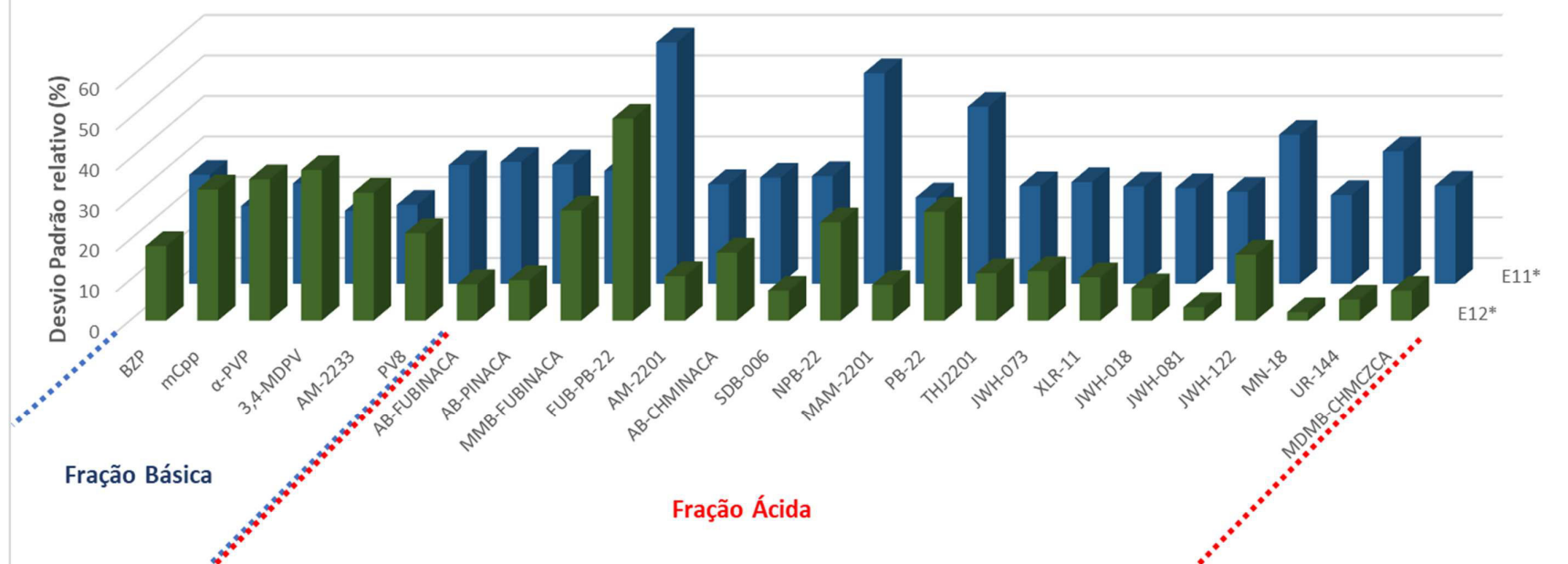


Figura 4.11 Gráfico com os resultados preliminares de desvio padrão relativo com os experimentos E11 e E12 para extração na fase sólida (SPE) para as 25 NPS.

* Para coleta em conjunto (fração ácida + básica) em uma única análise os dados não estão agrupados na Figura.

A precipitação de proteína não foi aplicada nos E13, E14 e E15 (**Tabela A9**) e esses experimentos foram avaliados com o objetivo de mensurar a extração em diferentes cartuchos de SPE (E13 e E14) para diferentes eluições, fração básica e fração ácida. Visto que, todos os experimentos foram sequenciados em primeira eluição ácida e segunda eluição básica. Além disso, as eluições básicas foram aplicadas sem e com acidificação, E14 e E15, respectivamente. No E15 foi aplicada a acidificação após a eluição e antes da evaporação, como em Swortwood *et al.*¹²² estudaram para catinonas e *designer drugs*, como as anfetaminas. A acidificação após a eluição básica funcionou melhor para BZP e mCpP, mas com o grupo vasto de analitos aplicado neste estudo, optou-se pelo experimento E14 por apresentar resultados satisfatórios e sem o acréscimo de mais uma etapa no procedimento experimental. O experimento E13 não apresentou resultados satisfatórios.

Os experimentos com SPE foram realizados com o intuito de desenvolver um procedimento analítico de extração com poucas etapas e, em comparação com a LLE, a SPE não apresenta muitas dificuldades no alcance de alta recuperação a um nível de confiança e reprodutibilidade alto. O processo de extração antes ao de separação por LC é crucial na concentração do analito e, conseqüentemente, na reprodutibilidade à níveis mais baixos de analito.¹²³

O cartucho de SPE utilizado é o Bond Elut Certify que tem o empacotamento sorvente C8 não polar e um forte trocador de cátions (do inglês, *Strong Cation eXchanger*, SCX). A fase modificada com funcionalidade iônica (troca iônica) permite que analitos de carga oposta à fase sejam retidos, e assim, separados. No grupo de NPS analisadas, os pKa variam de 6 a 10 e o Certify é mais comumente usado para extrair drogas básicas (catiônicas) da urina e do sangue, mas também é muito eficaz para a

extração de uma ampla gama de compostos a partir de um número diversificado de matrizes aquosas, como o fluido oral.

A fase estacionária com material SCX, contém sílica com grupos de ácido sulfônico alifático que são ligados à superfície. Como o grupo do ácido sulfônico é fortemente ácido ($pK_a < 1$), o mecanismo de retenção pela atração eletrostática na sílica com grupos básicos e neutros são favorecidos e, para que ocorra a separação dos analitos por troca iônica, é imprescindível a análise do pH na matriz (fluido oral) e o pH das soluções de eluição para que o analito mantenha-se na forma neutra e, se solubilize no solvente por meio de interações intermoleculares.¹²⁴ Não há presença de compostos semelhantes ao grupo funcional da fase estacionária.

O pK_a é indispensável para SPE com troca iônica e afeta diretamente a extração dos compostos de interesse, pois o pK_a pode ser definido como o pH no qual o analito é 50 % ionizado (equilíbrio). Com isso, os compostos são carregados com pH acima ou abaixo de seu valor de pK_a , compostos ácidos são carregados negativamente acima do seu pK_a e compostos básicos são carregados positivamente abaixo de seu pK_a .¹²³

O pH das soluções de condicionamento é considerado pois é nessa etapa que o grupo funcional ganha carga negativa (ativar a fase) para iniciar o processo de extração e para não permitir que o material seque e fissuras apareçam. O solvente utilizado foi de polaridade e pH similares, como o sorvente é composto por sílica, utilizou-se inicialmente o metanol e posteriormente o ácido acético por causa do grupo sulfônico. Quando o grupo funcional é neutralizado, ou utiliza-se um solvente com força iônica alta, ou ainda, o solvente promove o deslocamento do analito desorvido por meio de alguma espécie iônica, a força eletrostática entre o analito e o a fase estacionária é interrompida e o composto é eluído.¹²⁴

Para os compostos com a faixa de pKa em torno de 6, o solvente com 1-butanol (1-Butanol: diclorometano:ácido acético, 24,5:75:0,5) apresentou melhores resultados de recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade, isto porque seu pH foi de 4,2, 2 unidades de pH abaixo do pKa, enquanto com 2-propanol, o pH foi de 5,47. Para eluição básica, foi utilizada um solvente com caráter mais básico que a amostra para o interrompimento da força eletrostática com os compostos mais básicos do grupo, por isso o solvente de eluição com melhores resultados foi o com melhor interação com o grupo sulfônico, o metanol foi melhor em relação a acetonitrila, e com pH em torno de 11,3. A eluição básica realiza-se com uma solução a 2 unidades de pH acima do pKa do cátion (neutralizando o analito), ou pela adição de um cátion diferente que desloca o analito. ¹²⁴

Os resultados para a melhor SPE (E12, fração ácida: 1-Butanol:CH₂Cl₂:HAc (24.5:75:0.5 v/v/v e fração básica CH₃OH:NH₄OH (49:1 v/v)) encontram-se abaixo (**Tabela 4.5**). A eluição básica apresentou melhores resultados de recuperação para BZP, mCpP, a-PVP, 3,4 MDPV, AM-2233 e PV8, enquanto a eluição ácida foi eficiente para AB-FUBINACA, AB-PINACA e MMB-FUBINACA. O grupo com XLR-11, JWH-018, JWH-081, JWH-122, MN-18, UR-144 e MDMB-CHMINACA apresentou extração em ambas eluições (ácida e básica). É importante ressaltar que são aceitáveis valores de recuperação com RSD menores que 20 %. Os resultados para recuperação foram calculados com os grupos amostrais C e B, de acordo com a **Equação 5**.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C}{B} \right) \times 100 \quad (5)$$

Tabela 4.5 Dados de recuperação com desvio padrão e desvio padrão relativo para cada fração coletada.

	RECUPERAÇÃO											
	Fração ÁCIDA						Fração BÁSICA					
	1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc (24,5:75:0,5 v/v/v)						CH ₃ OH:NH ₄ OH (49:1 v/v)					
	Média (10 ng/mL)			Alta (100 ng/mL)			Média (10 ng/mL)			Alta (100 ng/mL)		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	11.9	3.3	27.9	3.6	2.0	56.1	74.3	5.8	7.8	67.7	4.0	5.9
MCP	13.0	2.7	20.8	3.3	3.4	104.8	91.2	3.7	4.0	84.8	5.6	6.6
α-PVP	13.5	3.0	22.5	3.7	3.3	90.8	108.8	3.8	3.5	99.2	4.8	4.8
3,4 MDPV	13.3	2.7	20.3	3.4	3.5	101.4	109.2	3.8	3.5	98.4	6.6	6.7
AM 2233	56.3	3.4	6.1	0.8	0.5	58.4	99.4	2.5	2.5	115.9	6.9	6.0
PV8	18.7	2.8	15.2	2.9	2.4	84.1	113.8	3.3	2.9	104.8	11.1	10.6
AB-FUBINACA	112.7	3.9	3.5	123.4	1.2	1.0	19.7	5.0	25.3	8.3	1.5	18.4
AB-PINACA	112.5	3.3	2.9	120.5	0.5	0.4	19.6	5.1	26.2	8.0	1.3	16.4
MMB-FUBINACA	135.8	7.3	5.4	81.2	3.1	3.8	25.9	2.0	7.7	17.2	1.8	10.4
FUB-PB-22	959.4	5.7	0.6	2.4	0.0	1.4	34.5	0.9	2.5	31.7	2.8	8.9
AM 2201	56.8	1.9	3.4	57.8	1.8	3.0	53.4	2.5	4.7	38.0	3.6	9.4
AB-CHMINACA	133.1	7.5	5.6	99.8	5.8	5.8	23.3	3.2	13.7	11.8	1.5	12.6
SDB-006	66.7	67.0	100.5	106.6	13.5	12.7	37.4	2.8	7.4	23.8	7.6	32.0
NPB-22	144.2	14.2	9.9	22.8	6.1	26.8	29.7	0.6	2.0	18.6	4.3	23.3
MAM 2201	50.6	1.2	2.3	41.9	3.1	7.3	56.9	2.7	4.8	42.1	4.4	10.5
PB-22	142.7	17.1	12.0	15.2	3.2	21.1	45.1	0.6	1.4	29.4	5.2	17.5
THJ2201	58.9	22.3	37.8	61.7	38.5	62.4	47.7	2.5	5.2	42.9	12.5	29.1
JWH-073	51.2	14.6	28.6	55.7	19.8	35.6	46.9	2.3	4.9	42.4	9.8	23.2
XLR-11	69.4	2.4	3.5	67.3	1.9	2.8	48.4	2.5	5.1	32.3	2.3	7.3
JWH-018	40.4	2.7	6.6	36.5	1.7	4.6	54.9	2.1	3.7	46.1	5.0	10.8
JWH-081	33.7	2.2	6.4	34.3	2.0	5.8	57.3	3.8	6.7	48.4	5.1	10.5
JWH-122	30.1	3.3	11.0	36.4	1.5	4.1	61.7	4.8	7.8	51.8	4.8	9.4
MN-18	33.2	4.5	13.4	36.1	2.8	7.9	60.5	3.7	6.2	49.0	6.3	12.8
UR 144	41.4	1.2	3.0	29.6	1.5	5.0	65.6	7.9	12.0	46.3	10.1	21.7
MDMB-CHMCZCA	36.4	1.9	5.1	32.5	2.3	7.2	59.3	8.2	13.8	48.2	8.5	17.7

¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Na **Tabela 4.6** estão agrupados os dados para efeito da matriz (fluido oral) e o cálculo foi com os grupos amostrais B e A, de acordo com a **Equação 6**.

$$\text{EFEITO DE MATRIZ (\%)} = \left(\frac{B}{A} \right) \times 100 \quad (6)$$

Como esperado, na eluição com solvente básico, BZP, mCpP, a-PVP, 3,4 MDPV, AM-2233 e PV8 o processo de eluição é mais eficiente. Neste grupo, observa-se a supressão iônica para todos os analitos, exceto para PV8 no nível médio de concentração (10 ng/mL), e a supressão iônica é alarmante ao AM2233. No grupo de analitos separados pela eluição ácida, há um maior número de analitos com supressão iônica pelo efeito de matriz.

Tabela 4.6 Dados de efeito de matriz para cada fração coletada.

	EFEITO DE MATRIZ (%)			
	Fração ÁCIDA		Fração BÁSICA	
	Média (10 ng/mL)	Alta (100 ng/mL)	Média (10 ng/mL)	Alta (100 ng/mL)
BZP	77.8	79.4	88.2	85.2
MCPP	80.6	77.9	84.2	82.2
α -PVP	84.5	77.9	90.0	85.4
3,4 MDPV	81.0	75.7	83.2	79.8
AM 2233	10.3	25.8	23.6	29.8
PV8	78.1	74.7	133.0	99.3
AB-FUBINACA	80.2	75.2	82.5	78.6
AB-PINACA	78.6	74.5	80.6	77.8
MMB-FUBINACA	65.7	70.1	61.1	67.4
FUB-PB-22	6.9	14.1	98.5	170.2
AM 2201	80.0	76.4	82.3	81.2
AB-CHMINACA	64.4	67.1	64.3	70.6
SDB-006	102.1	83.5	41.0	38.6
NPB-22	23.9	34.8	34.4	53.6
MAM 2201	69.4	74.8	83.5	82.7
PB-22	14.9	19.6	39.0	39.5
THJ2201	58.0	83.2	49.4	40.1
JWH-073	55.9	76.7	45.7	40.4
XLR-11	73.5	74.4	82.3	86.4
JWH-018	76.3	74.9	82.9	79.2
JWH-081	116.5	76.7	111.4	111.3
JWH-122	135.2	87.6	118.3	120.0
MN-18	84.2	79.0	81.8	81.9
UR 144	90.2	67.2	162.2	201.2
MDMB-CHMCZCA	124.2	67.2	105.8	132.3

¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Na **Tabela 4.7** estão os dados para eficiência do processo de extração estabelecido. A eficiência do processo foi calculada com os grupos amostrais C e A, conforme a **Equação 7**.

$$\text{EFICIÊNCIA DO PROCESSO (\%)} = \left(\frac{C}{A} \right) \times 100 \quad (7)$$

Na avaliação da eficiência do processo de extração, os resultados com desvio padrão relativo maior que 20 % foram excluídos da **Tabela 4.7**. Observa-se que somente PV8, no grupo da eluição básica, apresentou extração próxima a 100 % e no grupo de eluição ácida, somente o MMB-FUBINACA e FUB-PB-22.

Tabela 4.7 Dados de eficiência do processo para cada fração coletada.

	EFICIÊNCIA DO PROCESSO (%)			
	Fração ÁCIDA		Fração BÁSICA	
	Média (10 ng/mL)	Alta (100 ng/mL)	Média (10 ng/mL)	Alta (100 ng/mL)
BZP	-	-	44.6	42.3
MCPP	-	-	60.3	62.2
α-PVP	-	-	78.6	77.9
3,4 MDPV	-	-	73.0	72.6
AM 2233	-	-	16.7	19.9
PV8	-	-	117.6	87.9
AB-FUBINACA	83.1	77.2	-	-
AB-PINACA	80.2	74.0	-	-
MMB-FUBINACA	98.9	58.9	-	-
FUB-PB-22	108.7	-	-	-
AM 2201	44.6	35.2	32.1	28.9
AB-CHMINACA	88.1	67.7	-	-
SDB-006	-	68.8	-	-
NPB-22	-	-	-	-
MAM 2201	34.4	26.2	33.0	30.4
PB-22	19.4	-	-	-
THJ2201	-	26.9	-	-
JWH-073	-	24.2	-	-
XLR-11	51.2	40.7	26.8	25.5
JWH-018	29.0	22.4	33.7	30.9
JWH-081	-	28.1	38.9	37.2
JWH-122	-	32.2	44.9	47.9
MN-18	-	21.8	35.7	32.3
UR 144	-	-	47.4	51.8
MDMB-CHMCZCA	-	-	35.8	35.7

¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

4.5 CONCLUSÕES

A aplicação do método DART-MS foi eficiente para triagem rápida e detecção de NPS no fluido oral e em plantas. Além da análise rápida e da preparação simples da amostra, observa-se que o fluido oral é uma amostra de coleta rápida e não invasiva para o teste de drogas.

O método LC-MS foi capaz de gerar espectros MS/MS com linearidade e sensibilidade adequadas. O método foi totalmente validado na faixa de 0,15 a 100 ppb. Amostras QC foram utilizadas durante o processo de validação do método, e todos os analitos mostraram RSD abaixo de 20 %.

Embora o SPE tenha muitas vantagens, como praticidade e maior sensibilidade, a limitação do método foi a aplicação em um grupo com grande diferença de pH e a instabilidade na extração. Isto é, refere-se à preparação da amostra (aplicação da precipitação de proteínas ou não) e ao passo de dessorção do analito aprisionado no cartucho de SPE e ao uso de solventes. O método de extração aplicado apresentou boa reprodutibilidade e boa extração para a maioria dos analitos, então, o ensaio pode ser considerado quantitativo para estes compostos.

REFERÊNCIAS

- 1 BAHR, U.; DEPPE, A.; KARAS, M.; HILLENKAMP, F.; GIESSMANN, U. Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-matrix-assisted laser desorption/ionization. *Analytical Chemistry*, **64**, 2866-2869, 1992.
- 2 MONGE, M.E.; HARRIS, G.A.; DWIVEDI, P.; FERNÁNDEZ, F. M. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. *Chemical reviews*, **113**, 2269-2308, 2013.
- 3 TAKATS, Z.; WISEMAN, J.M.; COOKS, R.G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry*, **40**, 1261-1275, 2005.
- 4 NEMES, P.; VERTES, A. Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. *Analytical chemistry*, **79**, 8098-8106, 2007.
- 5 ROMÃO, W.; SABINO, B.D.; BUENO, M.I.M.S.; VAZ, B.G.; JÚNIOR, A.C.; MALDANER, A.O.; DE CASTRO, E.V.R.; LORDEIRO, R.A.; NASCENTES, C.C.; EBERLIN, M.N.; AUGUSTI, R. LSD and 9, 10-dihydro-LSD Analyses in Street Drug Blotter Samples via Easy Ambient Sonic-Spray Ionization MassSpectrometry (EASI-MS). *Journal of forensic sciences*, **57**, 1307-1312, 2012.
- 6 HUANG, G.; CHEN, H.; ZHANG, X.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Rapid screening of anabolic steroids in urine by reactive desorption electrospray ionization. *Analytical chemistry*, **79**, 8327-8332, 2007.
- 7 MANICKE, N.E.; YANG, Q.; WANG, H.; ORADU, S.; OUYANG, Z.; COOKS, R.G. Assessment of paper spray ionization for quantitation of pharmaceuticals in blood spots. *International Journal of Mass Spectrometry*, **300**, 123-129, 2011.

- 8 ZHENG, Y.; WANG, Q.; WANG, X.; CHEN, Y.; WANG, X.; ZHANG, X.; BAI, Z.; HAN, X.; ZHANG, Z. Development and Application of Zirconia Coated Paper Substrate for High Sensitivity Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. *Analytical Chemistry*, **88**, 7005-7013, 2016.
- 9 CARVALHO, T.C.; TOSATO, F.; SOUZA, L.M.; SANTOS, H.; MERLO, B.B.; ORTIZ, R.S.; RODRIGUES, R.R.T.; FILGUEIRAS, P.R.; FRANÇA, H.S.; AUGUSTI, R.; ROMÃO, W.; VAZ, B.G. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. *Forensic science international*, **262**, 56-65, 2016.
- 10 DAMON, D.E.; DAVIS, K.M.; MOREIRA, C.R.; CAPONE, P.; CRUTTENDEN, R.; BADU-TAWIAH, A.K. Direct biofluid analysis using hydrophobic paper spray mass spectrometry. *Analytical chemistry*, **88**, 1878-1884, 2016.
- 11 CARVALHO, T.C.; OLIVEIRA, I.F.; TOSE, L.V.; VANINI, G.; KILL, J.B.; NETO, A.C.; MACHADO, L.F.; AMBROSIO, J.C.L.; LACERDA JR, V.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray ionisation mass spectrometry (PSI-MS). *Analytical Methods*, **8**, 614-620, 2016.
- 12 WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. *Angewandte Chemie*, **122**, 889-892, 2010.
- 13 WANG, H.; MANICKE, N.E.; YANG, Q.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Direct analysis of biological tissue by paper spray mass spectrometry. *Analytical chemistry*, **83**, 1197-1201, 2011.
- 14 ZHANG, Z.; XU, W.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Silica coated paper substrate for paper-spray analysis of therapeutic drugs in dried blood spots. *Analytical chemistry*, **84**, 2, 931-938, 2012.

- 15 NARAYANAN, R.; SARKAR, D.; COOKS, R.G.; PRADEEP, T. Molecular ionization from carbon nanotube paper. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 5936-5940, 2014.
- 16 WANG, Q.; ZHENG, Y.; ZHANG, X.; HAN, X.; WANG, T.; ZHANG, Z. A silica coated paper substrate: development and its application in paper spray mass spectrometry for rapid analysis of pesticides in milk. *Analyst*, **140**, 8048-8056, 2015.
- 17 ZHENG, Y.; ZHANG, X.; YANG, H.; LIU, X.; ZHANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, Z. Facile preparation of paper substrates coated with different materials and their applications in paper spray mass spectrometry. *Analytical Methods*, **7**, 5381-5386, 2015.
- 18 HAN, F.; YANG, Y.; OUYANG, J.; NA, N. Direct analysis of in-gel proteins by carbon nanotubes-modified paper spray ambient mass spectrometry. *Analyst*, **140**, 710-715, 2015.
- 19 COLLETES, T.C.; GARCIA, P.T.; CAMPANHA, R.B.; ABDELNUR, P.V.; ROMAO, W.; COLTRO, W.K.T.; VAZ, B.G. A new insert sample approach to paper spray mass spectrometry: a paper substrate with paraffin barriers. *Analyst*, **141**, 1707-1713, 2016.
- 20 JI, J.; NIE, L.; LIAO, L.; DU, R.; LIU, B.; YANG, P. Ambient ionization based on mesoporous graphene coated paper for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B*, **1015**, 142-149, 2016.
- 21 SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E.J.; MACDIARMID, A.G.; CHIANG, C.K.; HEEGER, A.J. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **16**, 578-580, 1977.
- 22 DU, D.; YE, X.; CAI, J.; LIU, J.; ZHANG, A. Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline

- copolymer for amperometric detection of organophosphates. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 11, 2503-2508, 2010.
- 23 WILSON, J.; RADHAKRISHNAN, S.; SUMATHI, C.; DHARUMAN V. Polypyrrole–polyaniline–Au (PPy–PANI–Au) nano composite films for label-free electrochemical DNA sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **171**, 216-222, 2012.
- 24 XIA, J.I.; CHEN, L.; YANAGIDA, S. Application of polypyrrole as a counter electrode for a dye-sensitized solar cell. *Journal of Materials Chemistry*, **21**, 12, 4644-4649, 2011.
- 25 HAN, J.; XU, G.; DING, B.; PAN, J.; DOU, H.; MACFARLANE, D.R. Porous nitrogen-doped hollow carbon spheres derived from polyaniline for high performance supercapacitors. *Journal of Materials Chemistry A*, **2**, 15, 5352-5357, 2014.
- 26 MACDIARMID, A.G. Synthetic metals: a novel role for organic polymers. *Synthetic metals*, **125**, 1, 11-22, 2001.
- 27 NASCIMENTO, T.A.; DUTRA, F.V.A.; PIRES, B.C.; TARLEY, C.R.T.; MANO, V.; BORGES, K.B. Preparation and characterization of a composite based on polyaniline, polypyrrole and cigarette filters: adsorption studies and kinetics of phenylbutazone in aqueous media. *RSC Advances*, **6**, 69, 64450-64459, 2016.
- 28 MO, Z.L.; ZHAO, Z.L.; CHEN, H.; NIU, G.P.; SHI, H.F. Heterogeneous preparation of cellulose–polyaniline conductive composites with cellulose activated by acids and its electrical properties. *Carbohydrate Polymers*, **75**, 4, 660-664, 2009.
- 29 KUHN, H.H.; CHILD, A.D.; KIMBRELL, W.C. Toward real applications of conductive polymers. *Synthetic Metals*, **71**, 1-3, 2139-2142, 1995.

- 30 CALLISTER JR., W. D.; **Materials Science and Engineering:** An Introduction. 4a Ed. New York: Editora John Wiley & Sons, 1997.
- 31 FEAST, W.J.; TSIBOUKLIS, J.; POWWER, K.L.; GROENENDAAL, L.; MEIJER, E.W. Synthesis, processing and material properties of conjugated polymers. *Polymer*, **37**, 22, 5017-5047, 1996.
- 32 WALLACE, G.G.; SPINKS, G.M.; TEASDALE, P.R. **Conductive Electroactive Polymers:** Intelligent Materials Systems. 3^a Ed. New York: CRC press, 2008.
- 33 BIDAN, G. Electrochemical Preparation of Electroconductive Polymers. In: Materials Science Forum. *Trans Tech Publications*, **21**, 21-30, 1987.
- 34 HUANG, B.; KANG, G.; NI, Y. Electrically Conductive Fibre Composites Prepared from Polypyrrole-Engineered Pulp Fibres. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **83**, 896-903, 2005.
- 35 KELLY, F.M.; JOHNSTON, J.H.; BORRMANN, T.; RICHARDSON, M.J. Functionalised hybrid materials of conducting polymers with individual fibres of cellulose. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2007**, 35, 5571-5577, 2007.
- 36 YOUSSEF, A.M.; KAMEL, S.; EL-SAKHAWY, M.; EL SAMAHY, M.A. Structural and electrical properties of paper–polyaniline composite. *Carbohydrate polymers*, **90**, 1003-1007, 2012.
- 37 RAGHUNATHAN, S.P.; NARAYANAN, S.; POULOSE, A.C.; JOSEPH, R. Flexible regenerated cellulose/polypyrrole composite films with enhanced dielectric properties. *Carbohydrate Polymers*, **157**, 1024-1032, 2017.
- 38 RAMAPRASAD, A.T.; LATHA, D.; RAO, V. Synthesis and characterization of polypyrrole grafted chitin. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **104**, 169-174, 2017.

- 39 SKOTHEIM, T.A.; REYNOLDS, J.R. **Conjugated Polymers** Theory, Synthesis, Properties and Characterization. Handbook of Conjugated Polymers, 3^a Ed. New York: CRC press, 2006.
- 40 ZHONG, W. DENG, J.; WANG, Y.; YANG, W. Oxidative graft polymerization of aniline on the modified surface of polypropylene films. *Journal of Applied Polymer Science*, **103**, 2442-2450, 2007.
- 41 MALMONGE, L.F.; MATTOSO, L.H.C. Electroactive blends of poly (vinylidene fluoride) and polyaniline derivatives. *Polymer*, **36**, 245-249, 1995.
- 42 CHEN, J.D.; ZHU, D.Q.; GUILLET, J.; CARROT, C. Synthesis of conductive polyaniline via oxidation by MnO₂. *Chinese Journal of Polymer Science*, **22**, 269-277, 2004.
- 43 BHADRA, S.; KHAISTGIR, D.; SINGHA, N.K.; LEE, J.H. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in polymer science*, **34**, 783-810, 2009.
- 44 JASIM, A.; ULLAH, M. W.; SHI, Z.; LIN, X.; YANG, G. Fabrication of bacterial cellulose/polyaniline/single-walled carbon nanotubes membrane for potential application as biosensor. *Carbohydrate Polymers*, **163**, 62-69, 2017.
- 45 GAZOTTI, W.A. JR.; FAEZ, R.; DE PAOLI, M.A. Thermal and mechanical behaviour of a conductive elastomeric blend based on a soluble polyaniline derivative. *European Polymer Journal*, **35**, 35-40, 1999.
- 46 PEREIRA, E.C; CORREA, A.A; BULHÕES, L.O.S; ALEIXO, P.C; NÓBREGA, J.A; DE OLIVEIRA, A.J.A; ORTIZ, W.A; WALMSLEY L. Polaronic ferromagnetism in conducting polymers. *Journal of magnetism and magnetic materials*, **226**, 2023-2025, 2001.
- 47 UNODC, World Drug Report 2018, (United Nations publication, Sales No. E.18.XI.9). United Nations Office of Drugs and Crime (UNODC).

- 48 MARINO, M. A.; VOYER, B.; CODY, R. B.; DANE, A. J.; VELTRI, M.; HUANG, L. Rapid identification of synthetic cannabinoids in herbal incenses with DART-MS and NMR. *Journal of forensic sciences*, **61**, S82-S91, 2016.
- 49 ALVES, A.O.; SPANIOL, B.; LINDEN, R. Canabinoides sintéticos: drogas de abuso emergentes. *Rev. Psiquiatr. Clín*, **39**, 4, 142-148, 2012.
- 50 COULTER, C.; GARNIER, M.; MOORE, C. Synthetic cannabinoids in oral fluid. *Journal of analytical toxicology*, **35**, 7, 424-430, 2011.
- 51 MONTESANO, C.; SIMEONI, M. C.; CURINI, R.; SERGI, M.; STERZO, C. L.; COMPAGNONE, D. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **407**, 13, 3647-3658, 2015.
- 52 BOTELHO, É. D.; CUNHA, R. B.; CAMPOS, A. F. C.; MALDANER, A. O. Chemical profiling of cocaine seized by Brazilian federal police in 2009-2012: Major components. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 611–618, 2014.
- 53 PAWLIK, E.; MAHLER, H.; HARTUNG, B.; PLÄSSER, G.; DALDRUP, T. Drug-related death: Adulterants from cocaine preparations in lung tissue and blood. *Forensic Sci. Int.* **249**, 294–303, 2015.
- 54 UNODC, World Drug Report 2016, (United Nations publication, Sales No. E.16.XI.7).
- 55 UNODC, World Drug Report 2015 (United Nations publication, Sales No. E.15.XI.6).
- 56 ROMÃO, W.; SCHWAB, N. V.; BUENO, M. I.; SPARRAPAN, R.; EBERLIN, M. N.; MARTINY, A.; SABINO, B. D.; MALDANER, A. O. Forensic chemistry: perspective of new analytical methods applied to documentoscopy, ballistic and drugs of abuse. *Quim. Nova*, **34**, 1717-1728, 2011.
- 57 SOUZA, L. M.; RODRIGUES, R. R. T.; SANTOS, H.; COSTA, H. B.; MERLO, B. B.; FILGUEIRAS, P. R.; POPPI, R. J.; VAZ, B. G.; ROMÃO, W. A survey of

- adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC–MS allied to chemometric tools. *Sci. Justice*, **56**, 73–79, 2016.
- 58 EVRARD, I.; LEGLEYE, S.; CADET-TAIROU, A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *Int. J. of Drug Policy*, **21**, 399–406, 2010.
- 59 CONCEIÇÃO, V. N.; SOUZA, L. M.; MERLO, B. B.; FILGUEIRAS, P. R.; POPPI, R. J.; ROMÃO, W. Study of Scott test using spectroscopic techniques: an alternative method for detecting cocaine hydrochloride and its adulterants in street drugs. *Quim. Nova*, **37**, 1538-1544, 2014.
- 60 TSUMURA, Y.; MITOME, T.; KIMOTO, S. False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision. *Forensic Sci. Int.*, **155**, 158–164, 2005.
- 61 TOSATO, F.; ROSA, T. R.; MORAIS, C. L. M.; MALDANER, A. O.; ORTIZ, R. S.; FILGUEIRAS, P. R.; LIMA, K. M. G.; ROMÃO W. Direct quantitative analysis of cocaine by thin layer chromatography plus a mobile phone and multivariate calibration: a cost-effective and rapid method. *Anal. Methods*, **8**, 7632-7637, 2016.
- 62 MAL, D.; BISWAS, G. Detection of organosulphur compounds on thin layers using Dragendorff's reagent. *J. Chromatogr. A*, **387**, 556-558, 1987.
- 63 JIA, Z.; TIAN, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. *Desalination*, **247**, 423-429, 2009.
- 64 TYIHAK, E.; VAGUJFALVI, D. Dragendorff reactions for visualization of amino acids and amino acid derivatives separated by paper or thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, **49**, 343-348, 1970.
- 65 UNODC, World Drug Report 2006, (United Nations publication, Sales No. E.06.XI.1).

- 66 OLIVEIRA, B. G.; COSTA, H. B.; VENTURA, J. A.; KONDRATYUK, T. P.; BARROSO, M. E. S.; CORREIA, R. M.; PIMENTEL, E. F.; PINTO, F. E.; ENDRINGER, D. C.; ROMÃO, W. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chem.*, **204**, 37-45, 2016.
- 67 MALDANER, A. O.; BOTELHO, E. D.; ZACCA, J. J.; MELO, R. C. A.; COSTA, J. L.; ZANCANARO, I.; OLIVEIRA, C. S. L.; KASAKOFFF, L. B.; PAIXÃO, T. R. L. C. Chemical profiling of street cocaine from different Brazilian regions. *J. Braz. Chem. Soc.*, **27**, 4, 719-726, 2016.
- 68 de OLIVEIRA SILVEIRA, G.; BELITSKY, Í. T.; LODDI, S.; de OLIVEIRA, C. D. R.; ZUCOLOTO, A. D.; FRUCHTENGARTEN, L. V. G.; YONAMINE, M. Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, **265**, 22-28, 2016.
- 69 CHERICONI, S.; STEFANELLI, F.; DA VALLE, Y.; GIUSIANI, M.A Direct aqueous derivatization gsms method for determining benzoylecgonine concentrations in human urine. *Forensic Sci.*, **60**, 5, 1355-1359, 2015.
- 70 GUNNAR, T.; MYKKÄNEN, S.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P. Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. *J. Chromatogr. B*, **806**, 205-219, 2004.
- 71 LI, X.; SHEN, B.; JIANG, Z.; HUANG, Y.; ZHUO, X. Rapid screening of drugs of abuse in human urine by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1302**, 95-104, 2013.
- 72 HESS, C.; RITKE, N.; BROECKER, S.; MADEA, B.; MUSSHOF, F. Metabolism of levamisole and kinetics of levamisole and aminorex in urine by

- means of LC-QTOF-HRMS and LC-QqQ-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 4077-4088, 2013.
- 73 GAMA, L. A.; MERLO, B. B.; LACERDA JR, V.; ROMÃO, W.; NETO, A. C. No-deuterium proton NMR (No-D NMR): A simple, fast and powerful method for analyses of illegal drugs. *Microchem. J.*, **118**, 12-18, 2015.
- 74 ATILA, A.; KADIOGLU, Y. Determination of prilocaine HCl in bulk drug and pharmaceutical formulation by GC-NPD method. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, **19**, 313-319, 2013.
- 75 MOHAMMAD M.A.A. LC determination of lidocaine and prilocaine containing potential risky impurities and application to pharmaceuticals. *Chromatographia*, **70**, 563-568, 2009.
- 76 YOUNGVISES, N.; LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, S. Simultaneous micellar LC determination of lidocaine and tolperisone. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 629-638, 2003.
- 77 MALDANER, A. O.; BOTELHO, É. D.; ZACCA, J. J.; CAMARGO, M. A.; BRAGA, J. W.; GROBÉRIO, T. S. Brazilian federal district cocaine chemical profiling-mass balance approach and new adulterant routinely quantified (aminopyrine). *J. Braz. Chem. Soc.*, **26**, 1227-1231, 2015.
- 78 MAGALHÃES, E. J.; NASCENTES, C. C.; PEREIRA, L. S. A.; GUEDES, M. L. O.; LORDEIRO, R. A.; AULER, L. M. L. A.; AUGUSTI, R.; Queiroz, M. E. L. R. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. *Sci. Justice*, **53**, 425-432, 2013.
- 79 da SILVA, M. J.; dos ANJOS, E. V.; HONORATO, R. S.; PIMENTEL, M. F.; PAIM, A. P. S. Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, **629**, 98-103, 2008.

- 80 ESPY, R.D.; TEUNISSEN, S.F.; MANICKE, N.E.; REN, Y.; OUYANG, Z.; VAN ASTEN, A.; COOKS, R.G. Paper spray and extraction spray mass spectrometry for the direct and simultaneous quantification of eight drugs of abuse in whole blood. *Analytical chemistry*, **86**, 7712-7718, 2014.
- 81 MA, Q.; BAI, H.; LI, W.; WANG, C.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Rapid analysis of synthetic cannabinoids using a miniature mass spectrometer with ambient ionization capability. *Talanta*, **142**, 190-196, 2015.
- 82 United Nations. Single Convention on Narcotic Drugs. (1961). As amended by the 1972 Protocol Amending the Single Convention on Narcotic Drugs.
- 83 United Nations. International Narcotics Control Board. (1971). Convention on Psychotropic Substances.
- 84 UNODC, World Drug Report 2014, (United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7).
- 85 KILL J.B.; OLIVEIRAA, I. F.; TOSE, L.V.; COSTA, H.B.; KUSTER, R.M.; MACHADO, L.F.; CORREIA, R.M.; RODRIGUES, R.R.T.; VASCONCELLOS, G.A.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. Chemical characterization of synthetic cannabinoids by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **266**, 474–487, 2017.
- 86 CARY, P. Spice, K2 and the problem of synthetic cannabinoids. *National Drug Court Institute*, **6**, 1-4, 2010.
- 87 UCHIYAMA, N.; KIKURA-HANAJIRI, R.; KAWAHARA, N.; HAISHIMA, Y.; GODA, Y. Identification of a Cannabinoid Analog as a New Type of Designer Drug in a Herbal Product. *Chem. Pharm.* **57**, 439-441, 2009.
- 88 CASTANETO, M. S.; GORELICK, D. A.; DESROSIERS, N. A.; HARTMAN, R. L.; PIRARD, S.; HUESTIS, M. A. Synthetic cannabinoids: Epidemiology,

- pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug Alcohol Depen*, **144**, 12-41, 2014.
- 89 European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Synthetic cannabinoids in Europe - update 2017. *Perspect. Drugs* 9 (2017). doi:10.2810/32306
 - 90 PERTWEE, R. G.; HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E.; ALEXANDER, S. P. H.; DI MARZO, V.; ELPHICK, M. R.; GREASLEY, P. J.; HANSEN, H. S.; KUNOS, G.; MACKIE, K.; MECHOULAM, R.; ROSS, R. A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacological reviews*, **62**, 588–631, 2010.
 - 91 WEST, A. L.; HOQUE, N.; GRIEP, M. H. Extraction Efficacy of Synthetic Cannabinoids From Damiana Leaf Substrates Utilizing Electrolytic Solvents. *Army research lab aberdeen proving ground md weapons and materials research directorate*, 2014.
 - 92 AUNG, M.M.; GRIFFIN, G.; HUFFMAN, J.W.; WU, M.J.; KEEL, C.; YANG, B.; SHOWALTER, V.M.; ABOOD, M.E.; MARTIN, B.R. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB1 and CB2 receptor binding. *Drug Alcohol Depend.* **60**, 133–140, 2000.
 - 93 HUFFMAN, J. W.; ZENGIN, G.; WU, M. J.; LU, J.; HYND, G.; BUSHELL, K.; THOMPSON, A.L.S.; BUSHELL, S.; TARTAL C.; HURST, D.P.; REGGIO, P.H.; SELLEY, D.E.; CASSIDY, M.P.; WILEY, J.L.; MARTIN, B.R. Structure–activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl) indoles at the cannabinoid CB 1 and CB 2 receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB 2 receptor agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **13**, 1, 89-112, 2005.
 - 94 KARILA, L.; MEGARBANE, B.; COTTENCIN, O.; LEJOYEUX, M. Synthetic cathinones: a new public health problem. *Current neuropharmacology*, **13**, 1, 12-20, 2015.

- 95 HELANDER, A.; BECK, O.; HÄGERKVIST, R.; HULTÉN, P. Identification of novel psychoactive drug use in Sweden based on laboratory analysis—initial experiences from the STRIDA project. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, **73**, 5, 400-406, 2013.
- 96 BASSINDALE, T. A.; BEREZOWSKI, R. Quantitative analysis of hair samples for 1-benzylpiperazine (BZP) using high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **401**, 6, 2013-2017, 2011.
- 97 COPPOLA, M.; MONDOLA, R. Synthetic cathinones: chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food”. *Toxicology letters*, **211**, 2, 144-149, 2012.
- 98 LUTZ, O. M.; BONN, G. K.; RODE, B. M.; HUCK, C. W. Reproducible quantification of ethanol in gasoline via a customized mobile near-infrared spectrometer. *Analytica chimica acta*, **826**, 61-68, 2014.
- 99 NAMERA, A.; KAWAMURA, M.; NAKAMOTO, A.; SAITO, T.; NAGAO, M. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicol.* **33**, 175–194, 2015.
- 100 CIOLINO, L. A. Quantitation of Synthetic Cannabinoids in Plant Materials Using High Performance Liquid Chromatography with UV Detection (Validated Method). *J. Forensic Sci.* **60**, 1171–1181 (2015).
- 101 GOLDBERGER, B. A.; POLETTINI, A. Forensic toxicology: web resources. *Toxicology*, **173**, 1-2, 97-102, 2002.
- 102 LANGMAN, L. J.; KAPUR, B. M. Toxicology: then and now. *Clinical biochemistry*, **39**, 5, 498-510, 2006.
- 103 COOPER, G.; NEGRUSZ, A. **Clarke's analytical forensic toxicology**. Pharmaceutical Press, 2013.

- 104 LEVINE, B. **Principles of forensic toxicology**. Amer. Assoc. for Clinical Chemistry, 2003.
- 105 AMARATUNGA, P.; THOMAS, C.; LEMBERG, B. L.; LEMBERG, D. Quantitative measurement of XLR11 and UR-144 in oral fluid by LC–MS-MS. *Journal of analytical toxicology*, **38**, 6, 315-321, 2014.
- 106 DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION, D.O.J., Government of United States of America. 4-Methylmethcathinone in Oregon, *Microgram Bull.*, **42**, 62, 2009.
- 107 MOORE, K. N.; GARVIN, D.; THOMAS, B. F.; GRABENAUER, M. Identification of Eight Synthetic Cannabinoids, Including 5F-AKB48 in Seized Herbal Products Using DART-TOF-MS and LC-QTOF-MS as Nontargeted Screening Methods. *Journal of forensic sciences*, **62**, 5, 151–1158, 2017.
- 108 HABALA, L.; VALENTOVÁ, J.; PECHOVÁ, I.; FUKNOVÁ, M.; DEVÍNSKY, F. DART – LTQ ORBITRAP as an expedient tool for the identification of synthetic cannabinoids. *Leg. Med.* **20**, 27–31, 2016.
- 109 LIAN, R.; WU, Z.; LV, X.; RAO, Y.; LI, H.; LI, J.; WANG, R.; NI, C.; ZHANG, Y. Rapid screening of abused drugs by direct analysis in real time (DART) coupled to time-of- flight mass spectrometry (TOF-MS) combined with ion mobility spectrometry (IMS). *Forensic Sci. Int.* **279**, 268–280, 2017.
- 110 STEINER, R. Versatile and powerful tool for forensic drug screening. JEOL, *Interview reprint*. **04**
- 111 SAVCHUK, S.; APPOLONOVA, S; PECHNIKOV, A. In vivo metabolism of the new synthetic cannabinoid APINAC in rats by GC – MS and LC – QTOF-MS. *Forensic Toxicol.* **35**, 359–368, 2017.
- 112 KAVANAGH, P.; GRIGORYEV, A. Detection of metabolites of two synthetic cannabimimetics , MDMB-FUBINACA and ADB-FUBINACA , in authentic

- human urine specimens by accurate mass LC – MS : a comparison of intersecting metabolic patterns. *Forensic Toxicol.* **35**, 284–300, 2017.
- 113 RODRIGUES, W. C.; CATBAGAN, P.; RANA, S.; WANG, G.; MOORE, C. Detection of synthetic cannabinoids in oral fluid using ELISA and LC–MS-MS. *Journal of analytical toxicology*, **37**, 8, 526-533, 2013.
- 114 STANDARD, A. S. B. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. ASB Standard 036, First Edition Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2017.
- 115 MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC– MS/MS. *Analytical chemistry*, **75**, 13, 3019-3030, 2003.
- 116 de CASTRO, A.; PIÑEIRO, B.; LENDOIRO, E.; CRUZ, A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M. Quantification of selected synthetic cannabinoids and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1295**, 99-106, 2013.
- 117 SUNDSTRÖM, M.; PELANDER, A.; ANGERER, V.; HUTTER, M.; KNEISEL, S.; OJANPERÄ, I. A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **405**, 26, 8463-8474, 2013.
- 118 DRUMMER, O. **Guidelines for Testing Drugs Under International Control in Hair**. Sweat and Saliva, United Nations International Drug Control Programme, New York, 1998.
- 119 SWORTWOOD, M. J.; ELLEFSEN, K. N.; WOHLFARTH, A.; DIAO, X.; CONCEIRO-GUISAN, M.; KRONSTRAND, R.; HUESTIS, M. A. First metabolic profile of PV8, a novel synthetic cathinone, in human hepatocytes

- and urine by high-resolution mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **408**, 18, 4845-4856, 2016.
- 120 SUNDSTRÖM, M.; PELANDER, A.; OJANPERÄ, I. Comparison of post-targeted and pre-targeted urine drug screening by UHPLC–HR-QTOFMS. *Journal of analytical toxicology*, **41**, 7, 623-630, 2017.
- 121 KNEISEL, S.; SPECK, M.; MOOSMANN, B.; CORNEILLIE, T. M.; BUTLIN, N. G.; AUWÄRTER, V. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **405**, 14, 4691-4706, 2013.
- 122 SWORTWOOD, M. J.; BOLAND, D. M.; DECAPRIO, A. P. Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 1383–1397, 2013.
- 123 TELEPCHAK, Michael J.; CHANEY, Glynn; AUGUST, Thomas F. **Forensic and clinical applications of solid phase extraction**. Totowa, NJ:: Humana Press, 2004.
- 124 SIGMA-ALDRICH, S. **Guide to Solid Phase Extraction-bulletin 910**. Bull, v. 910, 1998.

APÊNDICES

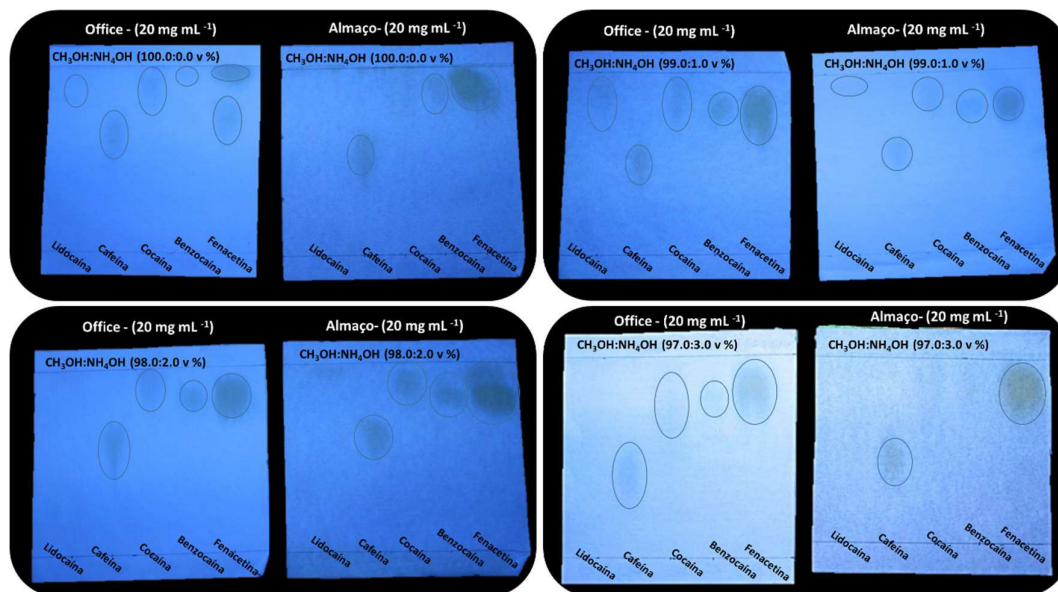


Figura A1 Cromatografia em papel *office* e papel *almoço* usando eluição com CH₃OH:NH₄OH 100.0:0.0; 99.0:1.0; 98.0:2.0 or 97.0:3.0 v% e revelação com câmera com luz ultravioleta (UV) no comprimento de 254 nm.

Estas figuras correspondem à cromatografia em papel no sistema 99.5:0.5 CH₃OH:NH₄OH, v% com o papel Canson (**Figura A2**) e Almaço (**Figura A3**).

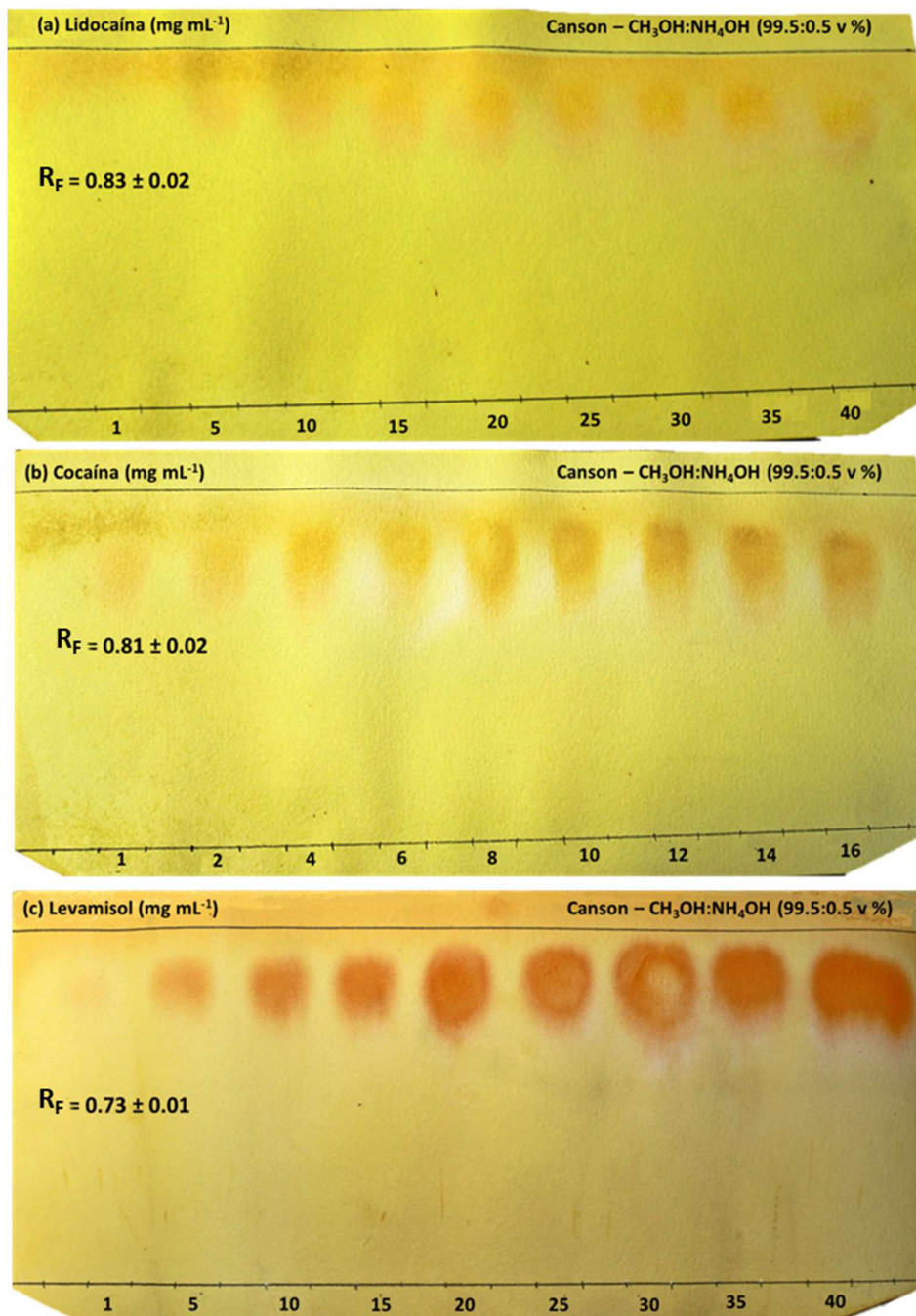


Figura A2 Cromatografia em papel do tipo Canson com variação de concentração dos padrões de: (a) Lidocaína (1 a 40 mg/mL), (b) Cocaína (0,5 a 16 mg/mL) e (c) Levamisol (1 a 40 mg/mL)

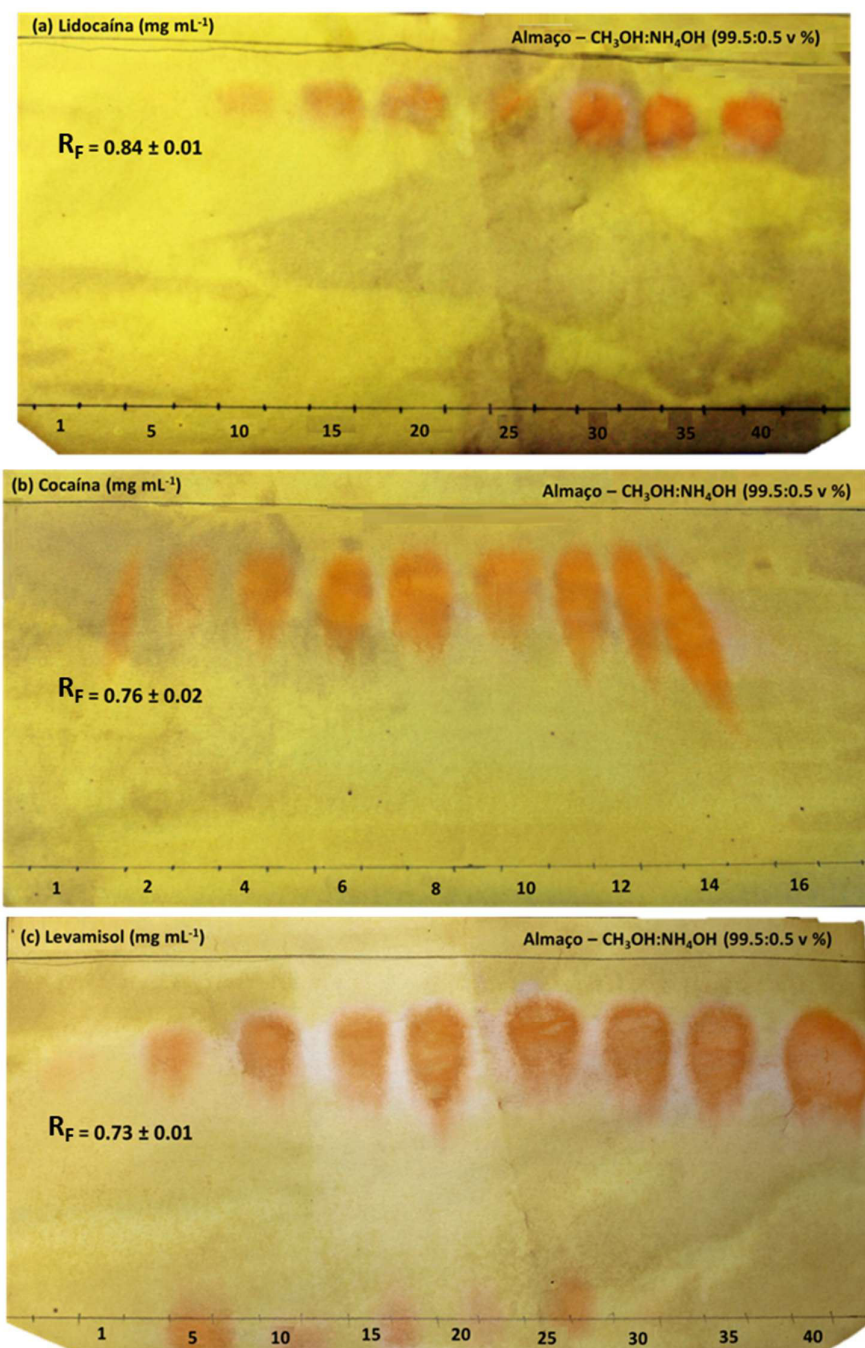


Figura A3 Cromatografia em papel do tipo Almaço com variação de concentração dos padrões de: (a) Lidocaína (1 a 40 mg/mL), (b) Cocaína (0,5 a 16 mg/mL) e (c) Levamisol (1 a 40 mg/mL)

Tabela A1 Metodologias aplicadas na extração na fase sólida (SPE)

Procedimento experimental		Eluição
GRUPO TESTE 1		
E1	CONDICIONAMENTO: 2 mL de CH ₃ OH + 2 mL de HAc 0.1M EXTRAÇÃO: 500µL de fluido oral + 1000µL de HAc 0.1M + 20µL solução com padrão (500 ppb) LAVAGEM: 2 mL de HAc 20 % em água + 2 mL de água: CH ₃ OH (1:1) Secagem por 15 minutos ELUIÇÃO	2-propanol:diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5 v/v/v)
E2		2-propanol:MTBE:ácido acético (24.5:75:0.5 v/v/v)
E3		2-propanol:Hexano:ácido acético (24.5:75:0.5 v/v/v)
E4	<u>Informações sobre as amostras</u> Amostras enriquecidas na concentração de 100 ppb (n=3), a etapa de lavagem também foi coletada para análise e 3 brancos de fluido oral.	2-propanol:diclorometano:ácido fórmico (24.5:75:0.5 v/v/v)
GRUPO TESTE 2		
E5	CONDICIONAMENTO: 2 mL de CH ₃ OH + 2 mL de HAc 0.1M EXTRAÇÃO: 500µL de fluido oral + 1000µL de CH ₃ OH + 20µL solução com padrão (500 ppb) Secagem por 15 minutos ELUIÇÃO	ELUIÇÃO ÁCIDA 2-propanol:diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA 2-propanol:diclorometano:hidróxido de amônio (20:80:2)
E6	<u>Informações sobre as amostras</u> Amostras enriquecidas na concentração de 100 ppb (n=5 e usadas 3), cada fração foi coletada separadamente e 3 brancos de fluido oral.	ELUIÇÃO ÁCIDA 1-Butanol: MTBE:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA Metanol:Hidróxido de amônio (49:1)
E7	Sem etapa de lavagem	ELUIÇÃO ÁCIDA 1-Butanol: diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA 1-Butanol: diclorometano: Hidróxido de amônio (20:80:2)

GRUPO TESTE 3		
E8	CONDICIONAMENTO: 2 mL de CH₃OH + 2 mL de HAc 0.1M EXTRAÇÃO: 500µL de fluido oral + 1000µL de CH₃OH ou ACN + 20µL solução com padrão (500 ppb) LAVAGEM: 2 mL de HAc 20 % em água + 2 mL de água: CH₃OH (1:1) Secagem por 15 minutos ELUIÇÃO	Precipitação com ACN e sem lavagem ELUIÇÃO ÁCIDA 1-Butanol: diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA Metanol:Hidróxido de amônio (49:1)
E9	LAVAGEM: 2 mL de HAc 20 % em água + 2 mL de água: CH₃OH (1:1) Secagem por 15 minutos ELUIÇÃO	Precipitação com CH₃OH e sem lavagem ELUIÇÃO ÁCIDA 1-Butanol: diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA Metanol:Hidróxido de amônio (49:1)
E10	<u>Informações sobre as amostras</u> <i>Amostras enriquecidas na concentração de 100 ppb (n=3), cada fração foi coletada separadamente e 3 brancos de fluido oral.</i>	Precipitação com CH₃OH e com lavagem ELUIÇÃO ÁCIDA 1-Butanol: diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA Metanol:Hidróxido de amônio (49:1)
GRUPO TESTE 4		
E11*	CONDICIONAMENTO: 2 mL de HAc 0.1M EXTRAÇÃO: 500µL de fluido oral + 1000µL de CH₃OH ou HAc 0.1M+ 20µL solução com padrão (500 ppb) Secagem por 15 minutos ELUIÇÃO <u>Informações sobre as amostras</u> <i>Amostras enriquecidas na concentração de 100 ppb e 10 ppb (n=5), 3 brancos de fluido oral e brancos enriquecidos em 100 ppb, cada fração foi coletada separadamente e também foram testadas coletas de ambas as frações em mesmo vial.</i>	ELUIÇÃO ÁCIDA 2-propanol:diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA Metanol:Hidróxido de amônio (49:1)
E12*	<u>Estes experimentos foram testados com precipitação de proteínas (CH₃OH) e sem precipitação e somente acidificação (HAc)</u> Sem etapa de lavagem	ELUIÇÃO ÁCIDA 1-Butanol: diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5) ELUIÇÃO BÁSICA Metanol:Hidróxido de amônio (49:1)

GRUPO TESTE 5		
E13	CONDICIONAMENTO: 2 mL de CH₃OH + 2 mL de HAc 0.1M EXTRAÇÃO: 100µL de fluido oral + 1000µL de HAc 0.1M + 20µL solução com padrão (500 ppb) Secagem por 15 minutos ELUIÇÃO	ELUIÇÃO ÁCIDA 2-propanol:diclorometano:ácido acético (24.5:75:0.5)
E14	<i><u>Informações sobre as amostras</u></i> <i>Amostras enriquecidas na concentração de 100 ppb (n=5), 1 branco de fluido oral, cada fração foi coletada separadamente.</i> Sem etapa de lavagem	ELUIÇÃO BÁSICA Metanol:Hidróxido de amônio (49:1)

* Dados tabelados para coleta separada das frações e para coleta em conjunto (fração ácida + básica) em uma única análise. Estes dados não foram agrupados na Figura 38.

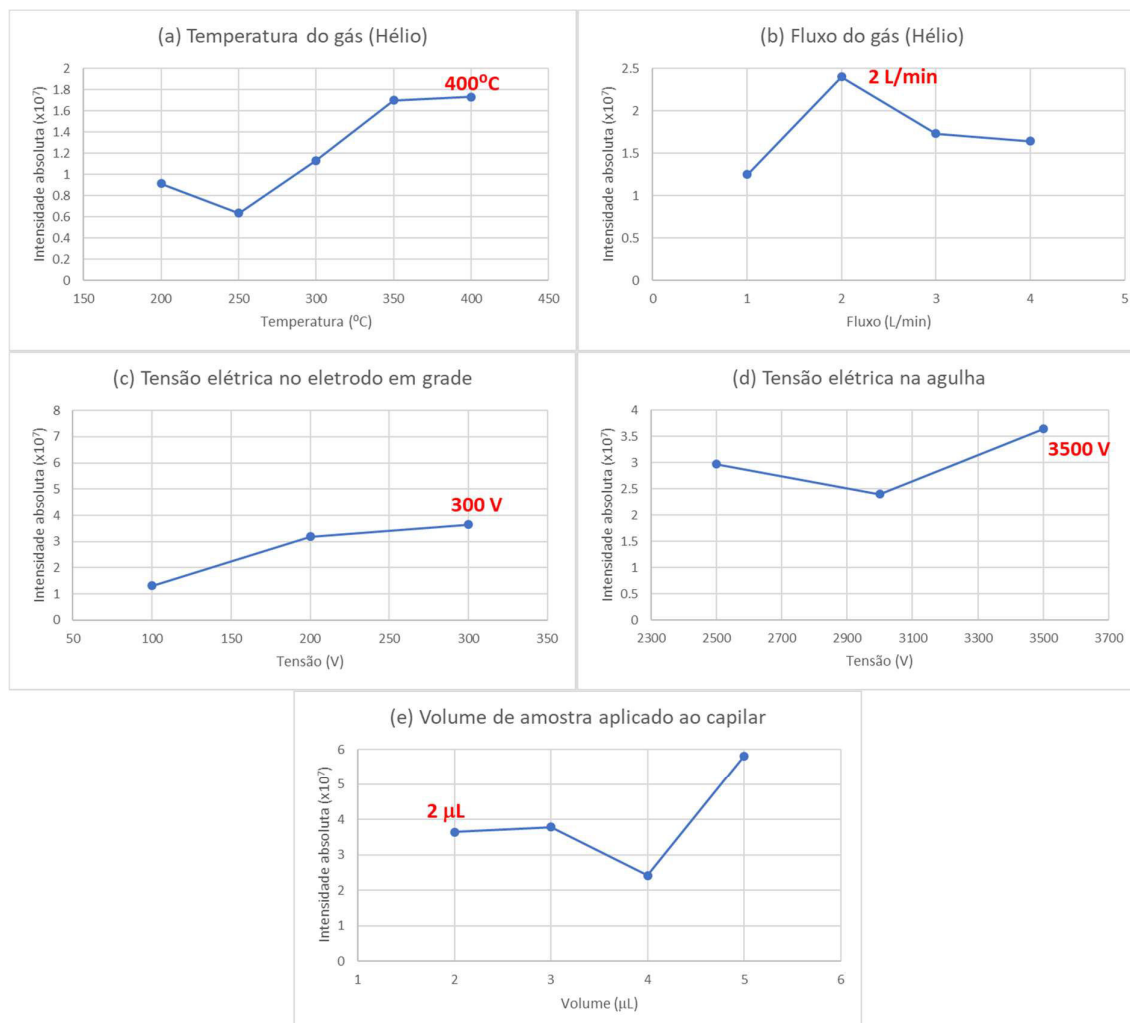


Figura A4 Otimização dos parâmetros para análises DART-QqQ para JWH-018. (a) Otimização da temperatura do gás, (b) Otimização do fluxo do gás, (c) Otimização da tensão elétrica no eletrodo em grade, (d) Otimização da tensão elétrica na agulha e (e) Volume de amostra aplicado ao capilar

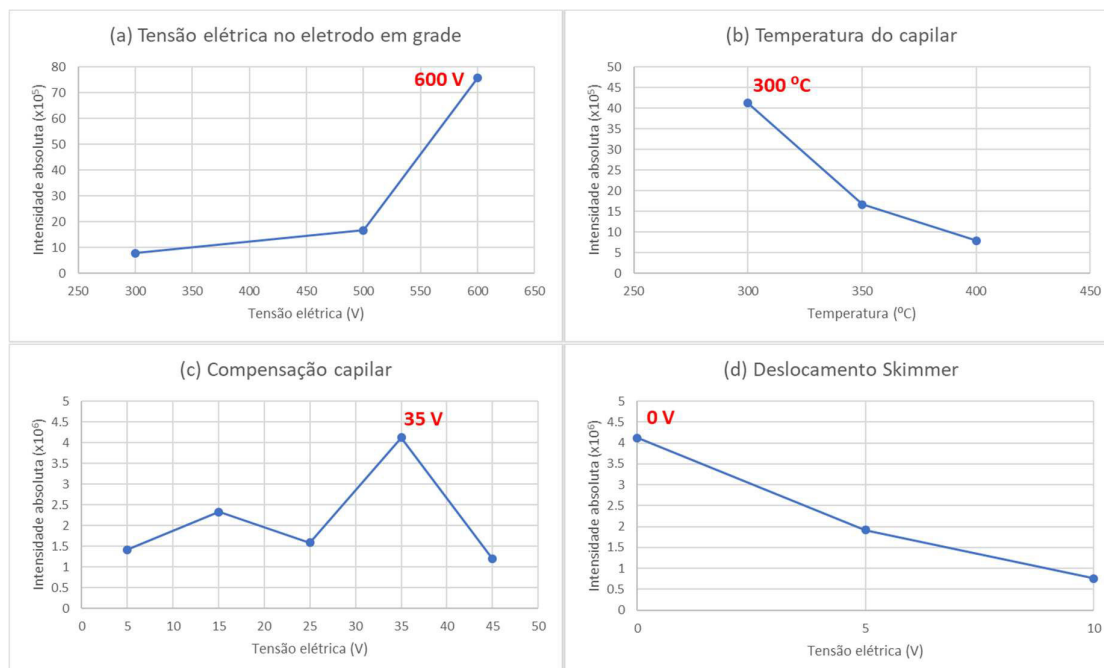


Figura A5 Otimização dos parâmetros para análises DART-QqQ para PB-22. (a) Tensão elétrica no eletrodo em grade, (b) Temperatura do capilar, (c) Compensação capilar, (d) Deslocamento Skimmer

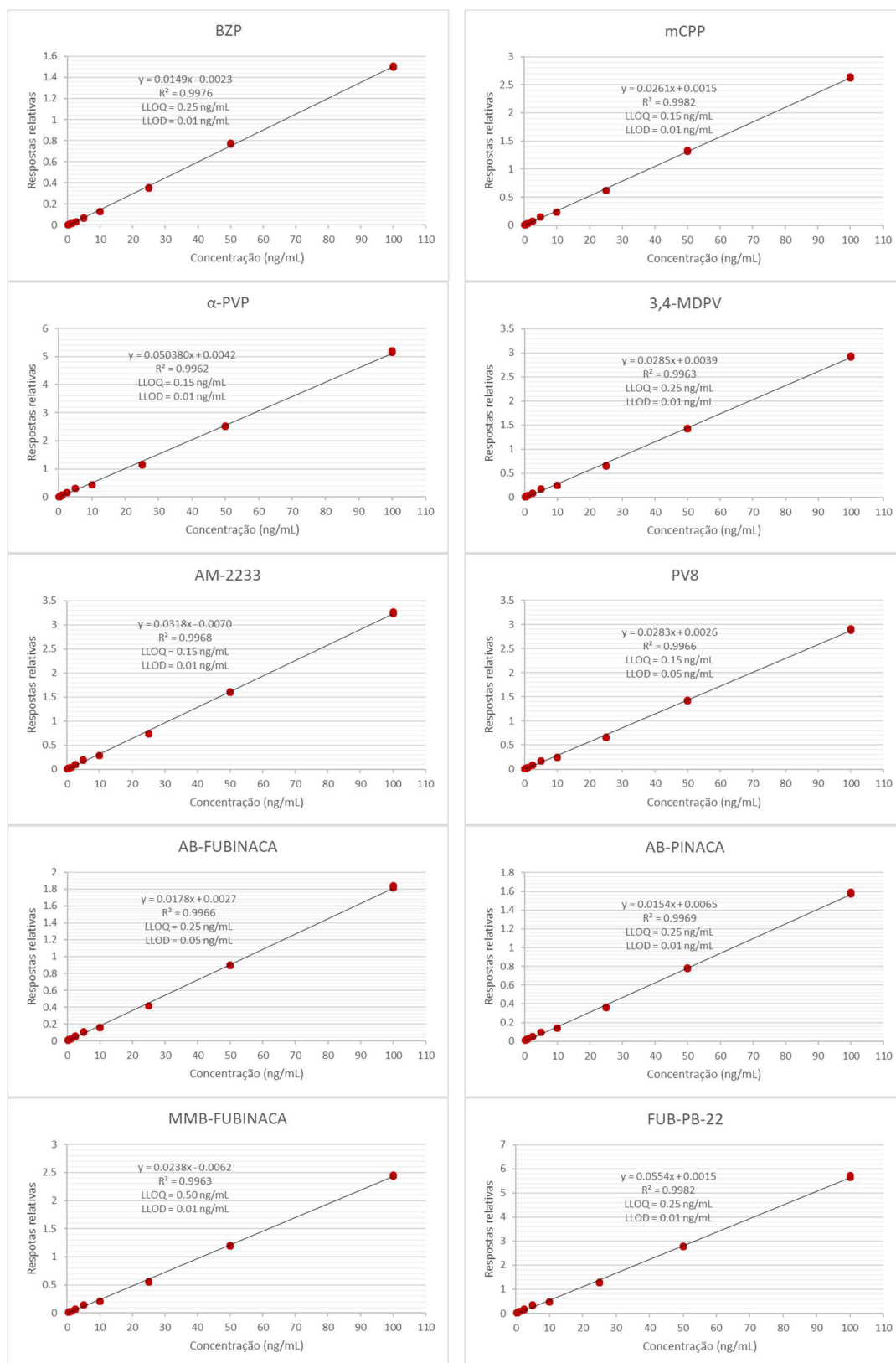


Figura A6-A. Curvas de calibração, $n = 7$, das 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

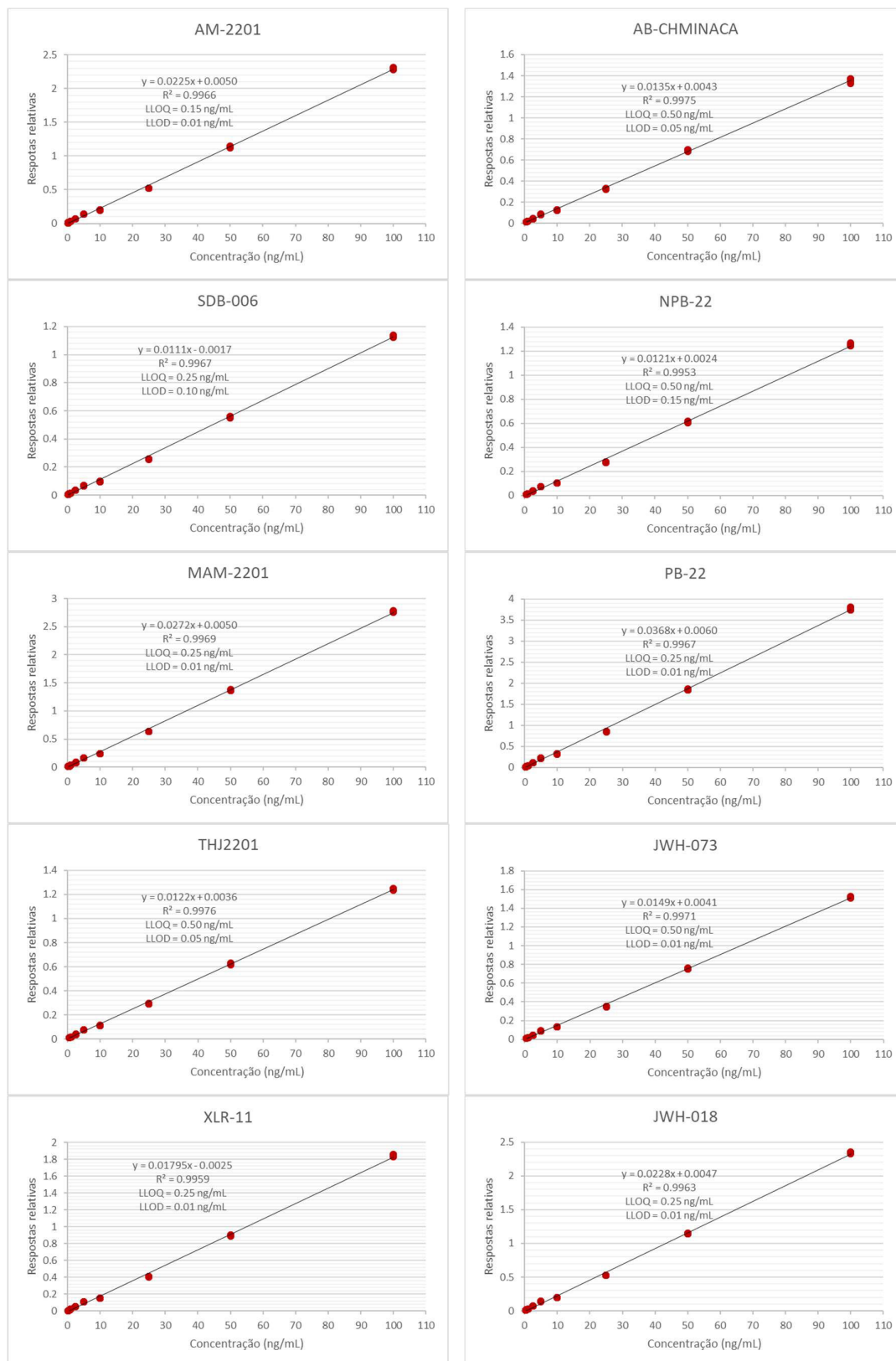


Figura A6-B. Curvas de calibração, $n = 7$, das 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

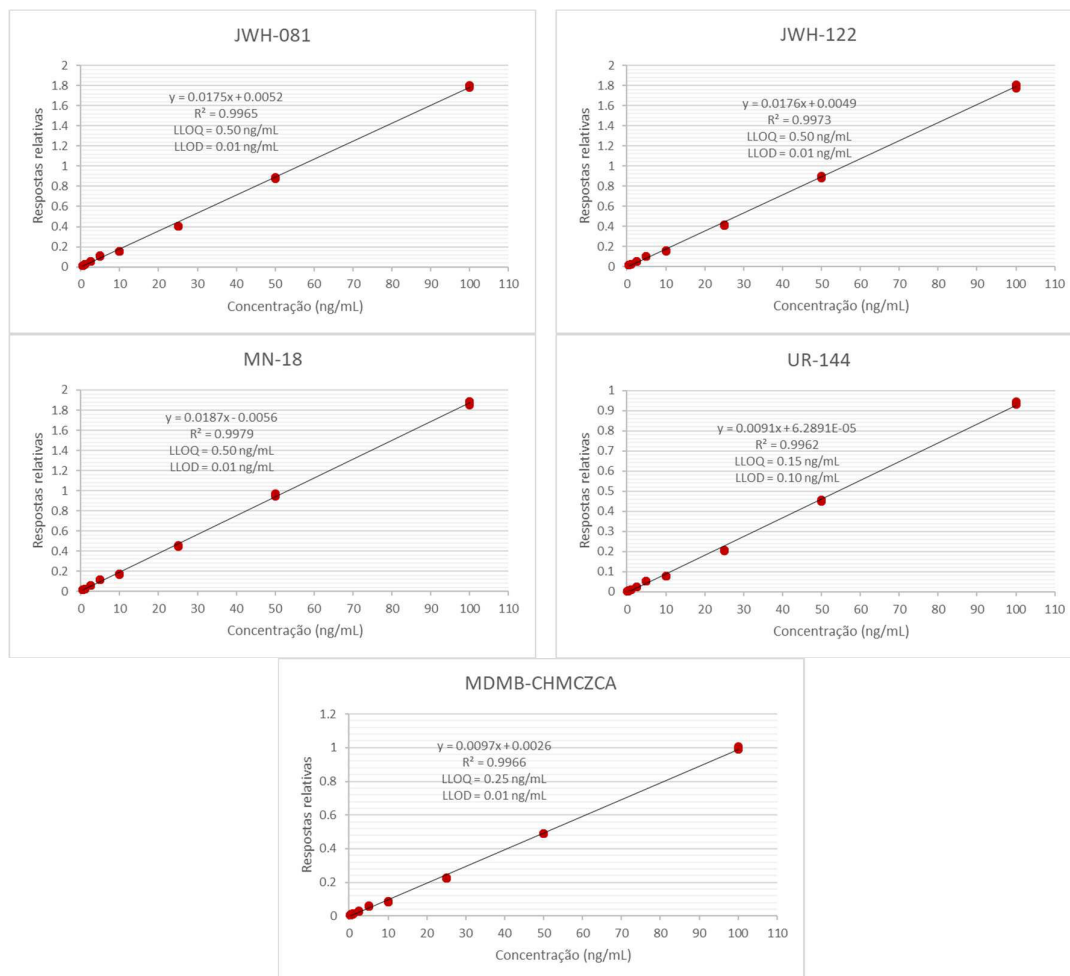


Figura A6-C. Curvas de calibração, $n = 7$, das 25 novas substâncias psicoativas (NPS)

Tabela A2 Resultados de recuperação para os experimentos 1-4.

	E1 2-propanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			E2 2-propanol:MTBE:HAc			E3 2-propanol:Hexano:HAc			E4 2-propanol:CH ₂ Cl:FA		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0	-
mCpp	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0	-
α-PVP	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0	-
3,4-MDPV	0.1	0.02	25.8	0.1	0.03	35.0	0.1	0.06	47.3	0.3	0.04	13.0
AM-2233	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0	-	0.0	0.01	173.205
PV8	0.1	0.02	29.0	0.0	0.01	39.2	0.0	0.01	26.3	0.2	0.11	53.6
AB-FUBINACA	68.8	2.06	3.0	60.2	4.9	8.1	43.6	1.97	4.5	68.6	7.87	11.5
AB-PINACA	79.4	1.17	1.5	70.2	5.09	7.3	49.9	1.85	3.7	79.0	6.82	8.6
MMB-FUBINACA	84.2	0.68	0.81	73.8	5.04	6.83	50.2	0.83	1.65	76.9	3.85	5.00
FUB-PB-22	49.9	1.76	3.5	7.5	1.51	20.0	2.5	0.05	1.8	37.1	3.52	9.5
AM-2201	84.2	0.63	0.7	73.4	6.23	8.5	48.5	1.51	3.1	79.0	5.15	6.5
AB-CHMINACA	95.7	0.35	0.4	81.5	6.17	7.6	54.0	2.01	3.7	93.0	9.35	10.1
SDB-006	85.7	1.07	1.2	74.1	5.86	7.9	49.5	1.05	2.1	82.7	6.97	8.4
NPB-22	17.4	0.46	2.7	3.2	0.45	14.0	1.6	0.51	33.2	6.0	0.21	3.5
MAM-2201	132.8	37.9	28.5	158.5	11.3	7.2	154.3	23.9	15.5	211.7	9.56	4.5
PB-22	60.1	0.89	1.5	10.2	2	19.6	5.6	0.12	2.2	46.8	5.09	10.9
THJ2201	104.0	1.09	1.0	91.3	7.29	8.0	66.7	3.8	5.7	103.6	5.7	5.5
JWH-073	89.2	0.87	1.0	81.0	6.29	7.8	58.8	2.05	3.5	91.0	6.26	6.9
XLR-11	79.8	1.06	1.3	69.9	5.51	7.9	46.9	1.25	2.7	76.9	7.8	10.1
JWH-018	88.1	0.2	0.2	74.7	5.93	7.9	50.0	1.77	3.5	82.7	7.77	9.4
JWH-081	70.8	1.56	2.2	66.1	5.47	8.3	40.9	2.41	5.9	67.5	6.35	9.4
JWH-122	83.2	0.59	0.7	72.6	6.06	8.3	47.4	2.93	6.2	73.6	6.26	8.5
MN-18	81.5	0.57	0.7	68.0	5.58	8.2	44.5	3.15	7.1	71.7	5.52	7.7
UR-144	70.0	0.8	1.1	57.5	4.56	7.9	34.6	1.71	4.9	57.2	6.58	11.5
MDBB-CHMCZCA	80.7	3.06	3.8	70.4	7.05	10.0	53.2	1.36	2.6	78.0	11	14.1

¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Tabela A3 Resultados de recuperação para os experimentos 5 e 6.

	E5						E6					
	FA: 2-propanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: 2-propanol:CH ₂ Cl ₂ :NH ₄ OH			FA: 1-Butanol:MTBE:HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	0.0	0.0	-	34.7	1.5	4.3	0.0	0.0	-	135.6	13.3	9.8
mCpp	0.0	0.0	-	66.1	2.3	3.4	0.0	0.0	-	99.8	7.0	7.0
α-PVP	0.0	0.0	-	73.4	2.6	3.5	0.0	0.0	-	123.0	13.3	10.8
3,4-MDPV	0.0	0.0	-	73.3	2.0	2.7	0.0	0.0	-	129.2	7.2	5.6
AM-2233	0.0	0.0	-	27.9	4.1	14.6	0.0	0.0	-	33.4	8.3	24.7
PV8	0.0	0.0	-	57.7	3.5	6.1	0.0	0.0	-	86.9	9.3	10.7
AB-FUBINACA	57.1	13.8	24.2	0.0	0.0	-	52.7	5.5	10.4	7.6	1.6	20.5
AB-PINACA	70.2	18.1	25.7	0.0	0.0	-	64.4	6.5	10.2	10.1	2.0	19.4
MMB-FUBINACA	52.5	26.0	49.6	0.0	0.0	-	37.7	9.8	25.9	1.0	0.9	86.9
FUB-PB-22	4.4	7.7	173.2	0.0	0.0	-	0.0	0.0	-	5.5	8.6	156.3
AM-2201	89.2	39.4	44.2	0.0	0.0	-	66.9	13.6	20.3	12.5	2.8	22.0
AB-CHMINACA	78.0	26.3	33.7	0.0	0.0	-	62.0	7.6	12.3	5.8	2.5	42.7
SDB-006	79.1	30.0	37.9	0.0	0.0	-	82.2	8.9	10.8	17.7	1.1	6.2
NPB-22	10.5	4.7	44.6	2.1	1.9	91.2	0.0	0.0	-	10.8	4.4	40.5
MAM-2201	100.9	43.6	43.2	0.0	0.0	-	67.2	23.9	35.6	13.4	3.1	23.1
PB-22	36.5	23.2	63.6	18.1	7.4	40.9	0.0	0.0	-	81.1	18.9	23.3
THJ2201	97.3	46.2	47.5	0.0	0.0	-	72.8	13.5	18.6	9.7	2.7	27.5
JWH-073	96.5	47.3	49.0	0.0	0.0	-	65.7	14.0	21.4	8.6	3.0	35.0
XLR-11	85.2	35.4	41.5	0.0	0.0	-	63.7	12.0	18.9	13.1	2.8	21.2
JWH-018	93.0	42.1	45.3	0.0	0.0	-	61.3	19.8	32.4	11.4	2.8	24.4
JWH-081	88.7	35.3	39.8	0.0	0.0	-	60.9	20.5	33.6	12.8	1.7	13.2
JWH-122	109.6	48.3	44.1	0.0	0.0	-	66.6	25.8	38.8	11.3	2.0	17.7
MN-18	114.7	51.0	44.4	0.0	0.0	-	73.6	21.8	29.6	1.6	1.7	109.0
UR-144	99.9	39.8	39.9	0.0	0.0	-	55.7	29.9	53.6	7.9	3.9	49.1
MDMB-CHMCZCA	102.4	51.6	50.4	0.0	0.0	-	60.7	29.2	48.0	4.3	3.4	79.2

FA= Fração Ácida. FB= Fração Básica. ¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Tabela A4 Resultados de recuperação para os experimentos 6 e 7.

	E6						E7					
	FA: 1-Butanol:MTBE:HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH			FA: 1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: 1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :NH ₄ OH		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	0.0	0.0	-	135.6	13.3	9.8	2.2	2.8	124.3	13.1	0.4	3.0
mCpp	0.0	0.0	-	99.8	7.0	7.0	3.2	3.6	112.0	44.7	1.7	3.7
α-PVP	0.0	0.0	-	123.0	13.3	10.8	5.2	3.7	71.1	59.8	3.7	6.2
3,4-MDPV	0.0	0.0	-	129.2	7.2	5.6	6.0	4.1	69.1	56.9	4.7	8.3
AM-2233	0.0	0.0	-	33.4	8.3	24.7	0.9	1.1	119.0	29.8	12.3	41.2
PV8	0.0	0.0	-	86.9	9.3	10.7	6.6	2.1	32.3	45.6	8.1	17.7
AB-FUBINACA	52.7	5.5	10.4	7.6	1.6	20.5	58.7	4.5	7.6	0.0	0.0	-
AB-PINACA	64.4	6.5	10.2	10.1	2.0	19.4	73.1	5.1	7.0	0.0	0.0	173.2
MMB-FUBINACA	37.7	9.8	25.9	1.0	0.9	86.9	60.7	3.6	5.9	0.0	0.0	-
FUB-PB-22	0.0	0.0	-	5.5	8.6	156.3	3.6	3.3	91.9	0.0	0.0	-
AM-2201	66.9	13.6	20.3	12.5	2.8	22.0	105.1	15.1	14.3	0.0	0.0	-
AB-CHMINACA	62.0	7.6	12.3	5.8	2.5	42.7	87.3	5.8	6.6	0.0	0.0	-
SDB-006	82.2	8.9	10.8	17.7	1.1	6.2	99.1	12.3	12.4	0.0	0.0	167.1
NPB-22	0.0	0.0	-	10.8	4.4	40.5	18.3	3.7	20.2	0.0	0.0	-
MAM-2201	67.2	23.9	35.6	13.4	3.1	23.1	118.8	19.6	16.5	0.0	0.0	-
PB-22	72.8	13.5	18.6	9.7	2.7	27.5	113.1	21.1	18.6	0.0	0.0	-
THJ2201	0.0	0.0	-	81.1	18.9	23.3	46.9	6.2	13.3	5.5	5.7	104.3
JWH-073	65.7	14.0	21.4	8.6	3.0	35.0	106.5	18.3	17.2	0.0	0.0	-
XLR-11	63.7	12.0	18.9	13.1	2.8	21.2	99.3	14.6	14.7	0.0	0.0	-
JWH-018	61.3	19.8	32.4	11.4	2.8	24.4	107.5	20.9	19.4	0.0	0.0	-
JWH-081	60.9	20.5	33.6	12.8	1.7	13.2	96.6	21.9	22.7	0.0	0.0	-
JWH-122	66.6	25.8	38.8	11.3	2.0	17.7	114.5	24.1	21.0	0.0	0.0	-
MN-18	73.6	21.8	29.6	1.6	1.7	109.0	120.8	30.5	25.3	0.0	0.0	-
UR-144	55.7	29.9	53.6	7.9	3.9	49.1	99.1	18.9	19.1	0.0	0.0	-
MDMB-CHMCZCA	60.7	29.2	48.0	4.3	3.4	79.2	156.4	49.4	31.6	0.0	0.0	-

FA= Fração Ácida. FB= Fração Básica. ¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Tabela A5 Resultados de recuperação para os experimentos 8 e 9.

	E8 (Precipitação do fluido oral com acetonitrila)						E9 (Precipitação do fluido oral com metanol)					
	FA: 1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH			FA: 1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	0.0	0.1	173.2	66.3	5.0	7.6	0.0	0.0	-	70.3	3.5	5.0
mCpp	1.0	0.0	5.0	73.5	2.9	3.9	0.2	0.2	94.5	80.1	5.1	6.3
α-PVP	4.4	0.0	0.5	58.6	5.6	9.5	2.3	0.9	39.9	75.6	3.2	4.2
3,4-MDPV	4.9	0.1	1.4	64.5	2.9	4.6	2.3	1.0	44.0	90.4	1.0	1.1
AM-2233	5.2	0.5	9.5	13.8	3.5	25.7	0.8	0.8	103.8	28.3	4.0	14.2
PV8	5.3	0.4	7.6	40.9	4.6	11.1	2.5	1.4	55.7	61.1	2.5	4.1
AB-FUBINACA	20.5	3.3	15.9	1.6	1.2	75.0	47.6	6.4	13.5	2.8	1.4	50.4
AB-PINACA	24.3	3.7	15.4	3.1	1.5	47.7	59.0	5.5	9.4	4.3	1.6	37.1
MMB-FUBINACA	16.6	1.6	9.7	1.8	0.5	29.1	42.2	4.9	11.6	2.1	0.9	45.0
FUB-PB-22	17.1	2.3	13.3	0.1	0.1	173.2	13.7	4.4	32.3	5.8	2.9	50.1
AM-2201	31.4	3.2	10.1	2.1	1.5	73.5	76.9	1.2	1.6	2.7	1.5	57.5
AB-CHMINACA	18.3	0.7	3.8	0.9	0.8	87.2	60.0	5.5	9.2	2.2	1.8	80.0
SDB-006	32.7	2.4	7.4	9.1	10.5	116.2	87.3	6.1	7.0	5.7	2.8	48.7
NPB-22	49.9	9.8	19.7	4.5	0.7	14.9	38.3	14.2	36.9	9.1	2.8	31.3
MAM-2201	34.4	5.3	15.5	0.5	0.5	88.3	86.0	4.8	5.6	1.4	0.9	63.9
PB-22	36.0	5.2	14.5	8.9	1.4	15.6	32.1	7.0	21.7	18.6	4.9	26.3
THJ2201	36.7	4.7	12.8	3.8	3.4	88.1	95.0	4.6	4.9	3.0	1.9	64.3
JWH-073	36.1	4.5	12.4	3.5	3.0	86.2	89.9	3.7	4.1	3.1	1.8	56.9
XLR-11	42.1	3.9	9.2	1.1	1.9	173.2	94.7	1.7	1.8	3.2	1.7	53.3
JWH-018	43.3	6.7	15.4	6.9	4.4	63.0	97.4	1.5	1.5	3.1	1.3	40.7
JWH-081	38.8	6.5	16.7	3.5	2.0	58.1	86.9	2.5	2.8	2.3	1.1	46.4
JWH-122	14.9	2.3	15.1	0.0	0.0	-	25.9	1.2	4.8	0.0	0.0	-
MN-18	12.8	1.8	13.7	0.0	0.0	-	25.3	3.2	12.9	0.0	0.0	-
UR-144	9.9	2.0	20.5	0.0	0.0	-	14.7	1.2	8.2	0.0	0.0	-
MDMB-CHMCZCA	49.3	13.2	26.8	1.8	1.3	72.8	102.9	7.6	7.4	2.1	1.1	51.5

FA= Fração Ácida. FB= Fração Básica. ¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Tabela A6 Resultados de recuperação para os experimentos 9 e 10.

	E9 (Precipitação do fluido oral com metanol sem lavagem)						E10 (Precipitação do fluido oral com metanol com lavagem)					
	FA: 1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH			FA: 1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	0.0	0.0	-	70.3	3.5	5.0	0.5	0.9	173.2	74.1	1.9	2.6
mCpp	0.2	0.2	94.5	80.1	5.1	6.3	0.8	1.4	173.2	83.3	4.6	5.5
α-PVP	2.3	0.9	39.9	75.6	3.2	4.2	2.4	2.1	85.7	79.9	8.7	10.9
3,4-MDPV	2.3	1.0	44.0	90.4	1.0	1.1	3.0	1.7	58.5	87.1	9.0	10.3
AM-2233	0.8	0.8	103.8	28.3	4.0	14.2	2.5	1.9	76.8	59.8	13.2	22.0
PV8	2.5	1.4	55.7	61.1	2.5	4.1	6.7	2.5	38.1	73.3	8.4	11.4
AB-FUBINACA	47.6	6.4	13.5	2.8	1.4	50.4	31.3	2.5	8.0	1.9	1.0	54.9
AB-PINACA	59.0	5.5	9.4	4.3	1.6	37.1	43.7	3.0	7.0	3.2	1.3	40.3
MMB-FUBINACA	42.2	4.9	11.6	2.1	0.9	45.0	42.6	10.5	24.7	2.3	1.4	62.0
FUB-PB-22	13.7	4.4	32.3	5.8	2.9	50.1	32.9	15.4	46.8	15.1	7.3	48.1
AM-2201	76.9	1.2	1.6	2.7	1.5	57.5	58.0	17.1	29.4	3.3	2.1	64.3
AB-CHMINACA	60.0	5.5	9.2	2.2	1.8	80.0	53.6	6.9	12.9	2.5	2.2	87.4
SDB-006	87.3	6.1	7.0	5.7	2.8	48.7	56.1	11.4	20.4	4.1	2.6	61.8
NPB-22	38.3	14.2	36.9	9.1	2.8	31.3	55.4	18.6	33.6	15.9	6.4	40.3
MAM-2201	86.0	4.8	5.6	1.4	0.9	63.9	60.6	20.1	33.1	2.8	2.1	73.0
PB-22	32.1	7.0	21.7	18.6	4.9	26.3	54.7	20.6	37.6	21.2	6.4	30.0
THJ2201	95.0	4.6	4.9	3.0	1.9	64.3	82.1	31.3	38.2	4.6	3.2	70.8
JWH-073	89.9	3.7	4.1	3.1	1.8	56.9	77.2	29.7	38.4	4.3	3.0	69.5
XLR-11	94.7	1.7	1.8	3.2	1.7	53.3	74.0	22.5	30.4	3.7	2.4	63.9
JWH-018	97.4	1.5	1.5	3.1	1.3	40.7	77.5	29.9	38.6	4.4	2.6	58.9
JWH-081	86.9	2.5	2.8	2.3	1.1	46.4	66.7	24.9	37.3	3.5	2.2	63.3
JWH-122	25.9	1.2	4.8	0.0	0.0	-	16.1	8.4	52.1	0.0	0.0	-
MN-18	25.3	3.2	12.9	0.0	0.0	-	13.6	6.9	51.0	0.0	0.0	-
UR-144	14.7	1.2	8.2	0.0	0.0	-	6.3	6.0	96.5	0.0	0.0	-
MDMB-CHMCZCA	102.9	7.6	7.4	2.1	1.1	51.5	72.8	28.8	39.6	3.5	2.4	67.6

FA= Fração Ácida. FB= Fração Básica. ¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Tabela A7 Resultados de recuperação para os experimentos 11 e 12 com coleta de frações em diferentes vials.

	E11						E12					
	FA: 1-Propanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH			FA: 1-Butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	0.3	0.2	76.0	83.2	22.4	26.9	2.4	3.7	153.5	64.5	11.9	18.4
mCpp	0.8	0.9	101.4	111.6	21.5	19.2	4.9	7.3	148.2	92.7	30.0	32.4
α-PVP	1.4	0.9	63.4	101.9	25.2	24.8	6.9	9.9	144.0	109.4	38.2	34.9
3,4-MDPV	1.9	1.4	70.8	127.0	22.8	18.0	6.7	9.8	145.9	119.7	44.6	37.2
AM-2233	1.5	0.6	42.9	51.6	10.1	19.5	2.7	3.3	122.4	38.0	12.0	31.6
PV8	2.1	1.1	53.2	79.9	23.4	29.3	5.4	7.2	133.5	73.5	15.9	21.6
AB-FUBINACA	80.2	24.2	30.1	2.3	0.6	26.8	64.8	5.8	9.0	1.6	0.6	39.6
AB-PINACA	99.0	29.2	29.5	2.8	0.5	17.8	79.9	8.0	10.0	2.2	1.1	48.8
MMB-FUBINACA	88.4	24.6	27.9	1.6	0.6	37.8	64.8	17.6	27.2	1.0	0.4	35.4
FUB-PB-22	34.2	20.4	59.6	16.0	5.1	31.6	20.0	10.0	49.9	15.4	13.4	86.5
AM-2201	153.3	37.7	24.6	3.2	1.1	33.7	109.3	12.1	11.0	1.8	0.5	29.5
AB-CHMINACA	102.3	26.8	26.2	2.2	0.8	35.3	84.6	14.2	16.8	1.5	0.5	35.2
SDB-006	139.7	37.2	26.6	3.4	1.1	33.3	108.9	8.0	7.4	2.1	1.2	58.4
NPB-22	89.4	46.5	52.0	27.1	3.5	13.0	58.8	14.3	24.3	22.8	5.0	21.9
MAM-2201	171.5	36.5	21.3	2.7	0.9	34.3	125.3	11.1	8.8	1.5	0.3	19.5
PB-22	67.2	29.4	43.7	54.9	9.6	17.5	41.5	11.2	26.9	40.0	6.7	16.8
THJ2201	183.9	44.3	24.1	5.2	1.7	32.8	128.4	15.0	11.7	3.0	1.4	47.6
JWH-073	169.8	42.6	25.1	4.0	1.3	32.0	118.1	14.3	12.2	2.7	1.2	42.8
XLR-11	163.2	39.1	24.0	3.4	0.8	23.7	119.0	12.8	10.7	1.6	1.1	71.7
JWH-018	185.3	43.8	23.6	3.3	1.0	29.2	129.6	10.3	8.0	2.3	0.6	27.8
JWH-081	163.8	37.1	22.7	3.7	1.1	28.7	115.5	3.8	3.3	2.5	0.6	24.2
JWH-122	85.9	31.6	36.8	10.3	10.6	103.2	44.9	7.3	16.3	4.7	4.2	90.5
MN-18	178.9	39.2	21.9	4.2	1.5	36.1	141.4	2.9	2.1	3.0	0.5	17.2
UR-144	164.3	53.7	32.7	1.8	0.2	8.8	152.9	7.9	5.2	2.6	0.9	36.3
MDMB-CHMCZCA	195.4	47.4	24.2	3.9	1.2	30.2	119.2	8.9	7.4	2.3	0.6	26.9

FA= Fração Ácida. FB= Fração Básica. ¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Tabela A8 Resultados de recuperação para os experimentos 11 e 12 com coleta de frações em diferentes vials.

	E11			E12		
	Fração ÁCIDA 2-propanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc + Fração BÁSICA CH ₃ OH:NH ₄ OH			Fração ÁCIDA 1-butanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc + Fração BÁSICA CH ₃ OH:NH ₄ OH		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	65.9	23.3	35.3	31.4	8.8	27.9
mCpp	104.4	15.4	14.7	46.6	11.5	24.6
α-PVP	117.3	12.0	10.2	67.5	10.1	14.9
3,4-MDPV	123.8	14.5	11.7	63.9	10.7	16.8
AM-2233	81.0	12.9	15.9	15.9	2.7	17.2
PV8	102.8	11.8	11.5	39.7	6.0	15.2
AB-FUBINACA	25.7	2.5	9.7	34.6	4.5	12.9
AB-PINACA	28.8	2.8	9.6	42.9	5.3	12.4
MMB-FUBINACA	13.8	2.4	17.2	38.2	4.0	10.5
FUB-PB-22	27.3	5.6	20.5	12.5	3.5	28.2
AM-2201	33.7	4.1	12.1	128.2	13.3	10.4
AB-CHMINACA	22.3	2.3	10.5	35.0	4.7	13.3
SDB-006	39.4	6.8	17.2	51.7	7.8	15.0
NPB-22	87.6	17.8	20.3	33.2	4.5	13.5
MAM-2201	27.2	4.4	16.3	55.2	14.0	25.3
PB-22	103.6	15.2	14.7	34.1	5.6	16.5
THJ2201	36.0	6.4	17.9	40.4	5.9	14.6
JWH-073	32.1	5.5	17.1	37.6	5.4	14.3
XLR-11	29.1	3.3	11.5	48.4	8.2	17.0
JWH-018	32.0	6.1	19.0	44.5	7.7	17.3
JWH-081	36.1	6.5	18.0	54.3	9.3	17.1
JWH-122	39.1	7.6	19.6	82.5	10.2	12.3
MN-18	38.3	6.8	17.9	67.9	11.2	16.4
UR-144	27.7	7.0	25.1	71.9	20.0	27.8
MDMB-CHMCZCA	40.9	8.4	20.4	63.8	9.9	15.5

¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

Tabela A9 Resultados de recuperação para os experimentos 13-15 com coleta de frações em diferentes vials e diferentes cartuchos de SPE.

	E13			E14			E15		
	FA: 2-propanol:CH ₂ Cl ₂ :HAc			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH			FB: CH ₃ OH:NH ₄ OH + 50 mL HCl:IPA (1:3) antes da secagem		
	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)	Rec ¹ (%)	ST ²	RSD ³ (%)
BZP	0.0	0.0	-	56.8	8.5	15.0	43.9	3.8	8.6
mCp	0.0	0.0	-	82.2	13.2	16.0	69.4	8.1	11.7
α-PVP	0.6	0.1	21.7	94.6	20.6	21.7	97.6	10.6	10.8
3,4-MDPV	1.0	0.3	24.9	110.2	18.1	16.4	97.9	11.2	11.4
AM-2233	1.7	0.6	34.2	39.9	7.8	19.6	65.6	9.2	14.1
PV8	3.2	0.7	21.2	88.4	20.3	23.0	105.1	14.6	13.9
AB-FUBINACA	138.4	6.6	4.8	132.9	20.7	15.6	105.1	12.4	11.8
AB-PINACA	136.4	7.4	5.4	131.0	19.5	14.9	103.1	12.7	12.3
MMB-FUBINACA	76.4	4.5	5.9	51.3	8.2	15.9	42.0	2.8	6.7
FUB-PB-22	25.2	2.9	11.3	6.1	3.7	61.0	1.9	2.0	107.7
AM-2201	50.8	5.2	10.2	89.8	12.7	14.1	77.1	7.3	9.4
AB-CHMINACA	114.8	8.8	7.7	91.1	15.1	16.6	74.0	9.4	12.8
SDB-006	89.9	6.9	7.7	165.9	47.5	28.6	161.7	45.5	28.1
NPB-22	58.1	9.3	16.1	72.6	17.7	24.4	103.8	11.6	11.1
MAM-2201	41.7	6.0	14.3	61.0	3.7	6.0	45.7	4.0	8.8
PB-22	49.3	8.1	16.4	70.8	17.3	24.4	63.2	6.2	9.9
THJ2201	45.9	5.3	11.5	102.3	20.2	19.7	100.3	20.1	20.1
JWH-073	45.0	5.4	11.9	88.9	17.3	19.4	87.1	15.7	18.1
XLR-11	56.3	4.7	8.3	86.2	7.5	8.7	70.7	6.2	8.8
JWH-018	28.6	4.8	16.8	56.7	7.4	13.1	49.9	3.0	6.1
JWH-081	26.0	5.2	20.1	49.7	5.5	11.2	40.8	3.0	7.4
JWH-122	14.8	3.4	22.9	33.5	5.1	15.2	28.2	3.5	12.6
MN-18	14.4	2.6	17.8	31.7	2.3	7.3	25.6	1.4	5.3
UR-144	13.0	2.2	16.9	17.6	1.4	7.8	12.6	2.1	16.5
MDMB-CHMCZCA	15.2	0.2	1.4	44.4	5.4	12.3	37.1	2.7	7.2

FA= Fração Ácida. FB= Fração Básica. ¹ Recuperação. ² Desvio padrão. ³ Desvio padrão relativo.

ANEXOS

- **Artigos publicados durante o doutorado**

DOMINGOS, E.; DE CARVALHO, T. C.; PEREIRA, I.; VASCONCELOS, G.A.; THOMPSON, C.J. ; AUGUSTI, R.; RODRIGUES, R.R. T. ; TOSE, L.V. ; **SANTOS, H.**; ARAUJO, J.R. ; VAZ, B.G. ; ROMÃO, W. Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry - drugs of abuse, inks and questioned documents. *Analytical Methods*, 9, 4400-4409, 2017.

CARVALHO, V.V.; VASCONCELOS, G.A.; TOSE, L.V.; **SANTOS, H.**; CARDOSO, F.M.R.; FLEMING, F.; ROMÃO, W.; VAZ, B.G. Revealing the chemical characterization of asphaltene fractions produced by N-methylpyrrolidone using FTIR, molecular fluorescence, ¹H NMR, and ESI(±)FT-ICR MS. *FUEL*, 210, 514-526, 2017.

SANTOS, H.; LIMA, A.S.; MAZEGA, A.; DOMINGOS, E.; THOMPSON, C.J.; MALDANER, A.O.; FILGUEIRAS, P.R.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. Quantification of cocaine and its adulterants (lidocaine and levamisole) using the Dragendorff reagent allied to paper spray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods*, 9, 3662-3668, 2017.

MANDA, B.; PRASAD, A.; THATIKONDA, N.; LACERDA JR., V.; BARBOSA, L.; **SANTOS, H.**; ROMÃO, W.; PAVAN, F.; RIBEIRO, C.; DOS SANTOS, E.; MARQUES, M.; DE LIMA, D.; MICHELETTI, A.; BEATRIZ, A. Synthesis, Antibacterial and Antitubercular Evaluation of Cardanol and Glycerol-Based β -Amino Alcohol Derivatives. *JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY*, 29, 639-648, 2017.

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

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

BESSA, C.; DE ANDRADE, J.; DE OLIVEIRA, R.; DOMINGOS, E.; **SANTOS, H.**; ROMÃO, W.; BASTIDA, J.; BORGES, W. Identification of Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) Using CGC-MS and Ambient Ionization Mass Spectrometry (PS-MS and LS-MS). *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Impresso), 1-12, 2016.

SANTOS, P.F.; SOUZA, L.M.; MERLO, B.B.; COSTA, H.B.; TOSE, L.V.; **SANTOS, H.**; VANINI, G.; MACHADO, L.F.; ORTIZ, R.S.; LIMBERGER, R.P.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. 2-(4-iodine-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]etamine OR 25I-NBOMe: CHEMICAL CHARACTERIZATION OF A DESIGNER DRUG. *Química Nova* (Impresso), 39, 229-237, 2015.

- **Apresentações em congressos**

SANTOS, H.; DAVIDSON, J.T.; COX, J.; JACKSON, G.P.; ROMÃO, W.; ARROYO, L. 66TH ASMS conference. Potential applications to new psychoactive substances identification in oral fluid and Damiana leaf (*Turnera diffusa*) by DART-MS/MS and LC-MS/MS. 2018.

SANTOS, H.; TOSATO, F.; LIMA, A. S.; DOMINGOS, E.; VAZ, B.G.; ROMAO, W. 64th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, ASMS. Quantification of Cocaine and its Adulterants by Paper Chromatography revealed by Dragendorff Reagent and Paper Spray Ionization Mass Spectrometry. 2016.

SANTOS, H.; CORDEIRO, M. M.; VASCONCELOS, G.A.; AQUIJE, G.M.F.V.; BORGES, W.S.; VAZ, B.G.; BORGES, K.B.; ROMÃO, W. 1º CSI: Congresso Brasileiro de Ciências Forenses. Papel Revestido com Polímeros Condutores (PPy e Pani) aplicado a espectrometria de massas (PS-MS). 2016.

SANTOS, H.; SANTOS, P. F. ; SOUZA, L. M. ; TOSE, LILIAN V. ; MACHADO, L. F. ; MERLO, BIANCA B. ; ROMAO, W. XXIII Congresso Nacional de Criminalística. 25 I-NBOME: ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE UMA DROGA SINTÉTICA COMERCIALIZADA COMO SELOS DE 'LSD'. 2015.

- **Organização de evento e entrevista para jornal**

ROMAO, W. ; SANTOS, H. . 1º CSI Vitória: Congresso brasileiro de Ciências Forenses. 2016. (Congresso).

ROMAO, W. ; DOMINGOS, E. ; SANTOS, H. . Pesquisador capixaba desenvolve método mais barato para detectar agrotóxicos em alimentos.. 2016. (Programa de rádio ou TV/Entrevista).

- **Doutorado sanduíche**

Química Forense

Processo: 99999.000051/2017-09

Programa: 203 - Programas Estratégicos - DRI

Projeto (título): Ferramentas Eletroquímicas e de Espectrometria de Massa para identificação de designer drugs

Edital: Portaria 19/2011 – Programas Estratégicos – Doutorado Sanduíche

IES de Estudo: West Virginia University

Orientador no Exterior: Dr. Luis E. Arroyo

Período: Agosto/2017 a Julho/2018