

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

**Desenvolvimento de Candidatos à Materiais de Referências  
com Aplicação em Química Forense**

**Development of Candidates for Reference Materials with Application in Forensic  
Chemistry**

**Clebson de Jesus Macrino**

**Tese de Doutorado em Química**

**Vitória  
2022**

**Clebson de Jesus Macrino**

**Desenvolvimento de Candidatos à Materiais de Referências  
com Aplicação em Química Forense**

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 Doutor em Química

**Área de Concentração:** Química

**Linha de Pesquisa:** Química Forense.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto

**VITÓRIA  
2022**

# Desenvolvimento de Candidatos à Materiais de Referências com Aplicação em Química Forense

Clebson de Jesus Macrino

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

Aprovado em 31/03/2022 por:

---

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

---

**Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientador

---

**Prof. Dr. Valdemar Lacerda Jr.**  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

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

---

**Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves**  
Universidade Federal de Goiás

---

**Prof. Dr. José Luiz da Costa**  
Universidade Estadual de Campinas

**Universidade Federal do Espírito Santo**  
Vitória, março de 2022

Dedico essa tese a toda minha família, em especial a minha mãe Neusa, por ter sempre incentivado a educação como uma ferramenta poderosa de transformação.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sabedoria, força e persistência para alcançar meus objetivos.

À toda minha família por ser meu alicerce. Em especial a minha mãe, por ter sempre incentivado a educação na minha vida e na das minhas irmãs e irmão.

Ao meu namorado Jhonis por ter estado ao meu lado nesse tempo.

Ao meu orientador, Prof Wanderson, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, por ter sido um grande semeador de oportunidades para meu crescimento acadêmico, por ter sempre acreditado e incentivado o meu potencial.

Ao meu co-orientador, Prof. Álvaro, pela confiança e oportunidade em trabalhar com ele, pela paciência e por ser sempre solícito em ensinar.

Ao Prof. Elias, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa durante a graduação, os ensinamentos, conselhos e confiança.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Petrolômica e Forense, pelos momentos de cumplicidade, aprendizados e diversão. Muito obrigado por terem feito parte dessa minha caminhada: Adriel, Camila, Eliane, Fernanda Endringer, Fernanda Fachim, Flávia, Iago, Juliana, Layla, Lilian, Lindamara, Natã, Radigya, Rayana, Vitor. E gostaria de agradecer em especial, a Nayara, por ter sido uma grande amiga, professora e referência no doutorado.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de orgânica pelo aprendizado.

Aos meus eternos amigos da graduação, pelo incentivo e apoio. Muito obrigado: André, Armando, Brener, Cristiano, Flávio, João, Karla, Layla e Maicon.

À banca por terem aceito e contribuído com o crescimento do meu trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFES pelos ensinamentos.

À todos que fizeram parte da minha rotina dentro do LabPetro.

À FAPES pelas bolsas concedidas. À Capes, ao CNPQ e ao INCT Forense pelos financiamentos.

À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo pelo acordo de cooperação.

À todos que contribuíram para que eu subisse mais degrau na minha vida. Meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigado!

“Faça o seu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda.”

Mário Sérgio Cortella

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Número de materiais de referência certificados produzidos no mundo e quantidade de produtores por país entre 2019-2020, segundo o COMAR.....	21
<b>Figura 2</b> Etapas de produção de um MRC.....	23
<b>Figura 3</b> Levantamento bibliográfico com o termo “development of certified reference material” (a) número de publicações (b) áreas de aplicação dos CRMs e (c) países com maiores números de publicações nas bases da Web of Science e Scopus entre 2001-2021.....	24
<b>Figura 4</b> Esquema representativo da estimativa de incerteza de um candidato para material de referência certificado .....	25
<b>Figura 5</b> Representação química dos principais alcalóides encontrados na <i>Erytroxylum</i> (a) cocaína, (b) , tropacocaína, (c) cis-cinamoilcocaína, (d) , trans-cinamoilcocaína, (e) trimetoxicocaína, (f) $\alpha$ -truxilina e (g) $\beta$ -truxilina.....	43
<b>Figura 6</b> Representação da planta do gênero <i>Erytroxylum</i> e da estrutura química da cocaína.....	44
<b>Figura 7</b> Representação da planta do <i>Erytroxylum coca</i> e sua classificação científica.....	45
<b>Figura 8</b> Formação do cloridrato de cocaína. ....	45
<b>Figura 9</b> Representação das reações de hidrólise da cocaína.....	46
<b>Figura 10</b> Representação da estrutura química dos principais subprodutos da oxidação da cocaína utilizando permanganato de potássio.....	48
<b>Figura 11</b> Representação do processo de refino da cocaína.....	50
<b>Figura 12</b> Representação química dos principais adulterantes da cocaína (a) lidocaína, (b) benzocaína, (c) cafeína, (d) fenacetina, (e) levamisol e (f) paracetamol.....	51
<b>Figura 13</b> Representação química dos principais metabólitos da cocaína.....	52
<b>Figura 14</b> Representação esquemática da (a) interação do cloridrato de cocaína com os grupos silanóis da sílica e (b) equilíbrio de conversão da cocaína em cloridrato de cocaína.....	57

<b>Figura 15</b> Resultados com os valores médios das onze amostras analisadas para a avaliação da homogeneidade com um intervalo de confiança de 95%.....	61
<b>Figura 16</b> O Valores médios das concentrações de benzoilecgonina durante o armazenamento em diferentes temperaturas (a) 22 °C, (b) 5 °C e (c) -8 °C com um intervalo de confiança de 95%.....	62
<b>Figura 17</b> Valores da variação da concentração de benzoilecgonina durante o armazenamento em diferentes temperaturas (a) 22 °C, (b) 5 °C e (c) -8 °C.....	63
<b>Figura 18</b> Representação química dos principais psicoativos encontrados nos comprimidos de “ecstasy” (a) MA, (b) MDMA, (c) MDA, (d) MDEA, (e) etilona, (f) dibutilona e (g) N-etilpentilona.....	66
<b>Figura 19</b> Esquema das sínteses do MDMA (a) método da aminação redutiva, (b) método de Leuckart e (c) método da bromação.....	67
<b>Figura 20</b> Esquema da metabolização do MDMA.....	68
<b>Figura 21</b> (a) Espectro de ESI (+) MS do MDMA e espectros de ESI (+) MS/MS (energia de colisão) (b) m/z 423,2 (-6,5 V) e (c) m/z 881,4 (-6,0 V) .....	74
<b>Figura 22</b> Sistema representativo de um complexo conversor molecular de luz....	78
<b>Figura 23</b> Esquema das sínteses dos complexos de európio <sup>III</sup> estudados.....	83
<b>Figura 24</b> Espectros de FTIR (a) Pic: 7- $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 - $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 - $\gamma\text{CH}$ ; (b) DVL: 1- $\nu_{\text{NH}}$ , 2 - $\nu_{\text{C=O}}$ ; (c) $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{DVL})_3]$ : 1- $\nu_{\text{NH}}$ , 2 - $\nu_{\text{C=O}}$ , 7- $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 - $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 - $\gamma\text{CH}$ ; (d) EPK: 3 - $\nu_{\text{NH}}$ , 4 - $\nu_{\text{C=O}}$ ; (e) $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{EPK})_3]$ : 3 - $\nu_{\text{NH}}$ , 4 - $\nu_{\text{C=O}}$ , 7- $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 - $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 - $\gamma\text{CH}$ ; (f) OEN: 5 - $\nu_{\text{NH}}$ , 6 - $\nu_{\text{C=O}}$ and (g) $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{OEN})_3]$ : 5 - $\nu_{\text{NH}}$ , 6 - $\nu_{\text{C=O}}$ , 7- $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 - $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 - $\gamma\text{CH}$ .....	84
<b>Figura 25</b> Esquema das síntese do complexo $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ .....	85
<b>Figura 26</b> Cédulas de R\$ 50 com os complexos estudados, sob excitação em diferentes comprimentos de onda.....	87
<b>Figura 27</b> Cédulas de R\$10, R\$20, R\$50 e R\$100 com $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{EPK})_3]$ , sob excitação em diferentes comprimentos de onda.....	88
<b>Figura 28</b> Perfil químico por LDI(+)-MS das cédulas de R\$50 (a) sem complexo de Eu <sup>III</sup> , (b) $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{DVL})_3]$ , (c) $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{EPK})_3]$ e (d) $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{OEN})_3]$ .....	89
<b>Figura 29</b> Espectros de (a) excitação com $\lambda_{\text{em}} = 612 \text{ nm}$ , (b) emissão com $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$ do complexo no estado sólido e (c) emissão com $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$ do complexo em solução etanólica.....	92

**Figura 30** (a) Espectros de emissão ( $\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$ ) monitorando a intensidade da transição  $^5D^0 \rightarrow ^7F_2$  (612 nm) do  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{PRD})(\text{H}_2\text{O})]$  em %v/v de etanol em gasolina (b) luminescência das misturadas iluminadas com lâmpada UV com comprimento de 356 nm a temperatura ambiente e (c) relação da concentração de etanol (% v/v) e  $I_0/I$ .....93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Normas para a produção e certificação de um candidato para material de referência certificado.....	22
<b>Tabela 2</b> Processos de preparação de candidatos ao MRC.....	28
<b>Tabela 3</b> Desenvolvimento de MRC para aplicação em diferentes matrizes.....	38
<b>Tabela 4</b> Perfil químico do espectro de ESI (+) MS obtido para a benzoilecgonina..	59
<b>Tabela 5</b> Dados de RMN encontrados para a benzoilecgonina em acetonitrila-d <sub>3</sub> ..	60
<b>Tabela 6</b> Valores médios encontrados para a concentração da benzoilecgonina no teste de estabilidade a curto prazo nas temperaturas de 22, 5, -8 e 50 °C.....	61
<b>Tabela 7</b> Valores médios encontrados para a concentração da benzoilecgonina no teste de estabilidade a curto prazo nas temperatura de 22, 5, -8 e 50 °C.....	63
<b>Tabela 8</b> Perfil químico do espectro de ESI (+) MS obtido para o MDMA.....	74
<b>Tabela 9</b> Dados de RMN encontrados para o MDMA em metanol-d <sub>4</sub> .....	75
<b>Tabela 10</b> Fórmula molecular, valor de massa medido e teórico, erro and DBE para os complexos Eu(pic) <sub>3</sub> .(DVL) <sub>3</sub> , Eu(pic) <sub>3</sub> .(EPK) <sub>3</sub> and Eu(pic) <sub>3</sub> .(OEN) <sub>3</sub> identificados por LDI(+)-FT-ICR MS.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - Espectrometria de absorção atômica

AE - Anidroecgonina

AEME - Éster de metilanidroecgonina

ANOVA - Análise de variância

BEZ - Benzoilecgonina

BIPM - *Bureau International des Poids et Mesures*

CCD - Cromatografia em camada delgada

CCQM - Comitê Consultivo de Quantidade de Substância: Metrologia em Química e Biologia

CETEM - Centro de Tecnologia Mineral

CG - Cromatografia gasosa

CG-MS - Cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa

COE - Cocaetileno

COMAR- Código de Indexação des Matériaux de Référence

DAD - Diode Array Detector

DESI-MS - Espectrometria de massas, desorption electrospray ionization

DMCLs - Dispositivos moleculares conversores de luz

DSC - Differential Scanning Calorimetry

EASI- MS - Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EME - Éster de metil ecgonina

ESI - Fonte de ionização por eletrospray

FTIR - Espectrometria de infravermelho com transformada de fourier

FTICR-MS - Espectrometria de massa por ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier

HCA - Hierarchical Cluster Analysis

ICP-MS - Espectrometria de massa plasmática indutivamente acoplada

ICP-OES - Espectrometria óptica plasmática indutivamente acoplada  
INCQS - Instituto Nacional de Controle da Qualidade na Saúde  
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia  
IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas  
ISO - *International Standardization Organization*  
LDI-MS - Laser desorption ionization mass spectrometry  
LQ - Limite de quantificação  
MA – Metanfetamina  
MBDB - 1,3-Benzodioxolil-N-metilbutanamina  
MDA - 3,4-metilenodioxianfetamina  
MEA - 3,4-metilenodioxietilamfetamina  
MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina  
MALDI-TOFMS - Matriz Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry  
MR - Material de referência  
MRC - Material de referência certificado  
NBS - *National Bureau of Standards*  
NIST - *National Institute of Standards and Technology*  
NOC – norcoína  
PCA - Principal Component Analysis  
PC-ES - Polícia Civil do Estado do Espírito Santo  
PLS - Partial Least Square  
RMN - Ressonância magnética nuclear  
SIMCA - Software Independent Modeling of Class Analogy  
TG - Termogravimetria  
VIM - Vocabulário Internacional da Metrologia  
WHO - World Health Organization

## RESUMO

A área da química forense vem crescendo e se desenvolvendo cada vez mais como linha de pesquisa no Brasil, e assim exige resultados cada vez mais confiáveis devido sua importância na criminalística. Desse modo, o desenvolvimento de novas que auxiliem essa área, seja na identificação e quantificação de drogas ou no combate de fraudes, se tornam promissoras. Nesse contexto, o presente trabalho explorou o desenvolvimento de materiais de referências a partir de amostras de drogas apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo (PC-ES), cocaína, crack e comprimidos de “ecstasy”. A cocaína foi isolada por meio de cromatografia em coluna, e apresentou um rendimento de isolamento de 50% para o uso da fase móvel metanol 9: 1 hidróxido de amônio com uma pureza de 98,37%. A benzoilecgonina foi sintetizada a partir da cocaína isolada, com um rendimento de 91,16% e uma pureza de 95,40%. Estudos de homogeneidade para a benzoilecgonina, indicou que o lote estudado foi homogêneo com base no teste estatístico da ANOVA por fator único, com um  $p$ -valor (0,9959) um valor médio de 976,7212  $\mu\text{g/mL}$  (1,80% de desvio padrão), com os valores de  $sbb$  igual a 22,6  $\mu\text{g/mL}$  e  $ubb$  de 1,03%. A estabilidade a curto prazo mostrou que a benzoilecgonina é estável nas temperaturas de 22, 5 e  $-8$   $^{\circ}\text{C}$  nos períodos de 15, 30 e 30 dias respectivamente. A 22  $^{\circ}\text{C}$  foi obtido um valor médio de 940,8432  $\mu\text{g/mL}$  (4,36% de desvio padrão) com  $u_{sts}$  igual a 1,22%. A 5  $^{\circ}\text{C}$  foi obtido o valor médio de 895,1915  $\mu\text{g/mL}$  (5,03% de desvio padrão) com  $u_{sts}$  de 0,28%. E a  $-8$   $^{\circ}\text{C}$  foi encontrado o valor médio de 942,2749  $\mu\text{g/mL}$  (2,49% de desvio padrão) e um valor de  $u_{sts}$  igual a 0,26%. A 50  $^{\circ}\text{C}$  se mostrou instável, devido a degradação ocorrida durante o processo de armazenamento para estudo. A partir comprimidos de “ecstasy”, foi possível isolar o MDMA por meio da CLAE e caracterizá-lo. Foi obtido um rendimento de isolamento de 91,34% m/m com uma pureza relativa de 89,49%. Também foram realizados estudos com complexos de európio<sup>III</sup> para aplicação no combate de fraudes. Os complexos  $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{DVL})_3]$ ,  $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{EPK})_3]$  e  $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{OEN})_3]$  foram avaliados como novos marcadores luminescentes para aplicação como elementos de segurança em cédulas brasileiras. Foram realizados testes qualitativos de luminescência em cédulas de R\$ 10, 20, 50 e 100 reais. Os complexos foram aplicados sobre a superfície das cédulas e foram expostos a diferentes comprimentos de onda, 254, 312 e 365 nm (Comparador Vídeo Espectral VSC® 6000) e 320 - 400 nm (Lumatec Superlite 400), sendo observada a emissão de luz vermelha európio<sup>III</sup>. O perfil químico dos complexos foi identificado nas cédulas por meio da técnica de LDI( $\pm$ )MS. Já o complexo  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{PRD})(\text{H}_2\text{O})]$  foi estudado para ser aplicado como sensor luminescente para

combater a adulteração de gasolina como etanol. A transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  (612 nm) foi monitorada com relação a variação da proporção gasolina:etanol(complexo) na faixa de 0-100 % (v/v). Foi obtido um  $R^2 = 0,9815$  e um limite de detecção de 4.94%.

**Palavras-chave:** Química forense. Material de referência. Drogas de abuso. Lantanídeos.

## ABSTRACT

The area of forensic chemistry has been growing and developing more and more as a research line in Brazil, and thus requires increasingly reliable results due to its importance in criminalistics. Thus, the development of new ones that help this area, whether in the identification and quantification of drugs or in the fight against fraud, become promising. In this context, the present work explored the development of reference materials from drug samples seized by the Civil Police of the State of Espírito Santo (PC- ES), cocaine, crack and ecstasy tablets. Cocaine was isolated by column chromatography, and presented an isolation yield of 50% for the use of the mobile methanol phase 9: 1 ammonium hydroxide with a purity of 98.37%. Benzyoecgonin was synthesized from cocaine alone, with a yield of 91.16% and a purity of 95.40%. Homogeneity studies for benzyoecgonin indicated that the studied lot was homogeneous based on the statistical test of ANOVA by single factor, with a p-value (0.9959) an average value of 976.7212  $\mu\text{g/mL}$  (1.80% standard deviation), with sbb values equal to 22.6  $\mu\text{g/mL}$  and ubb of 1.03%. Short-term stability showed that benzyoecgonin is stable at temperatures of 22, 5 and -8 °C in the 15, 30 and 30 day periods respectively. At 22 °C, an average value of 940.8432  $\mu\text{g/mL}$  (4.36% standard deviation) was obtained with usts equal to 1.22%. At 5 °C the mean value of 895.1915  $\mu\text{g/mL}$  (5.03% standard deviation) was obtained with usts of 0.28%. And at -8 °C was found the mean value of 942.2749  $\mu\text{g/mL}$  (2.49% standard deviation) and a value of usts equal to 0.26%. At 50 °C was unstable, due to the degradation that occurred during the storage process for study. From ecstasy tablets, it was possible to isolate MDMA through HPLC and characterized. An isolation yield of 91.34% m/m was obtained with a relative purity of 89.49%. Studies with europium III complexes have also been carried out for application in the fight against fraud. The complexes  $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{DVL})_3]$ ,  $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{EPK})_3]$  and  $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{OEN})_3]$  were evaluated as new luminescent markers for application as security elements in Brazilian banknotes. Qualitative luminescence tests were performed on R\$ 10, 20, 50 and 100 reais banknotes. The complexes were applied on the surface of the banknotes and were exposed to different wavelengths, 254, 312 and 365 nm (Spectral Video Comparator VSC® 6000) and 320 - 400 nm (Lumatec Superlite 400), with the emission of europium red light III. The chemical profile of the complexes was identified in the banknotes LDI( $\pm$ )MS. The complex  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{PRD})(\text{H}_2\text{O})]$  was studied to be applied as a luminescent sensor to combat

adulteration of gasoline as ethanol. The  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  (612 nm) transition was monitored in relation to the variation of the gasoline:ethanol(complex) ratio in the range of 0-100% (v/v).  $R^2 = 0.9815$  and a detection limit of 4.94%.

**Keywords:** Forensic chemistry. Reference material. Drugs of abuse. Lanthanides.

## SUMÁRIO

Capítulo 1: INTRODUÇÃO GERAL .....	19
1.1 Considerações gerais sobre materiais de referências.....	19
1.1.1 Caracterização.....	25
1.1.2 Homogeneidade.....	27
1.1.3 Estabilidade.....	32
1.1.4 Incertezas.....	34
Capítulo 2: Purificação da cocaína para uso como material de referência.....	43
2.1 INTRODUÇÃO .....	43
2.2 OBJETIVOS .....	54
2.3 METODOLOGIA .....	54
2.3.1 Isolamento da cocaína.....	55
2.3.2 Síntese da benzoilecgonia.....	56
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
2.4.1 Isolamento da cocaína.....	57
2.4.2 Síntese da benzoilecgonia.....	58
2.5 CONCLUSÃO .....	64
Capítulo 3: Isolamento do MDMA para aplicação como material de referência.....	65
3.1 INTRODUÇÃO .....	65
3.2 OBJETIVOS.....	70
3.3 METODOLOGIA .....	71
3.3.1 Isolamento do MDMA.....	71
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72

3.5 CONCLUSÃO .....	75
Capítulo 4: Aplicação de compostos de európio <sup>III</sup> como materiais de referência contra fraudes .....	76
4.1 INTRODUÇÃO .....	76
4.2 OBJETIVOS .....	80
4.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	80
4.3.1 Materiais e métodos.....	80
4.3.1.1 Marcadores luminescentes em cédulas.....	80
4.3.1.2 Sensor luminescente contra adulteração em gasolina.....	82
4.3.2 Síntese.....	82
4.3.2.1 Marcadores luminescentes em cédulas.....	82
4.3.2.2 Sensor luminescente contra adulteração em gasolina.....	84
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	85
4.4.1 Marcadores luminescentes em cédulas.....	85
4.4.2 Sensor luminescente contra adulteração em gasolina.....	91
4.5 CONCLUSÃO .....	94
5 CONCLUSÃO GERAL .....	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
ANEXOS .....	115

# 1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Considerações Gerais Sobre Materiais de Referência

A necessidade na obtenção na comparabilidade nas medições sugiu como uma necessidade da humanidade em trocar bens e produtos, e assim garantir a confiabilidade. Padrões naturais baseados no corpo humano, como mão, palma ou pé, foram usados há 6.000 a.C, contudo o primeiro registro de estabelecimento de um padrão de medidad data de 2900 a.C com a construção da grande pirâmide de Khufu no Egito. O faraó Khufu estabeleceu um padrão de comprimento por decreto real, que se baseava no comprimento do seu antebraço e mão. Esse padrão foi construído em granito preto e ficou conhecido como Côvado Real Egípcio. Todos os côvados de trabalho eram feitos em madeira e deviam ser comparados com o côvado de granito, o não cumprimento, poderia levar a punição com pena de morte. A partir de então, o desenvolvimento de padrões de referências foram evoluindo, na mesma proporção que a ciência, tecnologia e necessidade.<sup>1</sup>

A crescente busca pelo controle de qualidade, em especial em ensaios analíticos, tem levado ao uso de materiais de referências certificados cada vez mais, visto sua importância em garantir a rastreabilidade metrológica, validação de novos métodos, estimativas de incertezas, utilização em análises de rotina em laboratórios acreditados e ensaios de proficiência. Contudo, o processo de produção de um material de referência é bastante laborioso, fazendo com que sua demanda no mercado com relação ao tipo e quantidade, torna-se burocrático a obtenção.<sup>2</sup>

Normas elaboradas pela ISO (*International Standardization Organization*) como a ISO 17034 e ISO Guide 35, descrevem de forma bem estabelecida e detalhada a respeito dos procedimentos para o desenvolvimento de materiais de referência e materiais de referências certificados, o que favorece a pesquisas acadêmicas e tecnológicas ao desenvolvimento de uma variedade de materiais de referências.<sup>3</sup>

De acordo com o Vocabulário Internacional da Metrologia (VIM), um Material de Referência (MR) é considerado um material, suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, para atender a um uso pretendido em uma medição ou em um exame de propriedades qualitativas. A MR tem grande importância em testes

analíticos, pois é utilizada para calibração de métodos, atribuição de valores de propriedade a outros materiais, avaliação da eficiência do equipamento, rastreabilidade e controle de qualidade.<sup>4</sup>

No entanto, de acordo com a ISO GUIA 30, existem três termos que devem ser diferenciados: material de referência (MR), material de referência certificado (MRC) e material de referência do candidato.<sup>5</sup>

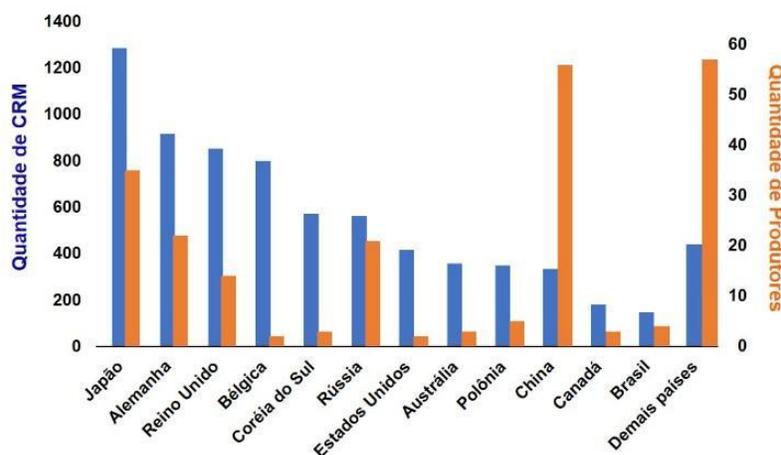
O MR é definido como material suficientemente homogêneo e estável em relação às propriedades específicas, sendo preparada para atender a um uso pretendido em uma medição ou exame de características qualitativas e quantitativas. O MRC é um material caracterizado por um procedimento metrológico válido para uma ou mais propriedades específicas, sendo acompanhado de um certificado que fornece valores de propriedades específicas compostas de incertezas associadas e rastreabilidade metrológica. O material de referência do candidato é produzido como material de referência, que deve ser caracterizado e avaliado para garantir seu uso adequado em procedimentos analíticos. Para ser reconhecido como MR, algumas propriedades devem ser avaliadas como homogeneidade e estabilidade do material candidato.<sup>6</sup>

O interesse no desenvolvimento das primeiras amostras de referência e materiais de referência está ligado ao início da química analítica. Inicialmente, por volta do século XIX, os reagentes químicos utilizados tinham um baixo grau de pureza, o que levou à purificação dos materiais a serem usados como padrões primários. O trióxido de arsênio ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) foi um dos primeiros padrões recomendados pela GayLussac. E em 1880, foi desenvolvido em Londres, o primeiro material de referência biológica para determinar a gordura do leite e identificar leite adulterado.<sup>7</sup>

Em 1906, com a necessidade de comparar resultados analíticos entre laboratórios de diferentes países, levou à criação nos Estados Unidos, o *National Bureau of Standards* (NBS), hoje conhecido como *National Institute of Standards and Technology* (NIST), que iniciou o programa de produção de materiais de referência para atender à demanda por padrões de engenharia industrial e à indústria metalúrgica, que foi feita pela primeira vez como material de referência para ferro fundido, chamou de "amostra padrão". Essa iniciativa surgiu para evitar futuras perdas de vidas, uma vez que os descarrilamentos dos trens que ocorram constantemente se devem à fratura das rodas de ferro fundido.<sup>8</sup>

Em 1993, valorizando a confiabilidade e a comparabilidade dos resultados das medições químicas, o *Bureau International des Poids et Mesures* (BIPM) e o *Comité Consultivo de Quantidade de Substância: Metrologia em Química e Biologia* (CCQM), referência em discussões relacionadas à metrologia química no mundo criado.<sup>9</sup>

De acordo com o COMAR (Código de Indexação des Matériaux de Référence), que visa disseminar informações sobre produtores e materiais de referência disponíveis em diversos países, estima-se que em 2019-2020 foram produzidos cerca de 7.200 CRMs de 197 produtores de 26 países. Japão, Alemanha, Reino Unido, Bélgica e Coreia do Sul foram os cinco maiores produtores. A Figura 1 mostra o número de produtores e MRCs produzidos pelos países registrados pelo COMAR.<sup>10</sup>



**Figura 1.** Número de materiais de referência certificados produzidos no mundo e quantidade de produtores por país entre 2019-2020, segundo o COMAR.

Apesar do grande número de materiais produzidos no mundo, há certas restrições na seleção e uso desses materiais, uma vez que não há MRCs suficientes para as variedades de amostras e análises. Entre essas limitações, pode-se mencionar o tempo de preparação e certificação do material relacionado às despesas associadas; alto custo de aquisição e validade do material. Isso motivou vários laboratórios a produzir matricial de matriz semelhante a amostras.<sup>11,12</sup>

A ISO GUIA 30 a 35 são responsáveis pela padronização do desenvolvimento e

produção de um material de referência certificado, desde termos e definições relacionados ao MRC até os métodos estatísticos a serem empregados. A Tabela 1 apresenta os principais padrões criados pela ISO.<sup>13,14</sup>

**Tabela 1.** Normas para a produção e certificação de um candidato para material de referência certificado.

<b>Norma ISO</b>	<b>Conteúdo</b>
GUIA 30	Termos e Definições Relacionados a Materiais de Referência
GUIA 31	Conteúdo do Certificado de Materiais de Referência
GUIA 32	Calibração em Química Analítica e Uso de Materiais de Referência Certificados
GUIA 33	Uso de Materiais de Referência
GUIA 34	Requisitos Gerais para a Competência dos Produtores de Materiais de Referência
GUIA 35	Certificação de Materiais de Referência - Princípios Gerais e Estatísticos

Além das normas mencionadas acima, o ISO GUIA 17025 também é outra ferramenta valiosa para as atividades de desenvolvimento e produção de um material de referência certificado, para atender aos requisitos gerais para a competência de teste laboratorial tais como: validação do método, estimativa de incerteza e controle de qualidade.<sup>15</sup>

A produção de materiais de referência possui várias etapas para garantir a qualidade do material produzido, para sua alicação na avaliação de tendência, precisão e análises diretas. Um aspecto importante, é que o material de referência deve ser suficientemente semelhante em termos de matriz com à amostra que será analisada, com intuito de se reproduzir ao máximo todos os problemas analíticos causadores de erros. Em sua maioria, esses materiais são produzidos a partir de amostras naturais que serão fortificadas com o analito de interesse para se chegar na concentração desejada, porém haverá a falta de rastreabilidade metrológica envolvida na etapa de preparo. De acordo com a ISO, as etapas de preparação e certificação envolvem as seguintes etapas de acordo com o diagrama abaixo (Figura 2).<sup>16,17</sup>

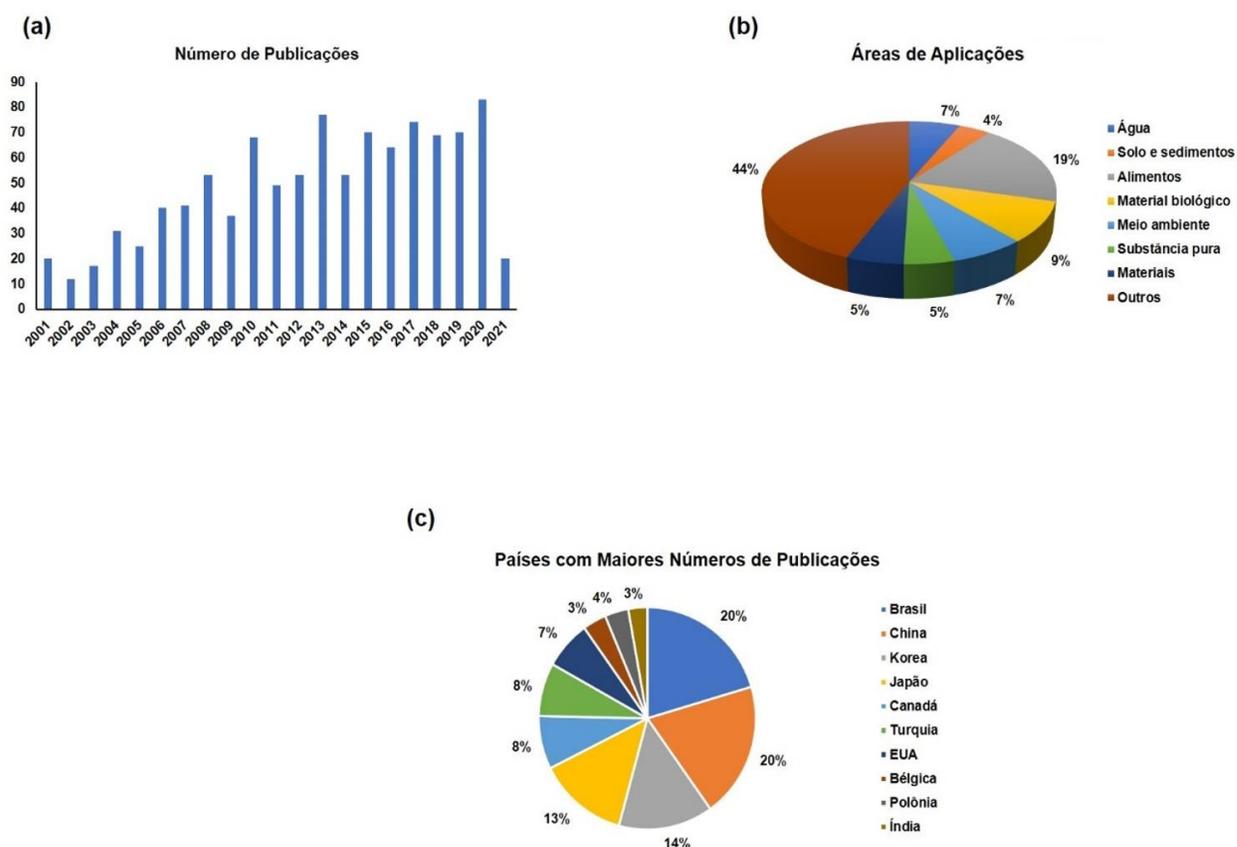


**Figura 2.** Etapas de produção de um MRC. Adaptado ISO 2017.

A aquisição de um material de partida é a etapa inicial no processo de produção de um material de referência, um aspecto importante a ser levado, é que a quantidade do material de partida para matrizes naturais dependendo do processamento pode levar a quantidades material com relação ao material de partida bem baixo. Hon *et al.* (2011)<sup>18</sup>, para produzir um material de referência para leite liofilizado partiu de 20 L de material de partida para se chegar em 1500 g de material. Zhu *et al.* (2011)<sup>19</sup> para obter 14,64 Kg de chá em pó como material de referência, precisou utilizar 100 Kg de quantidade amostrada. E Yarita *et al.* (2014)<sup>20</sup>, para produzir 2,0 Kg de material de referência para soja, necessitou de 10 Kg de amostra de partida. Na etapa de preparação ou processamento, deve-se assegurar que o material sofrerá o tratamento adequado para a aplicação pretendida. Contudo a ISO 2017 não define uma regra única a respeito do assunto. Por exemplo, materiais de referência sintéticos, que são produzidos a partir de substâncias, podem ser utilizadas técnicas de purificação, como destilação, recristalização e de separação por meio de técnicas cromatográficas. Já materiais de referência produzidos a partir de matrizes naturais a preparação e processamento podem ser mais complexos. Além disso, esses procedimentos estarão ligados diretamente a particularidades do material como tipo e matriz, assim, se faz necessário estudos prévios com relação a tratamento adequado, pré-tratamento e formulação, que viabilizem a

produção e caracterização de um material de referência.<sup>17</sup>

Os materiais de referência têm como principais aplicações a avaliação da precisão, avaliação da tendência de medição (*bias* - estimativa sistemática de erros), calibração, atribuições para escalas convencionais e para outros materiais. Observa-se grande interesse nos estudos para o desenvolvimento da nova MRC.<sup>21</sup> A Figura 3 mostra o levantamento bibliográfico através da busca pelo "desenvolvimento de material de referência certificado" com base na Web of Science e Scopus no período 2001-2021 em um total de 294 publicações, nas quais foram encontrados o número de publicações e os principais países que mais publicaram sobre o assunto.



**Figura 3.** Levantamento bibliográfico com o termo “*development of certified reference material*” (a) número de publicações (b) áreas de aplicação dos MRCs e (c) países com maiores números de publicações nas bases da *Web of Science* e *Scopus* entre 2001-2021.

Os materiais de referência são caracterizados de acordo com a precisão de todo o processo experimental e o valor certificado da propriedade representa a melhor estimativa do valor real. A incerteza do valor da propriedade deve considerar todos os efeitos casuais e sistemáticos relacionados ao processo de medição, variabilidade entre as amostras (homogeneidade) e o prazo de validade do material (estabilidade). Segundo a ISO GUIA 35, a produção de uma MRC envolve três estudos principais: caracterização, homogeneidade e estabilidade. A Figura 4 representa os passos fundamentais para a determinação da estimativa de incerteza.<sup>22</sup>



**Figura 4.** Esquema representativo da estimativa de incerteza de um candidato para material de referência certificado.

### 1.1.1 Caracterização

A caracterização do material segue a norma ISO GUIA 34 e é realizada com o uso de métodos primários recomendados pelo CCQM, que são indicados devido à alta precisão e rastreabilidade. Entre esses métodos estão a gravimétrica, titulométrica, coulométrica e espectrometria das massas de diluição de isótopos. No entanto, existem outros métodos primários que não estão incluídos no CCQM, e que atendem à caracterização exigida pelo MRC.<sup>23</sup> A caracterização visa determinar todas as propriedades químicas físicas do candidato para material de referência, como umidade, impurezas inorgânicas e impurezas orgânicas, que participam do equilíbrio de massa da pureza total do MRC.<sup>24,25</sup>

A ISO GUIA 34 e 35 sugerem a utilização de quatro procedimentos a serem utilizados na caracterização do material de referência: uso de método primário em um único laboratório; medições por dois ou mais métodos de referência independentes no mesmo laboratório; laboratórios utilizando métodos de precisão demonstrativos e estudo interlaboratório. A escolha apropriada dependerá do tipo de material de referência e seu uso. A literatura relata o uso de testes interlaboratoriais como os mais comuns e as exclusões de outliers são realizadas com o teste de Grubb no nível de confiança de 95%.<sup>26-29</sup>

Dai *et al.* (2011)<sup>30</sup>, propôs o desenvolvimento de dois novos MRCs de creatinina no soro humano, nos quais são descritos procedimentos de preparação amostral, certificação, estudo de estabilidade, homogeneidade e avaliação da incerteza. E para a caracterização do material, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massa de diluição de isótopos. Neste estudo, foram encontrados os valores de incertezas relativas expandidas de 1,2% e 1,1% para creatinina-1 e creatinina-2, respectivamente. Os valores de referência certificados foram validados pela comparação de valores certificados pelos MRCs NIST, que apresentaram valores de 0,3% e 0,07% de desvio relativo e completamente dentro da incerteza ampliada. Nesse contexto, os dois novos MRCs de creatinina demonstraram viável para uso em métodos de calibração em diagnósticos e avaliação de métodos clínicos de rotina.

Chew *et al.* (2016)<sup>31</sup>, desenvolveu um material de referência para análise de cálcio, arsênico, cádmio e cogumelo de chumbo. O MRC foi preparado a partir da fortificação de aproximadamente 0,2 g de pó de cogumelo com os respectivos metais. Para sua caracterização, utilizou-se a técnica de espectrometria de massa de diluição de isótopos. O MRC foi certificado com base em um MRC NIST. Os valores obtidos com a certificação foram de  $1.444 \pm 0,099$  mg/g para cálcio,  $5,61 \pm 0,59$  mg/kg para arsênico,  $1.191 \pm 0,079$  mg/kg para cádmio e  $5,23 \pm 0,94$  mg/kg para chumbo. As incertezas de medição ampliada foram obtidas pelas combinações de incerteza da caracterização ( $u_{char}$ ) e entre homogeneidade ( $u_{bb}$ ).

Yang *et al.* (2019)<sup>32</sup>, desenvolveu um material de referência a ser utilizado na determinação da enrofloxacin em ovos, que é um antibiótico administrado em aves. A amostragem de ovos com a droga foi obtida naturalmente pela administração de

enrofloxacin oralmente em galinhas poedeiras. Para a caracterização da MRC, a cromatografia líquida com espectrometria de massa de diluição de isótopos foi utilizada como método de referência confiável. Obteve-se um valor certificado de 30,6  $\mu$  g/kg com incerteza ampliada de 3,1  $\mu$  g/kg (fator de cobertura  $k$  = intervalo de confiança de 2 e 95%). Os testes de homogeneidade e estabilidade mostraram que o CABG proposto é válido por 12 meses a -70 °C, e prazo de validade de 9 dias armazenados a -18 °C e 4 °C.

Tangpaisarnkul *et al.* (2018)<sup>33</sup>, desenvolveu um MRC de stevia, um açúcar natural não calórico, extraído das folhas de *Stevia rebusiana* (Bertoni). As técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear (RMN) foram utilizadas para caracterizar o candidato para material de referência. As impurezas foram determinadas pela titulação de Karl Fischer para umidade e análise termogravimétrica para resíduos inorgânicos. Os valores de pureza foram obtidos em -20 °C, 98.676  $\pm$  0,117% para HPLC e 98.775  $\pm$  0,114% para RMN, demonstrando estar em acordo. O MRC ficou estável a 50 °C por um mês, e a 23 °C, 4 °C e -20 °C em um período de um ano. Estudos de estabilidade, juntamente com estudos de homogeneidade, forneceram um valor certificado de 0,986  $\pm$  0,0019 ( $k$  = 2).

Marchezi *et al.* (2020)<sup>34</sup>, desenvolveu um material de referência para a quantificação de vanádio, níquel, magnésio, sódio, cálcio, estrôncio e bário em petróleo bruto. Cerca de 3 kg de petróleo bruto foram processados e distribuídos em 115 unidades, cada uma contendo 20 g. O MRC foi caracterizado pela espectrometria de absorção atômica (AAS) e espectrometria óptica plasmática indutivamente acoplada (ICP-OES) e espectrometria de massa plasmática indutivamente acoplada (ICP-MS).

### 1.1.2. Homogeneidade

O estudo da homogeneidade da amostra é um dos fatores essenciais para garantir a conservação das propriedades físicas e químicas do material. A ISO GUIA 35 descreve que o número de amostras dentro de um lote a ser selecionado aleatoriamente deve incluir de 10 a 30 unidades do lote preparado. Uma recomendação é aumentar o número

de unidades à medida que o lote aumenta. Os dados obtidos para o teste de homogeneidade devem ser realizados em condições de repetibilidade extrema, com o mesmo laboratório, mesmo analista e todas as amostras devem ser testadas no mesmo dia. Além disso, a variabilidade entre frascos deve incluir relativa incerteza. O estudo também utiliza a análise de variância de fator único (ANOVA). A análise baseia-se na comparação de  $F_{\text{calculado}}$ , obtida pela expressão  $F_{\text{calculado}} = MQ_{\text{entre}} / MQ_{\text{dentro}}$ , onde  $MQ_{\text{entre}}$  representa as médias quadrática entre os grupos e  $MS_{\text{dentro}}$  representa média quadrática dentro dos grupos, com o  $F_{\text{crítico}}$  da tabela de nível de significância  $\alpha = 0,05$  e os graus de liberdade para  $QM_{\text{entre}}$  e  $QM_{\text{dentro}}$ . Se  $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$ , o lote é considerado homogêneo.<sup>35</sup>

A matriz material é um fator crítico que controla os procedimentos de análise química, bem como a inclusão do tratamento e medição das amostras. A literatura relata diversos estudos com o objetivo de desenvolver diversos MRC em diferentes matrizes, como água, solo, sedimentos, material biológico, meio ambiente, substância pura e materiais.<sup>36-41</sup>

Alguns procedimentos como secagem, moagem, lavagem, ajuste de pH, congelamento, filtração, irradiação gama, pasteurização e liofilização são recomendados para que o processamento do material de referência tenha um material suficientemente estável e homogêneo. A Tabela 2 apresenta alguns processos utilizados para tratar a MRC de acordo com a matriz.

**Tabela 2.** Processos de preparação de candidatos ao MRC.

Processo	Matriz	Analito	Ref.
Ajuste de pH	Água	Pb, Cd, Ni, As, Cr, Zn, Mn e Al	Uribe et al. (2017) <sup>42</sup>
	Água do mar	Mercury	Sánchez et al. (2015) <sup>43</sup>
Congelamento	Tecido de mexilhões ( <i>Mytilus edulis</i> )	Azspiracidas	McCarron et al. (2015) <sup>44</sup>
	Pepino	Pesticidas	Grimalt et al. (2015) <sup>45</sup>
	Batata e cenoura	Pesticidas	Saldanha et al. (2012) <sup>46</sup>
Filtração	Solo	Benzo(α)pireno	Baquero et al. (2022) <sup>47</sup>

	Drogas	Baicaleína	Gong et al. (2014) <sup>48</sup>
	Carne de frango	Prata	Grombe et al. (2015) <sup>49</sup>
Irradiação gama	Cogumelo em pó	Ca, As, Cd e Pb	Chew et al. (2016) <sup>50</sup>
	Frango	Nitrofurano	Violante et al. (2018) <sup>51</sup>
Lavagem	Cabelo	Ca, Cd, Cr,, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, Sr, e Zn	Okamoto et al. (1985) <sup>52</sup>
	Carne de frango	Fluoroquinolone	Hyung et al. (2017) <sup>53</sup>
Liofilização	Leite	Melanina	Hon et al. (2001) <sup>54</sup>
	Soro humano	Creatinina	Dai et al. (2011) <sup>55</sup>
	Músculo bovino	As, Cr, Cd, e Pb	Caroli et al. (2000) <sup>56</sup>
	Queijo	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxina A	Zeleny et al. (2015) <sup>57</sup>
Moagem	Algas marinhas ( <i>Thallus laminaria</i> )	Minerais nutricionais, espécies de arsênico, isômeros de vitamina K1 e elementos tóxicos	Yu et al. (2018) <sup>58</sup>
	Minério	Cromo	Cheng et al. (2016) <sup>59</sup>
	Torrada de pão	Acrilamida	Dabrio et al. (2008) <sup>60</sup>
Pasteurização	Carne	Hidroxiprolina	Liscio et al. (2016) <sup>61</sup>
	Leite	Células somáticas	Marzo et al. (2016) <sup>62</sup>
Secagem	Sedimentos	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Fang et al. (2015) <sup>63</sup>
	Trigo	Micotoxinas fusarium	Köppen et al.(2013) <sup>64</sup>
	Mel	Pinocembrin	Zhang et al. (2016) <sup>65</sup>

A literatura relata diversos trabalhos com candidatos do MRC, como Cardoso et al. (2010)<sup>66</sup>, preparou um material de referência certificado para o controle de agrotóxicos em frutas e hortaliças. Neste trabalho, foram utilizados quatro pesticidas ( $\gamma$ -HCH, fenitroção, clorpirifos e procimidono), que foram adicionados à polpa de tomate para preparar o candidato à MRC, e após a preparação foram expostos à radiação gama para esterilização. Neste trabalho, foi realizado o estudo de homogeneidade e utilizada a

técnica de cromatografia gasosa acoplada a um detector de massa seletiva para caracterizar o MRC. Neste estudo, concentrações certificadas de  $0,191 \pm 0,047$  mg/kg;  $0,192 \pm 0,068$  mg/kg;  $0,225 \pm 0,076$  mg/kg e  $0,177 \pm 0,051$  mg/kg para  $\gamma$ -HCH, fenitroção, clorpirifos e procimidone, respectivamente foram encontrados.

Otake et al. (2013)<sup>67</sup>, propôs um material de referência de maçã certificado para a análise de resíduos de quatro pesticidas, três organofosfatos (diazinon, fenitrocion e clorofilos) e um da classe piretoride (permetrina). A preparação do MRC consistiu no uso de maçãs que foram pulverizadas com pesticidas, que foram colhidas, cortadas em pequenos pedaços, liofilizadas, pulverizadas, peneiradas e armazenadas com uma massa de 3 g em frascos âmbar, totalizando 200 garrafas. Foi realizada a avaliação de estabilidade e homogeneidade, a partir destas, obtida uma data de validade de 32 meses. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de diluição de isótopos foi utilizada para a caracterização do MRC, os valores certificados de  $2,28 \pm 0,82$  mg/kg para diazinon,  $3,14 \pm 0,79$  mg/kg para fenitroção,  $1,55 \pm 0,81$  mg/kg para cipermetrina e  $2,81 \pm 0,70$  mg/kg para permeína foram obtidos. Com base nos resultados obtidos no estudo, o CRM proposto mostrou-se promissor para o controle de pesticidas para análise de maçã.

Yarida et al. (2014)<sup>68</sup> propôs uma MRC de soja para a análise de quatro pesticidas, sendo o mesmo estudado por Otake et al. (2013)<sup>67</sup>, três organofosfatos (diazinon, fenitroção e cloretos) e um da classe piretoride (permetrina). Os pesticidas foram pulverizados na soja, três vezes antes da colheita. E esta soja foi congelada, pulverizada, homogeneizada, armazenada em frascos, e esterilizada com radiação gama. Foram utilizadas as técnicas de espectrometria de massa de isótopos e cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massa (CG-MS), ambas com resultados de acordo e satisfatórias. Os testes de homogeneidade e estabilidade inferiram uma data de validade de 55 meses. As concentrações certificadas de pesticidas com incertezas (fator de cobertura  $k = 2$ , com intervalo de confiança de 95), foram de  $21,7 \pm 3,2$   $\mu$ g/kg para diazinon,  $88 \pm 21$   $\mu$ g/kg para fenitroção,  $11,1 \pm 3,2$   $\mu$ g/kg para clorifilia e  $20,1 \pm 4,3$   $\mu$ g/kg para permetrina.

Fraga et al. (2012)<sup>69</sup> desenvolveu um MRC para bioetanol utilizando estudos de certificação baseados em três importantes parâmetros de qualidade eletroquímica (número de ácido total, pH e condutividade eletrolítica). Foi utilizado um lote de

aproximadamente 40 L de bioetanol de cana-de-açúcar, que foi engarrafado em 200 garrafas âmbar de 500 mL. Os resultados certificados obtidos para o número total de ácido, pH e condutividade eletrólito foram de  $16,2 \pm 1,7$  mg/L,  $6,07 \pm 0,30$  e  $1,03 \pm 0,11$   $\mu$ S/cm, respectivamente. Assim, este estudo mostrou-se uma ferramenta útil para a qualidade do comércio de bioetanol, além de sua utilização para garantir resultados de medição com rastreabilidade e confiabilidade metrológicas.

Ng et al. (2015)<sup>70</sup> desenvolveu um material de referência certificado para creme cosmético contendo chumbo, mercúrio e arsênico. O MRC foi caracterizado pela espectrometria de massa de diluição de isótopos. O teor metálico foi considerado homogêneo e estável por um período de 14 dias a 46 °C (estabilidade de curto prazo) e 6 meses à temperatura ambiente (estabilidade a longo prazo). As incertezas expandidas foram obtidas no nível de confiança de 95% para chumbo ( $26,14 \pm 0,76$  mg/kg), mercúrio ( $2,956 \pm 0,092$  mg/kg) e arsênico ( $5,25 \pm 0,28$  mg/kg) foram 2,90%, 3,11% e 5,38%.

O teste ANOVA é o mais abordado para avaliar a homogeneidade e estabilidade do candidato ao material de referência. As ferramentas quimiométricas como PCA (Principal Component Analysis) e HCA (Hierarchical Cluster Analysis) também são exploradas e aplicadas em conjunto com a análise de variância. Castro et al. (2017)<sup>71</sup> descreveram e avaliaram os resultados de seu trabalho por meio de técnicas univariadas e multivariadas, de um candidato a material de referência do rim bovino, e neste estudo foi demonstrada a utilidade das técnicas quimiométricas para avaliação da homogeneidade, sendo uma nova ferramenta para auxiliar na certificação.

Santos et al. (2020)<sup>72</sup> avaliaram a homogeneidade de um candidato para material de referência do leite em pó, utilizando ferramentas quimiométricas (PCA e HCA) como alternativa para a ANOVA. Os resultados da ANOVA, PCA e HCA permitiram afirmar que o material pode ser considerado homogêneo. Com a aplicação de ferramentas quimiométricas, permitiu extrair mais informações em relação à ANOVA, indicando as possíveis causas de dispersão dos resultados.

### 1.1.3. Estabilidade

Os estudos de estabilidade também são pré-requisitos nas etapas de certificação de um MRC, e visam avaliar sua estabilidade após sua preparação em períodos específicos e temperatura, pois o candidato ao MRC pode ser suscetível à degradação por temperatura, luz, oxigênio, umidade, atividade microbológica, entre outros. O estudo de estabilidade é realizado por meio de dois testes distintos: estabilidade de curto e longo prazo.<sup>73</sup>

A estabilidade de curto prazo visa simular as condições de transporte, avaliando se o material não sofrerá degradação pela mudança de temperatura ao longo dele. Neste ensaio, os frascos com o material são mantidos em temperaturas diferentes e analisados em função do tempo, para verificar possíveis alterações em suas propriedades. Por outro lado, a estabilidade a longo prazo simula o tempo de prateleira que o MR é armazenado pelo produtor, assim, as condições ideais de armazenamento são definidas. De acordo com a ISO GUIA 35, para o desenvolvimento deste estudo, a longo prazo recomenda-se utilizar pelo menos 10 a 12 frascos e, a curto prazo, são necessários pelo menos 6 a 10 frascos, sendo necessários dois réplicas. Para este teste, o material é armazenado em condições extremas, com temperatura de 40 °C ou superior.<sup>74,75</sup> Chen et al. (2021)<sup>76</sup> desenvolveram um material de referência certificado para metronidazol em pó de ovo. A estabilidade foi estimada após ser armazenada em -20 °C por 0, 1, 3, 5, 6 e 13 meses, a 4 °C, em temperatura ambiente e a 40 °C, o que simulou uma possível condição de transporte por 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias. O material de referência foi estável em todas as condições.

Nogueira et al. (2011)<sup>77</sup> desenvolveram um estudo utilizando o captopril como material de referência para aplicação na área farmacêutica. Neste trabalho, utilizou-se a temperatura de armazenamento de 50 °C para estudar a estabilidade a curto prazo e o desenho clássico, que é feito em condições de reprodutibilidade. Todos os frascos foram submetidos a 50 °C ao mesmo tempo e analisados individualmente em dias pré-determinados. Neste tipo de estudo, são esperados resultados com altos níveis de incerteza devido a possíveis variações no sistema utilizado para a realização das medições. Com base no teste ANOVA, a estabilidade do captopril a 50 °C foi confirmada

durante 12 dias.

Além disso, a condução do teste de estabilidade segue o uso do teste desenvolvido por Lamberty et al. (1998)<sup>78</sup> chamado de "design isocróno", que se baseia no estoque de amostras em diferentes temperaturas por diferentes períodos, com a análise das diferentes amostras ao mesmo tempo. Todas as amostras são armazenadas a uma temperatura muito baixa ou são congeladas para garantir a conservação do MRC. Em seguida, eles são movidos desta temperatura para a temperatura de armazenamento para ser estudado em diferentes momentos. No final do período, as amostras são imediatamente analisadas.<sup>78</sup>

As vantagens desse método são que estudos de estabilidade podem ser realizados em condições repetitivas como as utilizadas em estudos de homogeneidade, o que facilita a implementação, já que a reprodutibilidade a longo prazo não é necessária. A avaliação pode ser feita temperatura por temperatura, começando com as amostras armazenadas em temperaturas mais altas. Se a instabilidade for detectada depois de um tempo, pode-se optar por não continuar analisando mais amostras por muito mais tempo e começar a analisar as amostras armazenadas na temperatura mais baixa.<sup>78,79</sup>

A desvantagem desse método é a necessidade de um número maior de amostras a serem medidas em um curto período. Sendo aconselhável estender o regime de curto prazo de 3 para 6 meses, para obter informações de estabilidade suficientes. Para testes de homogeneidade e estabilidade, devem ser escolhidos métodos altamente repetitivos. Caso necessite, a repetibilidade pode ser melhorada aumentando o número de medições.<sup>35,78</sup>

Rego et al. (2017)<sup>80</sup> desenvolveram um candidato ao MRC para cloromfenicol (CAP) no leite, que é um antibiótico proibido para o tratamento de animais produtores de alimentos. A CAP foi caracterizada pela cromatografia líquida aliada à espectrometria de massa de diluição de isótopos e o teor de água presente no MRC foi determinado pela titulação coulométrica de Karl Fischer. O resíduo de água foi reduzido por congelamento, o que melhorou a estabilidade do MRC, diminuindo a chance de degradação microbiana. O MRC apresentou-se estável por 10 meses e foi armazenado a -80 °C e apresentou homogeneidade de 5%, demonstrando ser viável para o controle da qualidade do leite.

Santos et al. (2022)<sup>81</sup> utilizou-se a ANOVA-PCA para investigar os resultados

experimentais de estabilidade do material de referência laboratorial. Além disso, utilizou-se o método de classificação SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogies), um método de classificação de classe única e pode ser bastante útil na interpretação dos resultados de um estudo colaborativo, para analisar o conjunto de parâmetros medidos através do estudo interlaboratório.

#### 1.1.4. Incertezas

A incerteza do valor estimado considera todos os efeitos sistemáticos inerentes ao processo de medição, caracterização, homogeneidade, estabilidade de curto e longo prazo. Os fatores que contribuem como fontes de incerteza podem ser ilustrados em um diagrama de causa e efeito  $(u_{char})(u_{bb})(u_{sts})(u_{lts})$ .<sup>82</sup>

De acordo com a ISO GUIA 35, a incerteza combinada ( $u_c$ ) da incerteza expandida ( $U_{CRM}$ ) pode ser descrita pelas seguintes equações e  $k$  é fator de cobertura no nível de confiança de 95%:<sup>32,83</sup>

$$u_c = \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2} \quad (1)$$

$$U_{CRM} = u_c \times k \quad (2)$$

Zapatarietxe et al. (2016)<sup>84</sup> descreveu que a incerteza de caracterização pode ser calculada pelo desvio padrão da medição do número de laboratórios envolvidos em análises interlaboratoriais, de acordo com as Equações 3 e 4:

$$u_{char} = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad (3)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (x'_i - x'')^2} \quad (4)$$

Onde,  $s$  é o desvio padrão das medições realizadas e  $(p - 1)$  é o número de laboratórios de direita de parte. Na Equação 4  $x'_i$  é a média de cada laboratório;  $x''$  é a média de todos os resultados.<sup>84</sup>

Lee *et al.* (2013)<sup>85</sup> relatou em seu estudo as equações envolvidas no teste de homogeneidade, que é avaliado segundo a ANOVA. A incerteza fornecida é obtida de acordo com a Equação 5:

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{QM_{entre} - QM_{dentro}}{n}} \quad (5)$$

Onde:  $s_{bb}$  variância entre os recipientes;  $n$  é o número de replicatas.<sup>85</sup>

Para calcular a homogeneidade existente entre grupo que pode ser mascarado pelo método de repetibilidade ( $u_{bb}$ ), Equação 6:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{QM_{dentro}}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_{QM_{dentro}}}} \quad (6)$$

Onde,  $u_{bb}$  está a homogeneidade da incerteza; e  $v_{QM_{dentro}}$  é o grau de liberdade de  $QM_{dentro}$ .<sup>86</sup>

Yarita *et al.* (2014)<sup>87</sup> informou que, para avaliar a estabilidade de longo e curto prazo, a regressão linear é utilizada para verificar a tendência dos resultados, que segue de acordo com a ISO GUIA 35. O material é considerado estável se a inclinação da linha for menor que o produto entre o teste  $t$  e o desvio padrão da inclinação da linha, calculada utilizando-se das Equações 7 e 8.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (7)$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (8)$$

Onde,  $b_1$  é a inclinação da linha;  $b_0$  é a interceptação no eixo  $y$ ;  $X_i$  e  $Y_i$  representam o tempo decorrido e concentrações relativas, respectivamente;  $\bar{X}$  e  $\bar{Y}$  representam a média de  $X_i$  e  $Y_i$  respectivamente.<sup>87</sup>

A Equação 9 é usada para calcular o desvio padrão de  $b_1$  |  $s(b_1)$ :

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (9)$$

Onde,  $s$  é o desvio padrão calculado usando a Equação 10 :

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 \cdot X_i)^2}{n-2} \quad (10)$$

De acordo com Yang et al. (2017)<sup>88</sup> deve-se analisar a inclinação da reta ( $b_1$ ) o produto do desvio padrão da inclinação da reta com o teste t de Student ( $t_{(0,95,n-2)} \cdot s(b_1)$ ). A condição  $|b_1| < (t_{(0,95,n-2)} \cdot s(b_1))$  deve ser atendida para que o MRC seja considerado estável para as temperaturas em estudo, além disso, o teste de ANOVA deve ser realizado. Assim, as Equações 11 e 12 são utilizadas para calcular as incertezas de longo ( $u_{(lts)}$ ) e curto prazo ( $u_{(sts)}$ ), respectivamente:<sup>88</sup>

$$u_{(lts)} = t \cdot s_{(b1')} \quad (11)$$

$$u_{(sts)} = t \cdot s_{(b1)} \quad (12)$$

Onde,  $s_{(b1')}$  é o desvio da inclinação da regressão linear a longo prazo;  $s_{(b1)}$  é o desvio da inclinação da regressão linear no curto prazo;  $t$  corresponde ao tempo em meses.

A pureza é outro parâmetro importante a ser determinado do candidato a material de referência. Goff et al. (2008)<sup>89</sup> descreveu a determinação da pureza usando CLAE com detector DAD (Diode Array Detector), onde o valor total da pureza foi calculado usando a Equação 13:

$$P_{total} = \left( 1 - \left[ \frac{\%umidade + \%inorganico}{100} \right] \right) \cdot P_{organico} \quad (13)$$

Onde,  $P_{\text{total}}$  é pureza total; % $_{\text{umidade}}$  corresponde à água presente em %m/m; % $_{\text{inorgânico}}$  são os componentes inorgânicos presentes em %m/m e  $P_{\text{organic}}$  é pureza determinada pela CLAE-DAD.<sup>89</sup>

Ma et al. (2009)<sup>90</sup> descreveu a determinação da pureza por meio de DSC (Differential Scanning Calorimetry), obtida com base na lei de Van't Hoff (Equação 14) e sua derivada (Equação 15), e a determinação do valor da pureza por este método é feita de forma rápida, precisa e na prática.

$$T_0 - T_m = \left( \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \right) \cdot x \quad (14)$$

$$T_0 - T_s = \left( \frac{RT_0^2 x}{\Delta H_f} \right) \cdot \left( \frac{1}{F} \right) \quad (15)$$

Onde,  $T_0$  é a temperatura de fusão do composto puro;  $T_m$  é a temperatura de fusão medida;  $R$  é a constante dos gases;  $\Delta H_f$  é a entalpia molar de fusão;  $x$  é uma fração molar de impurezas na substância. Na Equação 15,  $T_s$  está a temperatura de fusão de equilíbrio;  $F$  é a fração derretida. Como,  $T_0$ ,  $R$ ,  $x$  e  $\Delta H_f$  são mantidos constantes,  $T_s$  varia linearmente com, portanto, a fração molar ( $1/Fx$ ) pode ser calculada por meio da inclinação da linha.<sup>90</sup>

Liu et al. (2009)<sup>91</sup>, relatou a determinação da pureza de um candidato à material de referência utilizando a técnica de RMN. Para essa metodologia, um sinal característico no espectro RMN do composto em questão é comparado com um sinal de um padrão interno, para o estudo, foi usado o ácido maléico. O valor da pureza foi determinado de acordo com a Equação 16:

$$P_x = \frac{I_x \cdot N_{\text{padrão}} \cdot M_x \cdot m_{\text{padrão}}}{I_{\text{padrão}} \cdot N_x \cdot M_{\text{padrão}} \cdot m} \cdot P_{\text{padrão}} \quad (16)$$

Onde,  $I_{\text{padrão}}$  e  $I_x$  são as áreas integradas do padrão interno e amostra, respectivamente;  $N_{\text{padrão}}$  e  $N_x$  são os números de spin do padrão interno e da amostra,

respectivamente;  $M_{padrão}$  e  $M_x$  são as massas molares do padrão interno e da amostra, respectivamente;  $m_{padrão}$  é a massa do padrão interno;  $m$  é a massa da amostra e  $P_{padrão}$  é a pureza do padrão interno.<sup>91</sup>

Para o cálculo final da pureza por meio do equilíbrio de massa, devem ser determinadas impurezas que possam estar presentes no material. A determinação das impurezas inorgânicas foi relatada por Westwood et al. (2013)<sup>92</sup> utilizando a técnica de termogravimetria (TG), e para a determinação da umidade presente no candidato a MRC, foi relatado por Yazgan et al. (2006)<sup>93</sup>, o uso de titulação potenciométrica por Karl Fischer. A Tabela 3 apresenta alguns estudos relatados na literatura sobre o desenvolvimento do MRC.

**Tabela 3.** Desenvolvimento de MRC para aplicação em diferentes matrizes.

Matriz	Analito	Estabilidade	Homogeneidade	Valor certificado	Referência
Sedimentos de água doce e tecido de bacalhau	Metoprolol, propranolol, carbamazepina, naproxeno; acenocumarol	50 frascos de sedimentos (10 g) 20 frascos de tecido de bacalhau (20 g); 4 °C e -20 °C; 5 amostras; 4, 8 e 12 meses	50 frascos de sedimentos (10 g) e 20 frascos de tecido de bacalhau (20 g) analisados em 4 réplicas	7 ng/g 32 ng/g	Baranowska et al. (2017) <sup>94</sup>
Carne de frango	Enrofloxacin; ciprofloxacina	-70 °C: 6 e 12 meses; -20 °C: 4 meses; 25 °C: 1 mês (4 sub amostras)	10 amostras	19,06 ± 0,86 mg/kg (enrofloxacin) e 1,095 ± 0,038 mg/kg (ciprofloxacina)	Hyungs et al. (2017) <sup>95</sup>
Hormônio	Diosgenina	Curto prazo: 60 °C; 0, 7 e 14 dias. A longo prazo: 25 °C; 12 meses	15 amostras em triplicata	16,700 ± 0,001 mg	. Gong et al. (2014) <sup>96</sup>
Carne de porco	RNZ;MNZ; HMMNI; MNZOH e IPZOH	Curto prazo: 4 °C Longo prazo: -20 °C; 24 meses; 14 amostras; duplicata	ANOVA	0,7 a 6,2 µg/kg	Zeleny et al. (2009) <sup>97</sup>

Chá verde	Cipermetrina	Curto prazo: 37 °C, 2 meses; Longo prazo: 25 °C, 12 meses	12 amostras; duplicata	148 ± 14 µg/kg	Sin et al. (2012) <sup>98</sup>
Sumo de maçã	Cádmio, chumbo e arsênico	Longo prazo: 3 e 4,5 meses	6 amostras, duplicata	Cádmio (0,245 ± 0,014 mg/kg); chumbo (0,185 ± 0,015 mg/kg) e arsênico total (0,124 ± 0,012 mg/kg)	Dewi et al. (2016) <sup>99</sup>
Soja	Ocratoxina A	-70 °C e -20 °C, 8 meses;	10 amostras	49,50 ± 1,17 µg/kg	Ahn et al. (2016) <sup>100</sup>
Vinho	Cobre e ferro	4 meses; 4 °C.	6 amostras; 4 réplicas	Ferro (2.986 ± 0,102 mg/L); cobre (0,154 ± 0,004 mg/L)	Espinoza et al. (2008) <sup>101</sup>

No Brasil, infelizmente a demanda de MRCs ainda é atendida na sua maioria por importações a custos elevados, além disso, alguns MRCs não são adequados e não tem disponibilidade às necessidades brasileiras, visto que cada país produtor visa atender sua própria demanda, e de uma maneira geral, a produção de materiais de referência certificados no Brasil é recente e está em desenvolvimento. Nesse contexto, vale ressaltar o desenvolvimento de tecnologia para produção desses materiais no país como o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), o qual vem produzindo MRCs desde ano de 1975, voltados para ligas metálicas, minérios, viscosidade, ponto de fluidez, ponto de fulgor, entre outros.<sup>102</sup>

Em 1978, foi criado o Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), o qual é responsável por desenvolver CRMs para a área de mineração e metalurgia.<sup>103</sup> O Centro Tecnológico de Polímeros (SENAI/CETEPO), que produz CRMs para medir viscosidade, resistência à abrasão em elastômero e reômetro.<sup>104</sup> O Instituto Nacional de Controle da Qualidade na Saúde (INCQS), foi criado em 1982, com o objetivo de produzir microorganismos de referência.<sup>105</sup> Em 1973, foi criado o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), que produz padrões de pH, bioetanol, condutividade, etanol em

água, materiais forense (benzoilecgonina, cloridrato de metilecgonina e cloridrato de ecgonina).<sup>106</sup> E a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que desenvolve um importante papel no setor agropecuário, na qual tem desenvolvido MRCs de suplementos mineral para bovino, solo arenoso, fígado bovino e fosfato de rocha.<sup>107</sup>

De acordo com o COMAR o Brasil ocupou entre 2019-2020 a 12ª posição entre os 26 países, possuindo quatro produtores registrados: CETEM, INMETRO, IPT e Visomes Comercial Metrológica LTDA. Dentre esses, o IPT se destacou como maior produtor de MRCs.<sup>10</sup>

Nota-se grande interesse e desenvolvimento de diversos materiais de referências em diversas áreas como alimentos, meio ambiente, materiais biológicos, solo e sedimentos. Infelizmente, no campo da química forense, percebe-se poucas publicações realizadas a obtenção de materiais de referência com aplicação na química forense, seja para identificação e quantificação de drogas de abuso, ou para identificação de adulteração. Pode-se mencionar o trabalho realizado por Lee et al. (2008)<sup>108</sup> que desenvolveu um MR usando amostras de cabelo que foram fortificadas com metanfetamina e seu principal metabólito, a anfetamina, para a quantificação das mesmas em amostras reais. Foram coletadas 200 amostras de cabelo de usuários dessa droga, as quais foram homogeneizadas e tratados com diclorometano por 2 min duas vezes, secos a temperatura ambiente e cortados em aproximadamente 2 cm. Em seguida foram lavados sob agitação com água destilada por 60 min, foram secos e divididos em 103 vials com 100 mg de amostra cada. O candidato a MR foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa após derivatização com anidrido trifluoroacético (TFAA). O RM foi validado com um material certificado NIST. A homogeneidade encontrada foi satisfatória e foram encontrados os valores de  $7,64 \pm 1,24$  ng/mg para metanfetamina e  $0,54 \pm 0,07$  ng/mg para anfetamina. Esse material se mostrou promissor para uso futuro em laboratórios de análises forenses.<sup>164</sup>

Embora a literatura reporte poucos trabalhos com o desenvolvimento de MRC para uso na química forense, pode-se mencionar o interesse em isolar algumas substâncias psicoativas a partir de amostras apreendidas em rua, como Dusy et al. (2005)<sup>109</sup> isolou o ácido  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinólico-A ( $\Delta^9$ -THCA-A) a partir de óleo da *Cannabis*. Foram utilizadas 100 g da planta, a qual após processo de extração resultou em 1,71 g de

extrato. O  $\Delta^9$ -THCA-A foi isolado por meio da cromatografia em coluna, utilizando 100 g de sílica 60 (0,063-0,2 mm). Os solventes de eluição usados foram hexano (650 mL), tolueno (215 mL), acetona (135 mL) e ácido acético (20 gotas), os quais foram passados na coluna a um fluxo de 1.5 mL/min. A eluição do  $\Delta^9$ -THCA-A começou após a eluição de 280 mL total de solvente, as frações entre 290 e 510 mL foram coletadas e rotaevaporadas, sendo obtido 99 mg de um material amarelo. O material foi caracterizado estruturalmente pela técnica de RMN e sua pureza (96%) também foi determinada pela mesma.

Leite et al. (2018)<sup>110</sup> a partir de amostras de maconha apreendidas isolou o canabinol (CBN). Usando o extrato bruto de 156 amostras de maconha apreendidas em rua, foi utilizada uma massa de 1,107 g, a qual foi fracionada com o uso de Sephadex LH-20, sendo obtidas seis frações (F1 a F6). Com o uso da técnica de cromatografia líquida nas seis frações, foi possível separar canabinóides presentes na amostra. A partir da F4, foram coletadas nove sub-frações (F4.1 a F4.9) que foram caracterizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e RMN de hidrogênio. Entre os resultados obtidos, a F4.5 apresentou como produto único, o CBN, e as demais sub-frações apresentaram como misturas de canabinóides.

Rocha et al. (2018)<sup>111</sup> isolou a cocaína de amostras de rua e a utilizou como padrão de referência para quantificar cocaína e seus adulterantes em 34 amostras apreendidas. O padrão de referência foi obtido, a partir de 600 mg de amostra, a qual foi purificada, usando cromatografia em coluna, com fase estacionária composta por sílica gel (0,062-0,2 mm) (70-230 mesh) e fase móvel de metanol/acetato de etila (9:1). O material isolado teve sua pureza confirmada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e sua aplicação como padrão de referência em análises de quantificação se mostrou satisfatória.

Molina et al. (2019)<sup>112</sup> isolou o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) da *Cannabis sativa* L. usando extração com fluido supercrítico e extração em fase sólida. A extração com fluido supercrítico foi feita por meio de otimização da pressão (15 a 33 MPa), temperatura (40 a 80 °C) e etanol como co-solvente (0 a 5%), sendo encontrada a condição ótimas de 60 °C e 2% de etanol constantes, e os maiores teores de  $\Delta^9$ -THC foram 37,85% a 33 MPa e 36,18% a 15 MPa. Em seguida, esses extratos foram usados na extração em fase

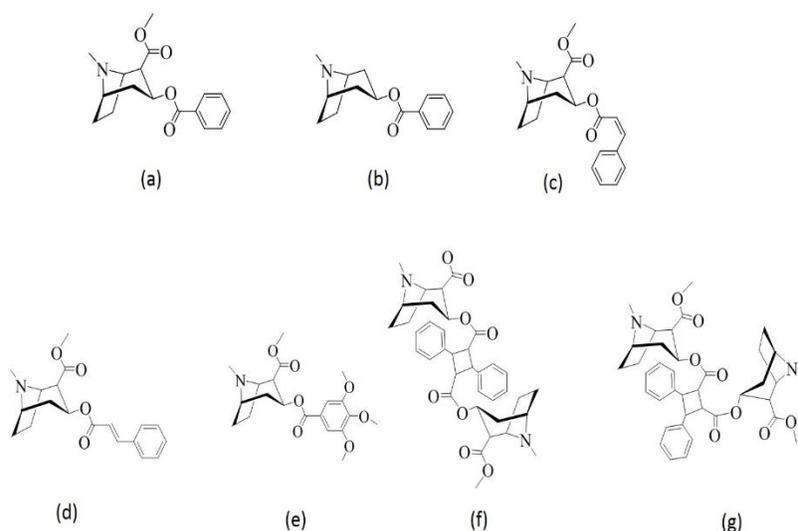
sólida. O produto obtido foi caracterizado e teve sua pureza estimada por cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e RMN. Assim, de 100 g de *Cannabis sativa L.*, foram obtidos por meio da extração de fluido super-crítico, 13,97 g de extrato enriquecido com  $\Delta^9$ -THC e 3,55 g de  $\Delta^9$ -THC com 90,1% de pureza, obtido por meio da extração de fase sólida. Nesse estudo, o isolamento do  $\Delta^9$ -THC se mostrou promissor para aplicação do mesmo como padrão de referência.

Nesse contexto, o desenvolvimento de materiais de referências confiáveis e de baixo custo, se torna um motivador no desenvolvimento de pesquisas voltadas na produção de MRC, visto que são ferramentas de grande importância analítica dentro da área da química forense.

## Capítulo 2: Purificação da cocaína para uso como material de referência

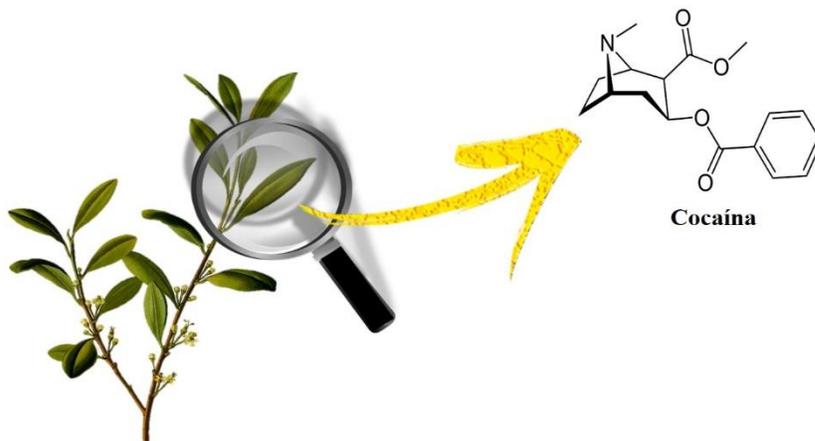
### 2.1 INTRODUÇÃO

A Metil (1S,3S,4R,5R)-3-benzoiloxi-8-metill-8-azabicyclo[3.2.1]octano-4-carboxilato, popularmente conhecida como cocaína, é um alcalóide tropânico extraído das folhas de plantas da família *Erytroxylaceae* sendo constituída pelos gêneros *Erytroxylum*, *Aneulophus*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*, sendo a cocaína um dos principais alcalóides provenientes dessas plantas. É relatado que haja pelo menos mais de 230 espécies existentes de plantas do gêneros *Erytroxylum* nativas da Cordilheira dos Andes, sendo apenas uma pequeno grupo que fornece uma quantidade considerável do presente alcalóide, a Figura 5 apresenta os principais alcalóides encontrados nesse vegetal.<sup>113</sup>



**Figura 5:** Representação química dos principais alcalóides encontrados na *Erytroxylum* (a) cocaína, (b) , tropacocaína, (c) cis-cinamoilcocaina, (d) , trans-cinamoilcocaina, (e) trimetoxicocaina, (f) α-truxilina e (g) β-truxilina.

Dentre as variedades de plantas do gênero *Erythroxylum*, destacam-se quatro variedades de duas espécies, que apresentam teores de cocaína que variam de 0,5-1,5% de alcalóides totais encontrados na planta, sendo que 75% corresponde a cocaína: *Erythroxylum coca* var. *coca*, *Erythroxylum coca* var. *ipadu*, *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*, e *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense*, as quais representam cerca de 97% da produção de cocaína (Figura 6) extraída para comercialização.<sup>114</sup>



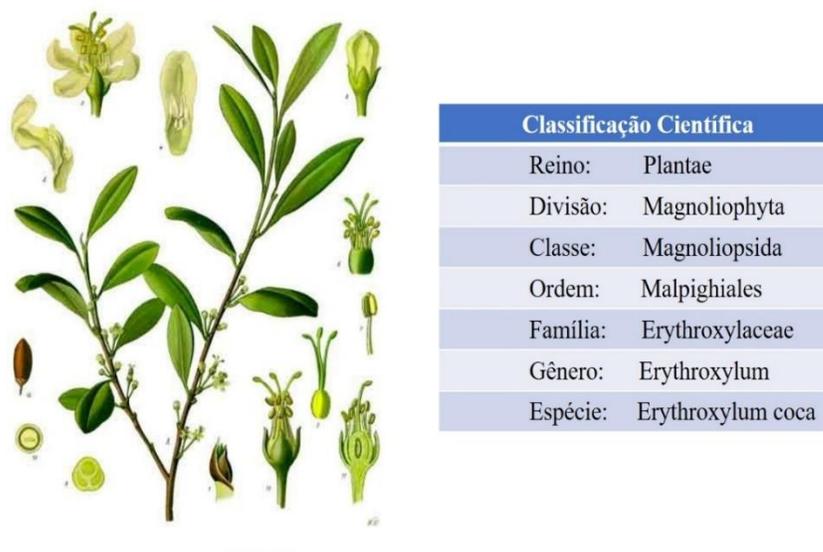
**Figura 6:** Representação da planta do gênero *Erythroxylum* e da estrutura química da cocaína.

O cultivo da *Erythroxylum* está concentrada em regiões com condições climáticas favoráveis ao plantio das espécies, geralmente são lugares com clima tropical úmido e altitudes variando de 500 a 2000 metros acima do nível do mar, sendo a região Andina que compreende Colômbia, Peru, Bolívia e Equador um dos principais locais para cultivo, além de outras regiões como Austrália, Índia e África.<sup>114</sup>

O Brasil também possui condições climáticas favoráveis ao cultivo de variedades da *Erythroxylum*, sendo a *Erythroxylum coca* v. *ipadu*, conhecida como Ipatu, Patu ou Epadu, cultivada por povos indígenas da região norte do país, principalmente na região que faz fronteira com a Venezuela e Colômbia. Por apresentar um teor de cocaína baixo,

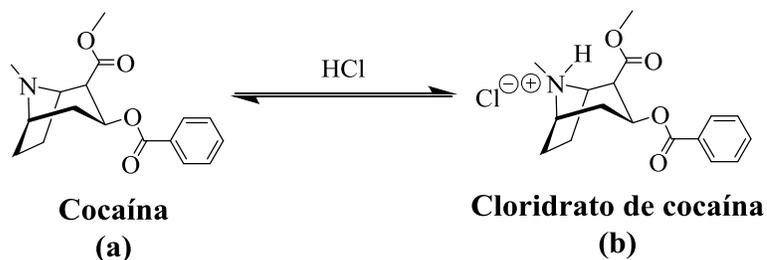
não sendo viável o extrativismo dessa variedade para a obtenção da cocaína.<sup>113,114</sup>

A *Erythroxylum coca* é a principal espécie que é cultivada na América do Sul. A origem da palavra coca é proveniente de uma palavra aimará, "khoka", cujo o significado seria "a árvore". Ela é um árvore de pequeno porte que pode atingir cerca de 5,50 m, pode ser considerada um planta arbustiva, possui casca com coloração vermelho-amarronzada, suas folhas se encontra dispostas de forma espiral, suas flores podem ser brancas ou amareladas (Figura 7).<sup>113</sup>



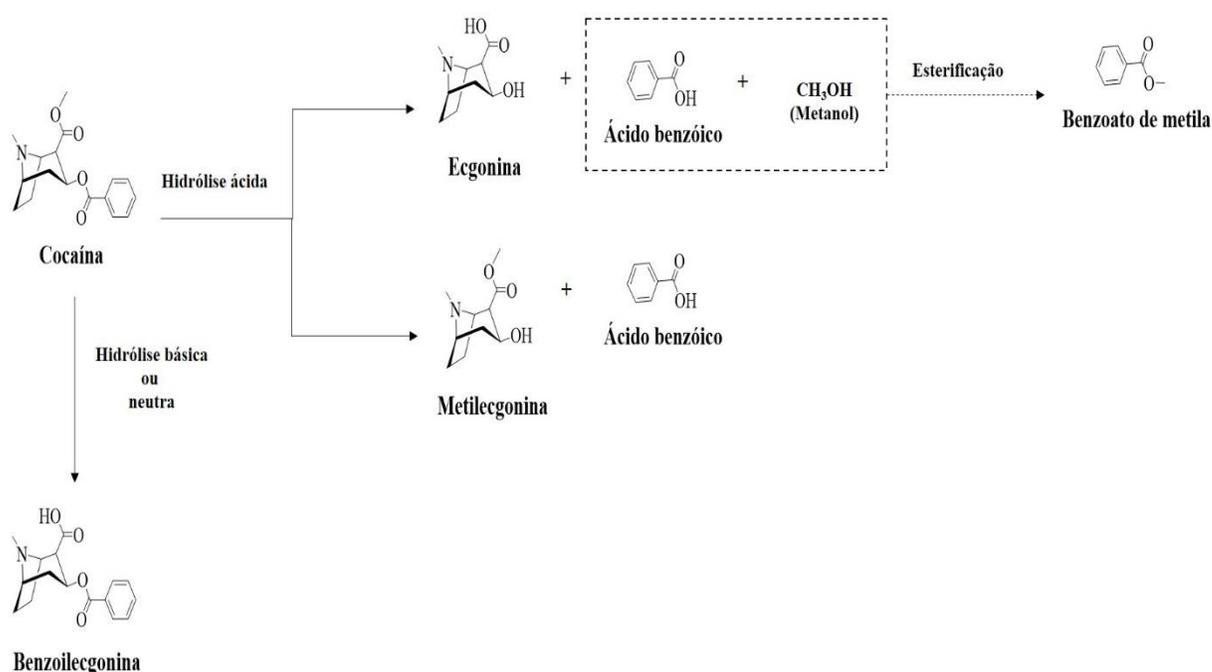
**Figura 7:** Representação da planta do *Erythroxylum coca* e sua classificação científica.

A cocaína é um dos principais estimulantes do sistema nervoso central entre as drogas de abuso. Ela é comumente administrada por via pulmonar na forma base – crack (Figura 8a), pois é a mais volátil, vaporizando-se ao ser aquecida. Já na sua forma de sal (Figura 8b), seu uso é por meio via intranasal, pois é muito bem absorvida pelas mucosas nasais.<sup>115</sup>



**Figura 8:** Formação do cloridrato de cocaína. adaptada de Vargas e Talhavini (2000)<sup>113</sup>

A cocaína foi isolada por volta de 1860 pelo químico alemão Albert Niemann, e apenas em 1880 o seu uso se popularizou através do psicanalista Sigmund Freud que publicou o trabalho “*On Coca*”, onde defendia o uso medicinal da cocaína.<sup>116</sup> Quando se encontra na forma de sua base livre está mais sujeita a sofrer processos de hidrólises, diferente da sua forma de cloridrato que é mais estável. Dessa forma, a cocaína em presença de água, ácidos ou substâncias alcalinas pode sofrer hidrólise total ou parcial (Figura 9).<sup>117</sup>



**Figura 9:** Representação das reações de hidrólise da cocaína. Adaptada de Botelho (2011)<sup>117</sup>

Acredita-se que a ecgonina, metilecgonina e benzoilecgonina não sejam extraídas da folha de coca durante o processo de refino. A presença dos mesmos é verificada pelo fato deles serem provenientes dos produtos de hidrólise conforme mostrado na Figura 9. Além desses, é observado também a presença de outros produtos advindos da hidrólise da cocaína como o metanol, ácido benzóico e benzoato de metila, sendo este

responsável pelo odor característico da cocaína.<sup>117</sup>

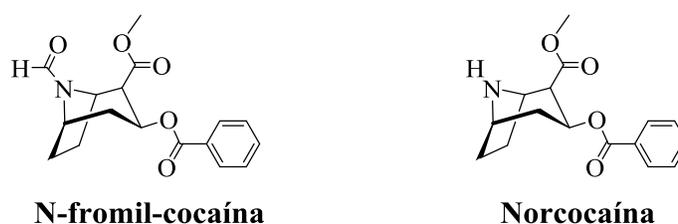
O refino da cocaína se divide basicamente em duas etapas, que é a extração e a purificação. A extração se baseia na imersão das folhas de coca diretamente em solventes orgânicos ou em soluções ácidas ou básicas. E a purificação visa branquear e aumentar o grau de pureza da cocaína, por meio de sucessivos processos de precipitação e solubilizações em diferentes solventes.<sup>118</sup>

Inicialmente as folhas de coca são trituradas e misturadas a uma solução ácida ou básica. Normalmente se utiliza como solução básica de óxido de cálcio (cal), a qual desprotona a base da molécula de cocaína. Em seguida, são utilizadas algumas etapas de extração com solvente orgânico, que pode ser querosene ou gasolina, o qual extrai a cera vegetal e os alcalóides presentes nas folhas de coca. Por meio de processos de troca de calor a cera é solidificada e facilmente separada.<sup>119</sup>

A fase orgânica produzida é extraída por meio de uma solução aquosa de ácido sulfúrico (água de bateria) e a cocaína neutra é convertida em sulfato de cocaína. Assim, os alcalóides são extraídos pela fase aquosa, a qual é alcalinizada com carbonato de sódio (barrilha), dando origem a chamada pasta base de cocaína ou pasta de coca, que apresenta uma pureza cerca de 30 a 80 % de cocaína. Apesar do nome, é obtida na forma de pó e/ou grânulos, a qual adquire o aspecto de pasta por meio da prensagem que sofre para a formação de blocos para a comercialização. Em conjunto com a pasta de coca, outros alcalóides e sais inorgânicos são encontrados na forma de um sólido aglomerado de cor bege ou amarelada mais escura e esse produto pode ser fumado puro ou misturada a maconha ou tabaco.<sup>119</sup>

Para purificar a pasta de cocaína é adicionada uma solução de ácido sulfúrico e posterior adição de permanganato de potássio até que a solução mude da coloração

bege para incolor. Nessa etapa visa a oxidação seletiva dos isômeros da cinamoilcocaína (cis e trans) e branquear a cocaína, tornando-a mais atraente. As cinamoilcocaínas são transformadas em ecgonina, que é facilmente separada da cocaína por meio de diferença de solubilidade. Além disso, quando se utiliza permanganato de potássio, a cocaína pode ser oxidada formando a N-formil-cocaína e norcocaína (Figura 10) como subprodutos principais.<sup>120</sup>



**Figura 10:** Representação da estrutura química dos principais subprodutos da oxidação da cocaína utilizando permanganato de potássio.

A ecgonina, metilecgonina e benzoilecgonina também podem ser formadas por meio da oxidação da cocaína, porém a presença desses alcalóides nas amostras refinadas, são provenientes principalmente da hidrólise que a cocaína pode sofrer.<sup>121</sup>

Após filtrar a solução obtida, após a adição do permanganato de potássio, adiciona-se um solução de hidróxido de amônia (amoníaco). Ao final desse processo é obtido um intermediário chamado de cocaína base, base de coca, pasta lavada ou pasta oxidada, que possui um teor de cocaína de 80 a 95 %. De acordo com a Drug Enforcement Administration (DEA), será considerada como base de cocaína, produtos considerados altamente oxidados, com o teor de cinamoilcocaína (cis e trans) menor que 2 % em relação ao teor de cocaína total. Caso o teor relativo de cinamoilcocaína (cis e trans) seja maior que 6 %, o produto é considerado como não oxidado e chamado de pasta base de cocaína.<sup>122</sup>

Para a obtenção do cloridrato de cocaína, a cocaína base é dissolvida em um solvente orgânico como éter etílico ou acetona, seguido de uma filtragem e adição de ácido clorídrico (ácido muriático).<sup>121</sup>

O crack, é um outro produto que pode ser obtido a partir tanto da pasta base de cocaína quanto do cloridrato de cocaína. O termo crack vem do inglês “crackling sound”, devido ao som de estalos produzidos quando as pedras são aquecidas. Diferentemente do cloridrato de cocaína, o crack não passa por um processo final de refino, o que produz um composto concentrado em impurezas e justifica o seu baixo preço se comparado ao produto na forma de cloridrato. Além disso, outros produtos podem ser obtidos a partir do refino da cocaína (Figura 11) como a merla e o oxi.<sup>117</sup>

A cocaína é normalmente adulterada por dois tipos de substâncias, os adulterantes e os diluentes. Os primeiros são adicionados para imitarem ou gerarem novos efeitos na droga enquanto os segundos são adicionados para aumentar o volume da droga.<sup>123</sup> Os adulterantes mais utilizados no Brasil são a benzocaína, cafeína, fenacetina, lidocaína, levamisol e paracetamol (Figura 12).<sup>124</sup>

A lidocaína e benzocaína são anestésicos locais, e acredita-se que podem imitar os efeitos da cocaína. A cafeína, que está presente no dia a dia em fármacos e bebidas, possui ação estimulante.<sup>125</sup> A fenacetina é bastante utilizada pela sua ação de prolongar o efeito da cocaína, e é utilizada como diluente, por conferir um aspecto mais cristalino ao crack, que os usuários associam à pureza.<sup>126</sup> O levamisol é usado como anti-helmíntico de uso veterinário e apresenta grande toxicidade aos humanos, e quando metabolizado, gera a aminorex que é classificado como uma substância semelhante às anfetaminas.<sup>127</sup>

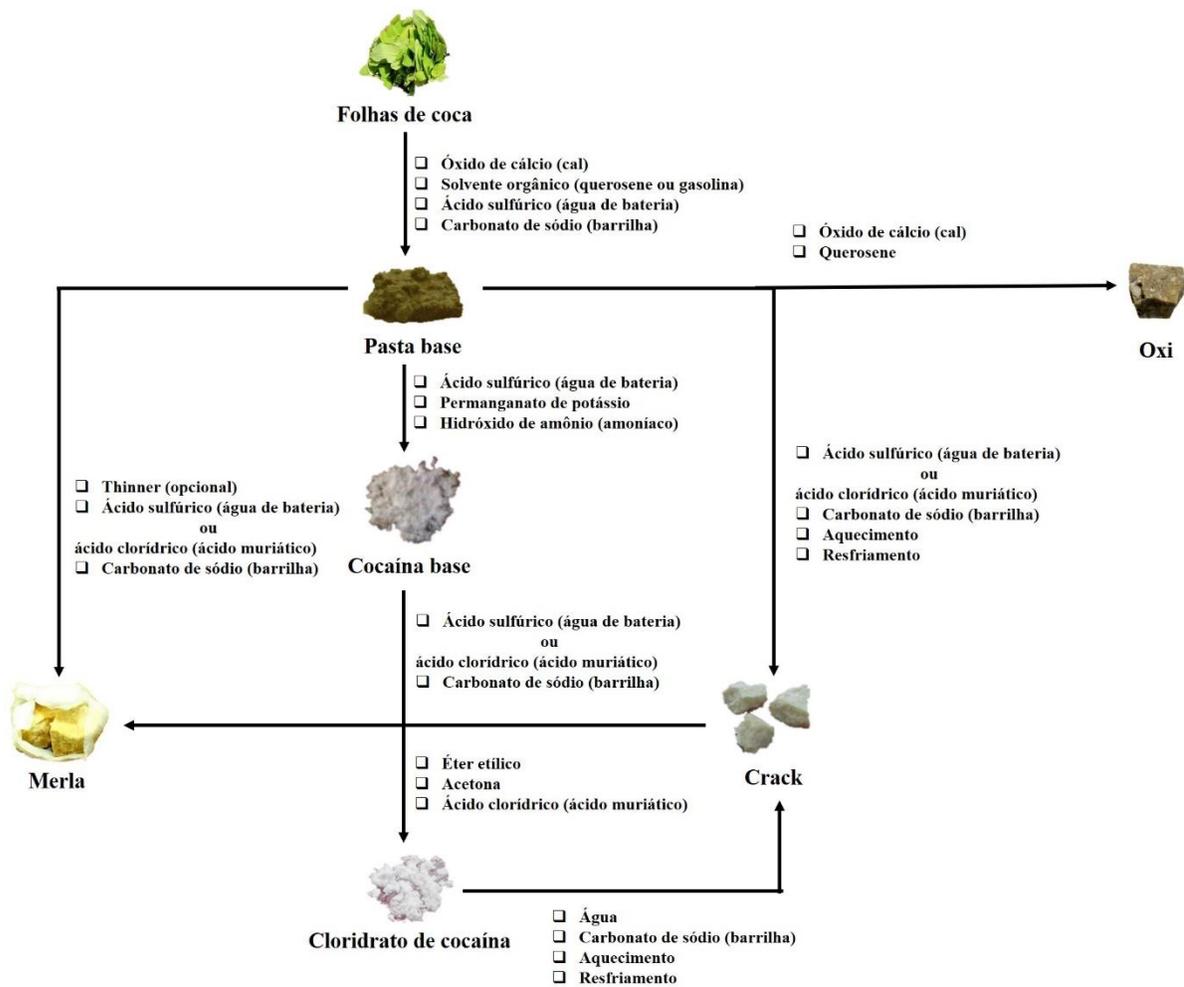
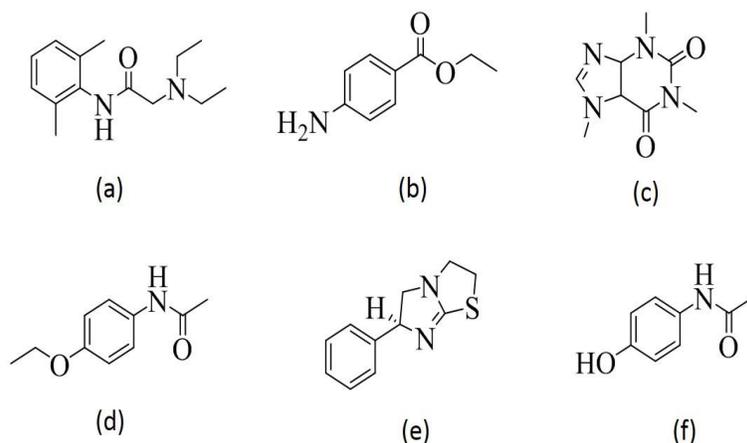


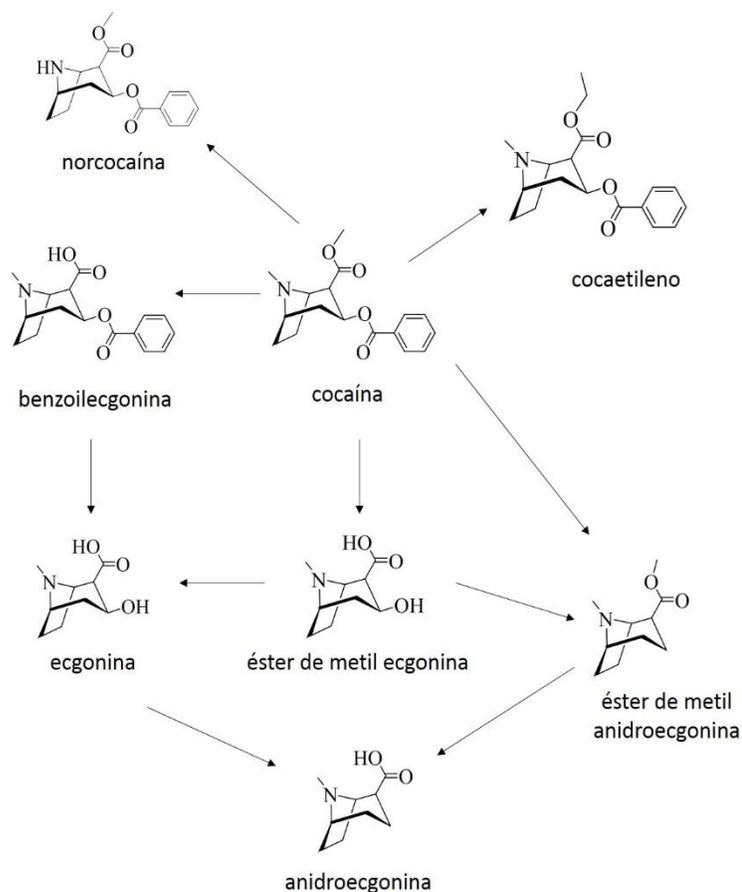
Figura 11: Representação do processo de refino da cocaína. Adaptada de Casale (1993).<sup>119</sup>



**Figura 12:** Representação química dos principais adulterantes da cocaína (a) lidocaína, (b) benzocaína, (c) cafeína, (d) fenacetina, (e) levamisol e (f) paracetamol.

Quando entra na corrente sanguínea, a cocaína sofre hidrólise mediada por colinesterase e por carboxilesterase no fígado. Nesses processos são formados como principais metabólitos o éster de metil ecgonina (EME), aproximadamente 45%, e a benzoilecgonina (BEZ), aproximadamente 29%. Ocorre também a formação da norcocaína (NOC) que ocorre por desmetilação da cocaína, aproximadamente 5%.<sup>128</sup> Caso seja administrada via aquecimento, há formação considerável de éster de metilanidroecgonina (AEME), a qual é metabolizada por meio de clivagem enzimática e da hidrólise química espontânea para formação da anidroecgonina (AE),<sup>129</sup> o que permite diferenciar os usuários de crack e de cocaína na forma inalada.<sup>130</sup> Já quando é consumida em conjunto com bebidas alcoólicas, os níveis plasmáticos de cocaína e norcocaína aumentam, a quantidade de benzoilecgonina diminui e um novo metabólito é formado, a cocaetileno (COE), por um mecanismo de transesterificação mediado pela ação enzimática de carboxilesterase. Além disso, a presença de N-óxido de cocaína foi recentemente identificado e quantificado em amostras de meconio para confirmação do

uso de cocaína em mulheres grávidas.<sup>131</sup> O esquema dos principais metabólitos da cocaína é mostrado na Figura 13.



**Figura 13:** Representação química dos principais metabólitos da cocaína.

Os métodos colorimétricos são amplamente utilizados como forma qualitativa de identificação. Entre eles está o teste do reagente de Mayer,<sup>132</sup> teste com o reagente tiocianato de cobalto,<sup>133</sup> teste do reagente de Scott,<sup>134</sup> que é o mais utilizado e o teste do reagente de Scott modificado.<sup>135</sup> Esses testes têm uma limitação que é o aparecimento de falsos positivos, devido à presença de adulterantes nas amostras de cocaína comercializadas.

Entre os diversos métodos analíticos usados para análise de cocaína, cromatografia é técnica analítica mais utilizada, pela facilidade com que se efetua a

separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou quando acoplada com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria e a espectrometria de massas.<sup>136</sup> As técnicas cromatografia gasosa (CG) e CG-MS são empregadas em análises de rotina empregadas para a cocaína, sendo indicadas pelas Nações Unidas.<sup>137</sup>

Nishikawa et al. (1994)<sup>138</sup> desenvolveu um método onde foi estudado a determinação simultânea da cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster, ecgonina e norcocaína em urina por meio da técnica analítica CLAE. Essa técnica se torna bastante fundamental para amostras que possuem compostos lábeis.

Bogusz (2000)<sup>139</sup> relatou o uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS) como um poderosa ferramenta com alto nível de confiabilidade, para as análises de substâncias de interesse forense, como a cocaína e seus metabólitos.

Além das técnicas cromatográficas, a espectrometria de infravermelho com transformada de fourier (FTIR) passou a ser usada como rotineira na distinção entre cocaína na forma de sal e cocaína base livre. Conceição et al. (2014)<sup>140</sup> por meio do teste de Scott aliado a técnicas espectroscópicas como a FTIR desenvolveu um método alternativo e seguro para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes.

A espectrometria Raman também tem sido explorada como um nova ferramenta analítica nas análises forense. Penido et al. (2005)<sup>141</sup> descreveu o uso da espectrometria Raman como método confirmatório na identificação de cocaína e outras drogas de abuso apreendidas. Com base no estudo, essa técnica mostra-se bastante promissora e por não ser destrutiva e permitir a reanálise das evidências.

Além disso, o uso crescente na portabilidade de análises, tem despertado grande interesse em desenvolvimento de métodos cada vez mais rápidos e precisos. Hespagnol et al. (2019)<sup>142</sup> desenvolveu uma metodologia para aplicação da espectroscopia de infravermelho portátil para a caracterização in situ de amostras de cocaína e para validação do método foram utilizadas a regressão multivariada PLS (Partial Least Square) e o modelo de classificação SIMCA. Aliado a portabilidade, o uso de ferramentas quimiométricas se tornam indispensáveis na garantia de resultados mais confiáveis. Nesse contexto, Risoluti et al. (2019)<sup>143</sup> descreveu o uso do equipamento portátil com

espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) como um estudo prévio para a determinação de cocaína e benzoilecgonina em fluido oral, por meio do uso dos métodos quimiométricos PCA e do PLS para calibração e validação do modelo, mostrando-se promissores para análises de rotina.

Com a crescente demanda no desenvolvimento de métodos cada vez mais confiáveis por meio do uso de diferentes técnicas analíticas, o uso de materiais de referências se tornam indispensáveis. Devido a limitação e dificuldade em obter materiais de referências para desenvolvimento de métodos, em especial na área forense, merecem atenção para o desenvolvimento de pesquisa que contornem esse problema, como o trabalho desenvolvido por Rocha et al (2018).<sup>111</sup>

## **2.2 OBJETIVOS**

Purificar e isolar a cocaína a partir de amostras de crack e cocaína apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, e sintetizar a benzoilecgonina para aplicação em análise forense.

## **2.3 METODOLOGIA**

As amostras de crack e cocaína foram fornecidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo (PC-ES) provenientes das quatro macrorregiões em que o estado é dividido (Central, Metropolitana, Norte e Sul). Foi feita um amostra padrão compostada pela mistura dos diferentes lotes de apreensão para realização do estudo. As substâncias obtidas foram caracterizadas por meio da técnica de espectrometria de massas por ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FTICR-MS) 9.4 T, Bruker, Daltonics (Bremer, Alemanha); Synapt G3S-MS e fonte de ionização por electrospray (ESI). As amostras foram solubilizadas em concentração de 1 mg/mL em metanol grau HPLC da NEON (Suzano, São Paulo, BR), em seguida, utilizou 10 µL dessa solução em 1 mL de metanol NEON (Suzano, São Paulo, BR) para posterior análise por infusão direta em ESI (+) FT-ICR MS. A solução calibrante do equipamento foi com a arginina VETEC

(Duque de Caxias, Rio de Janeiro, BR). Foram otimizados os parâmetros para a elaboração de melhores resultados com menores erros (ppm) e melhores relações sinal/ruído. Para as análises de ESI (+) MS foi utilizada a faixa de massa de 150-1500 Da, acumulação de 16 scans e domínio de aquisição de 4 M. Também foram realizados experimentos de fragmentação, ESI (+) MS/MS, para os principais sinais obtidos nos espectros de ESI (+) MS, acumulação de 16 scans e domínio de aquisição de 512 k. Para as análises de ressonância magnética nuclear foi utilizado um espectrômetro Varian 400 MHz (modelo VNMRS 400), operando com um campo magnético de 9,4 Tesla e sonda de detecção direta de 5 mm BroadBand 1H/19F/X. Todos os espectros foram tratados no software MestReNova® e calibrados pelo sinal do solvente em 1,94 ppm (acetonitrila-d<sub>3</sub>) para a benzoilecgonina. Apenas a cocaína foi caracterizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). A amostra foi preparada na concentração de 2 mg/mL em diclorometano da Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA) e as análises realizadas em um cromatógrafo Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA) com sistema de CG modelo 7890B e detector de massas modelo 5977A. As condições para o método são as que seguem: coluna DB5-MS com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e revestida com uma camada de 0,25 µm de espessura composta por 5% difenil – 95% dimetilpolisiloxano; hélio como gás de arraste num fluxo constante de 1 mL/min; injetor com divisor/sem divisor (Split/splitless) a 240 °C; razão de divisão de fluxo (Split ratio) de 50:1; volume de injeção de 1 µL; temperatura inicial do forno de 60°C, permanecendo na mesma por 3 minutos, e após, com uma rampa de aquecimento de 40°C/min, chegando-se à temperatura final de 300°C e mantendo-se nela por 6 minutos; tempo total de análise de 15 minutos; temperatura do detector de massas (MS) de 300°C; e aquisição de íons no modo full scan com faixa de massa de 50 a 400 m/z.

### **2.3.1 Isolamento da cocaína**

A cocaína foi isolada segundo a metodologia desenvolvida por Rocha et al. (2018).<sup>111</sup> Foram pesados inicialmente aproximadamente 1,000 g da amostra padrão, a qual foi solubilizada em 2 mL de metanol NEON (Suzano, São Paulo, BR). Para o

isolamento foi utilizada a cromatografia em coluna, usando 58 g de sílica gel 60 (0,062-0,2mm)(70-230 mesh) da marca Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), e uma mistura de metanol 9:1 acetato de etila como fase móvel. As frações coletadas foram comparadas com um padrão de cocaína por meio da cromatografia em camada delgada, e agrupadas conforme similaridade. Sendo obtido 10,800 mg de cocaína. Foi testado também, o uso de metanol 9:1 hidróxido de amônio, como fase móvel, realizando as mesmas condições anteriores de separação.

### **2.3.2 Síntese da benzoilecgonina**

A benzoilecgonina foi sintetizada a partir da cocaína isolada da amostra da mistura padrão. A síntese foi feita de acordo com adaptação de Karlsen et al. (2015).<sup>144</sup> Foram pesados inicialmente 90,5 mg de cocaína. Adicionou-se 3 mL de água e 3 mL de dioxano. Foi montado um sistema de refluxo a 70 °C por 2 dias. Após o tempo de reação, foram realizadas três extrações com 10 mL de éter etílico. A fase orgânica foi rotaevaporada e obteve 82,5 mg de um sólido branco.

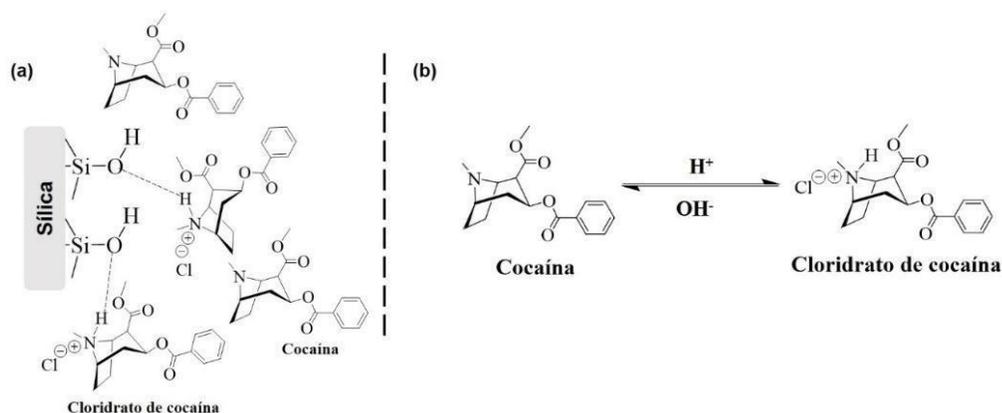
Com base na benzoilecgonina, foram realizados estudos de homogeneidade e estabilidade a curto prazo, para validação da mesma para ser candidato a material de referência. Foram preparadas 200 frascos com 1 mL cada, de uma solução de 1 mg/mL de benzoilecgonina em metanol grau HPLC da NEON (Suzano, São Paulo, BR). Para o teste de homogeneidade, foram selecionados 11 frascos de forma aleatória, dos quais foram realizadas triplicatas, sendo obtidos 33 frascos, os quais também foram analisados de forma aleatória. Para os testes de estabilidade foram avaliadas as temperaturas de 22, 5, -8 e 50 °C, onde foram escolhidos de forma aleatória 40, 40, 80 e 20 frascos respectivamente para ficarem armazenados em cada temperatura, sendo selecionados seis frascos de cada temperatura de forma aleatória, fazendo duplicata, e analisando também de forma aleatória. Os testes de estabilidade a curto prazo para as temperaturas de 22, 5 e -8 °C foram realizados em 1, 2, 7, 15 e 30 dias e para a temperatura de 50 °C foram feitos em 15, 30 e 45 dias. Os valores obtidos das concentrações com a variação do tempo foram avaliados por meio da técnica de

cromatografia líquida de alta eficiência, com um equipamento Analítico Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA) modelo 1260 Infinity com detector DAD, uma coluna analítica Waters SunFire C18 (Milford, Massachusetts, EUA), tamanho de partícula de 3,8  $\mu\text{m}$ , diâmetro interno de 4,6 mm x 150 mm de comprimento; solventes A - água (ácido fórmico 0,1%) e B - acetonitrila; modo isocrático de eluição (solvente A: 5%, solvente B: 95%); fluxo de 1,0 mL/min; tempo de corrida 4 minutos; comprimento de onda registrado 234 nm; e volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ .

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 Isolamento da cocaína

Com base nas duas metodologias aplicadas para o isolamento da cocaína foram obtidos os seguintes rendimentos: 1,08 % (metanol 9:1 acetato de etila) e 50,0 % (metanol 9:1 hidróxido de amônio). Tal resultado sugere que o cloridrato de cocaína presente na amostra está ficando adsorvido na coluna por meio de interação intermolecular com os grupos silanóis da sílica. Quando se adiciona hidróxido de amônio, essa interação é enfraquecida, possivelmente pela possível desprotonação causada pelo hidróxido de amônio sobre o cloridrato de cocaína (Figura 14).



**Figura 14.** Representação esquemática da (a) interação do cloridrato de cocaína com os grupos silanóis da sílica e (b) equilíbrio de conversão da cocaína em cloridrato de cocaína.

A pureza foi determinada com base no cromatograma (Figura S1), de acordo com Yang et al. (2017).<sup>88</sup> Com base apenas nesse parâmetro, a pureza calculada para a cocaína foi de 98,37%.

Com base na análise do CG-MS, foi observado no cromatograma obtido (Figura S2) apenas a presença de uma única banda com tempo de retenção de 10,166 min. Com base no banco de dados da biblioteca NIST do equipamento foi dada uma similaridade de 90% para cocaína. Além disso, a partir da análise do espectro de massas (Figura S3), foi possível observar sinais característicos para a molécula de cocaína,  $m/z = 303$ ; 182 e 82.<sup>145</sup> O perfil químico do espectro de ESI (+) MS (Figura S4) obtido para a cocaína,  $C_{17}H_{21}NO_4$  (303 Da) apresentou a molécula de cocaína protonada,  $[cocaína+H]^+$ , com  $m/z$  de 304,15430,  $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$ , e erro de massas de -0,09 ppm.

#### 2.4.2 Síntese da benzoilecgonina

O rendimento obtido na síntese foi de 91,16%, o qual está em acordo com o obtido por Karlsen et al. (2015)<sup>144</sup>. O perfil químico do espectro de ESI (+) MS obtido para a benzoilecgonina (Figura S5),  $C_{16}H_{19}NO_4$  (289 Da), onde os principais sinais observados, qualificam a presença da molécula de benzoilecgonina, estão inseridos na Tabela 4. Foi observado a presença da molécula de benzoilecgonina protonada,  $[Benzoilecgonina+H]^+$ , com  $m/z$  de 290,13877;  $[C_{16}H_{20}NO_4+H]^+$ , com erro de massa de -0,31 ppm. Juntamente a esse, foi verificado a presença do  $m/z$  579,27074;  $[C_{32}H_{38}N_2O_8+H]^+$ , que corresponde a uma dímero de benzoilecgonina protonada,  $[2Benzoilecgonina+H]^+$ , com erro de massa -1,12 ppm. Também, foi possível verificar o  $m/z$  601,25270;  $[C_{32}H_{38}N_2O_8+Na]^+$ , que corresponde a um dímero de benzoilecgonina como aduto de sódio,  $[2Benzoilecgonina+Na]^+$ , com erro de massa -1,10 ppm. E, por conseguinte, foi observado o  $m/z$  890,38504;  $[C_{48}H_{57}N_3O_{12}+Na]^+$ , que corresponde a um trímero de benzoilecgonina como aduto de sódio,  $[3Benzoilecgonina+Na]^+$ , com erro de -1,79 ppm.

**Tabela 4.** Perfil químico do espectro de ESI (+) MS obtido para a benzoilecgonina.

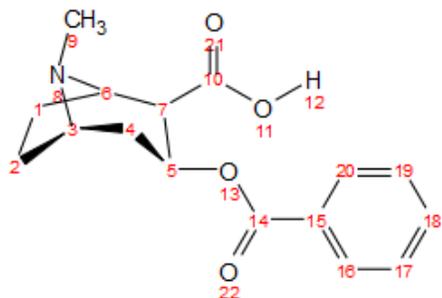
Composto	Fórmula Molecular	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> calculado	Erro (ppm)
[Benzoilecgonina+H] <sup>+</sup>	[C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	290,13877	290,13868	-0,31
[2Benzoilecgonina+H] <sup>+</sup>	[C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> +H] <sup>+</sup>	579,27074	579,27009	-1,12
[2Benzoilecgonina+H] <sup>+</sup>	[C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> +Na] <sup>+</sup>	601,25204	601,25204	-1,10
[3Benzoilecgonina+Na] <sup>+</sup>	[C <sub>48</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub> +Na] <sup>+</sup>	890,38504	890,38345	-1,79

Com base nos principais sinais observados no ESI (+) MS na Tabela 4, foram realizados experimentos de ESI (+) MS/MS (Figura S6). Na Figura S6a, foi observado a fragmentação do sinal de *m/z* 579,3, [2Benzoilecgonina+H]<sup>+</sup>, com energia de colisão de -10,5 V, que gerou o íon [Benzoilecgonina+H]<sup>+</sup> de *m/z* 290,1, o qual é proveniente da perda de massa de 289 Da, que corresponde a perda de uma molécula de benzoilecgonina, C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>. Já na Figura S6b, foi observado a fragmentação do sinal de *m/z* 890,4, [3Benzoilecgonina+Na]<sup>+</sup>, com energia de colisão de -3,5 V, que gerou o íon [2Benzoilecgonina+Na]<sup>+</sup> de *m/z* 601,3, o qual é proveniente da perda de massa de 289 Da, que corresponde a perda de uma molécula de benzoilecgonina. E na Figura S6c a fragmentação do sinal de *m/z* 601,3, gerou o íon [Benzoilecgonina+Na]<sup>+</sup> de *m/z* 312,1, o qual é proveniente da perda de massa de 289 Da, que corresponde a perda de uma molécula de benzoilecgonina.

A estrutura da benzoilecgonina com base nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT (Figura S7-9) foi elucidada com base nos seus valores da Tabela 5 os quais estão em acordo com os resultados reportados por (Karlsen et al. 2015).<sup>144</sup>

O cromatograma obtido para a benzoilecgonina por meio da CLAE (Figura S10b) apresentou um tempo de retenção de 2,876 ± 0,002 min, o qual foi comparado com o cromatograma de um padrão comercial de benzoilecgonina (Cerilliant, Texas, EUA) (Figura S10a), os quais estão em acordo. A pureza relativa da benzoilecgonina foi de 95,40%, a qual foi calculada de acordo com Yang et al. (2017)<sup>88</sup>.

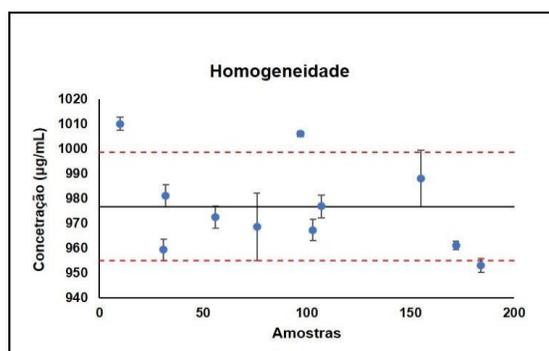
**Tabela 5.** Dados de RMN encontrados para abenzoilecgonina em acetonitrila-d<sub>3</sub>.



Posição	$\delta_H$ (ppm) Mult. J (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	DEPT
1	2,29 m, 2H	24,82	CH <sub>2</sub>
2	2,12 m, 2H	23,56	CH <sub>2</sub>
3	3,89 quinteto (9), 1H	64,10	CH
4	2,26 td (4,5; 6,75; 9), 2H	33,72	CH <sub>2</sub>
5	5,31 q (9), 1H	66,40	CH
6	4,06 q (6,3), 1H	60,78	CH
7	2,98 q (9), 1H	49,39	CH
9	2,76 s, 3H	37,57	CH <sub>3</sub>
10	-	173,31	C
14	-	164,93	C
15	-	131,03	C
16	7,95 d (9), 1H	130,19	CH
17	7,47 dd (9; 18), 1H	129,35	CH
18	7,60 t (9), 1H	133,99	CH
19	7,47 dd (9; 18), 1H	129,35	CH
20	7,95 d (9), 1H	130,17	CH

H': hidrogênio equatorial, H'': hidrogênio axial.

Para avaliar a homogeneidade dentro e entre as unidades, foi utilizada a ANOVA por fator único (TabelaS1). A partir desta, obteve-se os valores de  $F_{\text{calculado}}$  e p-valor. Para  $\alpha = 0,05$ ,  $g_{\text{dentre}} = 10$  e  $g_{\text{dentro}} = 22$ , o  $F_{\text{crítico}}$  é de 2,2967. Segundo Gonçalves et al. (2018)<sup>146</sup> para que um lote seja considerado homogêneo,  $F_{\text{crítico}} > F_{\text{calculado}}$ , e o p-valor deve ser maior que 0,05 (probabilidade de 95% de abrangência). O  $F_{\text{calculado}}$  foi de 0,1820 e o p-valor de 0,9959. Como  $F_{\text{crítico}} > F_{\text{calculado}}$ , indica que o padrão de homogeneidade do material preparado está satisfatório. A Figura 15 mostra que o valor médio da homogeneidade foi de 976,7212  $\mu\text{g/mL}$  (faixa de 952,9984 a 1010,0830  $\mu\text{g/mL}$ ), com um desvio padrão de 1,80%.



**Figura 15.** Resultados com os valores médios das onze amostras analisadas para a avaliação da homogeneidade com um intervalo de confiança de 95%.

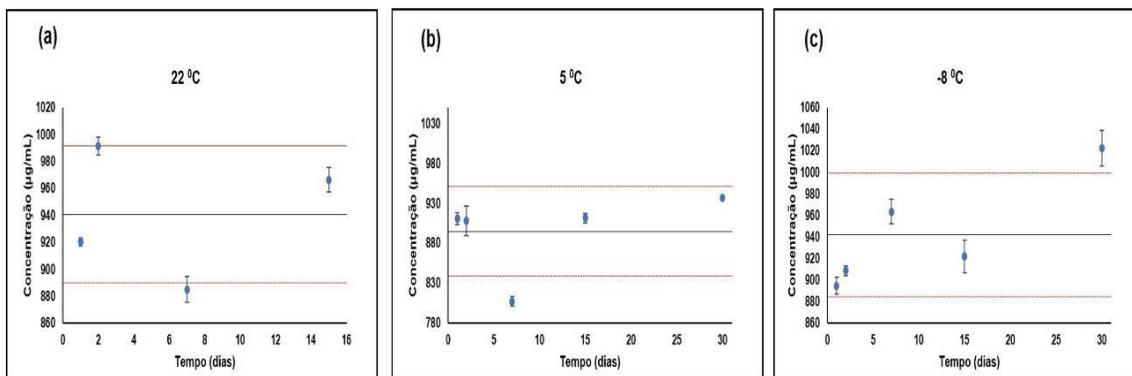
Para avaliar a incerteza devido homogeneidade, a variância entre os frascos foram utilizadas a equações de acordo com Sin et al. (2012)<sup>98</sup>. O valor encontrado para  $s_{bb}$  foi de 22,60 µg/mL e a incerteza padrão relativa ( $u_{bb}$ ) foi de 1,03%.

**Tabela 6.** Valores médios encontrados para a concentração da bezoilecgoninano teste de estabilidade a curto prazo nas temperaturas de 22, 5, -8 e 50 °C.

Temperatura	Dia	Valor <sup>a</sup>
22 °C	1	920,4479 ± 18,4538
	2	991,3744 ± 4,1449
	7	885,1779 ± 53,6552
	15	966,3724 ± 55,7406
5 °C	1	910,9249 ± 37,7425
	2	908,3224 ± 22,6408
	7	807,6350 ± 94,7641
	15	911,6105 ± 34,2378
	30	937,4648 ± 35,1973
-8 °C	1	894,8621 ± 43,6401
	2	908,6757 ± 24,7709
	7	963,5940 ± 68,4125
	15	921,7833 ± 88,6949
50 °C	30	1022,4600 ± 55,7406
	15	855,6857 ± 66,6194
	45	809,4035 ± 37,7389
	45	651,4331 ± 35,2066

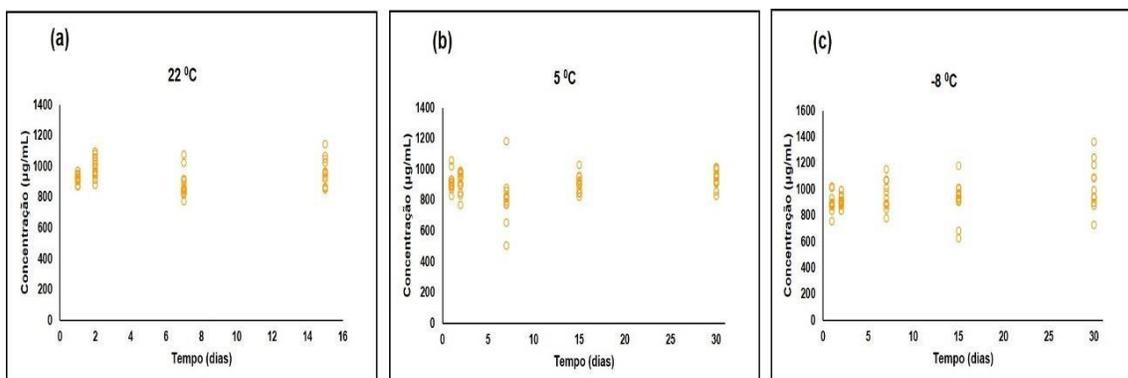
<sup>a</sup>média e intervalo de confiança a 95%, n = 12

Foi encontrado para a temperatura de 22 °C o valor médio de 940,8432 µg/mL com desvio padrão de 4,36%, para o tempo de 15 dias. Para a temperatura de 5 °C, foi calculado um valor médio de 895,1915 µg/mL com um desvio padrão de 5,03%, para o período de 30 dias. E para a temperatura de -8 °C foi obtido o valor de médio de 942,2749 µg/mL, com um desvio de 4,90% para o tempo de 30 dias. Para a temperatura de 50 °C, foi observado a diminuição da concentração da benzoilecgonina com a variação do tempo, o que está associado a degradação da mesma devido o armazenamento na temperatura de estudo, fato que é confirmado com base nos cromatogramas (Figura S11), onde foi observado a diminuição da banda característica da benzoilecgonina no tempo de retenção de  $2,876 \pm 0,002$  min. A Figura 16, mostra a variação dos valores determinados para o candidato a material de referência com a variação do tempo nas determinadas temperaturas.



**Figura 16.** Valores médios das concentrações de benzoilecgonina durante o armazenamento em diferentes temperaturas (a) 22 °C, (b) 5 °C e (c) -8 °C com um intervalo de confiança de 95%.

Para avaliar a estabilidade a curto prazo, foi utilizada a regressão linear para verificar a tendência dos resultados, Figura 17.



**Figura 17.** Valores da variação da concentração de benzoilecgonina durante o armazenamento em diferentes temperaturas (a) 22 °C, (b) 5 °C e (c) -8 °C.

A Tabela 7 apresenta os valores da inclinação da reta ( $b_1$ ) e o produto do desvio padrão com o teste  $t$  de Student ( $t(0,95,n-2) \cdot s(b_1)$ ). Como a condição  $|b_1| < (t(0,95,n-2) \cdot s(b_1))$  foi satisfeita para as temperaturas de 22, 5 e -8 °C, é possível concluir, que o material é estável para as referidas temperaturas. Além disso, foi realizado o teste de ANOVA (Tabelas S2-5), que indicou os valores de  $F$  presentes na Tabela 7. Com base na comparação do  $F_{\text{calculado}}$  com o  $F_{\text{crítico}}$ , foi possível inferir que a benzoilecgonina é estável nas condições das temperaturas de 22, 5 e -8°C, já para a temperatura de 50 °C, ela se mostrou instável, devido a possível degradação ocorrida. A incerteza a curto prazo ( $u_{sts}$ ) foi calculada de acordo com Yang et al. (2017)<sup>88</sup>, Tabela 7.

**Tabela 7.** Valores médios encontrados para a concentração da benzoilecgonina no teste de estabilidade a curto prazo nas temperatura de 22, 5, -8 e 50 °C.

Temperatura	F	F <sub>crítico</sub>	$b_1$	$t_{(0,95,n-2)} \cdot s(b_1)^a$	$u_{sts}$	Condição
22 °C	5,625	6,591	2,74	15,44	11,55	Estável
5 °C	3,048	5,192	1,21	8,01	2,51	Estável
-8 °C	3,423	5,192	3,71	7,92	2,49	Estável
50 °C	24,933	9,552	-	-	-	Instável

$$^a t_{(0,95,n-2)} = 3,18$$

## 2.5 CONCLUSÃO

A partir da amostra padrão foi possível isolar a cocaína e caracterizá-la. A cocaína apresentou um rendimento de isolamento de 50% para o uso da fase móvel metanol 9: 1 hidróxido de amônio com uma pureza relativa de 98,37%. A benzoilecgonina foi sintetizada a partir da cocaína isolada, com um rendimento de 91,16% e uma pureza relativa de 95,40%. O teste de homogeneidade para a benzoilecgonina indicou que o lote estudado foi homogêneo com base no teste estatístico da ANOVA por fator único, com um p-valor de 0,9959, um valor médio de 976,7212 µg/mL (1,80% de desvio padrão), com os valores de *sbb* igual a 22,6 µg/mL e *ubb* de 1,03%. O estudo de estabilidade a curto prazo mostrou que a benzoilecgonina é estável nas temperaturas de 22, 5 e -8 °C nos períodos de 15, 30 e 30 dias respectivamente. Para 22 °C foi obtido um valor médio de 940,8432 µg/mL (4,36% de desvio padrão) com *usts* igual a 1,22%. A 5 °C foi obtido o valor médio de 895,1915 µg/mL (5,03% de desvio padrão) com *usts* de 0,28%. E para a temperatura de -8 °C foi encontrado o valor médio de 942,2749 µg/mL (2,49% de desvio padrão) e um valor de *usts* igual a 0,26%. Para a temperatura de 50 °C a benzoilecgonina se mostrou instável, devido a degradação ocorrida durante o processo de armazenamento para estudo. O presente trabalho se mostra promissor no desenvolvimento de materiais de referência para drogas de abuso a partir de amostras de drogas apreendidas pela polícia, uma que vez que se mostra barata e eficiente para atender as necessidades na área da química forense que demande de materiais de referências para análises de identificação e quantificação de drogas abuso.

## Capítulo 3: Isolamento do MDMA para aplicação como material de referência

### 3.1 INTRODUÇÃO

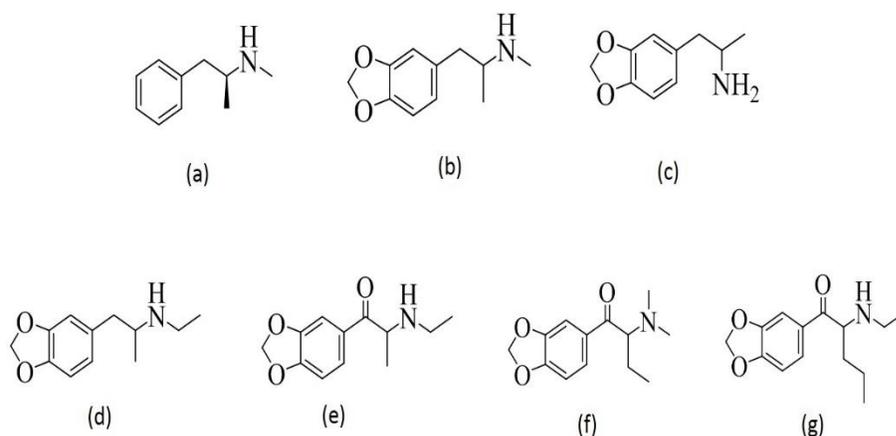
A 3,4-metilendioximetilanfetamina popularmente conhecido como MDMA (Figura 21), é um estimulante anfetamínico sintético que se tornou inicialmente um dos principais ingredientes do “ecstasy” ou “molly” (abreviação de molécula). O MDMA foi originalmente denominado *methysafrylamin*, sendo sintetizado e patenteado pela indústria farmacêutica Merck em 1912, para ser utilizado como agente coagulante. E a partir da década de 80 seu uso se popularizou como uma droga recreativa alternativa principalmente entre jovens e adolescentes.<sup>147</sup>

Quimicamente o MDMA pertence a classe das anfetaminas alucinôgenas ou fenilrtilaminas. Sua estrutura assemelha-se com a metanfetamina, composto com propriedades estimulantes, diferindo apenas pela presença de um grupamento metilenodioxi (-O-CH<sub>2</sub>-O-) ligado ao anel aromático. Por apresentar um carbono quiral, ele possui isomeria óptica, apresentando as formas S(+)-MDMA e R(-)-MDMA. Embora seja produzido como mistura racêmica, estudos mostram que ambas as formas são farmacologicamente ativas e produzem efeitos distintos. A forma R (levogira) apresenta ação lucinogênica semelhante a mescalina e a forma S (dextrogira) apresenta efeitos estimulantes análogos à anfetamina.<sup>148</sup>

Outra característica estrutural química do MDMA, é o fato dele ser uma amina secundária, na qual o hidrogênio do grupo amino é substituído por um grupo metila, fato que pode estar associado a atenuação da sua ação alucinogênica pela N-metilação. O MDMA pode ser encontrado na sua forma de base livre, a qual tem o aspecto de um óleo incolor com cheiro de mofo e sabor ardente, e é comercializado na forma de sal, como cloridrato (MDMA.HCl) e fosfato (MDMA.H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), podendo ser encontrado na como comprimido, pó, cristais e gota.<sup>149</sup>

Quando comercializado na forma de comprimidos podem ser adicionados adulterantes como paracetamol, cetamina, cafeína e fenacetina. E para dá forma e gosto a pílula são adicionados carboidratos como glicose, amido e lactose. Além disso, os

comprimidos possuem diversos formatos e cores, como também diferentes figuras e logotipos. Com o passar do tempo os comprimidos de “ecstasy” acabaram ganhando nova composição como uso de metanfetamina (MA), 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) e de catinonas sintéticas como etilona, dibutilona e N-etilpentilona, consideradas como novas substâncias psicoativas (NPS), popularmente conhecidas como designs drugs (Figura 18). E em 1997, a World Health Organization (WHO), concluiu que o termo genérico “ecstasy” pode apresentar uma gama extensa de compostos ativos e não apenas o MDMA.<sup>150</sup>

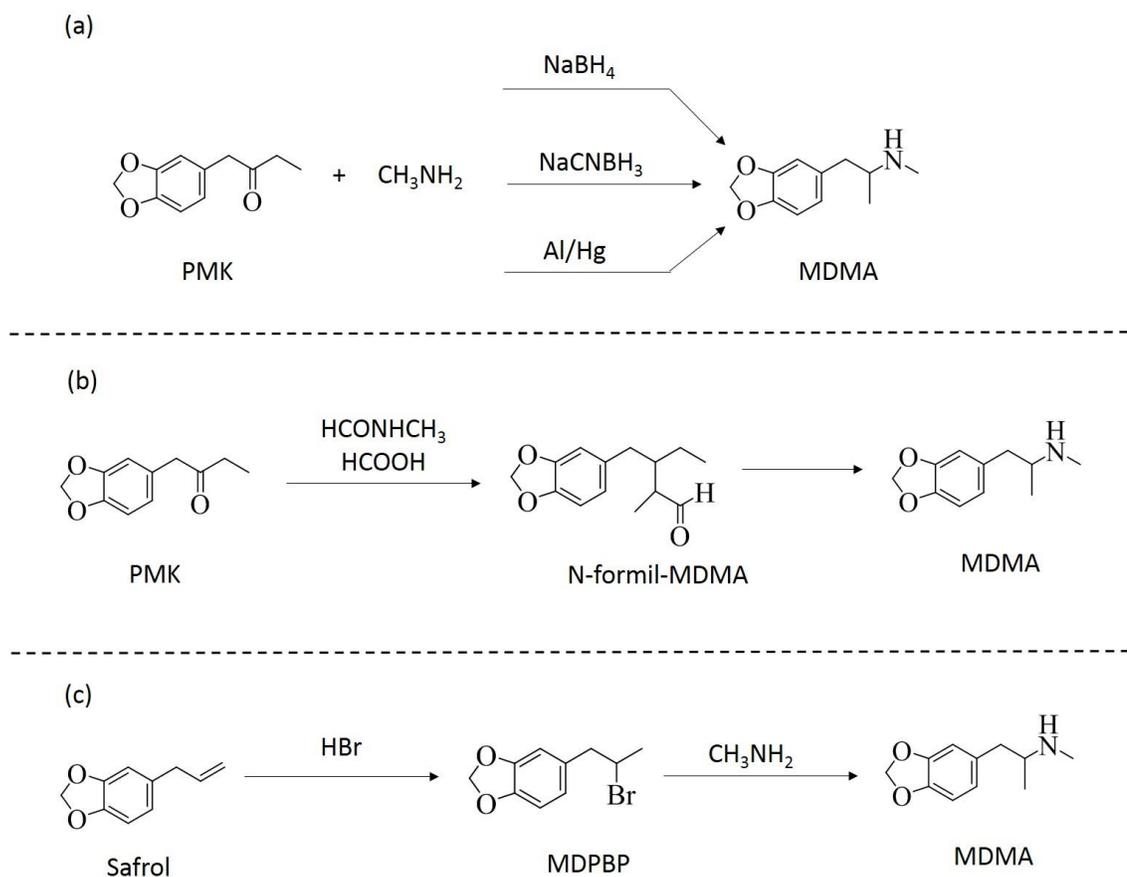


**Figura 18:** Representação química dos principais psicoativos encontrados nos comprimidos de “ecstasy” (a) MA, (b) MDMA, (c) MDA, (d) MDEA, (e) etilona, (f) dibutilona e (g) N-etilpentilona.

A síntese do MDMA em laboratório clandestinos, método mais popular é aminação redutiva da PMK (piperonilmetilcetona), que é comercialmente disponível, sendo o método de síntese mais utilizado devido a diversidade de agentes redutores, sendo o bor-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), o cianoboro-hidreto de sódio ( $\text{NaCNBH}_3$ ) e a amálgama de alumínio ( $\text{Al/Hg}$ ) os mais utilizados.<sup>151</sup> O método de Leuckart, também pode ser utilizado na síntese do MDMA, o qual apresenta como produto intermediário uma amida e não uma imina, como ocorre na aminação redutiva.<sup>152</sup>

Diversos precursores para o MDMA possuem sua comercialização controlada pela lei, como: o safrol, isosafrol, 3,4-metiletilenodioxifenil-2-propanona (MDP2P) e o piperonal, porém alguns precursores alternativos como o catecol, vanilina, piperina e

eugenol são livremente comercializados, o que facilita a produção clandestina. O safrol é bastante citado na literatura como precursor para o MDMA, pelo fato de apresentar o grupo fenilmetilenodioxo, sendo o método conhecido como bromação do safrol. Este precursor é inicialmente bromado, produzindo como intermediário o 3,4-metilenodioxifenil-2-bromopropano (MDPBP) que depois sofre um reação de substituição nucleofílica pela metilamina. A Figura 19 ilustra as rotas sintéticas do MDMA.<sup>151,152</sup>

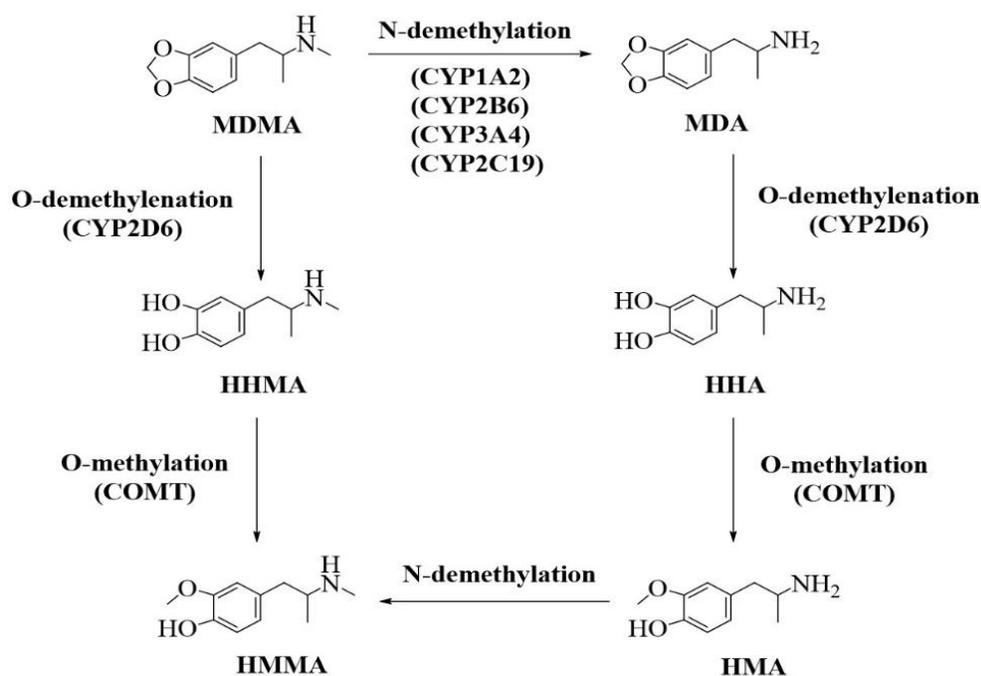


**Figura 19:** Esquema das sínteses do MDMA (a) método da aaminação redutiva, (b) método de Leuckart e (c) método da bromação.

Após a ingestão, os efeitos do MDMA começam a aparecer após 30-60 minutos podendo durar de três a seis horas. O MDMA age sobre vários neurotransmissores, o que leva a liberação de dopamina, serotonina e norepinefrina sobre o sistema nervoso central. Por agirem no controle do humor, apetite, sono, termoregulação e no sistema

nervoso autônomo, o MDMA causa como principais modificações corporais, como euforia, alterações sensoriais, aumento na sensibilidade, aumento na capacidade comunicativa e perda na percepção de tempo. Embora traga uma falsa sensação de bem estar, o uso pode levar sintomas de intoxicação como taquicárdia, hipertensão, hepatotoxicidade hipertermia e em casos mais extremos a morte.<sup>153,154</sup>

Cerca de 65% da dose ingerida da droga é eliminada sem metabolização, via excreção renal. A metabolização do MDMA (Figura 20) ocorre com dependência hepática, e pode ser metabolizado no corpo humano por duas vias que possuem o envolvimento do citocromo P450 monoxidase (CYPs). Uma das vias metabólicas do MDMA ocorre pela ação da CYP2D6 que proporciona o O-desmetilamento formando a 3,4-di-hidroxi metanfetamina (HHMA), a qual sofre ação da catecol-O-metiltransferase (COMT) levando ao O-metilado, 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), o principal metabólito inativo do MDMA. A outra via metabólica ocorre pela ação das CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 e CYP2C19 que N-demetila o MDMA formando o MDA, que possui a atividade metabólica.<sup>155</sup>



**Figura 20:** Esquema da metabolização do MDMA. Adaptado de Fonsart et al. (2008)<sup>155</sup>.

O MDMA pode ser identificado por meio de testes colorimétricos para anfetaminas, metanfetaminas e seus derivados, onde pode-se citar o Teste de Marquis, o Teste do ácido sulfúrico, Teste de Simon, Teste de Simon com acetona e Teste do ácido gálico.<sup>156</sup>

As técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia gasosa são as mais utilizadas como triagem toxicológica devido a simplicidade operacional.<sup>157</sup>

Para a determinação do MDMA a literatura reporta diversas análises

Cheze et al. (2007)<sup>158</sup> desenvolveu por meio do LC-MS/MS com triplo quadrupolo, um método rápido sensível para determinação de amfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA (3,4-metilenodioxietilamfetamina) e MBDB (1,3-Benzodioxolil-N-metilbutanamina) em cabelo, sangue e urina. O método apresentou limite de quantificações (LQ) em sangue e urina com valor de 0,1 ng/mL para todos os analitos. Em cabelo, o LQ foi menor que 5 pg/mg para MA, MDMA e MBDB, 14,7 pg/mg para amfetamina e 15,7 pg/mg para MDA. Esse trabalho foi motivado para a determinação de MDMA em mulheres que usaram a droga sem conhecimento. Esse trabalho permitiu a detecção de MDMA em urina por cerca de oito dias.

Concheiro et al. (2006)<sup>159</sup> publicou um trabalho que descreveu o desenvolvimento de um método por meio de LC (ESI)-MS/MS para a determinação de amfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA e MBDB. O método se mostrou bem rápido com um tempo total de corrida de 8 min, não apresentou efeito de matriz e apresentou ser bem sensível, com limite de detecção (LD) 0,2 ng/mL para MDMA, MDEA e MDA e MBDB, e 1 ng/mL para MDA. Já os valores de LQ foram 1 ng/mL para MA, MDMA, MDEA e MBDB e 2 ng/mL para MDA. Quando realizado em amostras reais, esse método se mostrou eficiente.

Nevescanin et al (2013)<sup>160</sup> avaliou o uso de eletrodo de ouro para determinação quantitativa de amfetamina e MDMA em amostras de urina fortificada por meio da sua oxidação por voltametria cíclica.

Kim et al. (2008)<sup>161</sup> Avaliou a determinação simultânea de MA, MDMA, MDEA e DMA e seus metabólitos usando uma mistura de metanol e ácido clorídrico 1 M (98:2 v/v) para serem analisados por LC-MS/MS.

Deconinck et al (2018)<sup>162</sup> reportou o uso da espectroscopia de infravermelho para diferenciar e quantificar MDMA em comprimidos. Os autores compararam espectros na região do infravermelho próximo e médio, sendo aliado aos métodos quimiométricos PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) e PLS. Demonstrando ser promissor em análises *in situ*.

Hussain et al. (2020)<sup>163</sup> reportou o uso da técnica de RMN na quantificação de MDMA em comprimidos. Os sinais dos hidrogênios aromáticos e dos hidrogênios presentes no carbono metoxilíco, foram utilizados como referência para a quantificação. Os resultados foram comparados com os obtidos por CG-MS, demonstrando serem equivalentes. O uso do RMN mostrou ser uma alternativa e vantajosa pelo fato de não necessitar de pré-tratamento de análise e na capacidade de recuperação da dos analitos da amostra.

Su et al (2005)<sup>164</sup> descreveu o uso da da técnica MALDI-TOFMS (Matriz Assited Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) para determinar MDMA em urina. A curva de calibração foi obtida por meio da relação do material de referência MDMA e MDMA deuterado. Os resultados foram comparados como CG-MS, e não apresentaram diferenças significativas. Os autores mostraram que a técnica MALDI-TOFMS é uma nova alternativa para uso em análises forenses.

Neste contexto, o uso do MDMA como material de referência se torna indispensável no contexto das análises forense, seja para a confirmação irrefutável da molécula de MDMA ou para a sua quantificação em materiais biológicos.

### **3.2 OBJETIVOS**

Desenvolver uma metodologia para isolar e purificar o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) a partir de comprimidos de “ecstasy” apreendidos pela PC-ES.

### 3.3 METODOLOGIA

Foi feita uma mistura com diferentes lotes de apreensão de comprimidos de “ecstasy”, cedidos pela PC-ES, provenientes das quatro macrorregiões em que o estado é dividido (Central, Metropolitana, Norte e Sul). A substância obtida foi caracterizada por meio da técnica de espectrometria de massas por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) 9.4 T, Bruker, Daltonics (Bremer, Alemanha); Synapt G3S-MS e fonte de ionização por electrospray (ESI). As amostras foram solubilizadas em concentração de 1 mg/mL em metanol grau HPLC da NEON (Suzano, São Paulo, BR), em seguida, utilizou 10 µL dessa solução em 1 mL de metanol NEON (Suzano, São Paulo, BR) para posterior análise por infusão direta em ESI (+) FT-ICR MS. A solução calibrante do equipamento foi com a arginina VETEC (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, BR). Foram otimizados os parâmetros para a elaboração de melhores resultados com menores erros (ppm) e melhores relações sinal/ruído. Para as análises de ESI (+) MS foi utilizada a faixa de massa de 150-1500 Da, acumulação de 16 scans e domínio de aquisição de 4 M. Também foram realizados experimentos de fragmentação, ESI (+) MS/MS, para os principais sinais obtidos nos espectros de ESI (+) MS, acumulação de 16 scans e domínio de aquisição de 512 k. Para as análises de ressonância magnética nuclear foi utilizado um espectrômetro Varian 400 MHz (modelo VNMRS 400), operando com um campo magnético de 9,4 Tesla e sonda de detecção direta de 5 mm BroadBand 1H/19F/X. Todos os espectros foram tratados no software MestReNova® e calibrados pelo sinal em 4,87 ppm (metanol-d<sub>4</sub>) para MDMA.

#### 3.3.1 Isolamento do MDMA

Foram pesados e triturados 0,5060 g de comprimidos de “ecstasy”. Adciounou-se 2mL de diclorometano da Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA) e o sistema foi deixado por agitação por 30 min. Em seguida filtrou-se. O filtrado foi deixado em repouso para evaporar a temperatura ambiente, sendo obtido 0,0868 g de extrato.

O extrato foi solubilizado em 3 mL de metanol grau HPLC da NEON (Suzano, São Paulo, BR). Para a otimização dos parâmetros de separação utilizando CLAE, foi usado

um equipamento Analítico Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA) modelo 1260 com detector DAD, uma coluna analítica Waters SunFire C18 (Milford, Massachusetts, EUA), tamanho de partícula de 3,8  $\mu\text{m}$ , diâmetro interno de 4,6 mm x 150 mm de comprimento; solventes A - água (ácido fórmico 0,1%) e B - acetonitrila; modo isocrático de eluição (solvente A: 20%, solvente B: 80%); fluxo de 1,0 mL/min; tempo de corrida 6 minutos; comprimento de onda registrado 234 nm; volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ . Para a separação efetiva do MDMA foi utilizado um equipamento Preparativo Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA) modelo 1260 Infinity com detector DAD, uma coluna preparativa ZORBAX SB-C18 Prep HT Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA), tamanho de partícula 7  $\mu\text{m}$ , diâmetro interno de 21,2 mm x 250 mm de comprimento; solventes A - água (ácido fórmico 0,1%) e B - acetonitrila; modo isocrático de eluição (solvente A: 20%, solvente B: 80%); fluxo de 4,0 mL/min; tempo de corrida 6 minutos; comprimento de onda registrado 234 nm; volume de injeção 100  $\mu\text{L}$ ; número de injeções: 10. Após injetar a amostra no equipamento preparativo foram obtidos 26,4 mg de material.

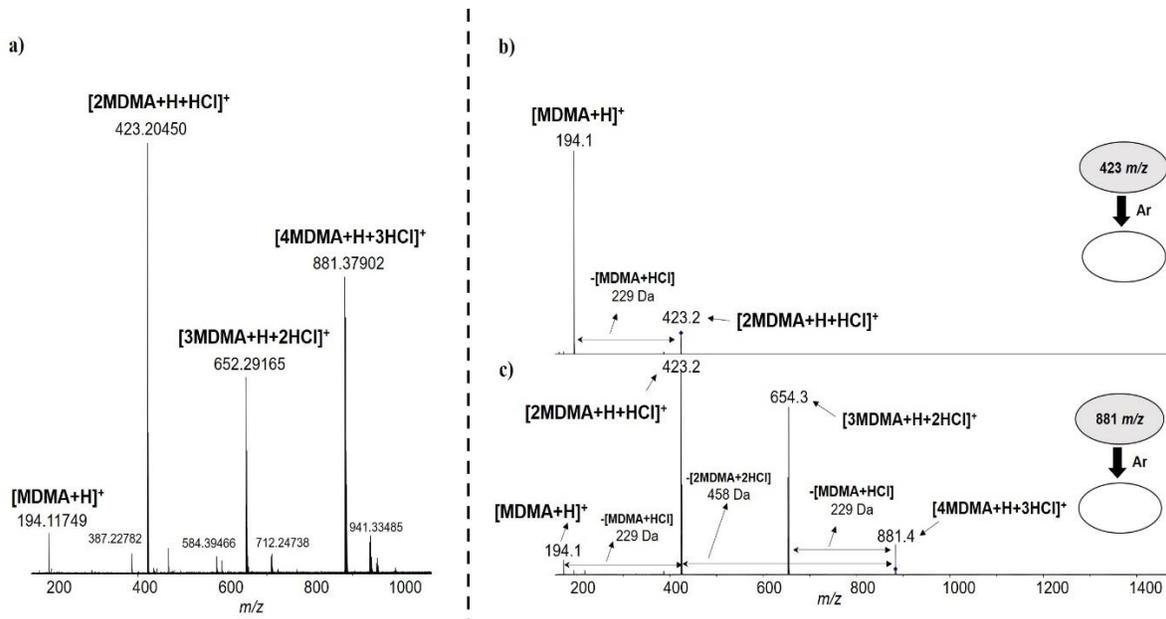
### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No isolamento do psicoativo MDMA presente nos comprimidos de “ecstasy”, foram obtidos a partir da massa de comprimidos pesados o rendimento de 17,15 % (m/m) de extrato bruto. Com esse extrato, foi obtido por meio do isolamento por CLAE a massa de 26,40 mg, que correspondeu a 91,34 % (m/m) da massa presente no volume injetado. O perfil químico (Figura 21a) do espectro de ESI (+) MS mostra os principais sinais observados que qualificam a presença da molécula de MDMA,  $M = \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$  ( $M_w = 193$  Da), estão inseridos na Tabela 8.

Foi observada a presença da molécula de MDMA protonada,  $[\text{MDMA}+\text{H}]^+$ , com  $m/z$  194,11749;  $[\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_2+\text{H}]^+$ , com erro de massas de 0,34 ppm. Juntamente a esse, foi verificado a presença do  $m/z$  423,20450;  $[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}+\text{HCl}]^+$ , que corresponde a um dímero de MDMA protonado junto a uma molécula de ácido clorídrico,  $[2\text{MDMA}+\text{H}+\text{HCl}]^+$ , com erro de massa na escala de ppm. Também, foi possível verificar

o  $m/z$  652,29168;  $[C_{33}H_{48}N_3O_6+H+2HCl]^+$ , que corresponde a um trímero de MDMA protonado junto a duas moléculas de ácido clorídrico,  $[3MDMA+H+2HCl]^+$ , com erro de massa -0,32 ppm. E, por conseguinte, foi observado o  $m/z$  881,37902;  $[C_{44}H_{60}N_4O_6+H+3HCl]^+$ , que corresponde a um tetrâmero de MDMA, protonado junto a três moléculas de ácido clorídrico,  $[4MDMA+H+3HCl]^+$ , com erro de -0.68 ppm. Romão et al. (2011)<sup>165</sup> reportou a presença dos mesmos sinais encontrados para o MDMA, em amostras de comprimidos de “ecstasy”, que foram analisadas pela técnica de ambiente de espectrometria de massa EASI-MS (easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry).

Com base nos principais sinais observados no ESI (+) MS (Tabela 8), foram realizados experimentos de ESI (+) MS/MS (Figura 21b-c). Na Figura S2b foi observado a fragmentação do sinal de  $m/z$  423,2;  $[2MDMA+H+HCl]^+$ , com energia de colisão de -6,5 V, que gerou o íon  $[MDMA+H]^+$  de  $m/z$  194,1; o qual é proveniente da perda de massa de 229 Da, que corresponde a perda de uma molécula de MDMA e uma molécula de ácido clorídrico,  $[MDMA+HCl]^+$ . Já na Figura S2c, foi observada a fragmentação do sinal de  $m/z$  881,4;  $[4MDMA+H+3HCl]^+$ , com energia de colisão de -6,0 V, que gerou o íon  $[3MDMA+H+2HCl]^+$  de  $m/z$  654,3; o qual é proveniente da perda de massa de 229 Da, que corresponde a perda de uma molécula de MDMA e uma molécula de ácido clorídrico,  $[MDMA+HCl]$ . E também foi observado para o mesmo sinal de  $m/z$  881,4; o íon  $[2MDMA+H+HCl]^+$  de  $m/z$  423,2, o qual é proveniente da perda de massa de 458 Da, que corresponde a perda de duas moléculas de MDMA e duas moléculas ácido clorídrico,  $[2MDMA+2HCl]^+$ .



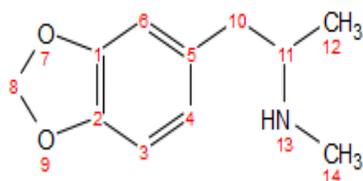
**Figura 21.** (a) Espectro de ESI (+) MS do MDMA e espectros de ESI (+) MS/MS (energia de colisão) (b)  $m/z$  423,2 (-6,5 V) e (c)  $m/z$  881,4 (-6,0 V).

**Tabela 8.** Perfil químico do espectro de ESI (+) MS obtido para o MDMA.

Composto	Fórmula Molecular	$m/z$ medido	$m/z$ calculado	Erro (ppm)	Resolução
[MDMA+H] <sup>+</sup>	[C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup>	194,11749	194,11756	0,34	709,326
[2MDMA+H+HCl] <sup>+</sup>	[C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> +H+HCl] <sup>+</sup>	423,20450	423,20451	0,00	376,855
[3MDMA+H+2HCl] <sup>+</sup>	[C <sub>33</sub> H <sub>48</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> +H+2HCl] <sup>+</sup>	652,29165	652,29147	-0,32	239,248
[4MDMA+H+3HCl] <sup>+</sup>	[C <sub>44</sub> H <sub>60</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> +H+3HCl] <sup>+</sup>	881,37902	881,37842	-0,68	180,816

A estrutura do MDMA foi elucidada com base nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT (Figura S12-14) com os seus valores na Tabela 9, os quais estão em acordo com os resultados reportados por Almeida *et al.* 2018 e Lee *et al.* 2000.[48-49]

**Tabela 9.** Dados de RMN encontrados para o MDMA em metanol-d<sub>4</sub>.



Posição	$\delta_H$ (ppm) Mult. J (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	DEPT
1	-	147,93	C
2	-	146,11	C
3	6,79 m	108,33	CH
4	6,72 dd (7.9; 1.7)	122,92	CH
5	-	129,32	C
6	6,77 s	109,00	CH
8	5,92 s (1.1)	100,11	CH <sub>2</sub>
10	3,05 dd (13.6; 5.3)	38,57	CH <sub>2</sub>
11	3,40 dtt (11.8; 9.6; 6.0)	56,74	CH
12	1,23 d (6.6)	14,38	CH <sub>3</sub>
14	2,70 s	29,79	CH <sub>3</sub>

A pureza do MDMA isolado foi de 89,49%, a qual foi determinada de acordo com Yang et al. (2017)<sup>88</sup> com base no cromatograma (Figura S15).

### 3.5 CONCLUSÃO

A partir comprimidos de “ecstasy” apreendidos, foi possível isolar o MDMA e caracterizá-lo. Foi obtido um rendimento de isolamento de 91,34% m/m com uma pureza relativa de 89,49%. A metodologia empregada para a purificação e isolamento da molécula, se mostrou promissora na obtenção de psicoativos existentes em comprimidos comercializados de forma ilegal para fins recreativos. Tais moléculas se tornam potenciais materiais de referências para aplicação forense.

## Capítulo 4: Aplicação de compostos de európio<sup>III</sup> como materiais de referência contra fraudes

### 4.1 INTRODUÇÃO

Os elementos químicos da série dos lantanídeos, conhecidos inicialmente como terras raras, correspondem aos elementos do lantânio (La,  $Z = 57$ ) ao elemento de lutécio (Lu,  $Z = 71$ ).<sup>166</sup>

A expressão terras raras é imprópria para designar estes elementos, que receberam esta denominação porque foram inicialmente conhecidos em forma de seus óxidos, que se assemelham aos materiais conhecidos como terras. Além da expressão “terras” não ser apropriada à denominação de tais elementos, a expressão “raras” também não está de acordo, pois alguns lantanídeos são mais abundantes, do que muitos elementos, como por exemplo, o Túlio (Tm,  $Z = 69$ ) é mais abundante do que o arsênio, cádmio e mercúrio.<sup>167</sup>

Segundo recomendação da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), usam-se os termos lantanídeos para designar os quinze elementos do bloco *f*, que vão do La ao Lu e terras raras quando aos lantanídeos estiverem incluído os elementos químicos, escândio, Sc ( $Z = 21$ ) e o ítrio, Y ( $Z = 39$ ).<sup>166,167</sup>

As inúmeras aplicações das terras raras são devidas às suas propriedades ímpares, principalmente as espectroscópicas e magnéticas. Além disso, as propriedades químicas e físicas dos elementos lantanídeos são muito semelhantes; isto é uma consequência da sua configuração eletrônica.<sup>166-176</sup>

O preenchimento gradativo dos orbitais 4f aumenta o potencial iônico, conduzindo ao decréscimo do raio atômico dos elementos, do mais leve, La, ao mais pesado, Lu. Este efeito é chamado de contração lantanídica, sendo o resultado da blindagem imperfeita da atração nuclear de um elétron 4f por outro elétron 4f. A contração lantanídica consiste numa significativa diminuição de tamanho dos átomos e dos íons com o aumento do número atômico.<sup>177</sup>

A luminescência é uma das principais características dos íons lantanídeos é, principalmente, originada de transições envolvendo os orbitais parcialmente ocupados 4f,

que são em princípio proibidas por mecanismo de dipolo elétrico (regra de Laporte), pois apresentam  $\Delta l = 0$ . Contudo se a simetria ao redor do íon  $\text{Ln}^{\text{III}}$  não apresentar centro de inversão, as transições ocorrem graças às relaxações da regra de seleção de paridade, devidas à diminuição de simetria pela presença de campo cristalino, misturas interconfiguracionais, efeitos de acoplamento spin-órbita, populações ativadas termicamente, dentre outros efeitos que fazem com que as emissões  $f-f$  sejam intensas.<sup>178,179</sup> Porém, se o íon  $\text{Ln}^{\text{III}}$  estiver inserido em um sítio que apresenta centro de inversão, a regra de Laporte não é relaxada, e as transições  $4f-4f$  permanecem proibidas por este mecanismo, mas podem ser permitidos pelos mecanismos de dipolo magnético, quadrupolo elétrico, acoplamento dinâmico e dipolo elétrico forçado, sendo o mecanismo de dipolo elétrico forçado<sup>180,181</sup> e acoplamento dinâmico<sup>182</sup> são dominantes em complexos de lantanídeos.

O espectro de luminescência de alguns íons lantanídeos apresenta bandas espectrais finas, que estão relacionadas à blindagem dos elétrons  $4f$ . Porém, nem todas as transições eletrônicas que ocorrem acarretarão emissão de luz visível. Também as transições  $5d \rightarrow 4f$  podem ocorrer, as quais originam bandas de emissão largas, pois o subnível  $5d$  é desdobrado pelo campo ligante. Estas transições normalmente aparecem nos compostos de  $\text{Ce}^{\text{III}}$ ,  $\text{Pr}^{\text{III}}$  e  $\text{Tb}^{\text{III}}$ .<sup>183</sup>

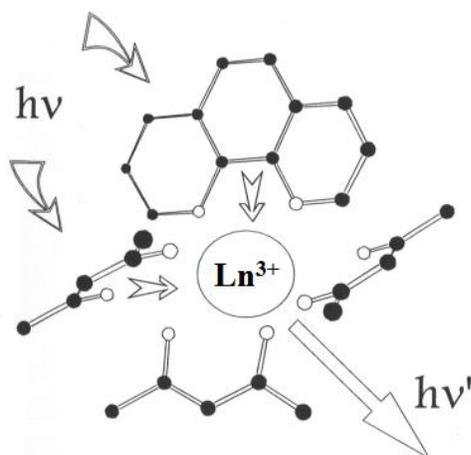
Os íons lantanídeos podem ser classificados em três grupos, em virtude de suas faixas de emissão:

- $\text{Sm}^{\text{III}}$ ,  $\text{Eu}^{\text{III}}$ ,  $\text{Tb}^{\text{III}}$  e  $\text{Dy}^{\text{III}}$  são emissores fortes, por possuírem níveis do estado excitado próximo do estado tripleto do ligante.

- $\text{Er}^{\text{III}}$ ,  $\text{Pr}^{\text{III}}$ ,  $\text{Nd}^{\text{III}}$ ,  $\text{Ho}^{\text{III}}$ ,  $\text{Tm}^{\text{III}}$  e  $\text{Yb}^{\text{III}}$  são emissores fracos na região do infravermelho próximo. A fraca luminescência desses íons é atribuída ao fato de que eles têm níveis eletrônicos muito próximos uns dos outros, fazendo com que as transições não radiativas sejam favorecidas.

- $\text{La}^{\text{III}}$ ,  $\text{Gd}^{\text{III}}$  e  $\text{Lu}^{\text{III}}$  não exibem fluorescência. Pois,  $\text{La}^{\text{III}}$  e o  $\text{Lu}^{\text{III}}$  possuem configurações  $4f^0$  e  $4f^{14}$  respectivamente, não sendo possíveis transições  $4f$ . Já o  $\text{Gd}^{\text{III}}$  possui configuração  $4f^7$ , o nível excitado de mais baixa energia é mais alto que o estado tripleto do ligante, impossibilitando de ser um receptor de energia, portanto não fluoresce.<sup>183</sup>

A luminescência por excitação direta do íon lantanídeo é pouco eficiente, porque os íons lantanídeos não têm absorvidades molares altas. Então, usa-se um ligante que absorve luz e este transfere energia para o íon lantanídeo, que emite sua luminescência, oriunda de transições intraconfiguracionais da camada  $4f$ , geralmente observada na região do visível<sup>184</sup>. Deste modo, ocorre uma transferência de energia intramolecular do ligante ao íon metálico central. Na linguagem dos espectroscopistas este efeito é conhecido como “efeito antena”, que é ilustrado pela Figura 22.<sup>185</sup>



**Figura 22.** Sistema representativo de um complexo conversor molecular de luz.

Essa capacidade que os complexos luminescentes de lantanídeos têm de absorver radiação com frequência característica do ligante e emitir com frequência característica do íon metálico, faz com que estes sejam denominados de dispositivos moleculares conversores de luz (DMCLs). E a eficiência da transferência de energia do ligante para o íon lantanídeo depende da natureza química do ligante coordenado. A partir desse processo, a energia absorvida pelo ligante, passa do estado singleto de baixa energia para o singleto de alta energia ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), podendo também haver, cruzamento intersistema do singleto de alta energia para o estado tripleto excitado ligante ( $S_0 \rightarrow T_1$ ). Assim, pode haver transferência de energia do  $S_1$  ou  $T_1$  para o nível emissor específico de cada lantanídeo, sendo a transferência do estado tripleto a mais provável, por apresentar maiores tempos de vida.<sup>186-189</sup>

Dentre os lantanídeos, merece destacar a capacidade do  $\text{Eu}^{\text{III}}$ ,  $\text{Tb}^{\text{III}}$  e  $\text{Tm}^{\text{III}}$  de emitirem luz na região do visível nas cores, vermelho, verde e azul respectivamente e o

Dy<sup>III</sup> e Sm<sup>III</sup> emitirem na região do infravermelho próximo, sendo que este último também é capaz de emitir na região do visível na cor laranja.<sup>190-192</sup> O íon Eu<sup>III</sup> é bastante utilizado, pelo fato dos seus estados excitados (<sup>5</sup>D<sub>0</sub> ~ 17267 cm<sup>-1</sup> e <sup>5</sup>D<sub>4</sub> ~ 20500 cm<sup>-1</sup>) apresentarem energias mais baixas do que a maioria dos estados tripletos dos ligantes orgânicos.<sup>193</sup>

Dentro da química forense a literatura reporta muitos trabalhos relacionados ao uso de complexos de lantanídeos, principalmente como marcadores luminescentes na identificação de resíduos de munição. Lucena et al. (2013)<sup>194</sup> reportou a síntese de ZnAl<sub>1.95</sub>Ln<sub>0.05</sub>O<sub>4</sub> (onde Ln = Eu<sup>III</sup> ou Tb<sup>III</sup>) sendo utilizado na marcação de munição e sendo facilmente identificado devido a luminescência do resíduo de pólvora. A identificação foi realizada visualmente por irradiação UV direta de qualquer superfície que contenha partículas do resíduo.

Destefani et al. (2014)<sup>195</sup> relataram a avaliação de toxicidade aguda do complexo [Eu(PIC)<sub>3</sub>(NMK)<sub>3</sub>], tendo como ligantes ácido picrico (PIC) e N-metilcaprolactama (NMK), aplicado também como marcador luminescente para a identificação visual da resíduos de armas de fogo.

Venturini et al. (2018)<sup>196</sup> avaliou o uso de um complexo [Eu(TBZ)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>].H<sub>2</sub>O e [Tb(TBZ)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>].H<sub>2</sub>O. O composto de térbio apresentou uma luminescência maior quando comparado ao composto de európio, sendo selecionado para os testes de identificação de resíduos. Os resíduos do composto de térbio foram identificados com sucesso nos locais esperados em ter vestígios de pólvora, o que se mostrou promissor como marcador luminescente.

Serwy et al. (2018)<sup>197</sup> reportou o uso de MOFs (metal organic frameworks) como marcadores luminescentes na identificação de resíduos de munição. Os autores avaliaram a proporção de lantanídeos (Eu<sup>III</sup> e Tb<sup>III</sup>) utilizadas na síntese do MOF. As proporções de cerca de 10 % para Eu<sup>III</sup> ou 5% para Tb<sup>III</sup> foram suficientes para a identificação dos vestígios de munição, o que mostra a eficiência do uso desses elementos para tal aplicação.

Além disso, são reportados também trabalhos voltados para identificação de substâncias por meio da luminescência dos lantanídeos. Chen et al. (2020)<sup>198</sup> sintetizou três MOFs (LnMOFs) [Ln<sub>2</sub>L<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (Ln<sup>III</sup> = Eu<sup>III</sup>, Tb<sup>III</sup> e Gd<sup>III</sup>) adotando ligante de

ciclobutano-1,1-dicarboxílico ácido (H<sub>2</sub>L). Nesse estudo, os autores mostraram o uso desses compostos como sensores luminescentes para metanol. Já Fonseca et al. (2019)<sup>199</sup> relatou o uso de MOF baseado em Tb<sup>III</sup> como um sensor luminescente para detectar a adulteração de etanol com metanol.

Assim, com o intuito de ampliar o espectro de aplicação de compostos a base de lantanídeos na área forense, novos estudos de materiais que incorporam esses elementos se tornam essenciais.

## 4.2 OBJETIVOS

Desenvolver estudos exploratórios para aplicação de novos complexos de európio<sup>III</sup> na área da química forense para combater a falsificação de cédulas e adulteração de combustível.

## 4.3 PARTE EXPERIMENTAL

Foram utilizados os complexos [Eu(pic)<sub>3</sub>(DVL)<sub>3</sub>], [Eu(pic)<sub>3</sub>(EPK)<sub>3</sub>] e [Eu(pic)<sub>3</sub>(OEN)<sub>3</sub>] para o estudo como futuros marcadores luminescentes em cédulas. E o complexo [Eu(TTA)<sub>3</sub>(PRD)(H<sub>2</sub>O)] como sensor luminescente no combate da adulteração de gasolina.

### 4.3.1 Materiais e métodos

#### 4.3.1.1 Marcadores luminescentes em cédulas

Foram utilizados, para a síntese dos complexos, reagentes com alto grau de pureza. Eu<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Chemicals, USA – 99,9%), uréia (Vetec Química Fina Ltda, Brazil – 99,5 %), ácido pícrico: C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (BA Quality – 99,9 %), delta-valerolactama – (DVL): C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO (Sigma-Aldrich Chemicals, USA – 98 %), epsolon-caprolactama – (EPK): C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO (Sigma-Aldrich Chemicals, USA – 98 %) e oenanolactama – (OEN): C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO (Sigma-Aldrich Chemicals, USA – 98 %).

As estequiometrias químicas dos complexos foram sugeridas por meio das análises de titulação complexométricas com solução padrão de EDTA 0.01 mol.L<sup>-1</sup> e por análise elementar utilizando o equipamento Flash 1112- CHNS-O da Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EUA). Os espectros de infravermelho foram obtidos no modo de transmitância com acessório de reflectância total atenuada (ATR), na região de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>, utilizando um espectrômetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum 400 MID/NIR (Massachusetts, EUA), à temperatura ambiente. Os espectros de excitação foram obtidos a partir dos compostos que estavam no estado sólido e a temperatura ambiente, na faixa de 250 – 550 nm, com abertura de fenda de 0,75, monitorando a intensidade da banda  ${}^5D^0 \rightarrow {}^7F^2$  em 616 nm, enquanto que os espectros de emissão, para os compostos que estavam no estado sólido, foram obtidos na faixa de 500 – 750 nm a temperatura ambiente, com abertura de fenda de 0,75 e excitação em 430 nm, utilizando um espectrofluorímetro Quanta Master 40 com lâmpada de Xenônio de 75 W. A determinação da massa exata dos complexos foram feitas por laser desorption ionization mass spectrometry em ambos os modos de ionização (LDI(±)-MS), usando um espectrômetro de massas FT-ICR modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany, equipado com um laser smartbeam-IITM (355 nm). Os espectros de LDI(±)-MS foram adquiridos com 16 scans, com frequência de 200 Hz, na faixa de massas de *m/z* 200-1200 usando 100 laser shots por pixel, laser focus setting small (~ 30 μm) e laser power variando de 13 a 15 %.

Foram utilizadas três cédulas de real nos valores de R\$10, R\$20, R\$100 e três cédulas de R\$50. Nas cédulas de R\$50 foram aplicados aproximadamente 1 mg de cada complexo, um em cada cédulas, e nas de R\$10, R\$20, R\$100 foram aplicados 1 mg apenas do complexo [Eu(pic)<sub>3</sub>.(EPK)<sub>3</sub>]. Cada complexo foi aplicado na superfície de cada cédula sobre a região que continha os respectivos valores numéricos das mesmas. As análises qualitativas da fotoluminescência de cada complexo presente nas cédulas foram feitas utilizando um Comparador Vídeo Espectral VSC® 6000 (Foster & Freeman - Worcestershire, United Kingdom) e foram excitadas utilizando os comprimentos de onda de 254, 312 e 365 nm. Também foi utilizado o equipamento Lumatec Superlite 400 (Deisenhofen, Germany) com excitação na faixa espectral de 320 - 400 nm.

#### 4.3.1.2 Sensor luminescente contra adulteração em gasolina

Foram utilizados os ligantes 2-tenoiltrifluoroacetato – (TTA):  $C_8H_4F_3O_2S$  (Sigma-Aldrich Chemicals, USA – 99,9%), e a 2-pirrolidona - (PRD):  $C_4H_7NO$  (Sigma-Aldrich Chemicals, USA – 99,9%). O percentual de európio no complexo foi sugerido por meio das análises de titulação complexométricas com solução padrão de EDTA  $0.01 \text{ mol.L}^{-1}$  utilizando alaranjando orto-xilenol como indicador. A análise elementar foi realizada utilizando o equipamento PerkinElmer 2400 series 2 Elemental Analysis Instrument. Os espectros de infravermelho foram obtidos em pastilha de KBr, no modo de transmitância, na região de  $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando um espectrômetro PerkinElmer FTIR GX, à temperatura ambiente. Os espectros de fotoluminescência foram obtidos usando um espectrofluorômetro FLUOROLOG3 ISA/ Jobin-Yvon equipado com um fotomultiplicador Hamamatsu R928P a SPEX 1934 D fosforímetro, equipado com uma lâmpada de Xe de 450 W e uma lâmpada de Xe-Hg de 150 W pulsada.

Para o experimento foi utilizada gasolina tipo 'A' que não possui aditivos e foram realizadas misturadas da mesma, com uma solução etanol com complexo  $[Eu(TTA)_3(PRD)(H_2O)] - 6.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ , variando as proporções na faixa de 0-100% (v/v), em seguida as misturas eram agitadas e analisadas no espectrofluorímetro.

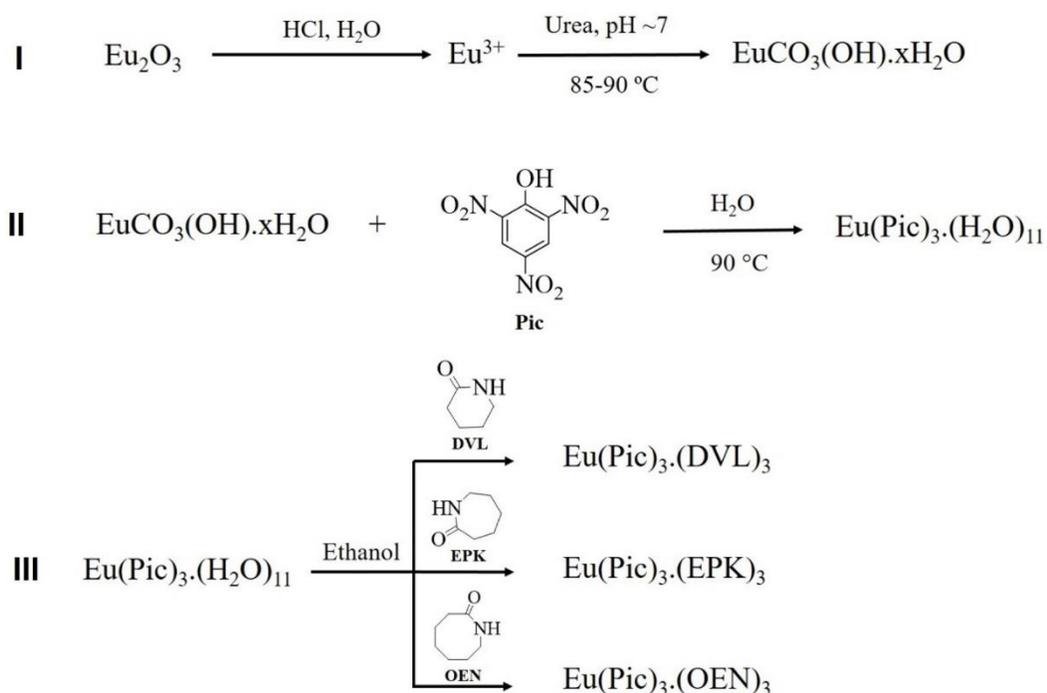
#### 4.3.2 Síntese

##### 4.3.2.1 Marcadores luminescentes em cédulas

As sínteses dos complexos foram feitos de acordo com Destefani et al. (2016)<sup>195</sup>. Inicialmente, o carbonato básico hidratado de európio<sup>III</sup>,  $EuCO_3(OH).xH_2O$ , foi obtido a partir do  $Eu_2O_3$  (5,0 g) e ácido clorídrico concentrado foi então adicionado na suspensão do óxido em água (800 mL). Em seguida, sob aquecimento ( $85-90 \text{ }^\circ\text{C}$ ), foi adicionado uréia até atingir um pH de aproximadamente 7. Como produto, foi obtido carbonato básico hidratado de európio<sup>III</sup>, com rendimento de 90 %, onde 2,0 g do composto foi suspenso em meio aquoso (100 mL), e sob aquecimento ( $85 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$ ), adicionou-se ácido pícrico até que todo carbonato básico hidratado de európio<sup>III</sup> fosse consumido. A

solução resultante foi filtrada e deixada em repouso à temperatura ambiente para cristalização. Os cristais obtidos de coloração amarela foram deixados para secar a temperatura ambiente e armazenados em frasco âmbar. Os resultados de análise elementar-experimental (calculado), em %, e FTIR para o complexo [Eu(pic)<sub>3</sub>.(H<sub>2</sub>O)<sub>11</sub>] foram: Eu<sup>III</sup>, 15,50 (14,70); C, 20,60 (20,90); H, 2,50 (2,73); N, 11,83 (12,19). Rendimento de 79 %.

Mantendo-se a relação molar 1:3 ([Eu(pic)<sub>3</sub>.(H<sub>2</sub>O)<sub>11</sub>] : L) L = DVL, EPK e OEN, o picrato de európio<sup>III</sup> hidratado foi solubilizado em álcool etílico. Foi adicionado o ligante delta-valerolactama e em seguida o reagente trietilortoformiato. O sistema ficou sob agitação até o aparecimento de um sólido amarelo. O sólido obtido foi lavado com éter etílico, sendo seco à temperatura ambiente e armazenado em frasco âmbar. A Figura 23 ilustra as sínteses dos complexos.



**Figura 23:** Esquema das sínteses dos complexos de európio<sup>III</sup> estudados.

Análise elementar- experimental (calculado), em %, e os dados de FTIR para os complexos foram:

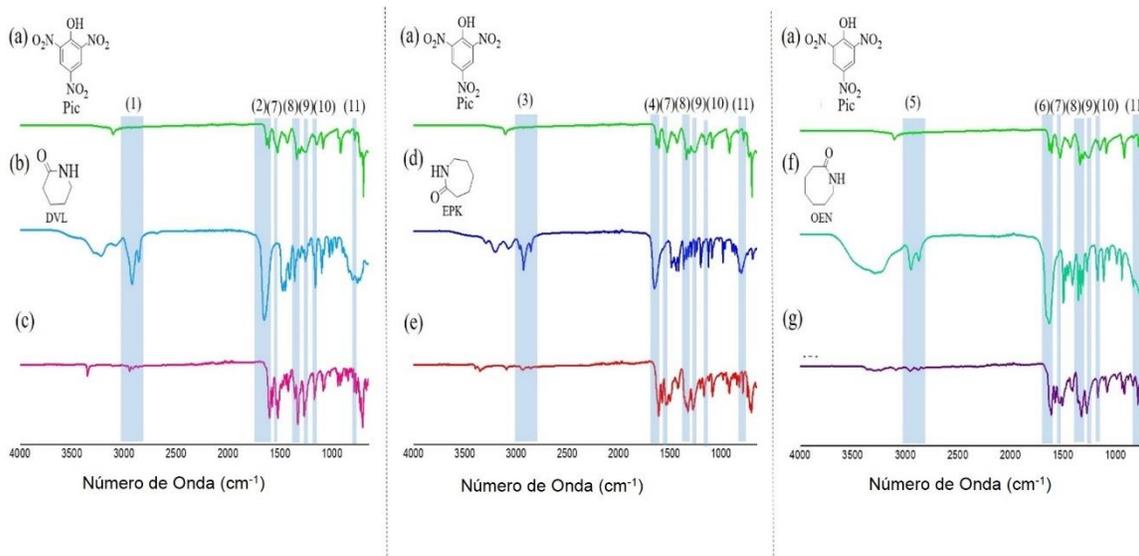
Eu(pic)<sub>3</sub>.(DVL)<sub>3</sub>] - EuC<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub>: Eu<sup>III</sup>, 13.37 (13.40); C, 35.88 (34.87); H, 3.09 (2.93); N, 14.39 (14.79). FTIR (cm<sup>-1</sup>) (Figura 24c): (1) νNH (2956<sub>(s)</sub>), (2) νC=O (1599<sub>(s)</sub>),

(7)  $\nu_{\text{assNO}_2}$  (1534<sub>(s)</sub>), (8)  $\nu_{\text{sNO}_2}$  (1318<sub>(s)</sub>), (9)  $\gamma_{\text{CH}}$  (785<sub>(m)</sub>); para DVL livre (Figura 24b), (1)  $\nu_{\text{NH}}$  (2951<sub>(s)</sub>), (2)  $\nu_{\text{C=O}}$  (1637<sub>(s)</sub>). Rendimento de 63 %.

[Eu(pic)<sub>3</sub>.(EPK)<sub>3</sub>] - EuC<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub>: Eu<sup>III</sup>, 13.01 (12.93); C, 37.39 (36.69); H, 3.39 (3.33); N, 14.34 (14.26). FTIR (cm<sup>-1</sup>) (Figura 24e): (3)  $\nu_{\text{NH}}$  (2935<sub>(s)</sub>), (4)  $\nu_{\text{C=O}}$  (1607<sub>(s)</sub>), (7)  $\nu_{\text{assNO}_2}$  (1534<sub>(s)</sub>), (8)  $\nu_{\text{sNO}_2}$  (1324<sub>(s)</sub>), (9)  $\gamma_{\text{CH}}$  (790<sub>(m)</sub>); para EPK livre (Figura 24d), (3)  $\nu_{\text{NH}}$  (2930<sub>(s)</sub>), (4)  $\nu_{\text{C=O}}$  (1647<sub>(s)</sub>). Rendimento de 68 %.

[Eu(pic)<sub>3</sub>.(OEN)<sub>3</sub>] - EuC<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub>: Eu<sup>III</sup>, 12.40 (12.48); C, 38.46 (38.43); H, 3.70 (3.69); N, 13.80 (13.79). FTIR (cm<sup>-1</sup>) (Figura 24g): (5)  $\nu_{\text{NH}}$  (2940<sub>(s)</sub>), (6)  $\nu_{\text{C=O}}$  (1604<sub>(s)</sub>), (7)  $\nu_{\text{assNO}_2}$  (1554<sub>(s)</sub>), (8)  $\nu_{\text{sNO}_2}$  (1335<sub>(s)</sub>), (9)  $\gamma_{\text{CH}}$  (783<sub>(m)</sub>); para OEN livre (Figura 24f), (5)  $\nu_{\text{NH}}$  (2924<sub>(s)</sub>), (6)  $\nu_{\text{C=O}}$  (1655<sub>(s)</sub>). Rendimento de 72 %.

FTIR (cm<sup>-1</sup>) para o ácido pícrico livre (Figura 24a),  $\nu_{\text{assNO}_2}$  (1526<sub>(s)</sub>),  $\nu_{\text{sNO}_2}$  (1539<sub>(s)</sub>),  $\gamma_{\text{CH}}$  (782<sub>(m)</sub>).

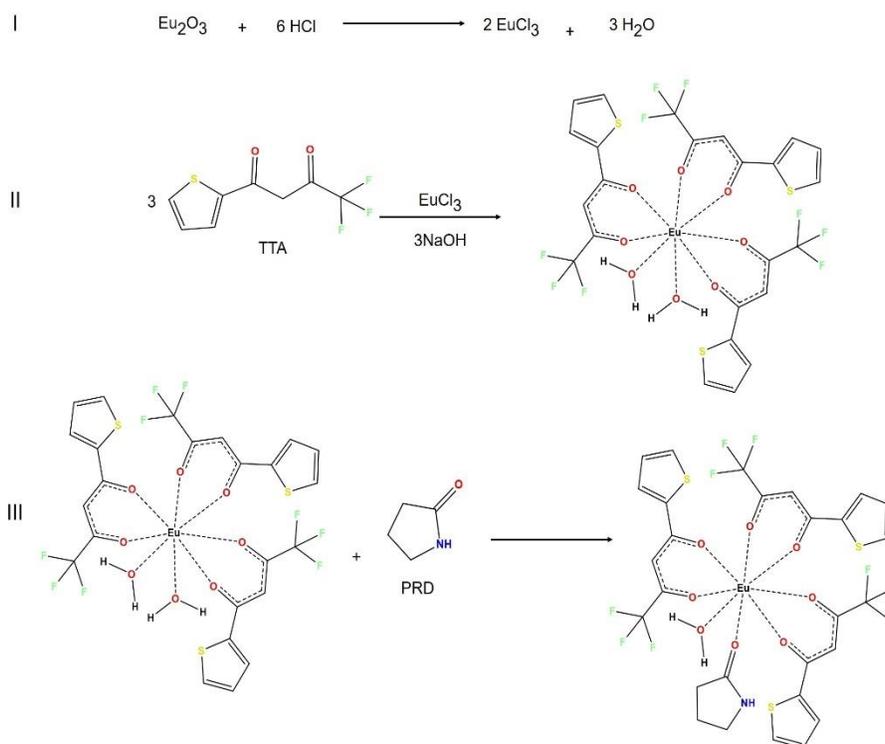


**Figure 24.** Espectros de FTIR (a) Pic: 7-  $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 -  $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 -  $\gamma_{\text{CH}}$ ; (b) DVL: 1-  $\nu_{\text{NH}}$ , 2 -  $\nu_{\text{C=O}}$ ; (c) [Eu(pic)<sub>3</sub>.(DVL)<sub>3</sub>]: 1-  $\nu_{\text{NH}}$ , 2 -  $\nu_{\text{C=O}}$ , 7-  $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 -  $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 -  $\gamma_{\text{CH}}$ ; (d) EPK: 3 -  $\nu_{\text{NH}}$ , 4 -  $\nu_{\text{C=O}}$ ; (e) [Eu(pic)<sub>3</sub>.(EPK)<sub>3</sub>]: 3 -  $\nu_{\text{NH}}$ , 4 -  $\nu_{\text{C=O}}$ , 7-  $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 -  $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 -  $\gamma_{\text{CH}}$ ; (f) OEN: 5 -  $\nu_{\text{NH}}$ , 6 -  $\nu_{\text{C=O}}$  and (g) [Eu(pic)<sub>3</sub>.(OEN)<sub>3</sub>]: 5 -  $\nu_{\text{NH}}$ , 6 -  $\nu_{\text{C=O}}$ , 7-  $\nu_{\text{assNO}_2}$ , 8 -  $\nu_{\text{sNO}_2}$ , 9 -  $\gamma_{\text{CH}}$ .

#### 4.3.2.2 Sensor luminescente contra adulteração em gasolina

O [Eu(TTA)<sub>3</sub>(PRD)(H<sub>2</sub>O)], foi sintetizado adaptado de Borges et al. (2016)<sup>200</sup>. A PRD (0.20 g, 2.35 mmol) foi adicionada gota a gota a uma solução de metanol (30 mL)

de  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$  (1.20 g, 1.40 mmol). A mistura foi deixada sob agitação durante a noite, produzindo um sólido branco, que lavado com água para remover o excesso do ligante PRD. Em seguida, o sólido foi lavado e filtrado. A Figura 25 ilustra a rota sintética do composto.



**Figura 25:** Esquema das síntese do complexo  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ .

$[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{PRD})(\text{H}_2\text{O})]$  -  $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{EuF}_9\text{NO}_8\text{S}_3$ : análise elementar-experimental (calculado), em %:  $\text{Eu}^{\text{III}}$ , 16.49 (16.54); C, 35.98 (36.61); H, 2.24 (2.30); N, 1.45 (1.52). FTIR (KBr /  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu_{\text{assC-O}}$  (1536 (s)),  $\nu_{\text{sC-O}}$  (1623 (s)),  $\nu_{\text{C-N}}$  (1496 (s)); TTA livre:  $\nu_{\text{sC-O}}$  (1654 (s)) e PRD livre:  $\nu_{\text{sC-O}}$  (1662 (s)),  $\nu_{\text{C-N}}$  (1467 (s)) (Figura S16). Rendimento de 85 %.

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Marcadores luminescentes em cédulas

A estequiometria dos complexos foram obtidas por meio da análise análise elementar (CHN) que confirmaram a relação molar 1:3 ( $[\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{H}_2\text{O})_{11}]$  : ligante) . As

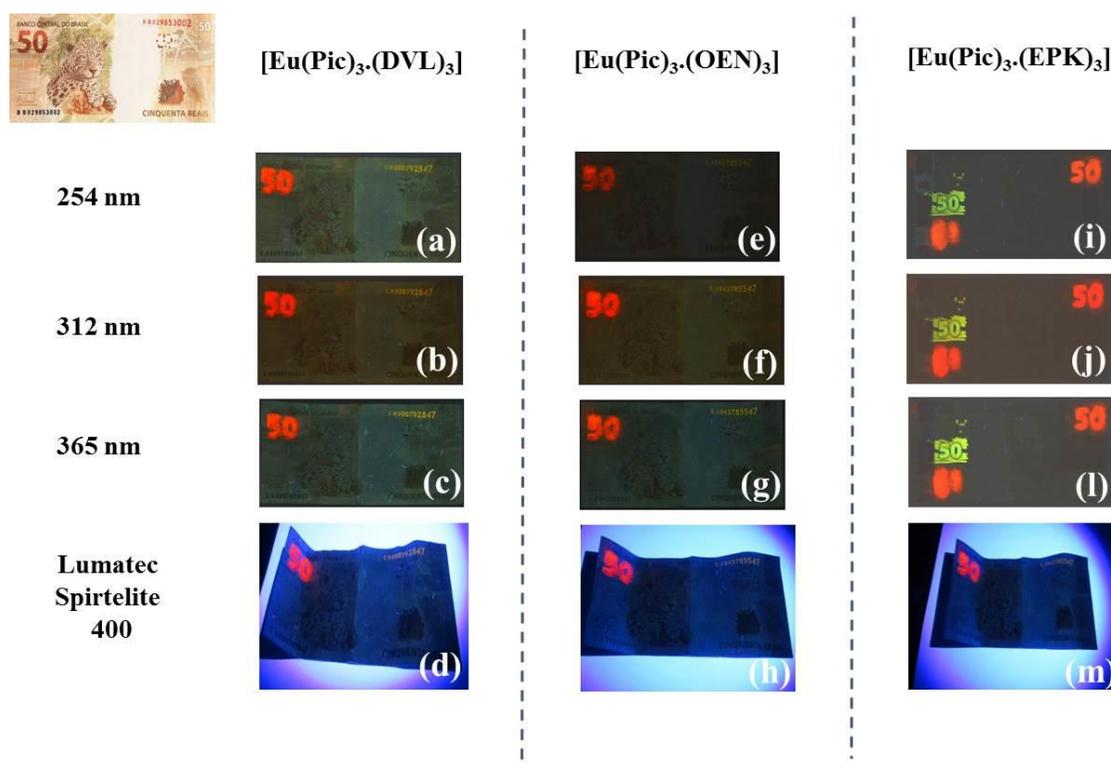
análises de FTIR (Figura 24), foram observadas a presença das frequências de estiramento assimétrica  $\nu_{\text{ass}}\text{NO}_2$  (7) e simétrica  $\nu_{\text{s}}\text{NO}_2$  (8) para o íon picrato, evidenciando a coordenação desse íon ao centro metálico do európio. Os desdobramentos e deslocamentos observados para o  $\nu_{\text{s}}\text{NO}_2$  sugerem que os íons picratos estão coordenados ao centro metálico de forma bidentada, por meio do oxigênio fenólico e pelo oxigênio do grupo o-nitro. E também foi observado deslocamento da frequência de estiramento  $\nu\text{C}=\text{O}$  (2, 4 e 6) para região de menor energia e diminuição da intensidade do estiramento  $\nu\text{NH}$  (1, 3 e 5), das lactamas em relação ao espectro vibracional do ligante livre, sugerindo a coordenação dessas ao centro metálico por meio dos átomos de oxigênio das respectivas carbonilas.<sup>201</sup>

Os espectros de excitação (Figura S17) apresentaram uma banda larga e intensa na faixa de 250 – 500 nm com excitação máxima em 397 nm, sendo caracterizada como a banda de transição dos ligantes ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) presentes nos compostos. Foi observado nos espectros emissão (Figura S18) de que a substituição das moléculas de água do  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{H}_2\text{O})_{11}]$  (Figura S18a) pelas respectivas lactamas levou a um aumento da intensidade de emissão nos espectros dos respectivos complexos. Isso pode ser atribuído ao fato das moléculas de águas atuarem como supressores de luminescência via processo não radiativo de acoplamento entre o estado emissor  $^5\text{D}_0$  com o oscilador OH.<sup>202</sup>

Os espectros de emissão dos compostos a temperatura ambiente apresentaram as regiões das transições  $f-f$  provenientes do nível excitado  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$  ( $J=0, 1, 2, 3$  e  $4$ ) com emissão máxima na região de 614 nm.  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$  (576 nm),  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$  (590 nm),  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  (614 nm),  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$  (650 nm) e  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$  (696 nm). Foi observada a banda correspondente à transição  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ , que se apresentou com uma intensidade fraca. A presença dessa banda sugere que o íon  $\text{Eu}^{3+}$  está envolvido em um ambiente químico de baixa simetria, que pode ser do tipo  $C_n$ ,  $C_s$  ou  $C_{nv}$ .<sup>203</sup> A transição  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$  é uma transição hipersensitiva apresentando um caráter predominantemente de dipolo elétrico e quando sua intensidade é maior do que a transição  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ , é um indicativo que os compostos não possuem centro de inversão. A baixa intensidade da transição  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$  associada com intensidade da transição  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$  apresentada, pode ser interpretada em termos do sítio simétrico do ambiente químico que o íon  $\text{Eu}^{\text{III}}$  está envolvido, sugerindo

que o íon se encontra num ambiente químico altamente polarizável com simetria distorcida.<sup>204</sup>

As análises de fotoluminescência nas cédulas foram feitas de forma qualitativa, avaliando de forma visual a intensidade de emissão de luz de cada complexo presentes nas cédulas de R\$ 50. A Figure 26 mostra a intensidade de emissão de luz de cada complexo sob excitação em diferentes comprimentos de onda.

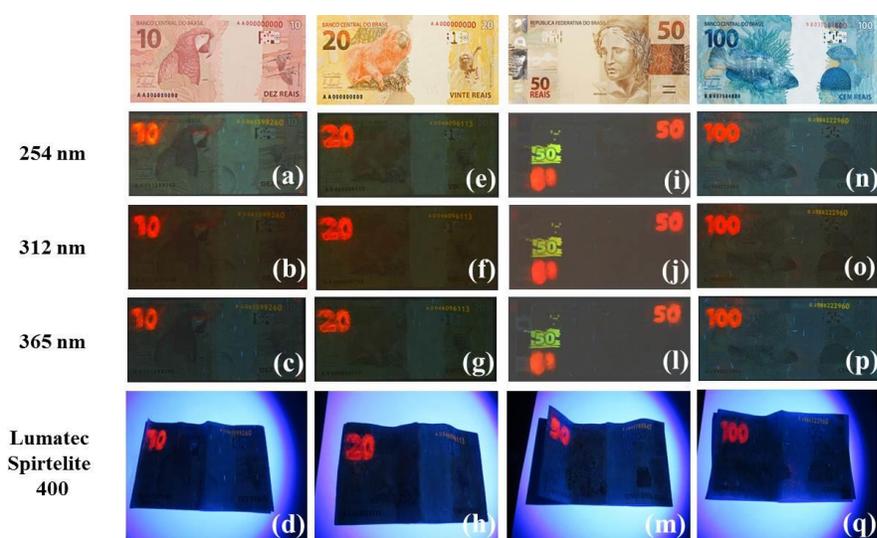


**Figura 26:** Cédulas de R\$ 50 com os complexos estudados, sob excitação em diferentes comprimentos de onda.

Foi possível observa que a luminescência, emissão de luz de coloração vermelha, correspondente a cada complexo presente nas cédulas, sob a excitação em diferentes comprimentos de onda: 254, 312, 365 e 320-400 (Lumatec Spirtelite 400), sendo facilmente evidenciada a olho nu. Para o comprimento de onda de 365 nm e com o uso do Lumatec Spirtelie, os quais possuem comprimentos de onda próximos ao do obtido (397 nm) nos espectros de excitação, a emissão de luz foi observada mais intensa quando comparada a dos comprimentos de onda de 254 e 312 nm. Além da

luminescência proveniente dos complexos adicionados nas superfícies das cédulas, é possível observar também uma região (Figura 26i-l) com emissão de luz verde, a qual é referente a um dos elementos de segurança já existentes na própria cédula. De uma maneira geral, de forma qualitativa foi verificado a seguinte ordem de intensidade da luminescência dos complexos nas cédulas  $Eu(pic)_3.(OEN)_3 > [Eu(pic)_3.(EPK)_3] > [Eu(pic)_3.(DVL)_3]$ , o que corroborou com o observado nos espectros de emissão.

Embora todos os complexos forneceram emissão de luz que possibilitou a identificação visual dos mesmos nas cédulas, o complexo  $[Eu(pic)_3.(EPK)_3]$  foi selecionado para ser adicionado nas superfícies das cédulas de R\$10, R\$20 e R\$100. A Figura 27 mostra a emissão de luz do complexo  $[Eu(pic)_3.(EPK)_3]$  sob excitação em diferentes comprimentos de onda nas diferentes cédulas.



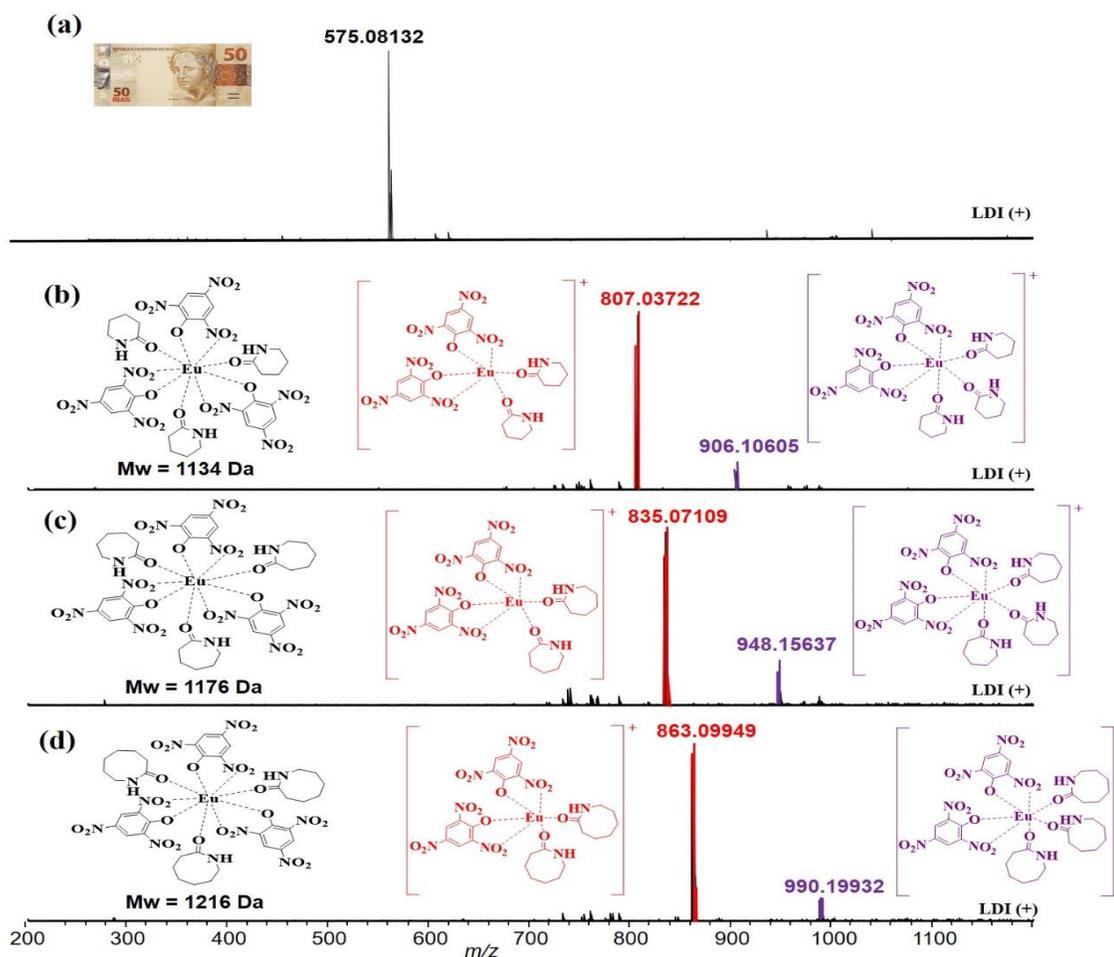
**Figura 27:** Cédulas de R\$10, R\$20, R\$50 e R\$100 com  $[Eu(pic)_3.(EPK)_3]$ , sob excitação em diferentes comprimentos de onda.

Com base na Figure 27 foi possível observar que a luminescência do complexo  $[Eu(pic)_3.(EPK)_3]$  é perceptível a olho nu nos diferentes comprimentos de ondas utilizados. Além disso, o comprimento de onda de 365 nm fornece uma emissão mais intensa, uma vez que esses estão próximos ao comprimento de onda máximo de excitação (397 nm) do complexo  $[Eu(pic)_3.(EPK)_3]$ .

Com o intuito de se identificar o perfil químico dos complexos na superfície das cédulas de forma que não danificasse a integridade das mesmas, a técnica de

LDI( $\pm$ )-MS foi utilizada, onde a análise é feita a partir da incidência de um feixe laser, o qual pode ser de natureza da região do ultravioleta ou infravermelho pulsado, sendo focalizando em uma superfície, permitindo a dessorção e ionização do analito, sem a necessidade de preparo prévio da amostra.<sup>205</sup>

A Figura 28 mostra o perfil químico por LDI(+)-MS obtido para cédula de R\$ 50 sem a presença dos complexos e após a aplicação dos mesmos.



**Figura 28:** Perfil químico por LDI(+)-MS das cédulas de R\$50 (a) sem complexo de  $Eu^{III}$ , (b)  $[Eu(pic)_3.(DVL)_3]$ , (c)  $[Eu(pic)_3.(EPK)_3]$  e (d)  $[Eu(pic)_3.(OEN)_3]$ .

A Figura 28a, mostra o perfil químico da cédula sem a aplicação de complexos. Foi observado a presença do sinal de  $m/z$  575,08132. Este íon é dominante em toda a região da cédula antes da aplicação dos complexos, assim, ele pode ser caracterizado como um marcador químico para reconhecer a autenticidade de cédulas verdadeiras.

Eberlin et al. (2010)<sup>206</sup> reportou em seu trabalho, a análise de cédulas brasileiras usando as fontes ambientes de espectrometria de massas, desorption electrospray ionization (DESI-MS) e EASI-MS. Nesse estudo foram encontrados os íons de  $m/z$  391, 413, 429, 803 e 819 como marcadores, que caracterizaram o perfil químico das cédulas verdadeiras. Schimdt et al. (2015)<sup>207</sup> também reportou utilizando EASI(+)-MS a identificação do íon de  $m/z$  443 como fingerprint para as cédulas brasileiras estudadas.

Os espectros de LDI(+)-MS (Figura 28) foram obtidos com resolução de massa,  $m/\Delta m_{50\%} \cong 381.783$ , onde  $\Delta m_{50\%}$  é a metade da altura do sinal de  $m/z \cong 400$ ,<sup>208</sup> e apresentaram erro de massa variando de 0.76 a 4.64 ppm (Tabela 10). O espectro de LDI(+)-MS (Figura 28b) do composto [Eu(pic)<sub>3</sub>.(DVL)<sub>3</sub>], EuC<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub>, M<sub>w</sub> = 1134 Da, apresentou o sinal referente íon de  $m/z$  906,10605, [EuC<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>9</sub>O<sub>17</sub>]<sup>+</sup>, DBE = 17, que representa a perda de uma molécula de picrato na forma de ácido pícrico, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (228 Da), da sua estrutura para que ocorra a ionização. Além disso, também foi observado o íon de  $m/z$  807,03722, [EuC<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>]<sup>+</sup>, DBE = 16, que é originado a partir da perda de uma molécula de DVL, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO (99 Da), do íon de  $m/z$  906,10605.

Para o composto [Eu(pic)<sub>3</sub>.(EPK)<sub>3</sub>], EuC<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub>, M<sub>w</sub> = 1176 Da, (Figura 28c) ocorreu a ionização a partir da perda de uma molécula de picrato na forma de ácido pícrico, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (228 Da), levando a formação do íon de  $m/z$  948,15637, [EuC<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>9</sub>O<sub>17</sub>]<sup>+</sup>, DBE = 17. Também foi observado a formação do íon de  $m/z$  835,07109, [EuC<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>]<sup>+</sup>, DBE = 16, que é originado a partir com a perda de uma molécula de EPK, C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO (113 Da), do íon de  $m/z$  948,15637.

No espectro de LDI(+)-MS (Figura 28d) do composto [Eu(pic)<sub>3</sub>.(OEN)<sub>3</sub>], EuC<sub>39</sub>H<sub>45</sub>N<sub>12</sub>O<sub>24</sub>, M<sub>w</sub> = 1216 Da, a ionização também ocorre a partir da perda de uma molécula de picrato na forma de ácido pícrico, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (228 Da), levando a formação do íon de  $m/z$  990,19932, [EuC<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>9</sub>O<sub>17</sub>]<sup>+</sup>, DBE = 17. Também no espectro foi observado o sinal do íon de  $m/z$  863,09949, [EuC<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>]<sup>+</sup>, DBE = 16, originado a partir da perda de uma molécula de OEN, C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO (127 Da), do íon de  $m/z$  990,19932.

**Tabela 10.** Fórmula molecular, valor de massa medido e teórico, erro and DBE para os complexos  $\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{DVL})_3$ ,  $\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{EPK})_3$  and  $\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{OEN})_3$  identificados por LDI(+)-FT-ICR MS.

Complexo	Fórmula molecular	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> teórica	Erro (ppm)	DBE
$\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{DVL})_3$	$[\text{EuC}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_9\text{O}_{17}]^+$	906,10605	906,10502	1,13	17
	$[\text{EuC}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_{16}]^+$	807,03722	807,03660	0,76	16
$\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{EPK})_3$	$[\text{EuC}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_{17}]^+$	948,15637	948,15197	4,64	17
	$[\text{EuC}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_{16}]^+$	835,07109	835,06790	3,82	16
$\text{Eu}(\text{pic})_3(\text{OEN})_3$	$[\text{EuC}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_{17}]^+$	990,19932	990,19892	0,40	17
	$[\text{EuC}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_{16}]^+$	863,09949	863,09920	0,33	16

Os espectros de LDI no modo negativo de ionização, LDI(-)-MS, para todos os complexos (Figura S19) apresentaram o mesmo perfil químico, sendo observado a presença do sinal referente ao íon de *m/z* 1064,87567,  $[\text{EuC}_{24}\text{H}_8\text{N}_{12}\text{O}_{28}]^-$  com erro de massa médio de -2.48 ppm e DBE = 27. Os resultados obtidos nos espectros LDI(-)-MS para os três complexos, se assemelharam com o perfil químico do espectro de electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry no modo de ionização negativo (ESI(-)-FT-ICR-MS), para o complexo picrato de európio<sup>III</sup> com a N-metilcaprolactama,  $\text{Eu}(\text{PIC})_3(\text{NMK})_3$ , onde foi observado o íon de *m/z* 1064,87567,  $[\text{EuC}_{24}\text{H}_8\text{N}_{12}\text{O}_{28}]^-$ , reportado por Destefani *et al.* (2014)<sup>195</sup>. Além disso, nos espectros LDI( $\pm$ )-MS das cédulas que possuíam complexos, não foram identificadas o sinal referente ao íon de *m/z* 575,08132, uma vez que o sinal deste foi suprimido pelos sinais provenientes dos complexos.

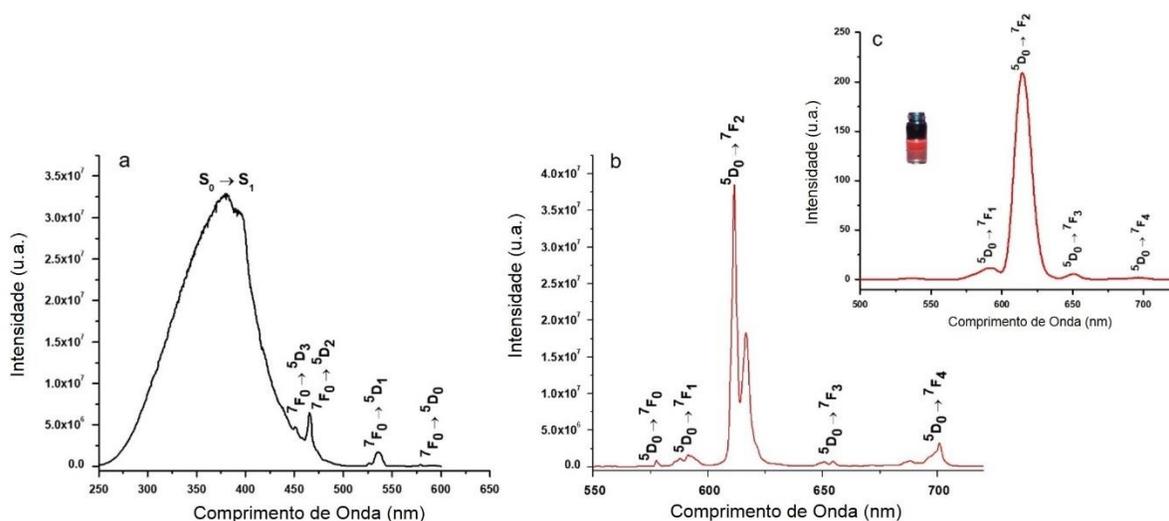
#### 4.4.2 Sensor luminescente contra adulteração em gasolina

A análise elementar de CHN e titulação complexométrica com EDTA sugerem a formação do composto com estequiometria:  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{PRD})(\text{H}_2\text{O})]$ .

Os espectros de FTIR (Figura S16) apresentaram a banda relativa ao estiramento simétrico,  $\nu_s\text{C-O}$ , no composto de adição ( $1623\text{ cm}^{-1}$ ), a qual sofreu um deslocamento para números de ondas mais baixas, em relação ao TTA ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ) e a PRD ( $1643\text{ cm}^{-1}$ ) livre, sugerindo a coordenação ao íon  $\text{Eu}^{\text{III}}$ . Além disso, o complexo

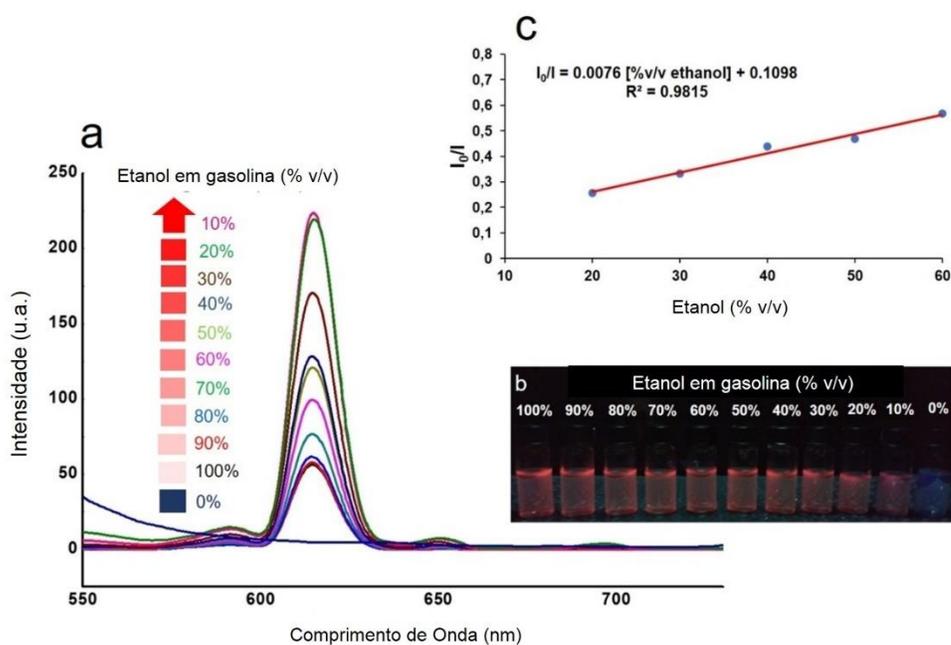
[Eu(TTA)<sub>3</sub>(PRD)(H<sub>2</sub>O)] apresentou a banda relativa ao estiramento assimétrico  $\nu_{\text{ass}}\text{C-O}$ , ausentes nos espectros dos ligantes livres, o que corrobora com a coordenação dos ligantes. Embora o TTA e a PRD apresentem o  $\nu\text{C=O}$  que não podem ser distinguidos por ocorrerem na mesma região. A presença da vibração de estiramento  $\nu\text{C-N}$  (1467  $\text{cm}^{-1}$ ) e o seu deslocamento para números de ondas maiores, em relação a 2-pirrolidona livre, sugeri que este ligante se encontra coordenado. Dessa forma, os deslocamentos observados no  $\nu\text{sC-O}$  do TTA e da PRD sugerem que estes ligantes estão coordenados por meio dos oxigênios carbonílicos. Além disso, o espectro do complexo apresentou o modo vibracional  $\nu\text{O-H}$  característico da água, na região de 3000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de água.<sup>201</sup>

O espectro de excitação (Figura 29a) apresentou uma banda larga e intensa na faixa de 250 – 450 nm com excitação máxima em 375 nm, sendo caracterizada como a banda de transição  $S_0 \rightarrow S_1$  dos ligantes, indicando que a luminescência do complexo é proveniente da transferência de energia dos ligantes para o estado excitado do európio. Além disso, foram observadas bandas referentes a excitação do estado fundamental  ${}^7F_0$ ,  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_3$  (451 nm),  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$  (466 nm),  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_1$  (526 nm),  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  (580 nm), a transição  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$  (396 nm), não foi observado por ter sido sobreposta pela banda dos ligantes.



**Figura 29.** Espectros de (a) excitação com  $\lambda_{\text{em}} = 612$  nm, (b) emissão com  $\lambda_{\text{exc}} = 375$  nm do complexo no estado sólido e (c) emissão com  $\lambda_{\text{exc}} = 375$  nm do complexo em solução etanólica.

Nos espectros de emissão (Figura 30a), nos quais foram monitorada a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  (612 nm), com relação a variação da proporção gasolina:etanol(complexo) na faixa de 0-100 % (v/v). Foi observado, conforme se aumentava a proporção de gasolina com relação ao volume de etanol a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  sofria um aumento em sua intensidade (Figura 30a). Isso pode ser associado, ao fato que o ambiente químico que está o complexo ser constituído em sua maioria por um solvente apolar, ocorre minimização das perdas de energia por meio de processo não radiativo. Quando há maior quantidade do etanol, a probabilidade de supressão por meio da ressonância do oscilador OH é bastante favorecida.<sup>202</sup> Embora visualmente (Figure 30b) esse fato não possa ser observado.



**Figura 30.** (a) Espectros de emissão ( $\lambda_{exc} = 380$  nm) monitorando a intensidade da transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  (612 nm) do  $[Eu(TTA)_3(PRD)(H_2O)]$  em %v/v de etanol em gasolina (b) luminescência das misturadas iluminadas com lâmpada UV com comprimento de 356 nm a temperatura ambiente e (c) relação da concentração de etanol (% v/v) e  $I_0/I$ .

As misturas preparadas (Figure 30b) apresentaram a luminescência característica do complexo na região do vermelho quando iluminadas com lâmpada UV (365 nm). Com base na regulamentação que define a quantidade de etanol em gasolina,<sup>208</sup> foram

utilizadas as concentrações de etanol (20, 30, 40 50 e 60%) e foram relacionadas pela razão  $I_0/I$ , onde  $I_0$  e  $I$  são as intensidades da emissão da banda  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  antes e depois da adição etanol em gasolina respectivamente. Foi obtido um  $R^2 = 0,9815$  (Figura 30c) e o limite de detecção (LD) foi calculado com base na equação:  $LD = 3\sigma / k$ . Onde  $\sigma$  é o desvio padrão da medida do branco e  $k$  é inclinação da reta ( $I_0/I$ ) vs ethanol (%v/v),<sup>209</sup> sendo o LD = 4.94 %.

## 4.5 CONCLUSÃO

Foi possível identificar os complexos  $[Eu(pic)_3.(DVL)_3]$ ,  $[Eu(pic)_3.(EPK)_3]$  e  $[Eu(pic)_3.(OEN)_3]$  an cédulas por meio visual quando exposta a luz ultravioleta e quando analisado por LDI( $\pm$ )-MS. Tais complexos se mostraram como uma nova alternativa como materiais luminescentes de segurança para a aplicação em documentoscopia forense. A identificação dos complexos nas cédulas ocorreu de forma rápida, simples e sensível, uma vez que comprimentos de ondas de menores energia foram capazes de proporcionar a emissão de luz dos complexos. Também foi possível realizar a identificação dos complexos de maneira fácil e não destrutiva nas cédulas, por meio da técnica LDI( $\pm$ )-MS, o que possibilitou o reuso comercial das mesmas.

Para o complexo do  $[Eu(TTA)_3(PR D)(H_2O)]$  foi possível observar a luminescência características do íon  $Eu^{III}$ . A medida que se aumentava a proporção de gasolina com relação ao volume de etanol, a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  sofria um aumento em sua intensidade, inferindo que a perdas de energia por processos não radiativos eram minimizados, como a supressão pelo oscilador OH presente no etanol. Além disso, os valores encontrados de  $R^2 = 0.9815$  e LD = 4.94 %, para os ensaios utilizando o complexo como marcador luminescente para etanol, torna-se promissor para o seu uso no controle de qualidade de combustíveis.

Assim, estudos voltados para a aplicação de complexos de lantanídeos na área da química forense se mostram com grande viabilidade no uso futuro no combate de fraudes.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foram desenvolvidos e avaliados novos materiais para a aplicação dentro da química forense. Assim, buscou-se avaliar a aplicabilidade da aplicação de métodos clássicos de separação como cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta resolução, afim de se isolar com maior grau de pureza possível os principais psicoativos presentes em drogas de abuso que foram apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo. Dessa forma, caracterizá-los com técnicas como RMN, CG-MS e espectrometria de massas, afim de garantir e confirmar a elucidação da molécula isolada.

Na purificação da cocaína e MDMA, foram elaboradas metodologias simples de separação, e que permitem que qualquer laboratório seja do meio acadêmico ou presente em centros de criminalística, apliquem, e isole tais substâncias para aplicação como materiais de referências em análises de rotina. Visto a quantidade e variedades de drogas que são apreendidas, elas acabam sendo matérias primas essenciais, para a obtenção de materiais de referências de drogas provenientes de amostras apreendidas. Assim, o custo e a burocracia para a importação de materiais de referências, em especial de drogas, seria reduzidos, o que reduziria a dependência externa. E faria com que o custo benefício seja favorável.

A partir da purificação dos principais psicoativos presentes nas drogas de abuso, foi possível, sintetizar os metabólitos que são gerados por essas substâncias. A síntese da benzoilecgonina a partir da cocaína purificada se mostrou promissora para o uso desse metabólito em análises de identificação e quantificação que confirmem o uso de drogas. Embora a síntese a partir de reagentes com alto grau de pureza, forneçam produtos de reações altamente puros, há o fator de custo com reagentes e também a burocracia de alguns reagentes serem controlados. Assim, a obtenção de amostras de drogas cedidas por meio de acordo de cooperação foram e são fundamentais para o estudo e desenvolvimento de novos candidatos à material de referência, visto a facilidade de acesso as amostras para estudo.

O desenvolvimento de novos métodos sejam rápidos e inquestionáveis, são essenciais dentro da química forense, visto sua responsabilidade dentro da criminalística. Nesse sentido, estudos utilizando compostos de lantanídeos mostraram-se promissores

na identificação de resíduos de munição e também na identificação de digitais, onde essas são idnetifcados via luminescência característica de cada íon, o que torna a identificação mais rápida, assim o estudo de novos compostos de lantanídeos para evitar fraudes, como feito nesse trabalho se mostrou promissor para um aplicação futura de novos marcadores como elementos de segura em cédulas visto sua fácil identificação nas notas e como sensor luminescente para ajudar a combater as possíveis adulterações que podem ocorrer com a gasolina e por etanol. Os compostos estudados são facilmente excitados por luz ultravioleta, o que torna a identificação de forma fácil, simples e rápida.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEASUREMENT SCIENCE CONFERENCE, MSC. History of metrology. Disponível em: <http://www.msc-conf.com/history-of-metrology/>. Acesso em 04 de fev. de 2022.
2. MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2<sup>nd</sup> ed., 2014. Disponível em: <http://www.eurachem.org>. Acesso em 04 de fev. 2022.
3. ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF STANDARDIZATION. Reference materials – Good practice in using reference materials. 3 ed. Geneva, 2015a (ISO Guide 33).
4. BIANCHI, F.; GIANNETTO, M.; CARERI, M. Analytical systems and metrological traceability of measurement data in food control assessment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **107**, 142-150, 2018.
5. VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Analytical Chemistry and Quality. *Trac Trends Anal Chem.* **13**, 17-23, 1994.
6. BULSKA, E.; TAYLOR, P. Do we need education in metrology in chemistry? *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 588-589, 2003.
7. STOEPLER, M.; WOLF, W. R.; JENKS, P. J.; Reference materials for chemical analysis certification – availability and proper usage. New York: John Wiley. **197**, 2001.
8. ZSCHUNKE, A. Reference material in analytical chemistry: a guide for selection and use. Berlin: Springer. **222**, 2000.
9. MILTON, M. J. T.; QUINN, T. J. Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia.* **4**, 289-296, 2001.
10. COMAR Database. Certified reference materials. Disponível em: <https://www.comar.bam.de/home/index.php>. Acesso em 20 de fev. de 2021.
11. ARNIGO, J. M. et al. Emerging needs for sustained production of laboratory reference materials. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **23**, 80-85, 2004.
12. ULBERTH, F. Reference measurement systems for food analysis: CCQM focus group meeting. *Accreditation Qual. Assur. Heidelberg*, **10**, 455-457, 2005.
13. BARWICK, V. et al. Applications of reference materials in analytical chemistry, Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2001.

14. QUEVAUVILLER, P. Quality assurance: reference materials, Editor(s): Paul Worsfold, Alan Townshend, Colin Poole, Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), Elsevier, 2005, 458–462.
15. OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the analytical quality assurance cycle. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **35**, 109-121, 2012.
16. QUEVAUVILLER, P. Quality assurance: production of reference materials, Editor(s): Paul Worsfold, Alan Townshend, Colin Poole, Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), Elsevier, 2005, 462–469.
17. ABNT. ISO Guia 31 - Materiais de referência — Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada. 2017.
18. HON, P. Y. T. et al. Development of melamine certified reference material in milk using two different isotope dilution mass spectrometry techniques. *J. Chromatogr. A.* **1218**, 6907–6913, 2011.
19. ZHU, Y. et al. Development of a Certified Reference Material (NMIJ CRM 7505-a) for the determination of trace elements in tea leaves. *Anal. Sci.* **27**, 1149–1155, 2011.
20. YARITA, T. et al. Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis. *Talanta*, **119**, 55–261, 2014.
21. CARDOSO, M. H. W. M. **Produção de material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros.** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008.
22. JOCHUM, K. P.; ENZWEILER, J. Reference materials in geochemical and environmental research. *Treatise on Geochemistry.* **15**, 2014, 43-70, 2014.
23. Richter, W. Primary methods of measurement in chemical analysis. *Accred. Qual. Assur.* **2**, 354–359, 1997.
24. WESTWOOD, S. et al. Mass balance method for the SI value assignment of the purity of organic compounds. *Anal. Chem.* **85**, 3118–3126, 2013.
25. GONG, N. et al. Development of a new certified reference material of diosgenin using mass balance approach and coulometric titration method. *Steroids.* **92**, 25-31, 2014.
26. ZELENY, R. et al. Development of a certified reference material for the content of nitroimidazole parent drugs and hydroxy metabolites in pork meat. *Anal. Chim. Acta.* **634**, 237–242, 2009.

27. TRAN, T. T. H. et al. Certification and stability assessment of recombinant human growth hormone as a certified reference material for protein quantification. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1126–1127**, 121732, 2019.
28. TING, H. et al. A new certified reference material (GBW10037) of vitamin B3 in infant formula. *J. Food Compos. Anal.* **23**, 367–372, 2010.
29. YAMANI, R. N.; RIZK, M. S.; SHEH, E. A. H. Preparation and certification of three new aluminum alloy reference materials using inter-laboratory comparison approach. *Arab. J. Chem.* **14**, 103174, 2021. In press
30. DAI, X. et al. Certified reference materials (GBW09170 and 09171) of creatinine in human serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 429–435, 2011.
31. CHEW, G. et al. Development of a mushroom powder certified reference material for calcium, arsenic, cadmium, and lead measurements. *Food Chem.* **190**, 293-299, 2016.
32. YANG, M. et al. Development of a whole liquid egg certified reference material for accurate measurement of enrofloxacin residue. *Food Chem.* **309**, 125253, 2019. In press
33. TANGPAISARNKUL, N. et al. Development of pure certified reference material of stevioside. *Food Chem.* **255**, 75-80, 2018.
34. MARCHEZI, T. T. B. et al. Preparation of a reference material for crude oil trace elements: Study of homogeneity and stability. *Microchem. J.* **155**, 104799, 2020.
35. LINSINGER, T.P.J. et al. J. Homogeneity and stability of reference materials. *Accred. Qual. Assur.* **6**, 20–25, 2001.
36. MERRICK, J. P. et al. Production of trace elements in coastal sea water certified reference material NMIA MX014. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 4413-4424, 2016.
37. ELORDUI-ZAPATARIETXE, S. et al. Novel concepts for preparation of reference materials as whole water samples for priority substances at nanogram-perliter level using model suspended particulate matter and humic acids. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 3055-3067, 2015.
38. YANG, M. et al. Development of a new certified reference material of tinidazole for quality and safety of agro-products. *Accred Qual. Assur.* **21**, 341-349, 2016.
39. AHN, S.; LEE, S.; KIM, B. Development of a lyophilized soybean paste certified reference material for the analysis of ochratoxin A. *J. Food Compos. Anal.* **52**, 68-73, 2016.

40. JIANG, Y. et al. Development of certified matrix-based reference material of genetically modified rice event TT51-1 for real-time pcr quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 6731-6739, 2015.
41. KÖPPEN, R. et al. T-2 and HT-2 toxins in oat flakes: development of a certified reference material. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2997-3007, 2015.
42. URIBE, C.; CARRASCO, E.; ACCO, S. Use of ETAAS, FAAS and ICP-OES for production and post-certification monitoring of a multielemental certified reference material according to national regulation limits for elements in drinking water. *Accred. Qual. Assur.* **22**, 141–151, 2017.
43. SÁNCHEZ, R. et al. Development and validation of a method for mercury determination in seawater for the process control of a candidate certified reference material. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 6569-6574, 2015.
44. McCarron, P. et al. A mussel (*Mytilus edulis*) tissue certified reference material for the marine biotoxins azaspiracids. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2985-2996, 2015.
45. GRIMALT, S. et al. Development of a new cucumber reference material for pesticide residue analysis: feasibility study for material processing, homogeneity and stability assessment, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 3083–3091, 2015.
46. SALDANHA, H. et al. Feasibility study for producing a carrot/potato matrix reference material for 11 selected pesticides at EU MRL level: material processing, homogeneity and stability assessment. *Food Chem.* **132**, 567-573, 2012.
47. BAQUERO, R. P. et al. Determining the bioavailability of benzo(a)pyrene through standardized desorption extraction in a certified reference contaminated soil. *Sci. Total Environ.* **803**, 150025, 2022.
48. GONG, N. et al. Characterization and uncertainty evaluation of a new certified referencematerial of baicalein. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **89**, 106–110, 2014.
49. GROMBE, R. et al. Feasibility of the development of reference materials for the detection of Ag nanoparticles in food: neat dispersions and spiked chicken meat. *Accred. Qual. Assur.* **20**, 3-16, 2015.
50. CHEW, G. et al. Development of a mushroom powder Certified Reference Material for calcium, arsenic, cadmium and lead measurements. *Food Chem.* **190**, 293-299, 2016.
51. VIOLANTE, F. G. M. et al. Feasibility study for the development of a certified reference

- material of nitrofuran metabolites in chicken breast muscle from incurred samples. *Measurement*. **129**, 368-374, 2018.
52. OKAMOTO, K. et al. Preparation and certification of human hair powder reference material. *Clin Chem*. **31**, 1592-1597, 1985.
53. HYUNG, S. W.; LEE, C. H.; KIM, B. Development of certified reference materials for accurate determination of fluoroquinolone antibiotics in chicken meat. *Food Chem*. **229**, 472-478, 2017.
54. Hon, P. Y. T. et al. Development of melamine certified reference material in milk using two different isotope dilution mass spectrometry techniques. *J. Chromatogr. A*. **1218**, 6907–6913, 2001.
55. DAI, X. et al. Certified reference materials (GBW09170 and 09171) of creatinine in human serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. **879**, 429-435, 2011.
56. CAROLI, S. et al. Trace elements in bovine muscle: an ongoing project for a new certified reference material. *Microchem. J*. **67**, 235-243, 2000.
57. ZELENY, R. et al. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. *Food Chem*. **168**, 241-246, 2015.
58. YU, L. L. et al. Development of a kelp powder (*Thallus laminariae*) standard reference material. *Anal. Bioanal. Chem*. **410**, 1265–1278, 2018.
59. CHENG, M. et al. Preparation of four chromium ore reference materials. *Geostand. Geoanal. Res*. **37**, 95–101, 2013.
60. DABRIO, M. et al. Production of a certified reference material for the acrylamide content in toasted bread. *Food Chem*. **110**, 504-511, 2008.
61. LISCIO, C.; HOPLEY, C. Development of a reference measurement procedure and certified reference material for the determination of hydroxyproline in meat. *Food Anal. Methods*. **9**, 1461–1469, 2016.
62. DI MARZO, L.; WOJCIECHOWSKI, K. L.; BARBANO, D. M. Preparation and stability of milk somatic cell reference materials. *J. Dairy Sci*. **99**, 7679-7689, 2016.
63. FANG, L. et al. Preparation and certification of two freshwater sediments certified reference materials for polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Environ. Anal. Chem*. **95**, 879–893, 2015.

64. KÖPPEN, R. et al. Development and certification of a reference material for *Fusarium mycotoxins* in wheat flour. *Anal Bioanal Chem.* **405**, 4755-4763, 2013.
65. ZHANG, L. et al. Purity determination and uncertainty evaluation of a new certified reference material of pinocembrin. *Anal. Methods.* **6**, 699-2703, 2016.
66. CARDOSO, M. H. W. M. et al. Preparation of a certified reference material for pesticide control in the cultivation of fruits and vegetables: a homogeneity study. *Food Sci. Technol.* **30**, 429-438, 2015.
67. OTAKE, T. et al. Development of apple certified reference material for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Food Chem.* **138**, 1243-1249, 2013.
68. Yarita, T. et al. Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis. *Talanta.* **119**, 255-261, 2014.
69. FRAGA, I. C. S. et al. Certified reference material of bioethanol for metrological traceability in electrochemical parameters analyses. *Talanta.* **99**, 99-103, 2012.
70. NG, S. Y. et al. Development of a cosmetic cream certified reference material: certification of lead, mercury and arsenic mass fractions in cosmetic cream. *Int. J. Mass Spectrom.* **389**, 59-65, 2015.
71. CASTRO, L.; MOREIRA, E. G.; VASCONCELLOS, M. B. A. Use of INAA in the homogeneity evaluation of a kidney candidate reference material. *J. Radio. Anal. Nucl. Chem.* **311**, 1291–1298, 2017.
72. SANTOS, A. S. et al. Application of chemometric tools for homogeneity and stability evaluation during the preparation of a powdered milk laboratory reference material for inorganic analysis. *Anal. Methods.* **12**, 1055-1063, 2020.
73. VAN DER VEEN, A. M. H. et al. Uncertainty calculations in the certification of reference materials 3. Stability study. *Accred. Qual. Assur.* **6**, 257-263, 2001.
74. TAHOUN, I. F.; SHEHATA, A. B. Preparation of honey reference material for water content by karl fisher and refractometric methods. *Metrol. Soc. India.* **31**, 25-29, 2016.
75. GANDRA, R. L. P. et al. Production and evaluation of a reference material for moisture, ash, and total fat mass fractions, and titratable acidity in whole milk powder. *Accred Qual. Assur.* **21**, 47-55, 2016.
76. CHEN, Y. et al. Development of a new matrix certified reference material for metronidazole in egg powder. *Microchem. J.* **168**, 106379, 2021.

77. NOGUEIRA, R. et al. Development studies of captopril certified reference material. *Braz. J. J. Pharm. Sci.* **47**, 339 – 350, 2011.
78. LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius J. Anal. Chem.* **360**, 359– 361, 1998.
79. GAWLIK, B. M. et al. Testing sample stability in shortterm isochronous stability studies for EU-wide monitoring surveys of polar organic contaminants in water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **36**, 36-46, 2012.
80. REGO, E. C. P. et al. Feasibility study for development of candidate reference material for food analysis: chloramphenicol in milk powder. *Measurement.* **98**, 300-304, 2017.
81. SANTOS, L. O. et al. The use of ANOVA-PCA and DD-SIMCA in the development of corn flour laboratory reference materials. *Food Chem.* **367**, 130748, 2022.
82. NOGUEIRA, R. et al. Development of a new sodium diclofenac certified reference material using the mass balance approach and <sup>1</sup>H qNMR to determine the certified property value. *Eur. J. Pharm. Sci.* **48**, 502-513, 2013.
83. OLIVARES, I. R. B. et al. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soil, and sediment matrices. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **100**, 53-64, 2018.
84. ZAPATARIETXE, S. E. et al. Preparation and evaluation of sufficiently homogeneous and stable reference materials for priority hazardous substances in whole water. *Accred. Qual. Assur.* **21**, 113-120, 2016.
85. LEE, K. J. et al. Development of new reference materials for the determination of cadmium, chromium, mercury and lead in polycarbonate. *Anal. Chim. Acta.* **758**, 19-27, 2013.
86. KOPPEN, R. et al. W. Development and certification of a reference material for *Fusarium* mycotoxins in wheat flour. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 4755-4763, 2013.
87. YARITA, T. et al. Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis. *Talanta.* **119**, 255-261, 2014.
88. YANG, D. et al. Development of a new chlorogenic acid certified reference material for food and drug analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **140**, 169-173, 2017.
89. GOFF, T. L.; WOOD, S. Production of malachite green oxalate and leucomalachite green reference materials certified for purity. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2035–2045, 2008.

90. MA, K. et al. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. *Anal. Chim. Acta.* **650**, 227–233, 2009.
91. LIU, N. Q. et al. Comparative quantitative analysis of Artemisinin by chromatography and qNMR. *Phytochem. Anal.* **21**, 451–456, 2009.
92. WESTWOOD, S. et al. Mass balance method for the SI value assignment of the purity of organic compounds. *Anal. Chem.* **85**, 3118–3126, 2013.
93. YAZGAN, S. et al. Water-an important parameter for the preparation and proper use of certified reference material. *Food Chem.* **96**, 411–417, 2006.
94. BARANOWSKA, I. et al. Development of potential candidate reference materials for drugs in bottom sediment, cod and herring tissues. *Chemosphere.* **169**, 181-187, 2017.
95. HYUNGS, S. W.; LEE, C. H.; KIM, B. Development of certified reference materials for accurate determination of fluoroquinolone antibiotics in chicken meat. *Food Chem.* **229**, 472-478, 2017.
96. GONG, N. et al. Development of a new certified reference material of diosgenin using mass balance approach and coulometric titration method. *Steroids.* **92**, 25-31, 2014.
97. ZELENY, R. et al. Development of a certified reference material for the content of nitroimidazole parent drugs and hydroxy metabolites in pork meat. *Anal. Chim. Acta.* **634**, 237-242, 2009.
98. SIN, D. W. M. et al. Development of a candidate certified reference material of cypermethrin in green tea. *Anal. Chim. Acta.* **721**, 110-114, 2012.
99. DEWI, F et al. Development of an apple juice certified reference material for cadmium, lead, total arsenic and arsenic species. *Inter. J. Mass Spectrom.* **411**, 14-20, 2016.
100. AHN, S. et al. Development of a lyophilized soybean paste certified reference material for the analysis of ochratoxin A. *J. Food Compost. Anal.* **52**, 68-73, 2016.
101. ESPINOZA, M. et al. Development of a reference material for copper and iron in wine. *J. Food Compost. Anal.* **21**, 684-688, 2008.
102. IPT, INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. Fornecimento e desenvolvimento de materiais de referência. Disponível em: [www.ipt.br/solucoes/54fornecimento e desenvolvimento de materiais de refe103](http://www.ipt.br/solucoes/54fornecimento_e_desenvolvimento_de_materiais_de_referencia). Acesso em 20 de fev. de 2021

103. CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL – CETEM. Programa de materiais de referência certificados. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/mrc>. Acesso em 20 de fev. de 2021.
104. SENAI. Material de referência. Porto Alegre. Disponível em: <http://www.senairs.org.br/pt-br/tecnologia-znova%C3%A7%C3%A3o/material-de-refer%C3%Aancia>. Acesso em 20 de fev. de 2021.
105. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Microrganismos de referências. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: [https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=120&Itemid=100](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=120&Itemid=100). Acesso em 20 de fev. de 2021.
106. INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Serviço de Certificação de Material de Referência. Disponível em: [https://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mat\\_ref\\_cert.asp](https://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mat_ref_cert.asp). Acesso em 20 de fev. de 2021.
107. BIANCHI, S. R. et al. Production and characterization of a bovine liver candidate reference material. *J. Phys Conf. Ser.* **733**, 1-4, 2016.
108. LEE, S. et al. Development of a reference material using methamphetamine abusers hair samples for the determination of methamphetamine and amphetamine in hair. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **865**, 33–39, 2008.
109. DUSSY, F. E. et al. Isolation of  $\Delta^9$ -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of  $\Delta^9$ -THC in cannabis products. *Forensic Sci Int.* **149**, 3–10, 2005.
110. LEITE, J. A. et al. Extraction and isolation of cannabinoids from marijuana seizures and characterization by  $^1\text{H}$  NMR allied to chemometric tools. *Sci. Justice.* **58**, 355-365, 2018.
111. ROCHA, W. W. F. et al. Quantification of Cocaine and its Adulterants by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy without Deuterated Solvent (No-D qNMR). *Anal. Methods.* **10**, 1685-1694, 2018.
112. MOLINA, A. C. G. et al. Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the Cannabis sativa L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. *J. Supercritical Fluids.* **146**, 208-216, 2019.

113. VARGAS, R. M.; TALHAVINI, M. Cocaína. Relatório de atividades do projeto FAPDF nº 193.000.360/99, Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, Brasília, 2000.
114. CALDAS NETO, O. B. Cocaína. Monografia de finalização do Curso Superior de Polícia, Departamento de Polícia Federal, Academia Nacional de Polícia, Brasília, 1998.
115. RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R.O., 2010. O Tratamento do Usuário de Crack, 1st ed. Casa da Leitura Médica, São Paulo.
116. GOMES, M. S. **Contributo da Química Forense na Detecção de Drogas de Abuso**. Dissertação de mestrado. Departamento de Química e Bioquímica da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013, 91.)
117. BOTELHO, E. D. **Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)**. Brasília, 2011. Dissertação. Programa de Pós-Graduação – Instituto de Química, Universidade de Brasília.
118. CALIGIORNE, S. M.; MARINHO, P. A. Cocaína: aspectos históricos, toxicológicos e analíticos – uma revisão. *Revista Criminalística e Medicina Legal*. **1**, 34-45, 2016.
119. CASALE, J. F.; KLEIN, R. F. X. Illicit production of cocaine. *Forensic Science Review Forensic Sci. Rev.* **5**, 95-107, 1993.
120. BREWER, L. M.; ALLEN, A. N-Formyl Cocaine: A Study of Cocaine Comparison Parameters. *J. Forensic Sci.* **36**, 697-708, 1991.
121. ZACCA, J. J. et al. Brazilian Federal Police drug chemical profiling — The PeQuiProject. *Sci. Jus.* **54**, 300-306, 2014.
122. ALMEIDA, F. L. A. A. **Análise comparativa de amostras de cocaína apreendidas em diferentes estados brasileiros**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2003)
123. COLE, C. et al. Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Test. Anal.* **3**, 89–96, 2011.
124. BOTELHO, E. D. et al. Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 611–618, 2014.
125. CONCEIÇÃO, V. N. et al. Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: Um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. *Quim.*

*Nova*. **37**, 1538–1544, 2014.

126. Santos, H. et al. Quantification of cocaine and its adulterants (lidocaine and levamisole) using the Dragendorff reagent allied to paper spray ionization mass spectrometry. *Anal. Methods*. **9**, 3662–3668, 2017.

127. CHANG, A.; OSTERLOH, J.; THOMAS, J. Levamisole: A dangerous new cocaine adulterant. *Clin. Pharmacol. Ther.* **88**, 408–411, 2010.

128. CASTIGLIONI, S. et al. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 8421–8429, 2006.

129. SODRÉ, F.F. et al. Illicit Drugs, Metabolites and Adulterants in Wastewater: Monitoring Community Drug Abuse in the Brazilian Federal District during the 2014 Soccer World Cup. *J. Braz. Chem. Soc.* **28**, 1–9, 2017

130. FIORENTIN, T. R. et al. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. **86**, 60–66, 2017.

131. Bermejo, A. M. et al. Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **156**, 2–8, 2006.

132. BACCHI, E. M. Alcalóides indólicos. In: SIMOES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: editora da Universidade UFRGS 2001, cap.31.

133. PASSAGLI, M. Toxicologia forense: teoria e prática. 4.ed. Campinas: Millennium, 2013.

134. MCGILL, J. W.; DIXON, C. A.; RITTER, D. Discovery of an interesting temperature effect on the sensitivity of the cobalt thiocyanate test for cocaine. *Microgram J.* **6**, 26-35, 2008.

135. 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.* **55**, 158-164, 2005

136. CLARKE, E. G. C. Clarke's isolation and identification of drugs. 4a Ed. London: The Pharmaceutical Press, 2011.

137. UNITED NATIONS. Division of Narcotics Drugs. Recommended Methods for Testing Cocaine: Manual for Use by National Narcotics Laboratories. New York, 1986.
138. NISHIKAWA, M. et al. The analysis of cocaine and its metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC/APCI-MS). *Forensic Sci. Int.* **25**, 304-313, 1994.
139. BOGUSZ, M. J. Liquid chromatography–mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J. Chromatogr B.* **748**, 3-19, 2000.
140. CONCEIÇÃO, V. N. et al. Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. *Quim. Nova.* **37**, 1538-1544, 2014.
141. PENIDO, C. A. F. O. et al. Raman spectroscopy in forensic analysis: identification of cocaine and other illegal drugs of abuse. *J. Raman Spectrosc.* **47**, 28–38, 2016.
142. HESPANHOL, M. C.; PASQUINI, C.; MALDANER, A. O. Evaluation of a low-cost portable near-infrared spectrophotometer for in situ cocaine profiling. *Talanta.* **200**, 553-561, 2019.
- 143 . RISOLUTI, R. et al. Miniaturized analytical platform for cocaine detection in oral fluids by MicroNIR/Chemometrics. *Talanta.* **202**, 546-553, 2019.
144. KARLSEN, M. et al. Economical synthesis of <sup>13</sup>C-labeled opiates, cocaine derivatives and selected urinary metabolites by derivatization of the natural products, *Molecules.* **20**, 5329-5345, 2015.
145. MOELLER, M. R.; FEYA, P.; WENNIG, R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GCMS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci. Int.* **63**, 185-206, 1993.
146. GONÇALVES, D. E. F. et al. Produção de material de referência certificado de óxido de hólmio(III) em ampolas. *Quim. Nova.* **41**, 1162-1166, 2018.
147. BERNSCHNEIDER-REIF et al. The Origin of MDMA (“Ecstasy) – separating the facts from the myth. *Pharmazie.* **61**, 966-972, 2006.
148. SHULGIN, A. T. The background and chemistry of MDMA. *J. Psychoactive Drugs.* **18**, 291-304, 1986.
149. SHULGIN, A. T.; SARGENT, T; NARANJO, C. The chemistry and psychopharmacology of nutmeg and several related phenylisopropyl-amines. In: EFRON,

D. H.; ed. *Ethnological search for psychoactive drugs*. Washington: US Government Printing Office, 202-214, 1967.

150. COLE, J. C.; SUMNALL, H. R. The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci. Biobehav. Rev.* **27**, 199-217, 2003.

151. GEMENO, P. et al. A study of impurities in intermediates and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) samples produced via reductive amination routes. *Forensic Sci. Int.* **155**, 141-157, 2005.

152. SWIST, M.; WILAMOWSLI, J.; PARCZEWSKI, A. Determination of synthesis method of ecstasy based on the basic impurities. *Forensic Sci. Int.* **152**, 175-184, 2005.

153. Wolff, K et al. Contents of "ecstasy". *Lancet.* **346**, 1100–1101, 1995.

154. STOJANOVSKA, N. et al. A review of impurity profiling and synthetic route of manufacture of methylamphetamine, 3,4-methylenedioxymethylamphetamine, amphetamine, dimethylamphetamine and *p*-methoxyamphetamine. *Forensic Sci. Int.* **224**, 8–26, 2013.

155. FONSART, J. et al. Sprague–Dawley rats display metabolism-mediated sex differences in the acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**, 117–125, 2008.

156. UNITED NATIONS, Rapid testing methods of drugs of abuse, Manual. New York, 1994.

157. YONAMINE, M. **Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas**. São Paulo, 2000. 96p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

158. CHEZE, M. et al. Simultaneous analysis of six amphetamines and analogues in hair, blood and urine by LC-ESI-MS/MS application to the determination of MDMA after low Ecstasy intake. *Forensic Sci. Int.* **170**, 100–104, 2007.

159. CONCHEIRO, M. et al. Fast LC–MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine. *Forensic Sci. Int.* **171**, 44–51, 2007.

160. NEVESCANIN, M. M. et al. The use of a gold electrode for the determination of

amphetamine derivatives and application to their analysis in human urine. *J. Serb. Chem. Soc.* **78**, 1373–1385, 2013.

161. KIM, Y. et al. Simultaneous determination of methamphetamine, 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine, 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine, N,N-dimethylamphetamine, and their metabolites in urine by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 1644-1651, 2008.

162. DECONINCK, E. et al. Combining attenuated total reflectance- infrared spectroscopy and chemometrics for the identification and the dosage estimation of MDMA tablets. *Talanta*. **195**, 142-151, 2019.

163. Hussain, J. H. et al. Quantification of MDMA in seized tablets using benchtop 1H NMR spectroscopy in the absence of internal standards. *Forensic Chem.* **20**, 100263, 2000.

164. SU, A. K.; LIU, J. T.; LIN, C. H. Rapid drug-screening and quantitation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **546**, 193-198, 2005.

165. ROMÃO, W. et al. Chemical profile of meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP) in ecstasy tablets by easy ambient sonic-spray ionization, X-ray fluorescence, ion mobility mass spectrometry and NMR. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 3053–3064, 2011.

166. LEE, J. D. Química Inorgânica não tão Concisa; Tradução da 5ª ed. inglesa: Toma, H. E.; Rocha, R. C.; Edgard Blücher Ltda.: São Paulo, 479-484, 1999.

167. MARTINS, T. S.; ISOLANI, P.C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. *Quim. Nova.* **28**,111-117, 2005.

167. Wang, S.; Wang, L. Lanthanide-doped nanomaterials for luminescence detection and imaging. *Trends Anal. Chem.* **62**, 123-134, 2014.

168. D. TU et al. Luminescent biodetection based on lanthanide-doped inorganic nanoprobos. *Coordin. Chem. Rev.* **273**, 13-29, 2014.

169. GUO, L. et al. Luminescence enhancement of Europium(III) complexes by an ionic liquid. *J. Lumin.* **215**,116610, 2019.

170. Xiang, W. et al. Europium-doped cspb<sub>2</sub>br for stable and highly efficient inorganic perovskite solar cells. *Joule.* **3**, 205-214, 2019.

171. KOSHELEV, D. S. et al. On the design of new europium heteroaromatic carboxylates for OLED application. *Dyes Pigments*. **170**, 107604, 2019.
172. HE, N. Rapid visual detection of nitroaromatic explosives using a luminescent europium-organic framework material. *Forensic Sci. Int.* **297**, 1-7, 2019.
173. Park, S. J.; Je, B. S.; Jang, J. W.; Oh, M. S.; Koo, M. S.; Yang, S. J.; Yang, H. K. Green and red emitting YBO<sub>3</sub>:Ln<sup>3+</sup> (Ln=Eu, Tb) phosphors for detection of latent fingerprint. *J. Alloys Compd.* **789**, 367-374, 2019.
174. SHAHI, P. K. et al. A strategy to achieve efficient dual-mode luminescence in lanthanide-based magnetic hybrid nanostructure and its demonstration for the detection of latent fingerprints. *Colloid Interf. Sci.* **491**, 199-206, 2017.
175. SILVA, M. A. et al. A new photoluminescent terbium(III) coordination network constructed from 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid: synthesis, structural characterization and application as a potential marker for gunshot residues *Inorg. Chim. Acta.* **495**, 118967, 2019.
176. JUNIOR, J. C. A. et al. **New Eu<sup>III</sup> Pyromellitic Metal–Organic Framework of Intense Red-Orange Luminescence and High Thermal Stability for Marking in Gunshot Residues.** *J. Phys. Chem. C.* **124**, 9996-10006, 2020.
- 177 COTTON, S. Lanthanide and Actinide Chemistry, John Wiley & Sons Ltd, England, 1991.
- 178 ATKINS, P.; DE PAULA, J., Physical Chemistry, Oxford, 8<sup>a</sup> ed., 2006.
179. MALTA, O. L.; CARLOS, L.D.; Intensities of 4f-4f transitions in glass materials. *Quim. Nova.* **26**, 889-895, 2003
180. JUDD, B. R. Optical Absorption Intensities of Rare-Earth Ions. *Phys. Rev.* **127**, 750-761, 1962.
181. OFELT, G. S. Intensities of Crystal Spectra of Rare-Earth Ions, The Journal of Chem. Phys. **37**, 511-520, 1962.
182. JÖRGENSEN, C. K.; JUDD, B. R. Hypersensitive pseudoquadrupole transitions in lanthanides. *Mol. Phys.* **8**, 281-290, 1964.
- 183 CARVALHO, C. A. A.; **Síntese dos compostos Ln(F<sub>3</sub>C-COO)<sub>3</sub>.2(3-picolina-N-óxido).xH<sub>2</sub>O Caracterização por técnicas espectroscópicas e termoanalíticas**, Tese de Doutorado, Instituto de Química-USP, São Paulo, 1992.

184. WEISSMAN, S. J. intramolecular energy transfer the fluorescence of complexes of europium. *J. Chem. Phys.* **10**, 214-217, 1942.
185. ANDRADE, A..V. M. et al. Methodology for the theoretical design of light conversion molecular devices. *Quim. Nova.* **21**, 51-59, 1998.
186. CHEN, W. T. Photophysical properties and energy transfer mechanism of three novel lanthanide upconverting materials (UCMs). *J. Solid State Chem.* **284**, 121160, 2019.
187. NING, Y.; ZHU, M.; ZHANG, J. L. Near-infrared (NIR) lanthanide molecular probes for bioimaging and biosensing. *Coord. Chem. Rev.* **399**, 213028, 2019.
188. ABDELHAMID, H. N. et al. Luminescence properties of a family of lanthanide metal-organic frameworks. *Microporous Mesoporous Mater.* **279**, 400-406, 2019.
189. Jia, J. H. et al. Luminescent single-molecule magnets based on lanthanides: Design strategies, recent advances and magneto-luminescent studies. *Coord. Chem. Rev.* **378**, 365-381, 2019.
190. MAOUCHE, R. et al. Luminescence properties of lanthanide complexes-based molecular alloys. *Inorg. Chim. Acta.* **501**, 119309, 2020.
191. SUN, Y. et al. Preparation and luminescence performance of flexible films based on curdlan derivatives and europium (III) complexes as luminescent sensor for base/acid vapor. *J. Lumin.* **225**, 117241, 2020.
192. STAN, C. S. et al. Highly luminescent europium and terbium complexes based on succinimide and N-hydroxysuccinimide. *J. Rare Earths.* **30**, 401-407, 2012.
193. KACZMAREK, M. Lanthanide-sensitized luminescence and chemiluminescence in the systems containing most often used medicines; a review. *J. Lumin.* **222**, 117174, 2020.
194. LUCENA, M. A. M. et al. ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-based luminescent marker for gunshot residue identification and ammunition traceability. *Anal. Methods.* **5**, 705–709, 2013.
195. DESTEFANI, C. A. et al. Europium–organic complex as luminescent marker for the visual identification of gunshot residue and characterization by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Microchemical Journal.* **116**, 216–224, 2014.

196. VENTURINI FILHO, E. et al. New luminescent lanthanide-based coordination compounds: synthesis, studies of optical properties and application as marker for gunshot residues. *J. Lumin.* **202**, 89-96, 2018.
197. SERWY, I. B. et al.  $[\text{Ln}_2(\text{BDC})_3(\text{H}_2\text{O})_4]_n$ : A low cost alternative for GSR luminescent marking. *J. Lumin.* **200**, 24-29, 2018.
198. CHEN, Z. et al. LnMOFs based on cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid: Single crystal structure and  $\text{CH}_3\text{OH}$  sensor. *Inorg. Chem. Commun.* **112**, 107744, 2020.
199. FONSECA, R. R. F. et al. Photoluminescent  $\text{Tb}^{3+}$ -based metal-organic framework as a sensor for detection of methanol in ethanol fuel. *J. Rare Earths.* **37**, 225-231, 2019.
200. BORGES, A. S. et al. Structure and luminescent investigation of new Ln(III)-TTA complexes containing N-methyl- $\epsilon$ -caprolactam as ligand. *Journal of Luminescence.* **170**, 654-662, 2016.
201. MARINHO, D. M. A. et al. Compounds of lanthanide picrates and 2-azacyclononanone (aza): synthesis, characterization and thermal study. *J. Alloys Compd.* **275**, 795–797, 1988.
202. TEOTONIO, E. E. S. et al. Influence of the N-[methylpyridyl]acetamide ligands on the photoluminescent properties of Eu(III)-perchlorate complexes. *Polyhedron.* **21**, 1837-1844, 2002.
203. FORSBERG, J. H. Complexes of lanthanides (III) ions with nitrogen donor ligand. *Coord. Chem. Rev.* **10**, 195- 226, 1973.
204. FERREIRA, R. A. S. et al. A theoretical interpretation of the abnormal  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$  intensity based on the  $\text{Eu}^{3+}$  local coordination in the  $\text{Na}_9[\text{EuW}_{10}\text{O}_{36}] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$  polyoxometalate. *J. Lumin.* **121**, 561 – 567, 2006.
205. ALMEIDA, C. M. et al. Study of chemical profile and of lines crossing using blue and black ink pens by LDI (+) MS and LDI (+) imaging. *Microchem. J.* **148**, 220–229, 2019.
206. EBERLIN, L. S. et al. Instantaneous chemical profiles of banknotes by ambient mass spectrometry. *Analyst.* **135**, 2533–2539, 2010.
207. SCHMIDT, E. M. et al. Characterization of anti-theft devices directly from the surface of banknotes via easy ambient sonic spray ionization mass spectrometry. *Sci. Justice.* **55**, 285–290, 2015.
208. COLATI, K. A. P. et al. Monitoring the liquid/liquid extraction of naphthenic acids in

brazilian crude oil using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry (ESI FT-ICR MS). *Fuel*. **108**, 647–655, 2013.

## ANEXOS

### Capítulo 2: Purificação da cocaína para uso como material de referência

Modo isocrático, 5 % solução aquosa ácido fórmico 0,1% : 95 % acetonitrila, fluxo de 1,0 mL / min, absorção em 234 nm, tempo de corrida de 4 min, volume de injeção de 5  $\mu$ L, coluna analítica Waters SunFire C18 3,8 $\mu$ m; 4,6 mm x 150 mm

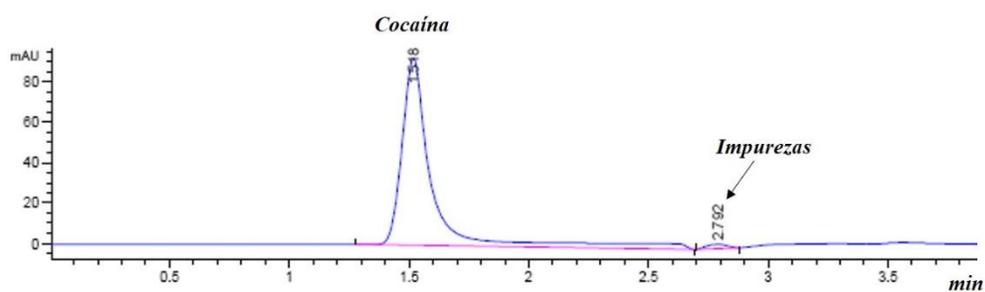


Figura S1. Cromatograma obtido da cocaína para o cálculo de pureza relativa por CLAE.

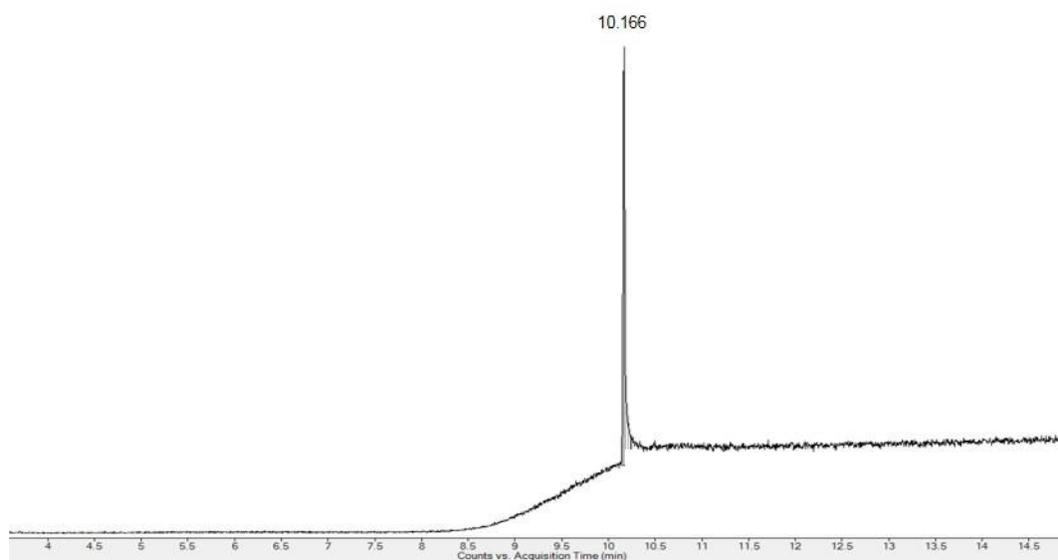


Figura S2. Cromatograma obtido da cocaína por meio do CG-MS.

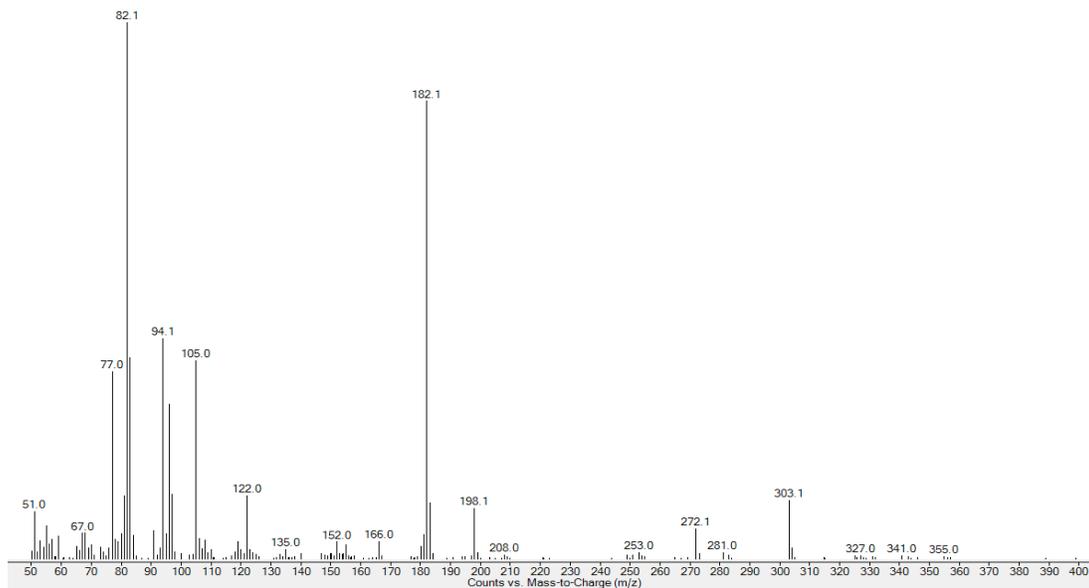


Figura S3. Perfil do espectro de massa obtido da cocaína por meio do CG MS.

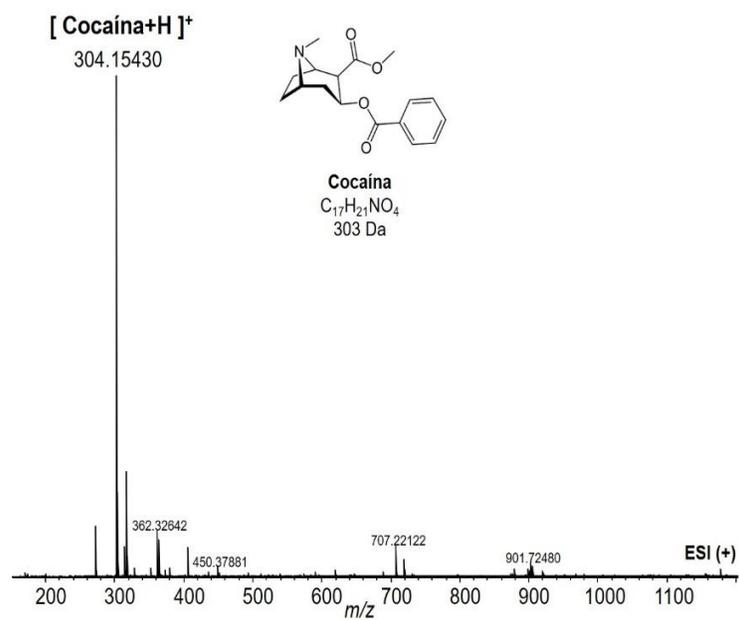
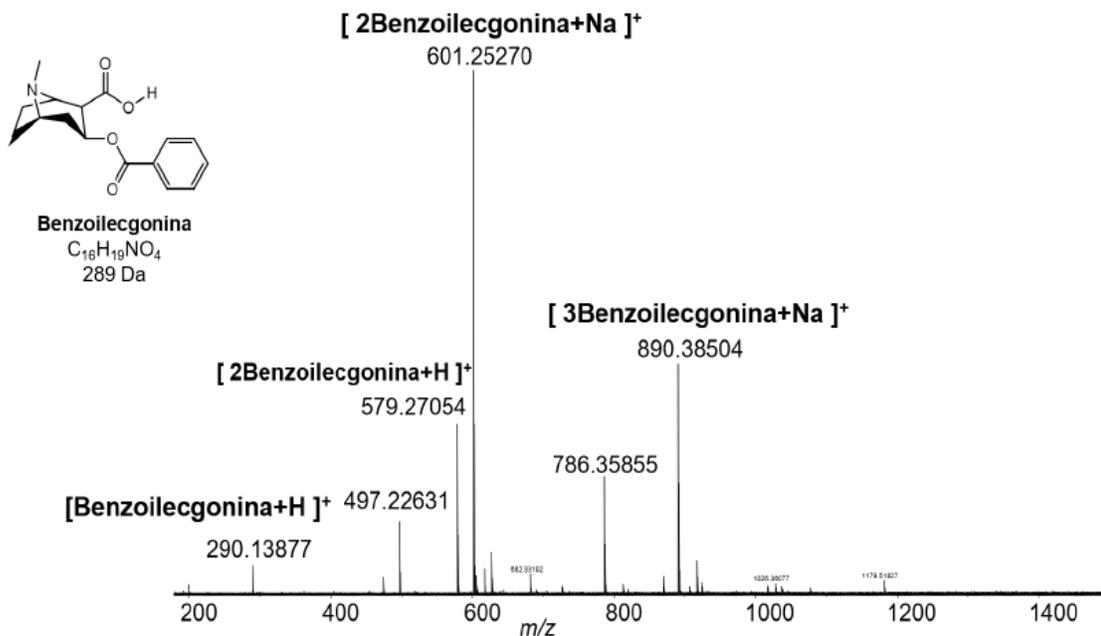
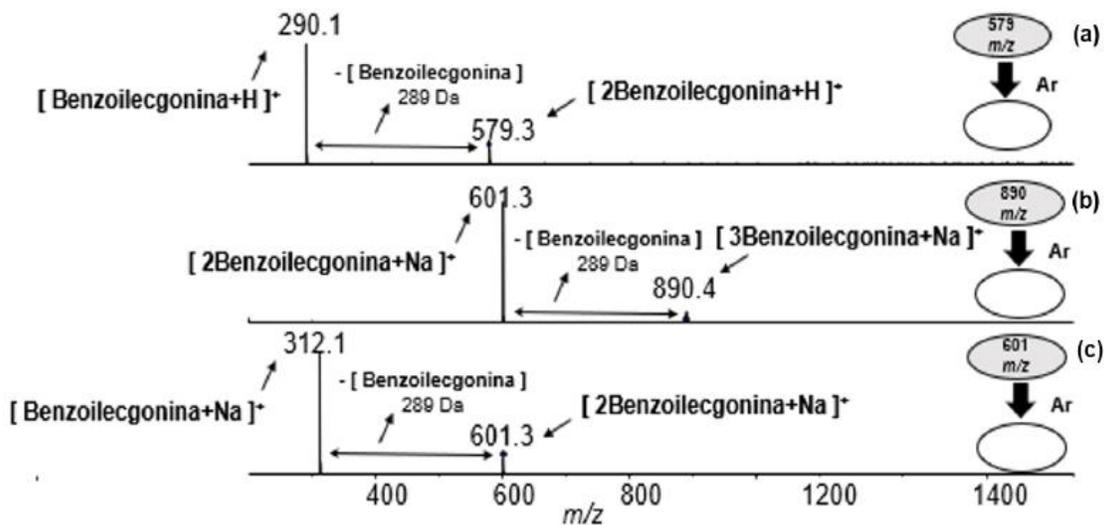


Figura S4. Espectro de ESI (+) MS da cocaína.



**Figura S5.** Espectro de ESI (+) MS da benzoilecgonina.



**Figura S6.** Espectro de ESI (+) MS/MS da benzoilecgonina (energia de colisão) (a)  $m/z$  579,3 (-10,5 V); (b)  $m/z$  890,4 (-3,5 V) e (c)  $m/z$  601,3 (-10,5 V).

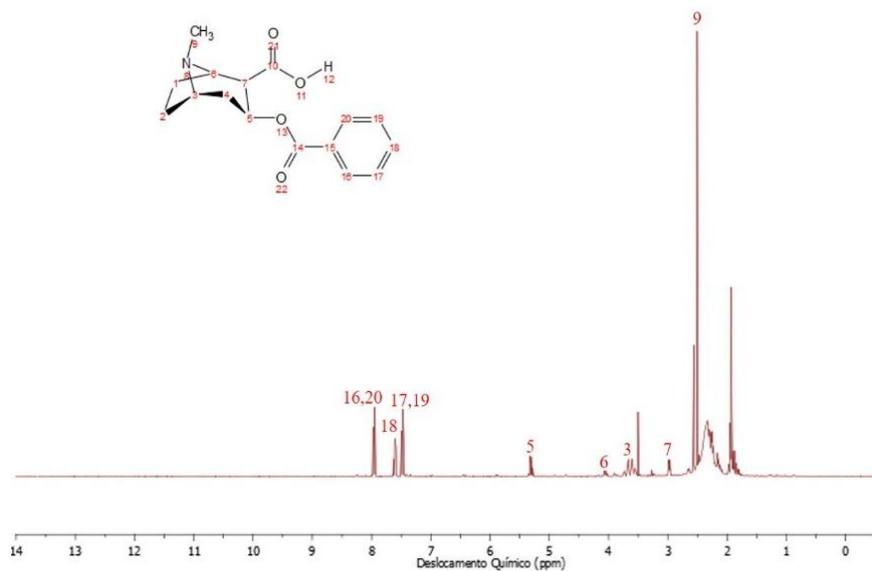


Figura S7. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da benzoilecgonina.

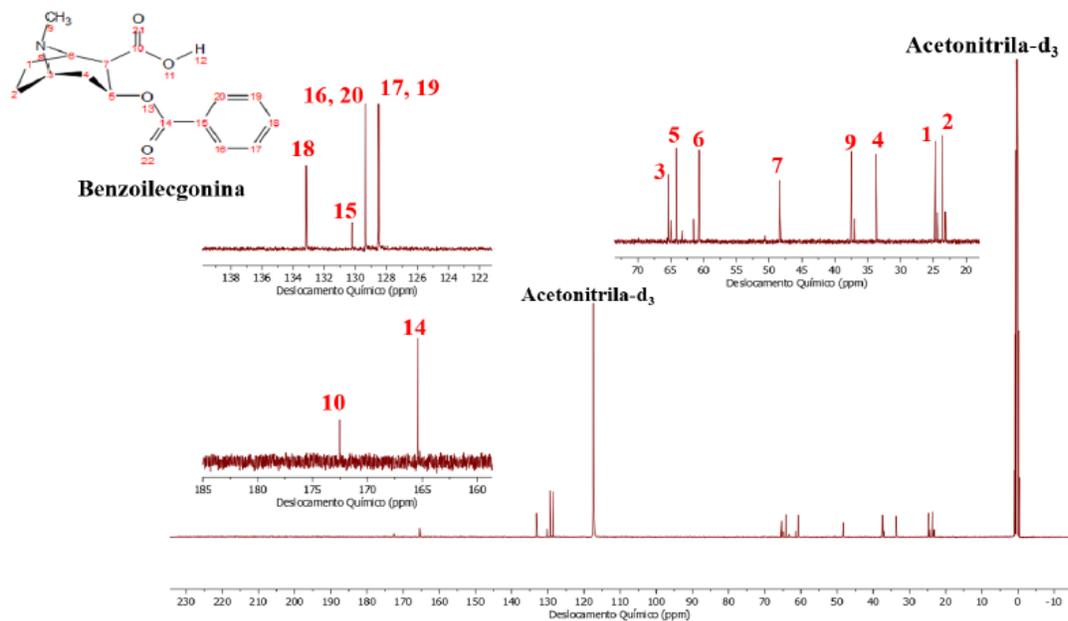
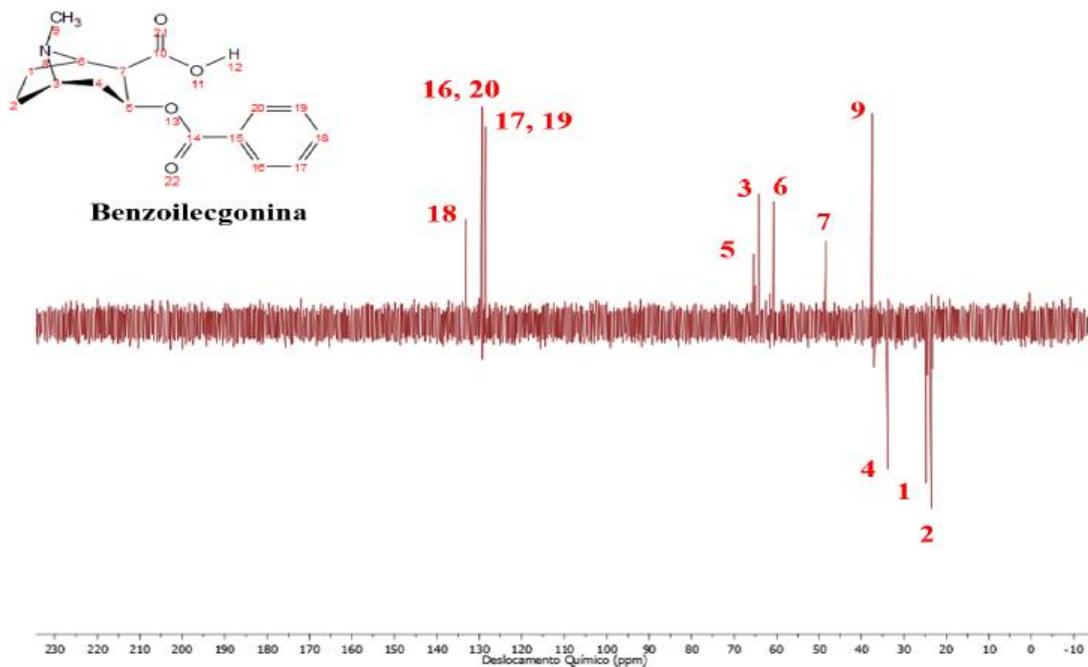
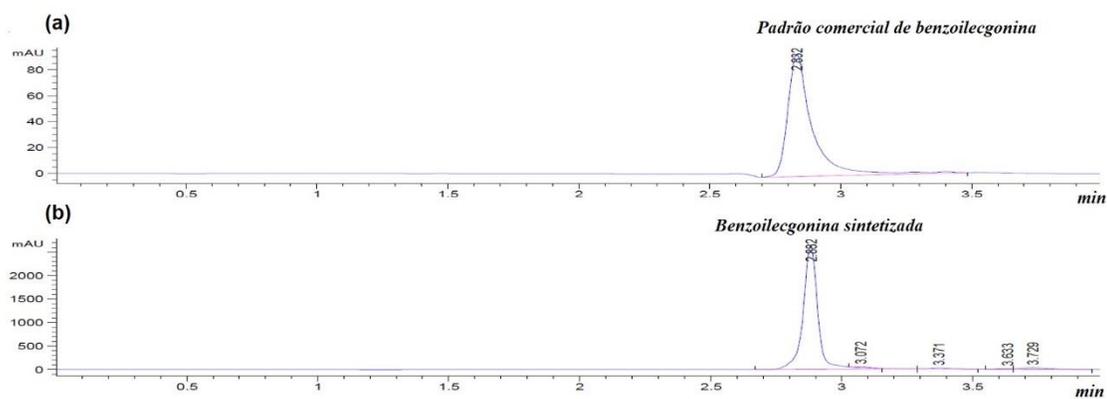


Figura S8. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da benzoilecgonina.



**Figura S9.** Espectro DEPT de RMN de  $^{13}\text{C}$  da benzoilecgonina.

Modo isocrático, 5 % solução aquosa ácido fórmico 0,1% : 95 % acetonitrila, fluxo de 1,0 mL / min, absorção em 234 nm, tempo de corrida de 4 min, volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ , coluna analítica Waters SunFire C18 3,8 $\mu\text{m}$ ; 4,6 mm x 150 mm



**Figura S10.** Cromatogramas obtidos da (a) benzoilecgonina comercial e (b) para a benzoilecgonina sintetizada.

Modo isocrático, 5 % solução aquosa ácido fórmico 0,1% : 95 % acetonitrila, fluxo de 1,0 mL / min, absorção em 234 nm, tempo de corrida de 4 min, volume de injeção de 5 µL, coluna analítica Waters SunFire C18 3,8µm; 4,6 mm x 150 mm

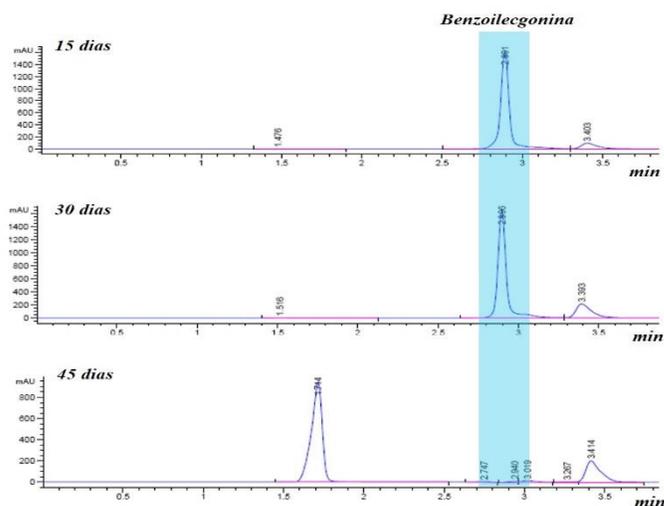


Figura S11. Cromatogramas obtidos da benzoilecgonina armazenada a 50 °C no período de 45 dias.

Tabela S1. Avaliação do estudo de homogeneidade por meio do teste ANOVA por fator único.

<i>Amostra</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
10	3	3030,2485	1010,0828	1045,5683
31	3	2877,9263	959,3088	2635,8433
32	3	2943,4162	981,1387	2892,2269
56	3	2917,3798	972,4599	2864,0740
76	3	2905,9979	968,6660	26060,6650
97	3	3018,0518	1006,0173	162,0443
103	3	2902,0349	967,3450	2603,0938
107	3	2930,6447	976,8816	2976,2968
155	3	2963,9854	987,9951	19055,5758
172	3	2883,1200	961,0400	371,3316
184	3	2858,9953	952,9984	979,5819

ANOVA						
<i>Fontes de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	10202,1631	10	1020,2163	0,18200	0,9959	2,2967
Dentro do grupo	123292,6033	22	5604,2092			
Total	133494,7664	32				

**Tabela S2.** Avaliação do estudo de estabilidade a 22 °C por meio do teste ANOVA por fator único.

<i>Período (dias)</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
1	2	1840,8957	920,4479	534,9211		
2	2	1982,7488	991,3744	121,6527		
7	2	1770,3558	885,1779	579,6514		
				1949,292		
15	2	1932,7448	966,3724	0		

ANOVA						
<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	13439,4700	3	4479,8230	5,6252	0,06427	6,5913
Dentro do grupo	3185,5170	4	796,3793			
Total	16624,990	7				

**Tabela S3.** Avaliação do estudo de estabilidade a 5 °C por meio do teste ANOVA por fator único.

<i>Período (dias)</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
1	2	1849,7940	924,8970	1480,6350		
2	2	1828,7510	914,3756	1512,4560		
7	2	1612,0850	806,0425	1732,7300		
15	2	1812,4730	906,2364	1258,1270		
30	2	1870,9000	935,4501	2970,9090		

ANOVA						
<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	21832,7000	4	5458,1740	3,04760	0,1265	5,1921
Dentro do grupo	8954,8570	5	1790,9710			
Total	30787,5500	9				

**Tabela S4.** Avaliação do estudo de estabilidade a -8 °C por meio do teste ANOVA por fator único.

<i>Período (dias)</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>			
1	2	1789,7240	894,8621	3126,622			
2	2	1817,3510	908,6757	993,4778			
7	2	1927,1880	963,5940	1396,6630			
15	2	1843,5670	921,7833	730,6305			
30	2	2044,9190	1022,4600	1552,3720			
<b>ANOVA</b>							
<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>	
Entre grupos	21361,7500	4	5340,4360	3,4234	0,1047	5,1921	
Dentro do grupo	7799,76500	5	1559,9530				
Total	29161,5100	9					

**Tabela S5.** Avaliação do estudo de estabilidade a 50 °C por meio do teste ANOVA por fator único.

<i>Período (dias)</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>			
15	2	1711,3710	855,6857	1669,2630			
30	2	1618,8070	809,4035	996,7742			
45	2	1302,8660	651,4331	93,9827			
<b>ANOVA</b>							
<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>	
Entre grupos	45877,2000	2	22938,6000	24,9330	0,0135	9,5520	
Dentro do grupo	2760,0200	3	920,0066				
Total	48637,2200	5					

### Capítulo 3: Isolamento do MDMA para aplicação como material de referência

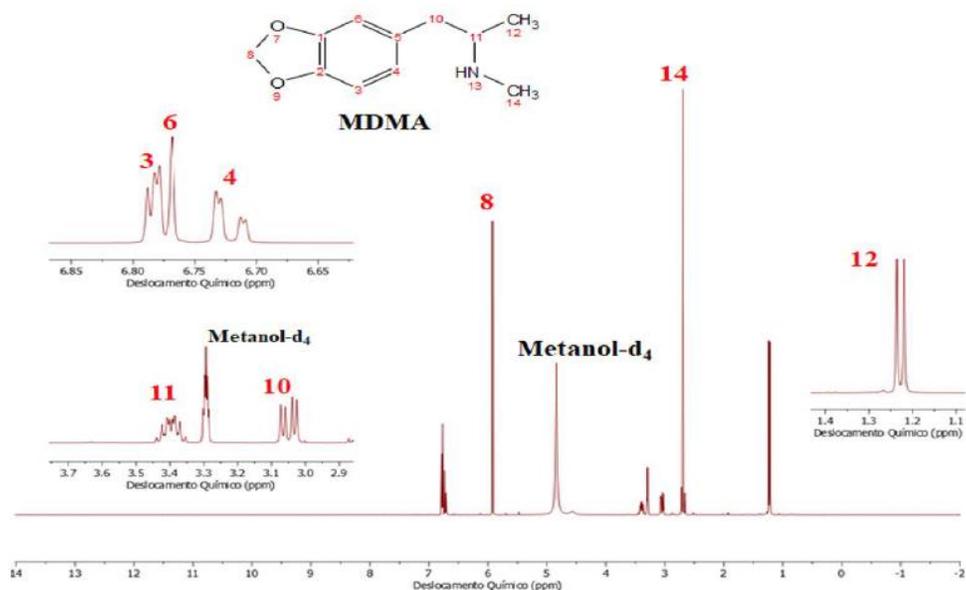


Figura S12. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do MDMA.

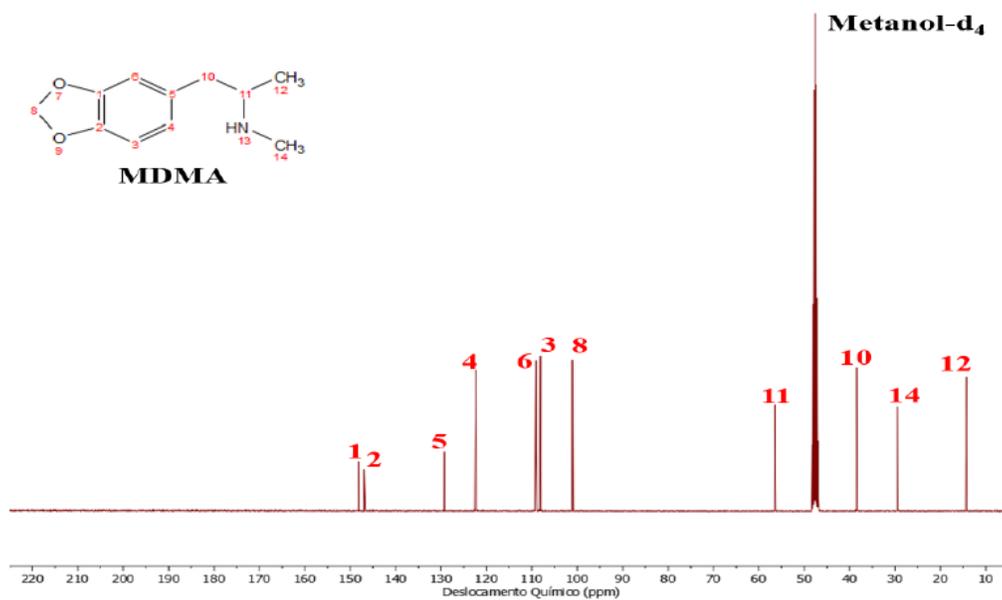


Figura S13. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do MDMA.

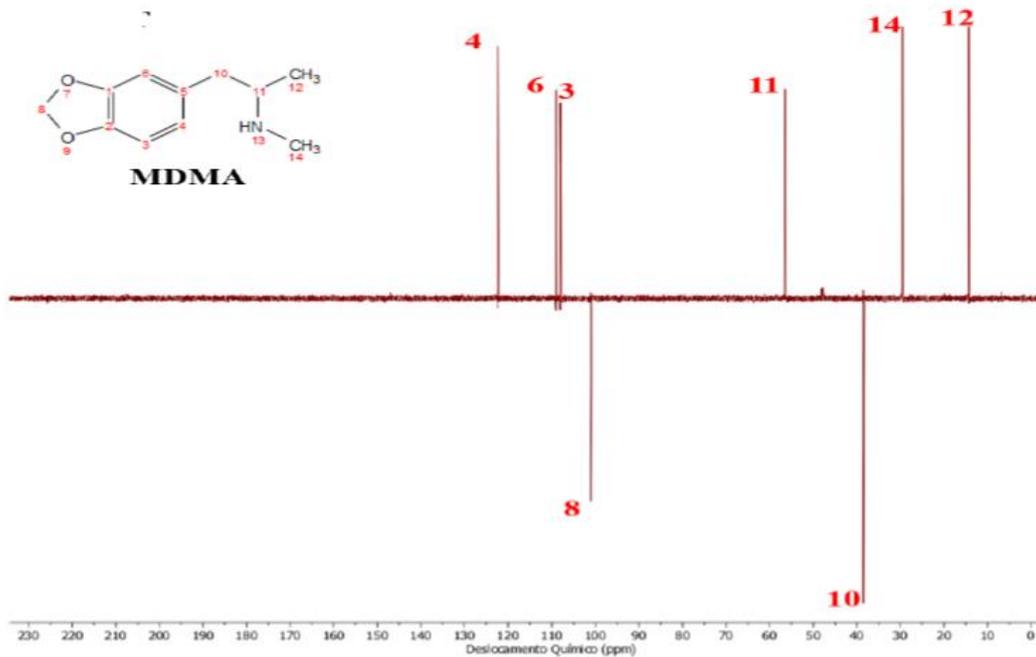


Figura S14. Espectro DEPT de RMN de  $^{13}\text{C}$  do MDMA.

Modo isocrático, 20 % solução aquosa ácido fórmico 0,1% : 80 % acetonitrila, fluxo de 1,0 mL / min, absorção em 210 nm, tempo de corrida de 6 min, volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ , coluna analítica Waters SunFire C18 3,8 $\mu\text{m}$ ; 4,6 mm x 150 mm

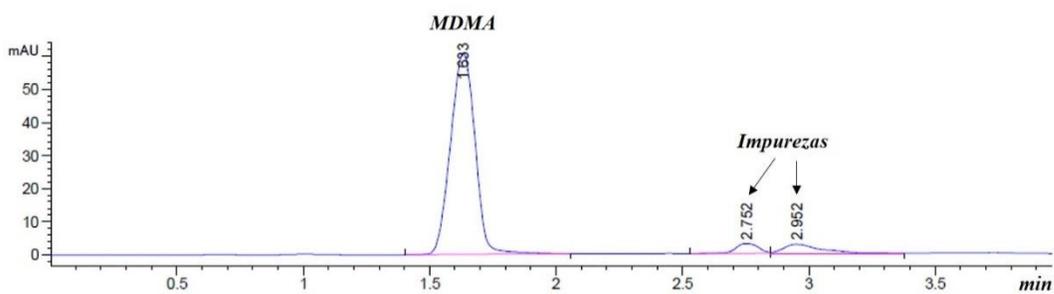


Figura S15. Cromatograma obtido do MDMA para o cálculo de pureza relativa por meio da CLAE.

## Capítulo 4: Aplicação de compostos de Európio<sup>III</sup> como materiais de referência contra fraudes

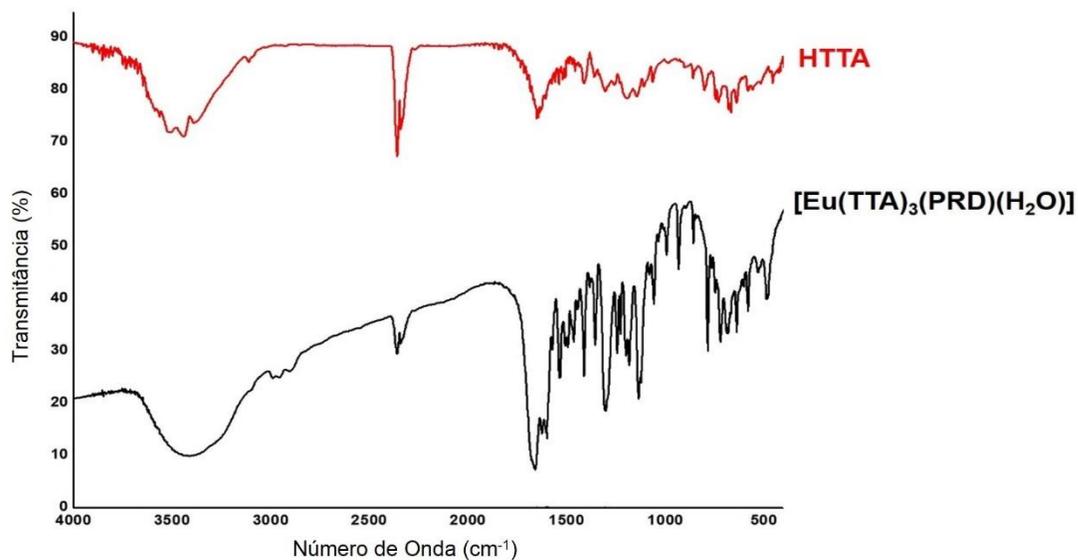


Figure S16. Espectro de FTIR do complexo sintetizado e do ligante.

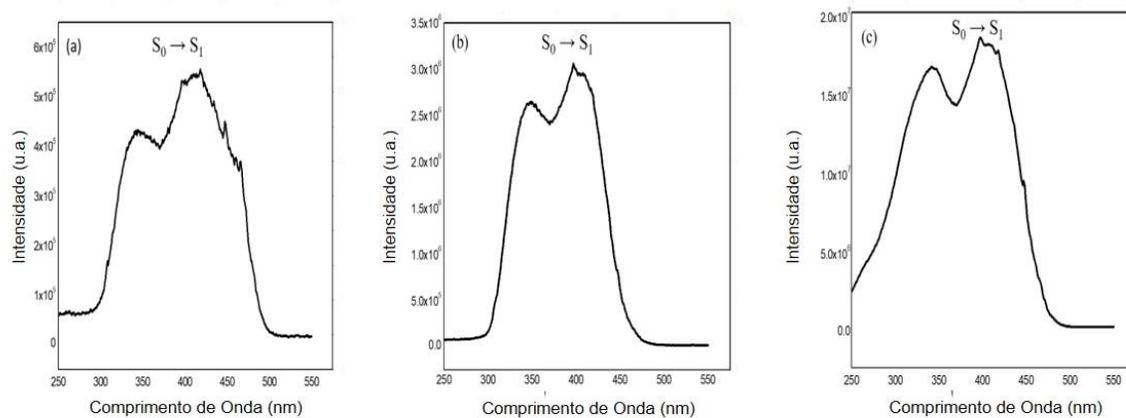
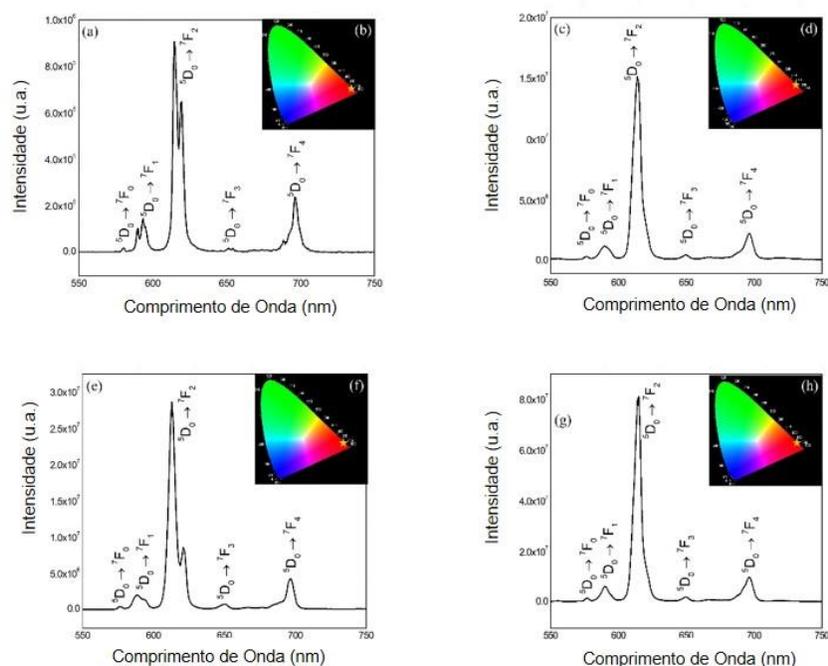
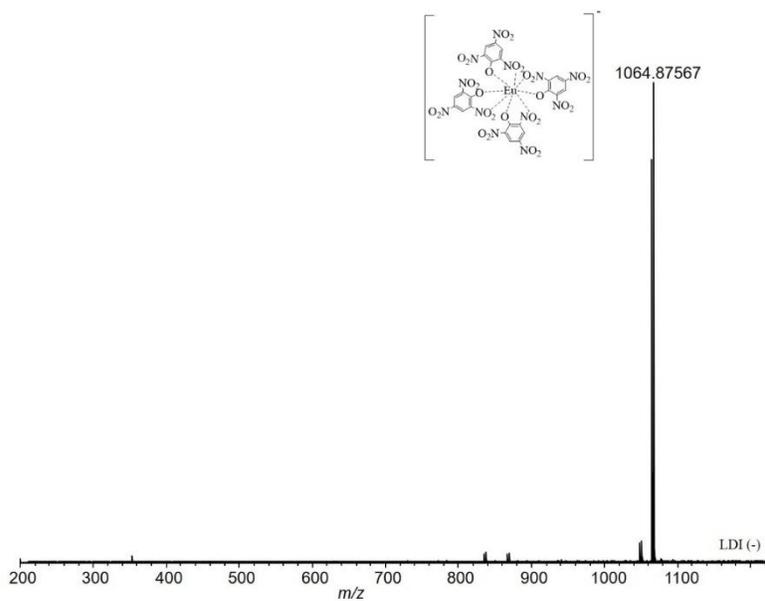


Figura S17. Espectros de excitação a temperature ambiente,  $\lambda_{\text{abs.}} = 617 \text{ nm}$  do (a) [Eu(pic)<sub>3</sub>.(DVL)<sub>3</sub>]; (b) [Eu(pic)<sub>3</sub>.(EPK)<sub>3</sub>] and (c) [Eu(pic)<sub>3</sub>.(OEN)<sub>3</sub>].



**Figure S18.** Espectros de emissão a temperature ambiente,  $\lambda_{exc.} = 430$  nm do (a)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{H}_2\text{O})_{11}]$ ; (c)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{DVL})_3]$ ; (e)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{EPK})_3]$  e (g)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{OEN})_3]$  e seus respectivos diagramas de cromaticidade (b)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{H}_2\text{O})_{11}]$ ; (d)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{DVL})_3]$ ; (f)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{EPK})_3]$  e (h)  $[\text{Eu}(\text{pic})_3.(\text{OEN})_3]$ .



**Figura S19.** Espectro LDI (-) MS da cédula de R\$50 marcada com o complexo sintetizado.