

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

**Análise de cocaína e seus metabólitos em fios de cabelo
por MALDI-TOF MS**

Analysis of cocaine and its metabolites in hair by MALDI-TOF MS

Patrícia Oliveira Donateli

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2023**

Patrícia Oliveira Donateli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa:

Química Forense.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

**VITÓRIA
2023**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D677a Donateli, Patricia Oliveira, 1988-
Análise de cocaína e seus metabólitos em fios de cabelo por MALDI-TOF MS / Patricia Oliveira Donateli. - 2023.
96 f. : il.

Orientador: Wanderson Romão.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Drogas abuso. 2. Cocaina. 3. MALDI. 4. Cabelo. I. Romão, Wanderson. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

Análise de cocaína e seus metabólitos em fios de cabelo por
MALDI-TOF MS

Patricia Oliveira Donateli

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

Aprovada em 12/12/2023 por:

Prof.(a) Dr.(a) Wanderson Romão
Orientador(a)
UFES

Prof.(a) Dr.(a) Hildegardo Seibert França
IFES

Prof.(a) Dr.(a) Rodrigo Rezende Kitagawa
UFES

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, dezembro de 2023





Documentos_BancaDefesaMestrado_Patricia Oliveira Donateli

Data e Hora de Criação: 04/06/2024 às 08:35:18

Documentos que originaram esse envelope:

- AtaAprovação_Patricia Donateli.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)
- FolhaRegistro_Patricia Donateli.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)
- FolhaAssinaturas_Patricia Donateli.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: ef597c3936c718886998a8a545a1d50ad53184cbb55ec03a875adadf152db8

[SHA512]: 747b0929942893031010727ef6ef54cd0d3c7a6eb040706951c2f2a68c41c94cacfb37f7bc5a4cd815b1d5c8a04c1f094942f0a4b91159d053025f945793b68

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Hildegardo Seibert França (hildegardo.franca@ifes.edu.br)

Data/Hora: 05/06/2024 - 01:55:26, IP: 76.170.193.70

[SHA256]: 6e59050692144c0b9a4ca47df1370d06801abf49bbd174bfd12375b42c8209c



ASSINADO - Rodrigo Rezende Kitagawa (rodrigo.kitagawa@ufes.br)

Data/Hora: 04/06/2024 - 10:13:01, IP: 177.137.224.159, Geolocalização: [-20.333454, -40.281074]

[SHA256]: c851f3643d7f8a73b76a7c486fd6cf1a1dd7d389c227ba2de654420deb6e27c4



ASSINADO - Wanderson Romão (wanderson.romao@ufes.br)

Data/Hora: 04/06/2024 - 10:42:30, IP: 179.132.2.222, Geolocalização: [33.7955130, -117.94030]

[SHA256]: f2ab94d4c19d07fb00a572d15279605a9827e481314eb760b3b15a4d0bfc9848

Histórico de eventos registrados neste envelope

05/06/2024 01:55:26 - Envelope finalizado por hildegardo.franca@ifes.edu.br, IP 76.170.193.70

05/06/2024 01:55:26 - Assinatura realizada por hildegardo.franca@ifes.edu.br, IP 76.170.193.70

05/06/2024 01:55:25 - Envelope visualizado por hildegardo.franca@ifes.edu.br, IP 76.170.193.70

04/06/2024 10:42:30 - Assinatura realizada por wanderson.romao@ufes.br, IP 179.132.2.222

04/06/2024 10:13:01 - Assinatura realizada por rodrigo.kitagawa@ufes.br, IP 177.137.224.159

04/06/2024 10:12:58 - Envelope visualizado por rodrigo.kitagawa@ufes.br, IP 177.137.224.159

04/06/2024 08:37:01 - Envelope registrado na Blockchain por michel.chaves@ufes.br, IP 200.137.65.104

04/06/2024 08:37:01 - Envelope encaminhado para assinaturas por michel.chaves@ufes.br, IP 200.137.65.104

04/06/2024 08:35:20 - Envelope criado por michel.chaves@ufes.br, IP 200.137.65.104

Á Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre estar presente em minha vida, pela força, saúde, paciência, consolo e perseverança.

Aos meus amados pais e irmãos.

Ao meu marido Eonassis por toda paciência e amor.

Às minhas filhas Esther e Stella.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wanderson Romão por ter me dado à oportunidade de produzir este trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pela paciência dispendida.

A Profa. Dra. Nayara Araújo dos Santos por toda ajuda e amizade.

A equipe do Laboratório de Petroleômica e Forense.

Ao LabPetro.

Ao PPGQUI-UFES e aos professores.

Ao pessoal da UNB, departamento de Biologia molecular, o Renan Monteiro, Prof. Dr. Sebastien Charneau, Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa pelo uso das instalações do laboratório, ao Nuno Manoel Ferrao Machado Silvano Domingues pela ajuda nas análises.

Ao laboratório Contraprova por fornecer material para análises.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conquistasse mais esta etapa.

“É justo que muito custe o que muito vale.”
Santa Teresa D’Avila

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número global de pessoas que usam drogas e pessoas com transtornos por uso de drogas, entre 2006 e 2019.	18
Figura 2. Amostras de toxicologia forense.....	19
Figura 3. Imagens de uma amostra de cabelo intacta e B) uma amostra de cabelo seccionada longitudinalmente. C) a cutícula, D) a medula e E) as regiões do córtex.	21
Figura 4. Fases de crescimento do cabelo e incorporação	22
Figura 5. Alcalóides presentes em folhas de coca.....	24
Figura 6. Via hipotética da biossíntese de alcalóides tropânicos em <i>Erythroxylum</i> levando à produção de cocaína.	26
Figura 7. Rota metabólica da cocaína.	28
Figura 8. Gráfico que correlaciona número de publicações com <i>drugs abuse</i> e técnicas analíticas, nos últimos 5 anos.	31
Figura 9. Esquema de um espectrômetro de massas.	33
Figura 10. Etapas do MALDI.	35
Figura 11. Mecanismos de ionização por MALDI	36
Figura 12. Algumas matrizes MALDI	37
Figura 13. Analísadores do tipo TOF.	38
Figura 14. Imagem de cocaína ao longo de amostras de cabelo. a)-Imagem ótica de fio de cabelo, b)Imagens de 5 réplicas de um fio de cabelo c)Análise de um fio e concentração ao longo do fio. Fonte: Adaptado de PORTA <i>et al.</i> , 2011 ^{54 61}	40
Figura 15. Nuvem de palavras com as 50 mais citadas nas publicações referentes à análise de drogas em cabelos.....	42

- Figura 16.** Metodologia analítica das etapas de lavagem da placa MALDI: primeiro conjunto: lavagem com etanol, água destilada e etanol; segunda etapa: sonicação por 20 min (10 min em água destilada e 10 min em etanol:água:0,1 M HCl 2:2:1 v/v); e terceiro passo lavagem com ACN.46
- Figura 17.** Esquema ilustrativo de preparação de amostras por MALDI-MS: (a) análises de padrões analíticos forenses em função da concentração de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) 1 a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico); e (b) disposição dos cabelos.47
- Figura 18.** Espectros MALDI(+)-TOF MS do padrão de cocaína (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) com as matrizes MALDI: a) CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e b) DHB(ácido 2,5-dihidroxibenzóico), ambas na concentração de 7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$49
- Figura 19.** Espectros de massa MALDI(+)-TOF de a) COC (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) b) BZE-d3 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e c) EME (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) com matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) de 1,5; 3,0; 7,0 a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$50
- Figura 20.** Espectros das amostras a) “A” e b) “B” com matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) 1,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ com dois métodos de lavagem (diclorometano e água:acetona:hexano) e sem lavagem53
- Figura 21(a-j).** Espectros com 10 amostras de fios de cabelo com matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) 1,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sem lavagem com faixa de expansão espectral (m/z 287 a 307) para visualização de moléculas de BZE e COC.55
- Figura 22.** Cromatograma de GC-MS da amostra de cabelo “E” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “E” na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).56
- Figura 23.** Amostra de cabelos dopados com 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de COC em metanol para avaliação da eficiência de ionização com (a) cabelos sem tratamento químico e (b)

cabelos com tratamento químico em matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$	58
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais aminoácidos presentes no cabelo humano.....	20
Tabela 2. Comparação geral de analisadores de massa usados com MSI.....	39
Tabela 3. Comparação de análises de cabelo usando LC, CG/MS e MSI.....	39
Tabela 4. Drogas de abuso detectadas em fios de cabelo por MSI.....	41
Tabela 5. Padrões analíticos com sua fórmula e peso molecular (Mw).....	44
Tabela 6. Avaliação de matrizes CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzóico) em padrões analíticos.....	45
Tabela 7. MALDI(+) TOF MS do padrão COC a 1 mg mL^{-1} em I com matriz CHCA de $1,5$ a 10 mg mL^{-1}	51
Tabela 8. Amostras "A" e "B" com matriz CHCA $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ com moléculas detectadas no espectro de massa MALDI(+) e suas respectivas lavagens.....	54
Tabela 9. Informações da fórmula molecular, m/z , IR, TIC das moléculas de interesse encontradas nas 10 amostras de fios de cabelo analisadas por MALDI(+)TOF MS e concentração de analitos detectados por GC-MS.....	57
Tabela 10. Informações da fórmula molecular, m/z TIC e IR da molécula COC em amostras de cabelo com e sem tratamento químico.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

ATR-FTIR - *Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy*

BZE – Benzoilecgonina

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CHCA - Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

CI - Ionização química

CICCA - Ácido 4-cloro- α -cianocinâmico

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COC - Cocaina

COCE - Cocaetileno

DESI - *Desorption electrospray ionization*

DHB - Ácido 2,5-di-hidroxibenzóico

ECG - Ecgonina

EI - Ionização por elétrons

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EME – Ecgonina metil ester

ESI - *Electrospray Ionization*

FE - Fase estacionária

FM - Fase móvel

FMTSP - *2-fluoro-1-Methylpyridinium p-tolunesulfonate*

FT-ICR - *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

GC-MS - *Gas chromatography–mass spectrometry*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

LC-MS - *Liquid chromatography–mass spectrometry*

LC-QTOF-MS - *Liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry*

LDI - Ionização/Dessorção a laser

LSD - Ácido lisérgico

LTDA - Limitada

MALDI - *Matrix assisted laser desorption ionization*

MBT - 2-Mercaptobenzotiazol

MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina
MS - *Mass spectrometry*
MSI - *Mass spectrometry imaging*
NMR - *Nuclear magnetic resonance*
NpCCA - Ácido (E) -2-ciano-3- (2-naftil) acrílico
OH-BE - Hidrobenzoilecgonina
OH-COC – Hidroxi-cocaina
OMS - Organização Mundial da Saúde
PNA - *Para-Nitroaniline*
Q-TOF - Quadrupolo por tempo de voo
SA - Ácido sinápico
SNC - Sistema Nervoso Central
SOHT - Society of Hair Testing
TIC - Corrente total de íons
THC - Tetrahydrocannabinol
TOF - *Time of flight*
TOF MS - *Time of flight mass spectrometry*
UNODC - *United Nations Office on Drugs and Crime*

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius

g – Grama

L – Litro

m – Mili

m/z – Razão massa carga

min – Minuto

Nº – Número

ppm – Partes por milhão

μ – Micro

RESUMO

O cabelo pode fornecer informações químicas sobre o uso de drogas, o que gera grande interesse nas ciências forenses. Uma técnica que tem apresentado resultados promissores para a detecção de fármacos nesta matriz de estudo é a espectrometria de massas por ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS), na qual é possível obter, em um único disparo, a detecção de fármacos de abuso, mesmo que tenha decorrido muito tempo desde o uso do composto ilícito. Neste estudo, a fonte de ionização MALDI foi utilizada para detectar drogas e metabólitos nos fios de cabelo de usuários e não usuários de drogas. Para isso foi desenvolvido um método com avaliação inicial da matriz MALDI mais eficiente para a ionização dos analitos monitorados. Dentre as matrizes avaliadas (ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA)), o CHCA foi escolhido, e entre suas concentrações testadas (de 1,5 a 10 mg mL⁻¹). Posteriormente, os resultados foram comparados com análises de cromatografia gasosa-espectrometria de massa, onde foi observada uma boa relação entre as respostas de ambos os métodos. Além disso, foi avaliado o efeito da pré-análise (lavagem dos cabelos) e sua influência na detecção dos compostos monitorados, além da avaliação do efeito do clareamento capilar em cabelos fortificados com medicamento e analisados com o método proposto. Os resultados mostram pouca influência na etapa de pré-análise e confirmam a redução na detecção de drogas em cabelos submetidos à descoloração. Nesse sentido, os resultados agregam informações que afirmam a aplicabilidade do método para detecção rápida de drogas e metabólitos em cabelos.

Palavras-chave: Química forense. Drogas de abuso. MALDI. TOF. MS.

ABSTRACT

Hair can provide chemical information about drug use, which generates great interest in forensic sciences. A technique that has shown promising results for the detection of drugs in this study matrix is the matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS), in which it is possible to achieve, in a single shot, the detection of drugs of abuse, even if a long time has elapsed since the use of the illicit compound. In this study, the MALDI ionization source was used to detect drugs and metabolites in the hair strands of drug users and non-drug users. For this, a method was developed with an initial evaluation of the most efficient MALDI matrix for the ionization of the monitored analytes. Among the evaluated matrices (2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)), CHCA was chosen, and among its tested concentrations (from 1.5 to 10 mg mL⁻¹). Subsequently, the results were compared with gas chromatography-mass spectrometry analyses, where a good relationship was observed between the responses of both methods. In addition, the effect of the pre-analysis (hair washing) and its influence on the detection of the monitored compounds were evaluated, in addition to the evaluation of the effect of hair lightening on hair fortified with a drug and analyzed with the proposed method. The results show little influence on the pre-analysis stage and confirm the reduction in drug detection in hair submitted to bleaching. In this sense, the results add information that asserts the applicability of the method for rapid detection of drugs and metabolites in hair.

Keyword: Forensic chemistry. Drugs of abuse. MALDI. TOF.MS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Drogas de abuso	17
1.2 Toxicologia	18
1.3 Cocaína	23
1.4 Técnicas para identificação de cocaína e seus metabólitos em fios de cabelo.	29
1.5 Cromatografia	31
1.6 Espectrometria de massas	32
2. OBJETIVOS	43
2.1 Geral	43
2.2 Específico.....	43
3. METODOLOGIA	44
3.1 Materiais e métodos.....	44
3.2 Preparo de amostra	45
3.3 MALDI-TOF MS	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1 Avaliação da eficiência de ionização das matrizes DHB e CHCA.....	48
4.2 Estudo do efeito da lavagem (pré-análise) dos fios de cabelo.....	51
4.3 Avaliações de amostras de fios de cabelo de indivíduos suspeitos de serem usuários de drogas	55
4.4 Efeito do tratamento químico (clareamento) nos cabelos.....	58
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Drogas de abuso

As drogas são compostos químicos, sejam naturais ou sintéticos, que, quando administrados, interferem no funcionamento dos organismos vivos, podendo atuar em órgãos específicos ou no organismo como um todo. Tais drogas atuam no sistema nervoso central (SNC), modificando o humor, a consciência, os sentimentos, as sensações, o estado de vigília, dentre outros. As drogas podem ser classificadas quanto à ação no SNC, sendo divididas em depressoras (opiáceos/opioides, etanol e barbitúricos), estimulantes (cocaína, anfetaminas, metanfetaminas, anorexígenos), perturbadoras (drogas alucinógenas como LSD-ácido lisérgico-, psilocibina, mescalina canabinóides); e quanto à legalidade como lícitas, em que a lei permite o comércio e o consumo, e as ilícitas, em que o comércio e o consumo são proibidos.^{1,2}

Ao longo da história tem-se relatado o uso recreativo das drogas e a intensificação do uso abusivo tem se tornado recente, para conseguir minimizar esse crescente consumo ilegal, várias normativas têm sido aplicadas em diversos países, no Brasil, por exemplo, há a Lei 11.343/06, que institui o sistema nacional de políticas públicas sobre drogas e a Portaria 344/98 da Anvisa, que aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial.²

Segundo o relatório da UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*), cerca de 284 milhões de pessoas, entre 15 e 64 anos, usaram drogas em 2020, 26% a mais do que em 2010. A população mais jovem está entre os que mais usam drogas.³

Entre 2010 e 2019, o número estimado de usuários aumentou de 226 milhões para 274 milhões. Houve uma maior diversidade de substâncias disponíveis no mercado, além de haver uma expansão no uso de substâncias a base de plantas como *Cannabis (maconha)*, *Erythroxylum coca* (cocaína) e *Papaver somniferum* (heroína).³

De acordo com o relatório da UNODC, estima-se que 11,2 milhões de pessoas no mundo utilizaram drogas injetáveis no ano de 2020, metade da estimativa convivia com hepatite C, 1,4 milhões com HIV e 1,2 milhões com ambos.³

No Brasil, um estudo feito pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no ano de

2019, divulgou que 3,2% (cerca de 4,9 milhões) dos brasileiros usaram substâncias ilícitas no ano de 2018 e entre os jovens de 18 e 24 anos entrevistados, 7,4% haviam consumido no ano de 2018.⁴

Conforme Figura 1, a alta taxa de usuários de drogas gera consequências não só de saúde pública, mas também com a saúde do usuário, que apresentam sérios transtornos. É possível observar a relação entre usuários de droga e usuários de drogas com transtornos e necessitam de tratamento. O termo utilizado para qualificar o uso indiscriminado de substâncias lícitas e ilícitas é chamado de “Drogas de abuso”.⁵

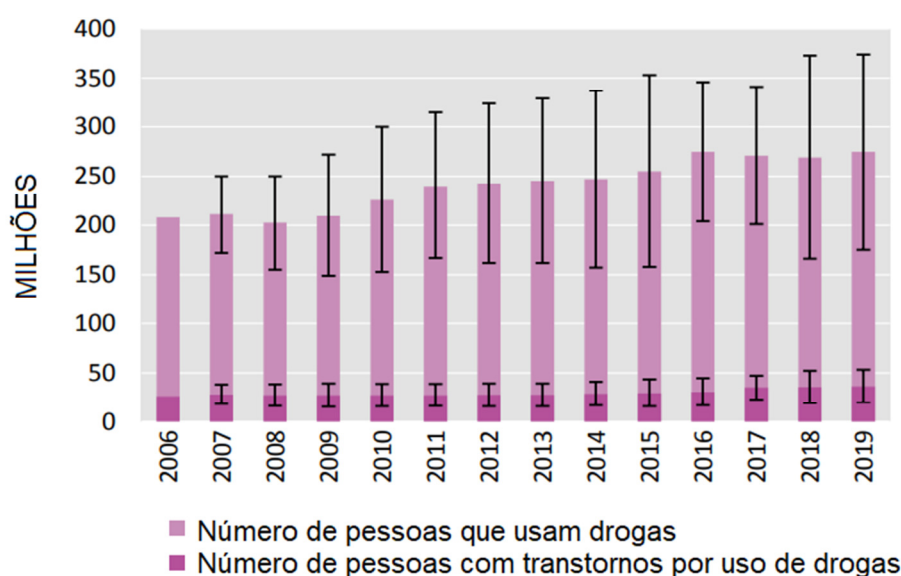


Figura 1. Número global de pessoas que usam drogas e pessoas com transtornos por uso de drogas, entre 2006 e 2019.

Fonte: UNODC-2022.³

1.2 Toxicologia

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos de substâncias químicas em organismos vivos. A toxicologia forense é o ramo que utiliza os princípios da toxicologia com objetivo de esclarecer fatos de interesse médico-legal. Ela engloba detecção, identificação e quantificação de xenobióticos envolvidos de forma parcial ou imparcial em um inquérito. Para isso, são utilizadas matrizes biológicas ou não biológicas, que passam por processos de extração e são submetidas a procedimentos analíticos.⁶

Com o grande avanço tecnológico e o aparecimento de métodos cada vez mais sensíveis e robustos é possível detectar substâncias com baixos níveis de concentração. A escolha adequada do tipo de amostra é de suma importância, pois uma escolha inadequada pode alterar a interpretação dos resultados obtidos.⁶

A análise toxicológica em pessoas para verificação de uso de drogas de abuso pode ser feita com diversas amostras biológicas a Figura 2 exemplifica as principais amostras utilizadas nas análises em vivos e *post mortem*.⁶

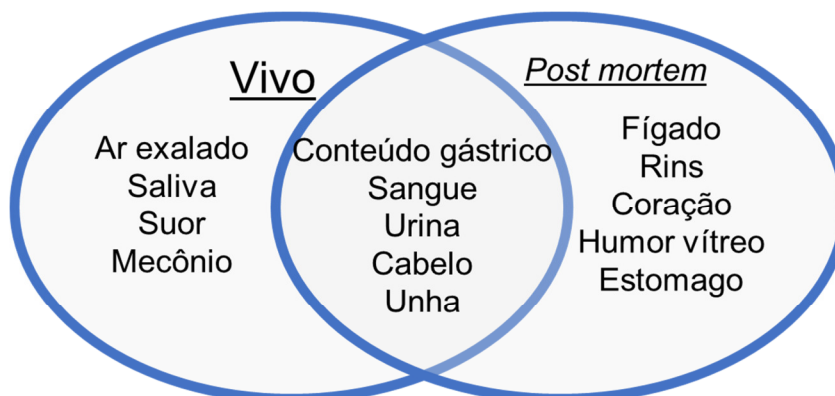


Figura 2. Amostras de toxicologia forense.
Fonte: Adaptado de DORTA, et al, 2018.⁶

De todas as amostras citadas anteriormente, o sangue e a urina são os mais utilizados, porém a utilização de matrizes alternativas têm aumentado, como por exemplo, saliva, cabelo, suor, mecônio e em casos de *post mortem*, humor vítreo.² Em indivíduos vivos, as vantagens são que as análises são não-invasivas e são mais fáceis de serem coletadas, quando comparadas ao sangue que necessita de profissional qualificado para coleta e a urina, que precisa de privacidade para coleta e armazenamento correto.² A utilização de cabelo para detecção de drogas de abuso vem crescendo nos últimos anos, devido vantagens, por ser um processo não invasivo, de difícil adulteração e com grande período de detecção.⁷

Resultados de análises em cabelo podem mostrar um histórico prolongado de exposição às drogas.² Há relatos na literatura da presença de um metabólito da cocaína, a benzoilecgonina, em cabelos de múmias chilenas, datadas de 2000 a.C. a 1500 d.C. Cocaína e éster metílico de ecgonina foram encontrados em cabelos de peruanos datados de 1000 d.C.⁸

O fio de cabelo é uma fibra originada a partir de folículos capilares localizados de 3 a 4 mm abaixo da camada epitelial.⁷

O cabelo humano é um tecido complexo que consiste em vários componentes

morfológicos. Dependendo do teor de umidade do cabelo, ele consiste em aproximadamente 65% a 95% de proteínas. A Tabela 1 mostra os principais aminoácidos presentes no cabelo humano, os constituintes restantes são água, lipídios, pigmentos e oligoelementos.⁹

Tabela 1. Principais aminoácidos presentes no cabelo humano.
Fonte: Adaptado de ROBBINS,2002.⁹

AMINOÁCIDO	FÓRMULA MOLECULAR	Mw (Da)
Ácido aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	133,10
Ácido glutâmico	C ₅ H ₉ NO ₄	147,13
Alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	89,09
Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,19
Asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,10
Cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,15
Cistina	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	240,28
Citrulina	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175,17
Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,18
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75,06
Glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146,13
Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,14
Isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,16
Leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,16
Lisina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,18
Metionina	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149,2
Prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	115,12
Serina	C ₃ H ₇ NO ₃	105,08
Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,17
Treonina	C ₄ H ₉ NO ₃	119,10
Triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,21
Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,14

Os folículos ficam cercados por capilares que fornecem sangue para o crescimento do cabelo. Eles também ficam próximo às glândulas sebáceas, sudorípara e a apócrina e as secreções dessas glândulas nutrem os fios de cabelo.⁷

O fio de cabelo é constituído de várias cutículas, que compõem a parte externa do cabelo e protegem a estrutura interna de danos externos. O córtex, estrutura fibrosa, de queratina, que fornece força, umidade e cor ao cabelo; local

onde a droga está localizada e medula, estrutura oca, no centro do cabelo, que normalmente está presente em pelos grossos, Figura 3.¹⁰

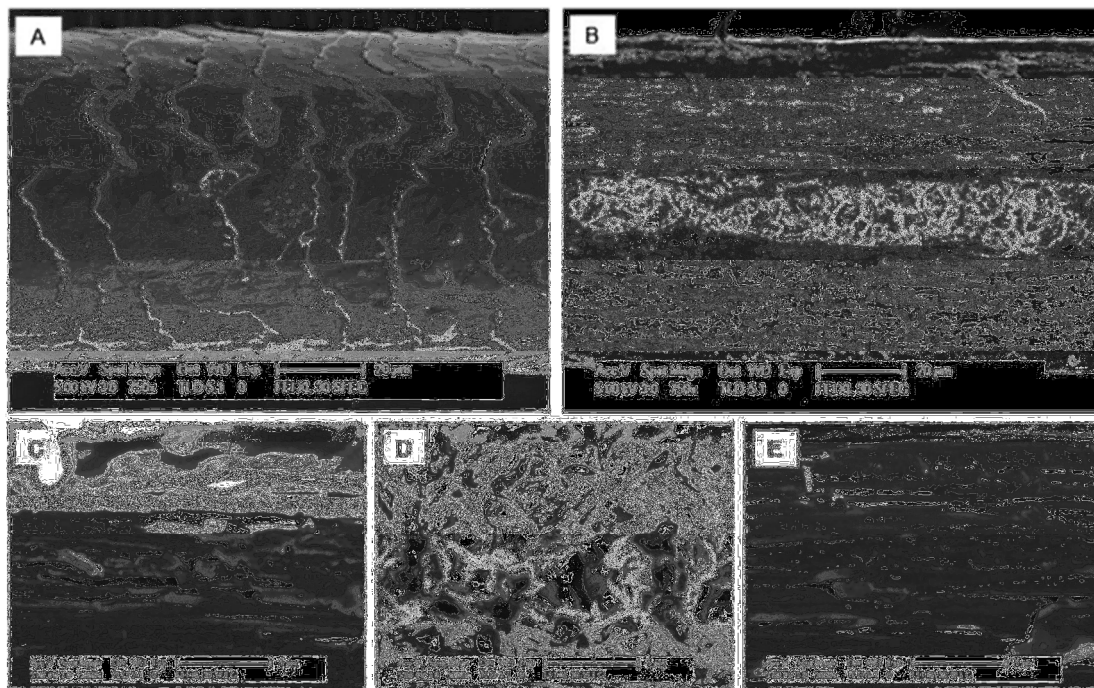
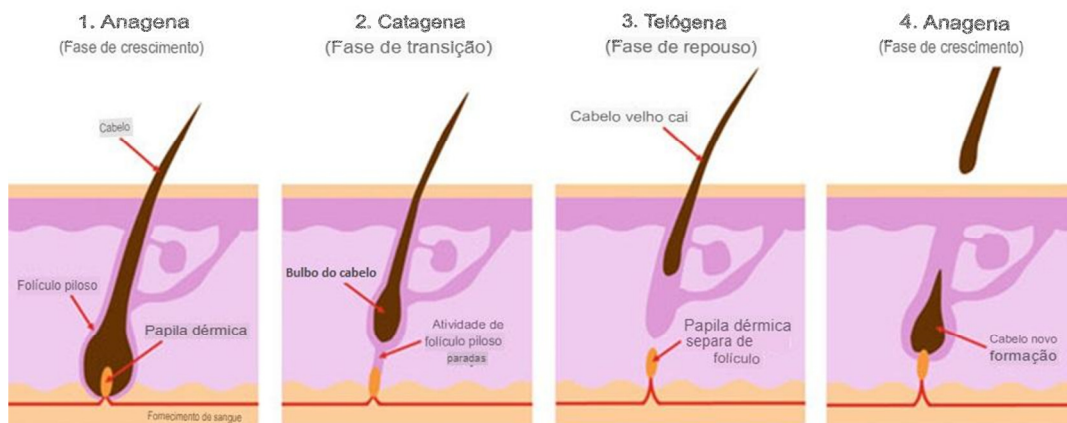


Figura 3.Imagens de uma amostra de cabelo intacta e B) uma amostra de cabelo seccionada longitudinalmente. C) a cutícula, D) a medula e E) as regiões do córtex.
Fonte: PHILIPSEN, et al. 2021.¹⁰

O crescimento do cabelo se apresenta em três fases: fase anágena, catágena e telógena. A fase anágena é o crescimento ativo do cabelo, ele cresce a partir do bulbo e essa fase pode durar em torno de 3 anos. A fase catágena é a transição, onde ocorre queratinização da raiz e o cabelo para de crescer e a fase telógena, fase de repouso, os pelos podem ser removidos se puxados e começa o crescimento de um novo fio e o processo recomeça Figura 4-a.⁷

a) fases de crescimento do cabelo



B) incorporação de compostos no cabelo

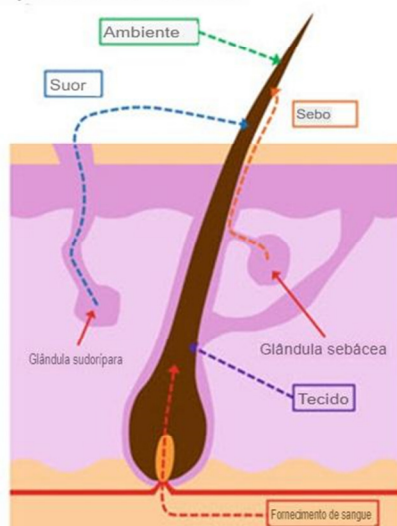


Figura 4. Fases de crescimento do cabelo e incorporação
Fonte: UEKI *et al.*, 2022.¹¹

Os compostos podem ser incorporados ao cabelo através da sua haste, de várias maneiras: através da corrente sanguínea na fase anágena, pelo suor após a formação do cabelo ou por exposição ambiental, Figura 4-b.¹¹

As drogas de abuso, por exemplo, podem ser incorporadas ao fio de cabelo através do sangue e depende das propriedades físico-químicas de cada droga e da melanina do cabelo.¹² Drogas básicas, com melhor capacidade de penetração para romper membrana, com base no pH entre o sangue e matriz ácida do cabelo, e drogas lipofílicas com maior capacidade para passagem em membranas celulares são melhor incorporadas no cabelo que outras.¹³

1.3 Cocaína

A cocaína é um alcaloide tropânico extraído de folhas de *Erythroxylum coca Lam*, originário dos Andes, tem efeito anestésico e atua como estimulante do SNC. Ela apresenta fórmula molecular (M) $C_{17}H_{21}NO_4$, massa molecular (M_w) de 303,4 g/mol, sendo sua forma básica, isto é, base livre, insolúvel em água e solúvel em álcool, éter e acetona.⁷ Seu comércio é ilegal no Brasil, sendo distribuída ilegalmente como cloridrato de cocaína ou base livre (também chamada de *crack*).⁵

Os alcalóides podem ser definidos como um grupo de compostos orgânicos de fontes naturais que contém nitrogênio.¹⁴ Dentre eles, os alcalóides tropânicos são produzidos por um grande número de plantas da família *Erythroxylaceae*, que apresentam uma estrutura bicíclica em comum, chamada 8-metil-8azabicyclo[3,2,1]octano. Essa estrutura bicíclica é formada pela fusão da pirrolidina e da *N*-metil piperidina.¹⁵

Juntamente com outras substâncias, as folhas de coca apresentam três tipos comuns de alcalóides, Figura 5.

- Derivados da ecgonina: cocaína, cinamoilcocaína, truxilinas, benzoilecgonina, metilecgonina (coloração azul na Figura 5).
- Derivados da tropina: tropacocaína e valerina (coloração verde na Figura 5).
- Derivados da higrina: higrina e cusco-higrina (coloração laranja na Figura 5).^{2, 16}

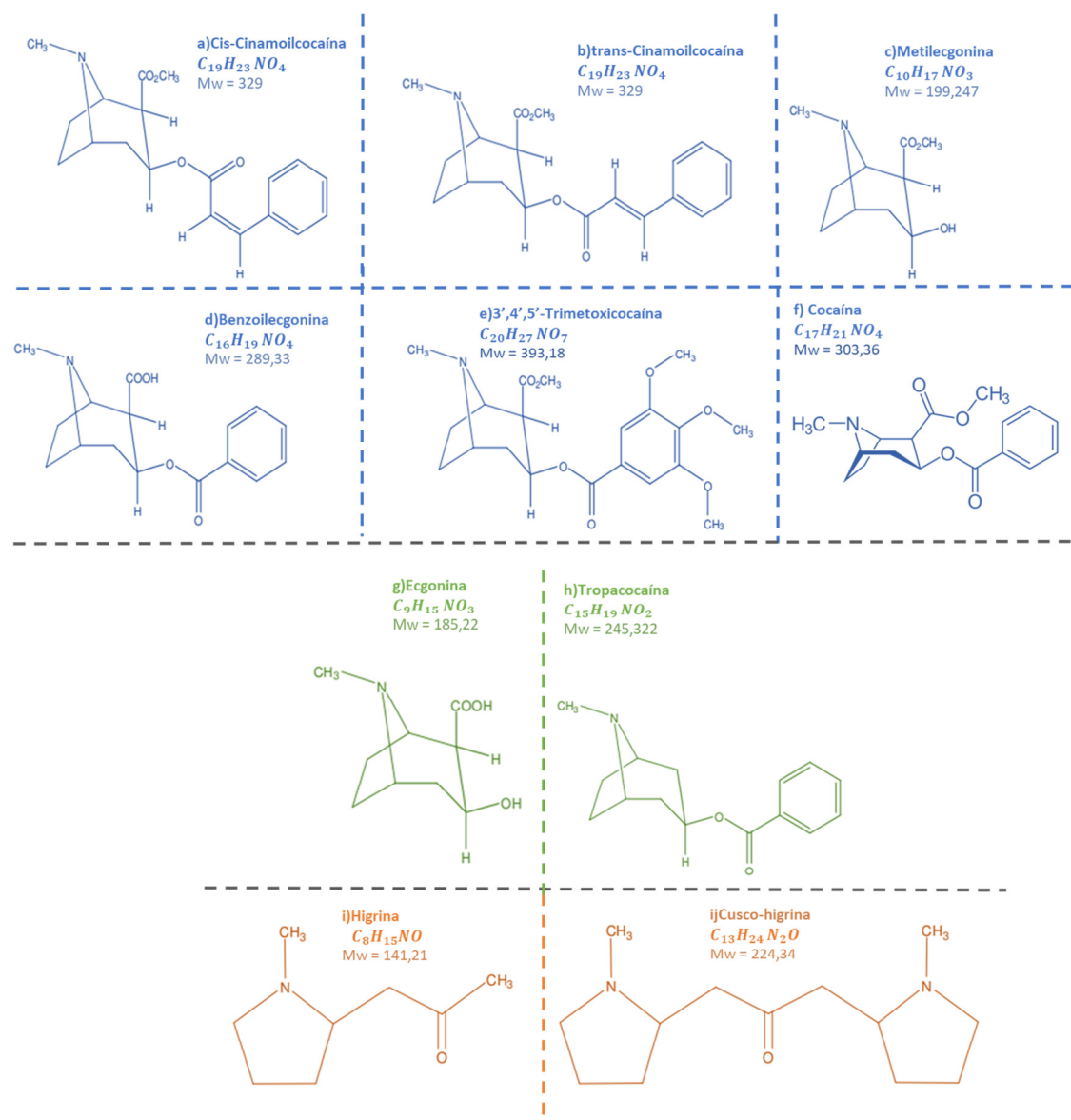


Figura 5. Alcalóides presentes em folhas de coca.
Fonte: Adaptado-BOTELHO,2011.¹⁷

O teor de cocaína das espécies cultivadas de *Erythroxylum* varia de 0,2 a 1% do peso seco das folhas, enquanto espécies selvagens estreitamente relacionadas não contêm mais que 0,01% .¹⁸

A biossíntese de cocaína e outros alcaloides tropânicos têm sido objeto de muitos estudos. A maioria das primeiras investigações utilizou alimentação in vivo de precursores radiomarcados na biossíntese do anel central de tropano. Esses estudos foram geralmente realizados por injeção de plantas produtoras de alcaloides tropânicos com precursores ou imersão em solução.¹⁹

A via hipotética que leva a formação da cocaína tem início com a poliamina putrescina, originada dos aminoácidos L-arginina ou L-ornitina (Figura 6). A putrescina é então mono-metilada para produzir *N*-metilputrescina. Em seguida, a oxidação do grupo amino primário resulta em 4-(metil-1-amino)butanal, cuja forma cíclica é o sal *N*-metil Δ^1 -pirrolínio. A condensação com acetoacetato (possivelmente como tioéster com coenzima A) conduz a um tioéster de ácido 4-(1-metil-2-pirrolidinil)-3-oxobutanóico, seguida por oxidação, resultando em um novo sal de imínio, o qual, por sua vez, sofre outra condensação aldólica, resultando em um produto com um sistema de anel tropano bicíclico. Após a hidrólise do CoA e a formação do éster metílico, é produzido o composto metilecgonona (2-carbometoxi-3-tropinona), que é um precursor direto da cocaína (Leete et al. 1991). As etapas subsequentes presumivelmente incluem a redução de metilecgonona em metilecgonina e, posteriormente, a benzoilação via benzoil-CoA para a produção de cocaína.¹⁸⁻²²

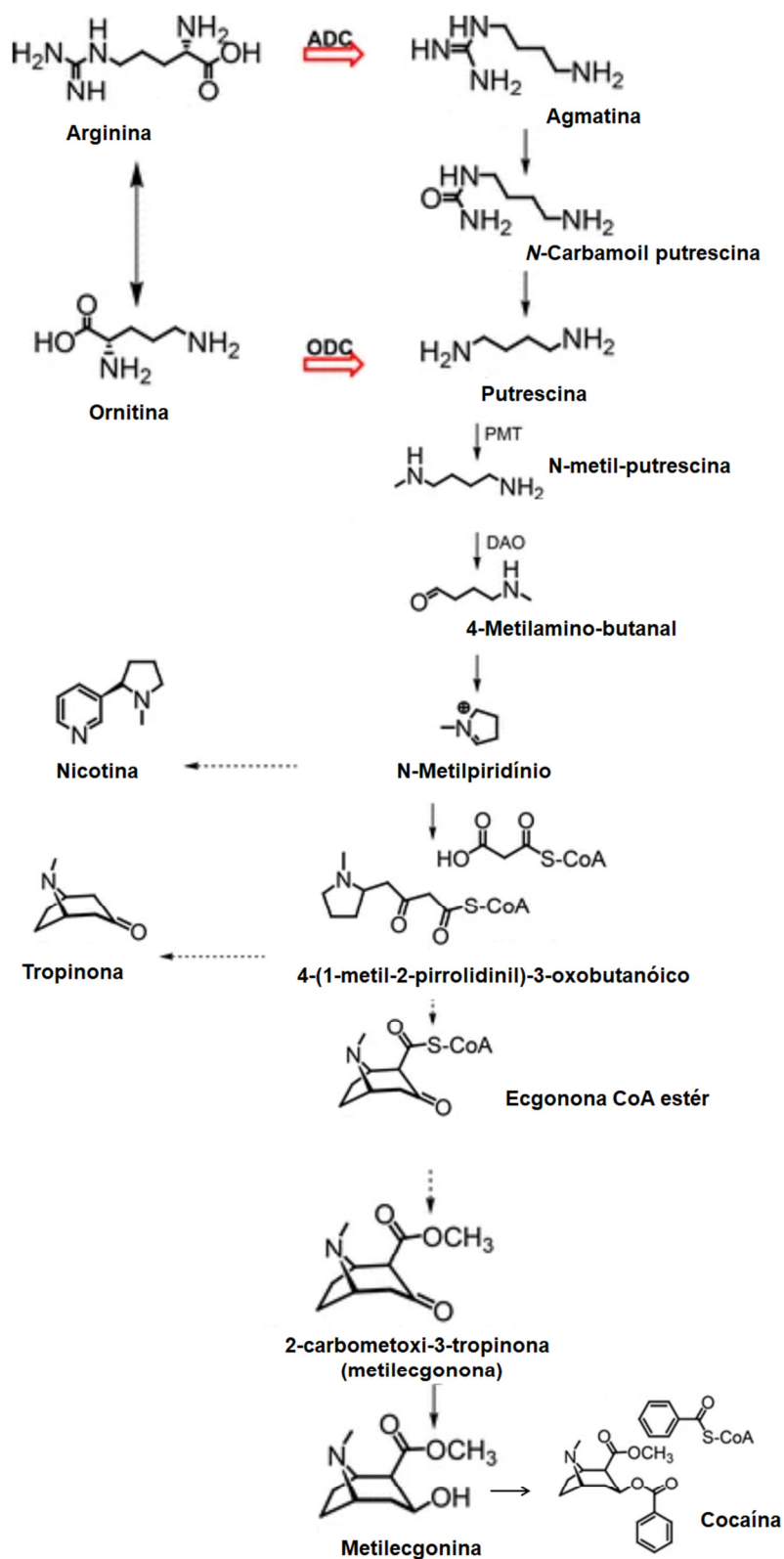


Figura 6. Via hipotética da biossíntese de alcalóides tropânicos em *Erythroxylum* levando à produção de cocaína.

Fonte: Adaptado-DOCIMO *et al.*, 2012.¹⁹

A cocaína apresenta efeitos anestésicos locais, o, tem boa afinidade pelo tecido nervoso. Seus efeitos colaterais estão em excitar o córtex cerebral.^{23,24} Como estimulante psicomotor produz seus principais efeitos farmacológicos ao inibir a receptação dos neurotransmissores norepinefrina, serotonina e dopamina nos terminais pré sinápticos, aumentando a neurotransmissão dessas monoaminas.²³ A cocaína atua no SNC com euforia, aumento do estado de alerta, aumento de energia e no sistema cardiovascular produz taquicardia, vasoconstrição e hipertermia.²⁵

Essa substância pode ser encontrada na forma básica ou salina e pode ser administrada por via oral, inalada, fumada ou injetada (por via intravenosa).^{26,27} Após a administração, a cocaína é rapidamente distribuída por todo o corpo, com as maiores concentrações da droga disponíveis no cérebro, baço, rim, pulmão, sangue, coração e músculos.²⁸ Sua meia-vida de eliminação média foi relatada em 244 minutos após uso intravenoso, 272 minutos após ser fumada e 299 minutos após uso intranasal.²⁸

A cocaína é metabolizada no tecido hepático, sendo os principais metabólitos a benzoilecgonina (BZE, Mw = 289,13 Da) e o éster metílico da ecgonina (EME, Mw = 199,12 Da) e metabólitos menores como a norcocaína (NCOC, Mw = 289,33 Da), hidróxi -cocaína (OH-COC, Mw = 319,40 Da) e hidrobenzoilecgonina (OH-BE, Mw = 305,32 Da).

O BZE pode ser formado por hidrólise química em pH alcalino e pela ação de esterases, como a carboxilesterase tipo 1. O BZE sofre oxidação e forma OH-BE. EME é produzido por hidrólise enzimática com 2 tipos de esterases, colinesterases plasmáticas e esterases hepáticas. BZE e EME ainda podem ser convertidos em ecgonina. A cocaína pode sofrer *n*-desmetilação para formar o metabólito NCOC, que é metabolizado em *n*-hidróxi cocaína e oxidado em nitróxido de cocaína.²⁹⁻³³ Além disso, a administração de cocaína e álcool leva à formação de cocaetileno (COCE), por transesterificação no fígado.²⁵ A Figura 7 mostra as principais vias metabólicas da cocaína.

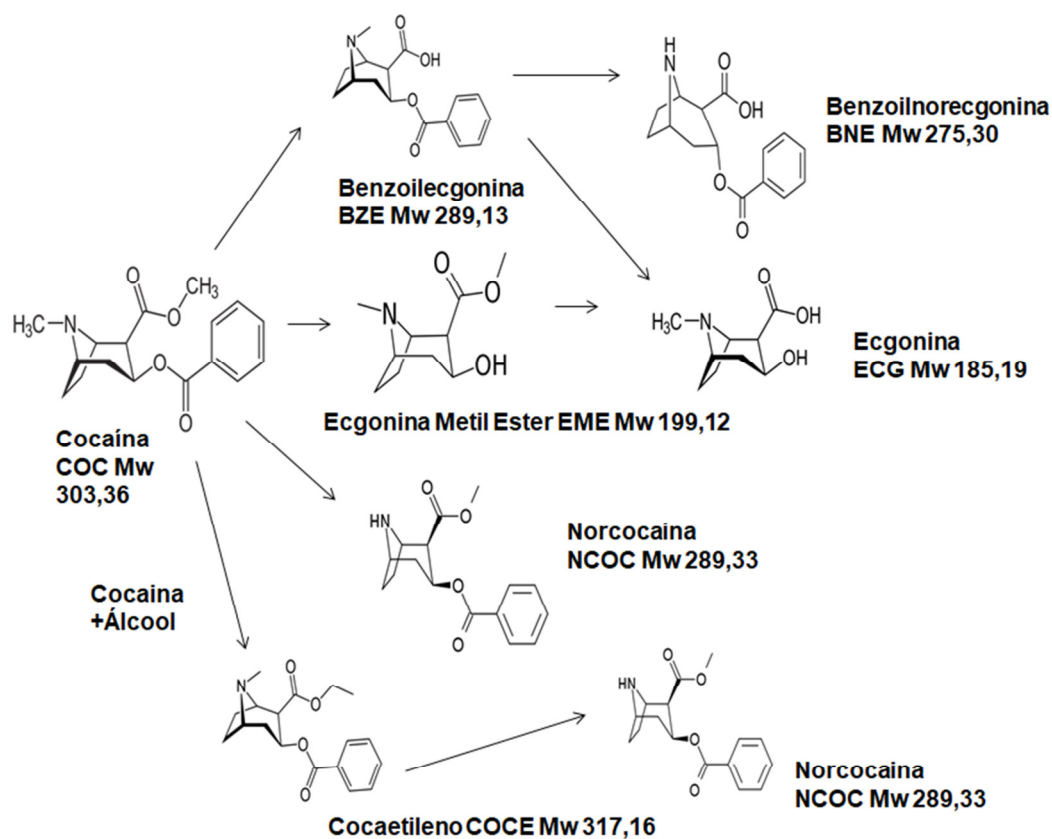


Figura 7. Rota metabólica da cocaína.

Fonte: Adaptado-PAULO,2017.³⁴ ⁶³

A cocaína, juntamente com seus metabólitos BZE, EME e ECG, é excretada na urina em sua forma original, inalterada por mais de 24 horas.^{26,35,36} Nos fluidos orais, a cocaína é detectável por 5 a 12 horas em dose única e até 10 dias para uso crônico.³⁷ Nos fios de cabelo, Garcia-Bournissen e colaboradores³⁶, em 2009, indicaram a detecção de cocaína dentro de 3 a 4 meses em ex-usuários de drogas. Amostras de cabelo, de 137 ex-usuários, foram cortadas em segmentos de 1 cm de comprimento e 10 mg de cabelo foram utilizados para extração em metanol. O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de desaparecimento da cocaína dos cabelos após a interrupção do uso da droga. As concentrações de cocaína foram analisadas por um ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e confirmadas por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).³⁸

Estudos acerca da cocaína datam de 1859, quando Albert Niemann, extraiu um alcalóide das folhas de *Erythroxylum coca*, provenientes do Peru e deu o nome

de cocaína.³⁷

A cocaína é de origem vegetal e para sua obtenção existem vários processos, com mesmas metodologias, que consiste no princípio de extração com solventes orgânicos e reações ácido-base para purificação e aquisição das diferentes formas de apresentação como pasta base, cocaína base, crack e cloridrato de cocaína.²

Durante o processo de extração e refino é possível encontrar várias impurezas e contaminantes que são adicionados para imitar a ação farmacológica, apesar de a cocaína ter composição química definida, esses adulterantes enganam o usuário². Para a detecção do princípio ativo existem técnicas cromatográficas e espectrométricas, além de ensaios colorimétricos.⁵

1.4 Técnicas para identificação de cocaína e seus metabólitos em fios de cabelo.

Com o crescente uso de drogas de abuso e o desenvolvimento de novas substâncias, houve um aumento com problemas de segurança e saúde pública, comércio ilegal de drogas e dependência química. Para as análises forenses os métodos analíticos de identificação, caracterização e quantificação auxiliaram profissionais e pesquisadores na resolução desses problemas.²

Através dos métodos analíticos é possível afirmar quimicamente a composição de uma substância e confirmar se existe ou não na amostra determinado analito, respaldando o julgamento de um indivíduo sob juízo com dados técnicos forenses consistentes, agilizando os processos desde a sua investigação até o seu fim.²

Na área forense os testes para identificação de drogas de abuso podem ser feitos através de análises preliminares e análises definitivas.²

Os testes preliminares são baseados em testes colorimétricos, como exemplo, o teste *Scott* modificado, para detecção de cocaína, em que são usados os reagentes tiocianato de cobalto, ácido acético, glicerina, ácido clorídrico e clorofórmio e a cor azul indica a presença da cocaína.³⁹

A análise química, para detecção de drogas de abuso é utilizada em vários segmentos, seja para verificar o uso de drogas em locais de trabalho, no esporte, para acompanhamento de usuários em tratamento e para a área forense.⁴⁰

Atualmente há várias técnicas para identificação das drogas de abuso como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *gas*

chromatography–mass spectrometry (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *liquid chromatography–mass spectrometry* (LC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, *liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry* (LC-QTOF MS)), a ressonância magnética nuclear (do inglês, *nuclear magnetic resonance* (NMR)) e a reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy* (ATR-FTIR)), FT-ICR além de testes.⁴¹

A detecção de drogas em cabelos pode ser feita por imunoenaios e GC-MS. Os imunoenaios são empregados como ferramenta de triagem para compostos como opiáceos, antes de uma análise confirmatória usando uma técnica hifenizada.

42

A Figura 8 mostra um resultado de uma pesquisa feita no banco de dados da *Web of Science*, quanto às publicações das técnicas mais usadas para análises de drogas de abuso, foram relacionadas na busca as palavras “*Drugs abuse and MS/MS*”; “*Drug abuse and RAMAN*”; “*Drugs abuse and NMR*”; “*Drugs abuse and GC*”; “*Drugs abuse and LC*”; “*Drugs abuse and IR*” dos últimos 5 anos (2019-2023).

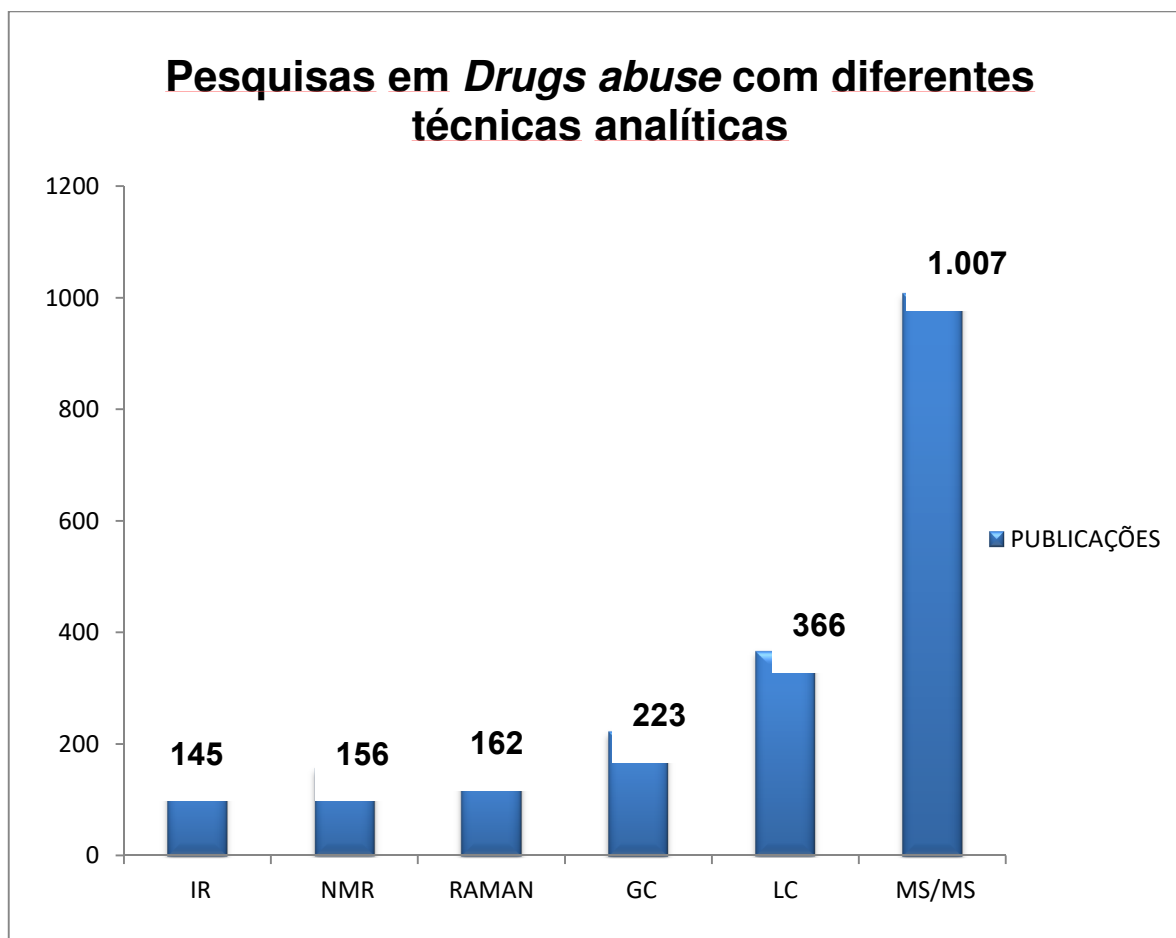


Figura 8. Gráfico que correlaciona número de publicações com *drugs abuse* e técnicas analíticas, nos últimos 5 anos.

Fonte: *Web of Science*.

1.5 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Os componentes são separados com base nas diferenças de velocidade em que são transportados através de uma fase fixa estacionária (FE) por uma fase móvel (FM) que pode ser líquida ou gasosa.^{43,44} As fases podem ser combinadas de diversas formas, o que gera diferentes métodos cromatográficos, como cromatografia líquido-sólido, líquido-líquido, gás-sólido e gás-líquido.⁴⁵

A utilização da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, em inglês, *Gas Chromatography- Mass Spectrometry- GC-MS*, consegue unir a separação, identificação e quantificação das espécies químicas da cromatografia e o alto poder de resolução, sensibilidade e seletividade na detecção de massa do espectrômetro.⁴³

GC-MS é utilizado em análises forenses em para identificação de compostos, como cocaína, canabinóides em matrizes biológicas como fio de cabelo.² Em 2016, Pego e colaboradores utilizaram GC-MS para determinação de cocaína e metabolitos em amostras de cabelo, com o método de micro extração em fase líquida.⁴⁶ Lachenmeier et al, em 2006, determinaram opiáceos e cocaína em cabelos utilizando ensaio imunoenzimático e confirmação por GC-MS.⁴⁷

Apesar de ser bastante utilizada para análises forenses tem como problema o aquecimento da amostra, logo não permite a determinação de canabinóides ácidos, por exemplo, devido à descarboxilação resultante na identificação de seus compostos neutros durante a análise.⁴³

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE ou do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC é um tipo de cromatografia líquida, que usa colunas de recheio na fase estacionária (FE) e solventes líquidos eluídos em alta pressão na fase móvel (FM).⁴⁵ Essa técnica analítica separar misturas com grande número de compostos, em diversas amostras, alta resolução, eficiência, consegue separar não-voláteis e termicamente instáveis, além de não aquecer a amostra durante a etapa de separação.^{40,45,48}

D'ávila e colaboradores, em 2016, utilizaram LC-MS para identificar biomarcadores de cocaína e *crack* em amostras de meconio (primeiras fezes de recém nascido) em bebês de mães que consumiram drogas nos dois últimos trimestres da gestação.⁴⁹

1.6 Espectrometria de massas

Os métodos espectrométricos são os mais utilizados para a identificação de drogas de abuso.⁵⁰ A espectrometria de massas é uma técnica analítica usada para estudo de massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas, para obtenção de um espectro de massa, as moléculas são ionizadas.⁴⁹

O espectrômetro de massas é constituído de uma fonte de ionização, que é responsável por gerar íons (cátions ou ânions), um analisador de massas, responsável por separar os íons e um detector, que produz uma corrente elétrica quando atingido pelos íons provenientes do analisador e um processador que converte o sinal elétrico em função da razão massa/carga (m/z) em dados, conforme ilustra a Figura 9.^{51,52}

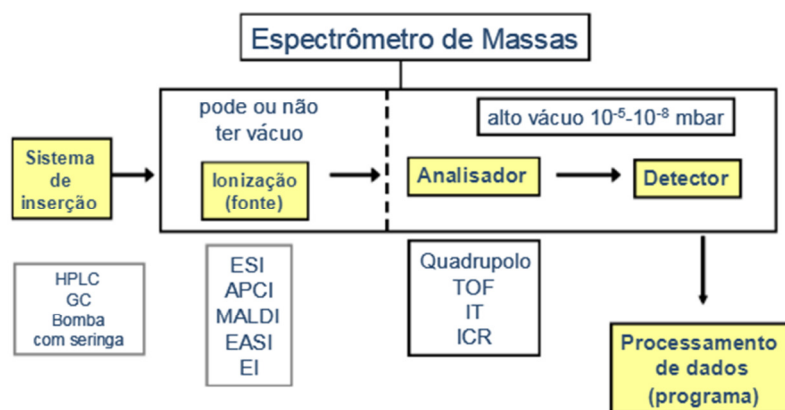


Figura 9. Esquema de um espectrômetro de massas.

Fonte: ROMÃO, 2010.⁵¹

O tipo da fonte de ionização e do analisador de massas vão determinar a aplicabilidade do MS, a fonte de ionização pode ter ou não vácuo, já o analisador e o detector são mantidos a vácuo, isso possibilitou a aplicação em diversos tipos de analitos.⁵¹

Em química forense o MS é bastante utilizado, por ser uma técnica qualitativa e quantitativa, ter alta sensibilidade, baixos limites de detecção, rápida, robusta, baixo consumo de amostra, devido à complexidade de amostras de drogas, o MS é muito eficiente na identificação de novos compostos.⁵³

Com o surgimento da espectrometria de massas, no início do século XX, e até anos 80, ela era voltada para o estudo de átomos e de moléculas pequenas, a fonte de ionização por elétrons (EI) era a principal técnica de ionização utilizada nesse período para estudo de moléculas orgânicas e biomoléculas. Mas essa fonte de ionização era restrita a moléculas voláteis e termicamente estáveis na temperatura da análise e devido ser muito energética, a ionização por elétrons causava fragmentação dos íons o que os deixava pouco intensos ou ausentes no espectro de massas.⁵⁴

Nos anos 60 e 70, surgiram novas técnicas como a ionização química (CI), a ionização/Dessorção a laser (LDI) e a ionização química à pressão atmosférica, em que possibilitaram obter espectros mais simples, com menor fragmentação de íons moleculares e uma maior diversidade de aplicações da espectrometria de massas. A fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês, *Electrospray Ionization*), surgiu por volta dos anos 80.⁵⁴

O DESI, do inglês, *desorption electrospray ionization*, ionização por dessorção por eletrospray, é uma técnica de ionização recente, com uso combinado com espectrômetro de massa e espectrometria de massa de imagem, ele permite o registro de espectros de amostras de fase condensada em condição ambiente, pode ser aplicado em amostras sólidas, materiais biológicos, líquidos, gases adsorvidos e soluções congeladas.⁵⁵

O método tem alta sensibilidade e consiste em pulverizar um solvente que entra no tubo capilar; lateralmente um jato de nitrogênio em alta pressão produz pequenas gotículas. Entre o início e o fim do nebulizador existe uma diferença de potencial que deixa as gotículas eletricamente carregadas, eletrospray. O feixe eletricamente carregado em alta velocidade incide sobre a amostra, o impacto dissolve o analito e libera íons gerados a partir dos componentes da amostra que são transportados através do ar à pressão atmosférica e atingem a interface do espectrômetro de massa onde são analisados.^{44,45}

A técnica DESI pode ser usada em análises forenses para detecção de explosivos, composição química de fármacos, drogas de abuso em fluidos biológicos, análise de metabolitos na respiração, verificação de documentos, impressões digitais, análise de compostos na pele.⁴⁴

Alguns estudos relatam a utilização da técnica DESI para detecção de drogas e metabólitos em matrizes biológicas como fios de cabelo, com o desenvolvimento de extração de ésteres de esteroides anabolizantes em cabelo bovino.^{46,47}

A fonte de ionização à vácuo *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) surgiu por volta da década de 80 por Karas e Hillenkamp. É uma fonte ampla e poderosa para a produção de íons em fase gasosa. O MALDI fornece tanto dessorção quanto ionização.⁵⁶

O MALDI ocorre em duas etapas. Primeiro, o composto a ser analisado é dissolvido em um solvente orgânico, a matriz, com absorção no comprimento de onda do laser, a mistura é seca antes da análise e colocado em uma placa geralmente de aço inox. O analito e a matriz formam uma solução. A segunda parte ocorre sob vácuo dentro da fonte do espectrômetro de massa, o laser pulsa sob a solução sólida com o aquecimento dos cristais e com acúmulo de grande quantidade de energia por meio da excitação das moléculas, o

aquecimento sublima os cristais da matriz e ocorre o processo de dessorção e expansão da matriz da fase sólida para gasosa, Figura 9.⁵⁶

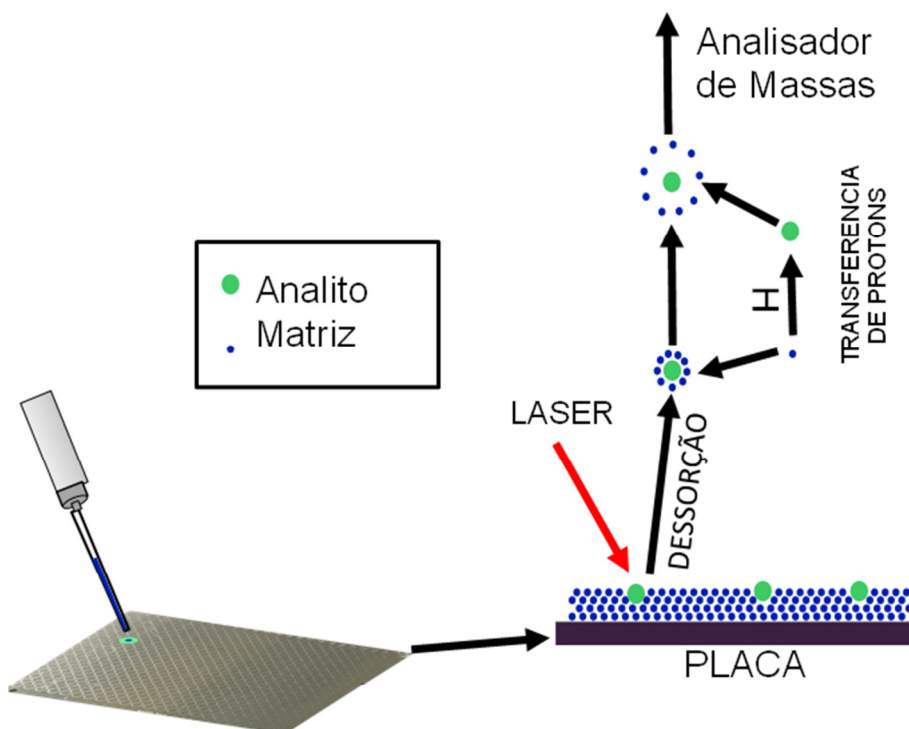


Figura 10. Etapas do MALDI.

Fonte: Próprio autor.

Os modelos de "Protonação em fase gasosa" e o "*Modelo Lucky Survivors*" explicam a formação de íons por MALDI (Figura 11), no primeiro, as moléculas da matriz e do analito são transferidas da fase sólida para gasosa e forma uma pluma sobre a superfície que incide o *laser*, nessa transferência de carga das moléculas da matriz e do analito dentro dessa pluma, podem gerar íons protonados e íons de adutos de metais alcalinos.⁵⁶ Já o modelo "*Lucky Survivors*", na etapa de co-cristalização o analito, que é incorporado na matriz, como espécie carregada, preserva o estado de carga que apresentava na solução. Na dessorção, uma parte desses íons é re-neutralizada pelos contra-íons presentes nos *clusters* formados por moléculas da matriz e são detectados apenas os que ficam neste processo.⁵⁶

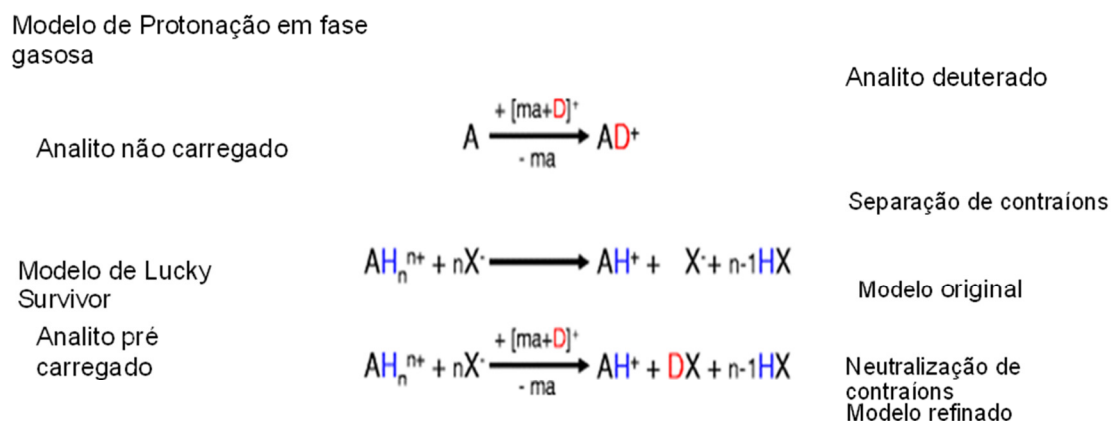


Figura 11. Mecanismos de ionização por MALDI
 Fonte: Adaptado de Karas, 2011⁵⁷

Em 2011, Jaskollas e Karas, comprovaram e verificaram experimentalmente essas duas vias de protonação do analito de MALDI (modelo de protonação em fase gasosa e Lucky Survivor) em que a geração de íons do analito deuterados prova o modelo de protonação em fase gasosa e a detecção de analitos protonados pela aplicação de matriz deuterada sem hidrogênio ácido prova a sobrevivência de analitos pré-carregados da solução do modelo de *Lucky Survivor*. Durante os experimentos eles detectaram vários parâmetros como afinidade dos prótons com a matriz e o analito, composição e tamanho do analito que podem afetar a protonação.⁵⁷

A escolha da matriz usada em MALDI vai depender do tipo de analito a ser identificado. As matrizes utilizadas em estudos forenses são CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico), DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzóico), SA (ácido sinápico), Ditranol, Umbeliferona, MBT (2-Mercaptobenzotiazol), NpCCA (Ácido (E) -2-ciano-3- (2-naftil) acrílico) CICC (ácido 4-cloro- α -cianocinâmico) e PNA (para-Nitroaniline)⁵⁰, Figura 12.

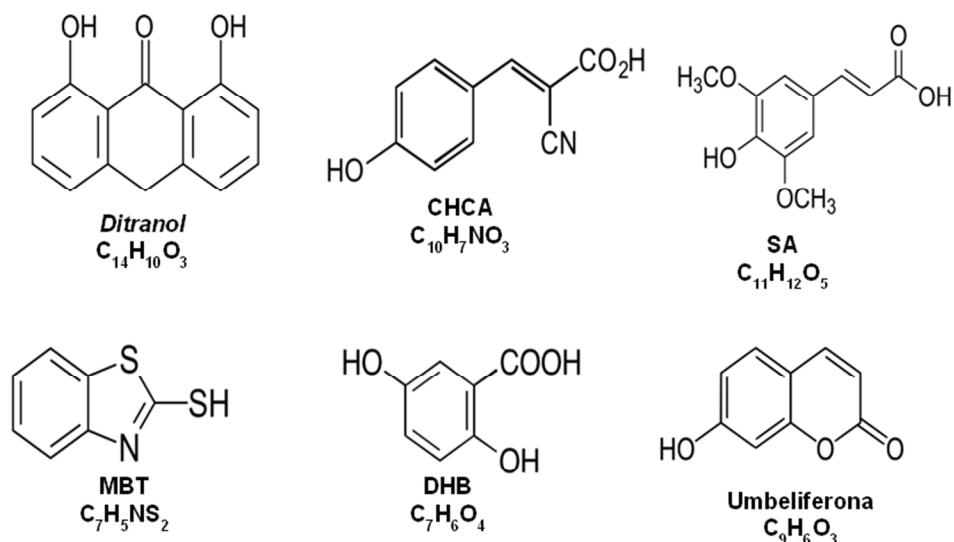


Figura 12. Algumas matrizes MALDI
Fonte: Próprio autor.

Na dessorção as matrizes de MALDI tem a função de absorver a energia do laser e transmitir uma parte da energia para as moléculas do analito e proteger contra a incidência direta do laser, para evitar a fragmentação das moléculas do analito.⁵⁶

O MALDI tem como vantagem a facilidade no preparo das amostras, por isso a utilização na identificação de drogas de abuso por meio do MALDI MS.⁵⁰

O MALDI é uma técnica de ionização pulsada que produz íons em feixes por um processo intermitente, essa natureza pulsada da fonte é adequada para analisadores do tipo tempo de voo, do inglês, *time off light*, TOF, podendo analisar íons de altas massas.⁴⁸

O TOF consiste na determinação da relação massa/carga através do tempo que os íons levam para se mover através de uma região livre entre a fonte e o detector, um tubo reto, comprido, no vácuo com uma fonte de íons de um lado e um detector no outro. Os íons ejetados pela fonte vão em direção ao detector de acordo com a massa, íons mais leves se deslocam mais rápido. Sua limitação é o poder de resolução, já que nem todos os íons terão a mesma velocidade ao sair da fonte. Para melhorar o poder de resolução há o TOF *Reflectron*, modo em que os íons passam por outra trajetória, um refletor especial, conjunto de anéis, os íons entram, sofrem desaceleração, param e são refletidos de volta e atingem uma nova região em frente ao detector. A

resolução do TOF fica entre 10.000 e 25.000 e exatidão de m/z 0,001.⁴⁹

A Bruker Daltonics, empresa do ramo de espectros de massa, produz vários instrumentos do TOF com fonte de ionização e dessorção MALDI, como MALDI-TOF, MALDI TOF/TOF e Q-TOF (quadrupolo por tempo de voo). São instrumentos que podem ser usados para análises forenses, sequenciamento de proteínas, mapeamento de biomoléculas em tecidos, identificação de microorganismos, com alto rendimento e velocidade para áreas de proteômica e estudos de imagens.⁵⁸ Na Figura 13 é possível visualizar diferentes tipos de TOF.



Figura 13. Analisadores do tipo TOF.
Fonte: Bruker⁵⁸

Na literatura existem vários artigos com utilização da fonte MALDI para uso em drogas de abuso com fonte MALDI, uma busca feita na *Web of Science* nos últimos 5 anos (2019-2023) foram encontradas 16 publicações quando relacionados à palavra *cocaine and MALDI*.

A espectrometria de massas de imagens (MSI) foi um avanço no desenvolvimento dos métodos de espectrometria de massas, é uma tecnologia analítica que consegue medir espécies moleculares, em amostras complexas e biológicas. Esse método une as vantagens da MS, como a alta sensibilidade, alto rendimento e especificidade molecular para produzir imagens.⁵⁰ A Tabela 2, mostra os principais analisadores de massas utilizados com a espectrometria

de massas de imagem.

Tabela 2. Comparação geral de analisadores de massa usados com MSI.
Fonte: PHILIPSEN,2011.⁵⁹

	TOF	SETOR MAGNÉTICO	ORBITRAP	FT-ICR
Íons primários	Pulsado	Contínuo	Pulsado	Pulsado
Limite de massa	10.000	20.000	50.000	30.000
Resolução em massa	15.000	<100.000	>100.000	1.000.00
Precisão em massa	<5 ppm	<3 ppm	<5 ppm	<1 ppm
Vantagens	Precisão rápida	Alta precisão e resolução	Alta precisão e resolução	Alta precisão e resolução
Desvantagens	Massa média resolução	Caro	Caro	Caro

O MALDI MSI é uma ótima ferramenta para análises forenses e toxicológicas, pois consegue detectar drogas de abuso em cabelos intactos, a vantagem em usar fios de cabelo é que ele fornece informações cronológicas sobre ingestão de drogas e exposição a produtos químicos.⁶⁰

O MALDI MSI tem vantagens em relação a outros métodos, a metodologia atual para análises de cabelos envolve técnicas complexas e demoradas de homogeneização, derivatização, limpeza da amostra e extração seguidas por cromatografia gasosa ou líquida acoplada a espectrometria de massas, além de utilizar grandes quantidades de cabelo,⁶⁰ conforme Tabela 3.

Tabela 3. Comparação de análises de cabelo usando LC, CG/MS e MSI.
Fonte: Adaptado de UEKI et al., 2022.¹¹

PROPRIEDADES	LC, GC/MS	MSI
Aquisição tempo curto	Parcialmente possível	Possível
Pré-processamento	Complicado	Simple
Dias necessários	3	½
Fios de cabelo	100-300	1

Porta *et al*, observaram a distribuição da cocaína e seus metabólitos em amostras de cabelo de usuários. As amostras foram lavadas com água, acetona e hexano, secas em temperatura ambiente e colocadas em placa MALDI e pulverizada com a matriz de CHCA, as imagens foram realizadas usando uma armadilha de íons linear quadruplo triplo em MALDI com laser de alta taxa de repetição, na Figura 14-a, é possível observar a imagem ótica do fio de cabelo, Figura 14-b 5 réplicas de uma amostra de cabelo e Figura 13-c - análise de um fio intacto e as concentrações de cocaína ao longo do fio.⁶¹

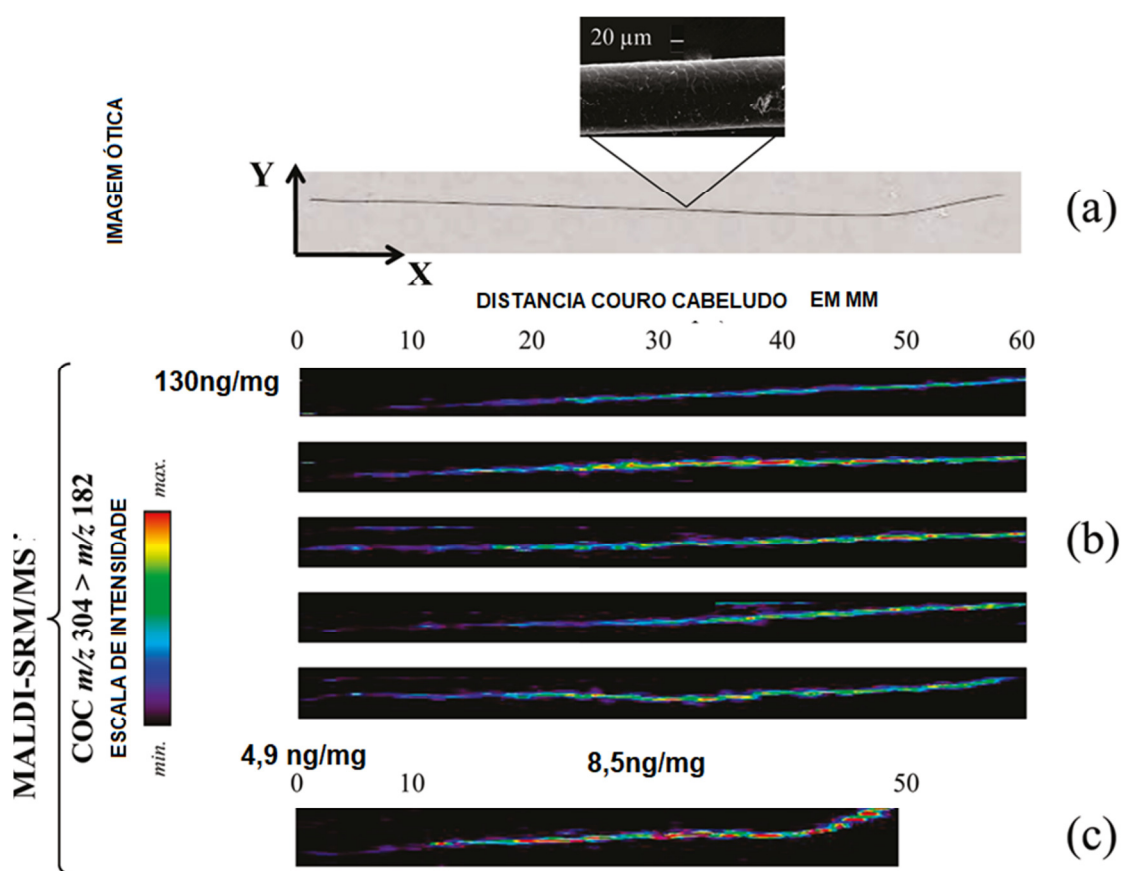


Figura 14. Imagem de cocaína ao longo de amostras de cabelo. **a)**-Imagem ótica de fio de cabelo, **b)**Imagens de 5 réplicas de um fio de cabelo **c)**Análise de um fio e concentração ao longo do fio. Fonte: Adaptado de PORTA *et al.*, 2011⁶¹

Cuypers *et al* investigaram o MSI para observar as mudanças em cabelos com cocaína e em soluções de peróxido de hidrogênio, concluíram que a detecção da cocaína é diminuída com a presença de peróxido de hidrogênio, já que ele destrói a ligação da cocaína com melanina e relataram que para

analisar cocaína é necessário levar em consideração os danos que houveram no cabelo e se ele foi previamente descolorido.⁶²

As concentrações de cocaína normalmente encontradas em cabelos são de 0,5 a 216 ng/mg com utilização de matriz CHCA. A matriz CHCA é a mais utilizada devido sua versatilidade e sensibilidade para ionização.⁶¹ A Tabela 4 mostra alguns artigos e drogas de abuso detectadas em fios de cabelo com a fonte MALDI.

Tabela 4. Drogas de abuso detectadas em fios de cabelo por MSI.
Fonte: Adaptado de FRANCESE,2019.⁶⁷

Ano	Composto	Matriz MALDI	Analizador	Limite de detecção	Referências
2009	Cocaína e metabolitos	CHCA+grafite	MALDI MSI	Não detectado	[63]
2010	Cocaína	CHCA+grafite	MALDI MSI	0,1 ng/mg	[64]
2011	Cocaína e metabolitos	CHCA	MALDI IMS	5ng/mg	[61]
2011	Metanfetamina	CHCA	MALDI-FT-ICR MSI	Não detectado	[65]
2015	Cocaína	CHCA	MALDI MS/MS MetA-SIMS	Não detectado	[11]
2016	9 tetrahydrocannabinol	FMPTS+CHCA	MALDI	Não detectado	[66]
2017	Metanfetamina	Umbeliferona	MALDI-FT-ICR MSI	Não detectado	[67]
2017	Cocaína e metabolitos	CHCA	MALDI MSI	Não detectado	[68]
2018	Canabinoide sintético	CHCA	MALDI MSI	69 pg/mg	[69]

A utilização de MALDI-MS para análise de cabelos tem crescido nos últimos anos, pois é possível a utilização de um único fio de cabelo para análise, preparação de amostra, fácil, rápida e barata, visualização direta do contaminante em cortes longitudinais. As desvantagens do método incluem alto custo, preparos e análises precisam ser validados e padronizados.⁶⁹

De modo geral, a análise forense de drogas de abuso em cabelos tem

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver um método MALDI-TOF MS para análise rápida de fios de cabelo de usuários de drogas, onde a etapa de preparo da amostra foi otimizada.

2.2 Especifico

- Avaliar a melhor matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzóico) na concentração de 7 mg.mL^{-1}
- Avaliar o efeito da matriz CHCA com a cocaína e seus metabolitos.
- Verificar a influência do tratamento químico na detecção da cocaína em fios de cabelo.

3. METODOLOGIA

3.1 Materiais e métodos

Foram utilizadas onze amostras de cabelo, com segmentos de 2 cm, sendo dez amostras de cabelo de usuários de drogas, fornecidas pelo Laboratório Contraprova - Análises, Ensino e Pesquisa LTDA, e uma de um doador sem histórico de uso de drogas, para posterior *dopping*. Os fios foram fixados na placa MALDI com auxílio de fita dupla face e a deposição da matriz foi realizada com pipeta. O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa com número CAAE 65316722.3.0000.5542 para utilização em pesquisas com cabelos humanos. Além disso, o grupo de pesquisa possui acordo de cooperação técnica com a Polícia Civil do Espírito Santo, processo nº 23068.022157/2020-69.

Os reagentes e solventes utilizados foram: metanol, etanol e acetonitrila, adquiridos pela Vetec® Química Fina Ltda, (Rio de Janeiro, Brasil), diclorometano (J.T.Baker, Carnaxide, Portugal), hexano (Merck, Darmstadt, Alemanha), acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido clorídrico (*Applied Biosystems, Massachusetts, EUA*). Todos com grau de pureza analítica superior a 99,5%. Os padrões analíticos como cocaína, COC, (1 mg.mL⁻¹), benzoilecgonina d3, BZE-d3, (100µg.mL⁻¹) e éster metílico de ecgonina, EME, (100 µg.mL⁻¹), Tabela 5, foram adquiridos pela Cerilliant, *Round Rock, TX, EUA*.

Tabela 5. Padrões analíticos com sua fórmula e peso molecular (Mw).

Padrão analítico	Fórmula Molecular	M _w (Da)
Cocaína (COC)	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,1470
Benzoilecgonina D3 (BZE-d3)	C ₁₆ D ₃ H ₁₉ NO ₄	292,1314
Ecgonina metil ester (EME)	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	199,1208

A matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) foram adquiridas à *Sigma-Aldrich Chemicals, Oakville, Ontário, EUA*. Primeiramente foi utilizado o CHCA e DHB na concentração de 7

mg.mL⁻¹ no padrão de cocaína na concentração de 1 mg.mL⁻¹ para verificar qual melhor matriz e depois a matriz CHCA nas concentrações de 1,5; 3 e 10 mg.mL⁻¹ para avaliar a melhor eficiência de ionização e detecção dos padrões, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação de matrizes CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico) em padrões analíticos.

Número de repetições	Amostra	Volume	Matriz				
			CHCA 7 mg.m L ⁻¹	DHB 7 mg.mL ⁻¹	CHCA 1,5 mg.mL ⁻¹	CHCA 3 mg.mL ⁻¹	CHCA 10 mg.mL ⁻¹
5	Cocaína (COC) 1 mg.mL ⁻¹	1 μ L	X	X	X	X	X
5	Benzoilecgonina (BZE) d3 100 μ g.mL ⁻¹	1 μ L	X	X	X	X	X
5	Ecgonina metil éster (EME) 100 μ g.mL ⁻¹	1 μ L	X	X	X	X	X

15 Total de análises

X: avaliado

A escolha das duas matrizes foi baseada na literatura ¹³, onde 2 μ L da solução da matriz foram depositados em amostras de fios de cabelo com micropipeta.

3.2 Preparo de amostra

Para limpeza da placa MALDI foram utilizados os solventes etanol, água destilada, acetonitrila e ácido clorídrico 0,1 mol/L. Na primeira etapa de lavagem foram utilizados 50 mL de etanol, 50 mL de água destilada e novamente 50 mL de etanol. Na segunda etapa, realizada por ultrassom, a placa foi colocada em um béquer com 500 mL de água destilada por 10 minutos e depois em uma solução com 200 mL de etanol, 200 mL de água destilada e 100 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L. A placa foi imersa no béquer e permaneceu em ultrassom por 10 minutos e na terceira etapa banho com 50 mL de acetonitrila, conforme Figura 16.

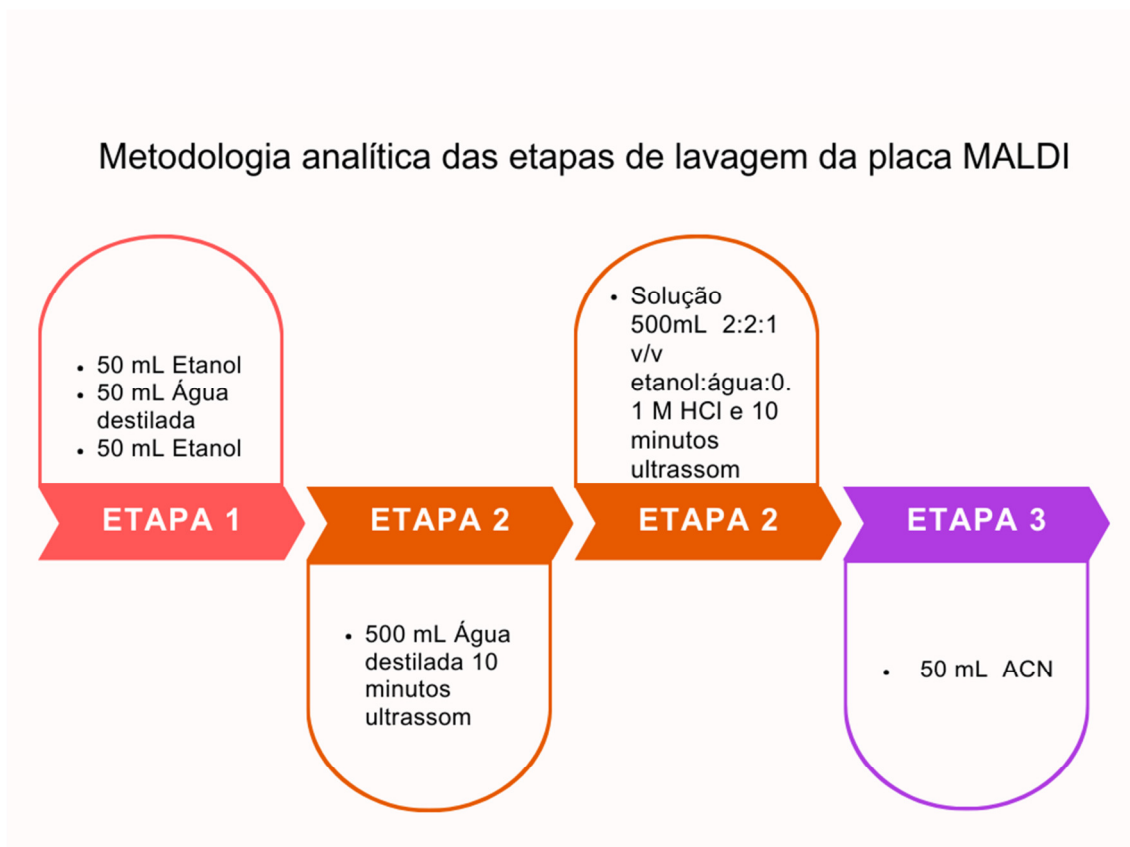


Figura 16. Metodologia analítica das etapas de lavagem da placa MALDI: primeiro conjunto: lavagem com etanol, água destilada e etanol; segunda etapa: sonicação por 20 min (10 min em água destilada e 10 min em etanol:água:0,1 M HCl 2:2:1 v/v); e terceiro passo lavagem com ACN.

O preparo da amostra foi dividido em duas partes: I) aplicação do padrão analítico COC ($1\mu\text{L}$ de concentração de 1 mg mL^{-1}), coberto pelas matrizes DHB e CHCA separadamente na placa MALDI ($2\mu\text{L}$ de concentração de 7 mg mL^{-1} cada). (Figura 17-a). A seguir, foram avaliadas quatro concentrações da matriz CHCA (de 1 a 10 mg mL^{-1}). II) Uma vez determinadas a melhor matriz e concentração, os cabelos de suspeitos de usar drogas foram colados à placa com fita dupla-face e rotulados em letras das amostras A a K. Um esquema de preparação da amostra é mostrado na Figura 17-b.

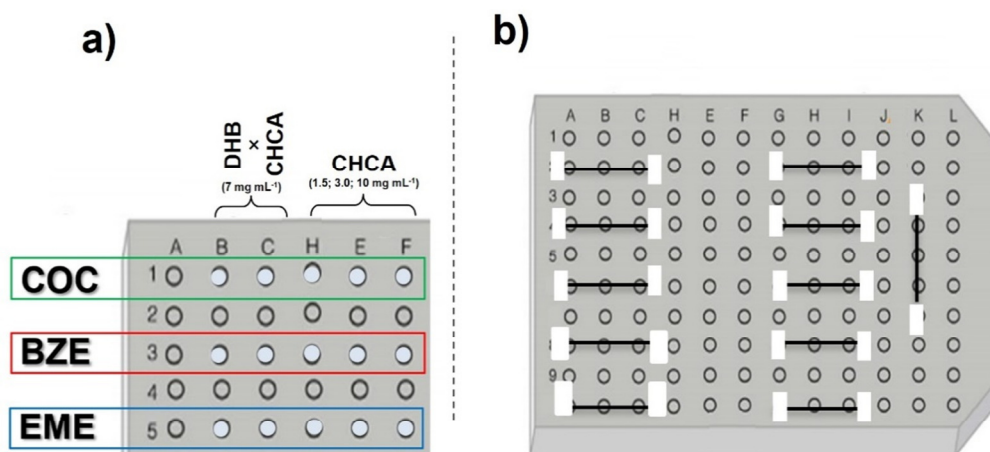


Figura 17. Esquema ilustrativo de preparação de amostras por MALDI-MS: (a) análises de padrões analíticos forenses em função da concentração de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) 1 a 10 mg.mL⁻¹ e 7 mg.mL⁻¹ DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzóico); e (b) disposição dos cabelos.

Inicialmente, duas amostras positivas para cocaína (denominadas amostras A e B) contendo três fios de cada cabelo foram utilizadas para avaliar a ionização dos analitos com e sem a etapa de lavagem. Para a etapa de lavagem foram utilizados 20 mL de cada um dos seguintes solventes: água destilada, diclorometano, acetona e hexano. Após determinar a eficiência do método de preparo da amostra sem ou com etapa de lavagem, as demais amostras 4 a 11, denominadas amostras D a J, foram analisadas utilizando 2 μ L de matriz CHCA 1,5 mg mL⁻¹.

3.3 MALDI-TOF MS

As análises MALDI-TOF MS foram realizadas utilizando um instrumento Bruker Ultraflex II (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemanha), operando em modo de íon positivo refletor com uma faixa espectral de m/z 150 a 1000. As condições de extração de íons pulsados foram as seguintes: IS1: 19,08kV; IS2: 17,03kV; e refletor: 20,361 kV. A calibração de massa externa foi realizada com base em íons $[M+H]^+$ e $[2M+H]^+$ de m/z 190,04 e 379,09 (para CHCA) e m/z 155,02 e 309,02 (para DHB). Os dados obtidos foram analisados através do software *DataAnalysis Daltonics*, EUA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação da eficiência de ionização das matrizes DHB e CHCA

Inicialmente, o padrão COC na concentração de 1 mg mL^{-1} foi analisado com as matrizes DHB e CHCA, ambas na concentração de 7 mg mL^{-1} , para avaliar o melhor processo de ionização do analito de interesse do MALDI. Nesta análise, Figura 18, a cocaína foi detectada na forma protonada, $[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4+\text{H}]^+$, m/z 304,0817 (CHCA) e m/z 304,1622 (DHB), e apesar da semelhança na eficiência das matrizes, quando avaliando os valores de TIC da cocaína em cada espectro de massa, que foi TIC 2×10^3 para ambos, a matriz CHCA foi escolhida para prosseguir com as análises porque sua menor afinidade de prótons (PA) e pKa; CHCA (PA = 183 kcal/mol e pKa = $\sim 1,2$) em comparação com DHB (PA = 204 kcal/mol e pKa = $\sim 3,0$).^{70,71}

Segundo a teoria ácido-base de Brønsted-Lowry, dentre as matrizes (moléculas de ácido) avaliadas, a matriz CHCA é o ácido mais forte e, portanto, auxiliará no processo de ionização dos analitos, pois para que ocorra a transferência de prótons, em geral, o PA do receptor deve ser maior que o do doador^{56,70-73} o que na cocaína (alcalóide tropano), é evidenciado pela presença da ligação amina com sua alta afinidade que potencializa o formação da molécula protonada por transferência de prótons da matriz CHCA. Esta matriz, sendo um ácido de Brønsted-Lowry, pKa = $\sim 1,2$, além da sua utilidade na recepção e redistribuição da energia do laser focada na amostra, permite também a maior disponibilidade de hidrogênio, facilitando assim, a protonação do analito no modo de ionização positiva, MALDI(+).

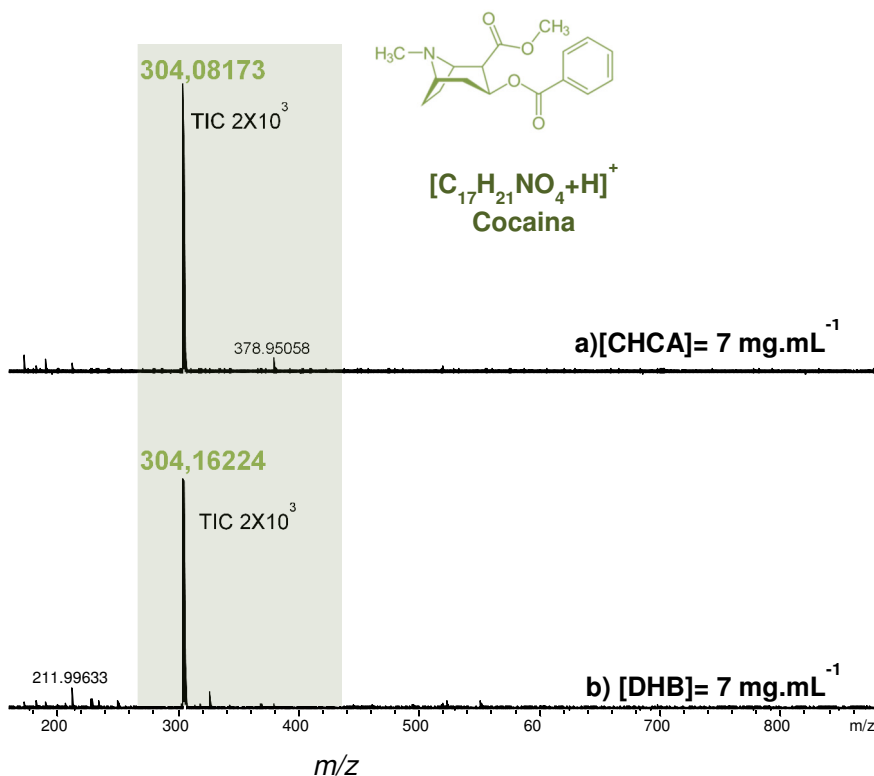


Figura 18. Espectros MALDI(+)-TOF MS do padrão de cocaína (1 mg mL⁻¹) com as matrizes MALDI: a) CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) e b) DHB (ácido 2,5-dihidroibenzóico), ambas na concentração de 7 mg mL⁻¹.

Sequencialmente, quatro concentrações da matriz CHCA (1,5; 3,0; 7,0 e 10 mg mL⁻¹) foram investigadas para escolher a melhor concentração de trabalho para ionização do padrão COC (1 mg mL⁻¹); BZE (100 μ g.mL⁻¹) e ECG (100 μ g.mL⁻¹). É possível observar nos espectros de massa adquiridos, Figura 19, a eficiência de ionização da molécula COC em todas as concentrações da matriz CHCA testada, porém, menor ionização dos padrões BZE e EME, possivelmente ocorreu devido às baixas concentrações destes padrões (100 μ g mL⁻¹).

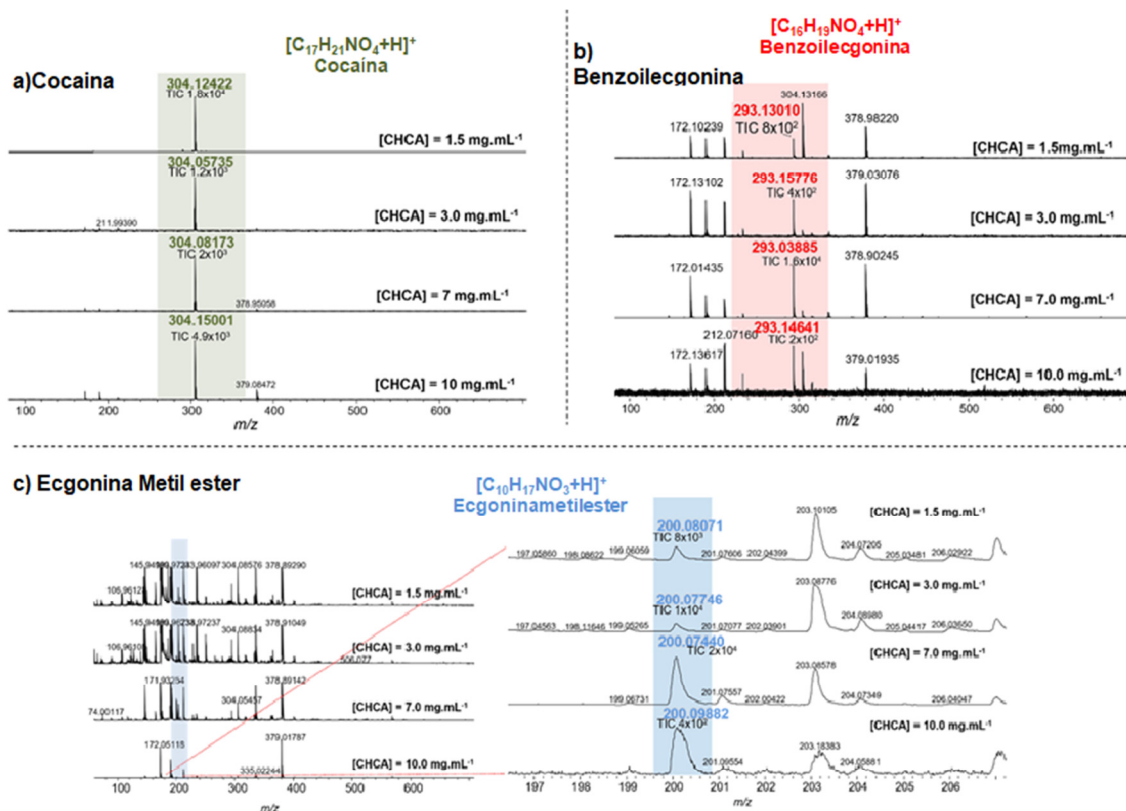


Figura 19. Espectros de massa MALDI(+)-TOF de **a)** COC (1 mg mL⁻¹) **b)** BZE-d3 (100 µg mL⁻¹) e **c)** EME (100 µg mL⁻¹) com matriz CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) de 1,5; 3,0; 7,0 a 10 mg mL⁻¹.

Apesar disso, é possível inferir que todas as concentrações testadas de CHCA (1,5, 3,0, 7,0 e 10 mg mL⁻¹) poderiam ser utilizadas para a detecção de pelo menos um composto alvo monitorado, destacando-se as concentrações da matriz a 1,5 e 7,0 mg mL⁻¹, que apresentou maior sensibilidade e eficiência para detecção dos três analitos monitorados (COC, BZE e EME), pois apresentaram maiores valores de TIC em comparação às concentrações de 3,0 e 10 mg mL⁻¹, com ênfase na concentração de 7,0 mg mL⁻¹ na ionização de moléculas de BZE e EME, e 1,5 mg mL⁻¹ da matriz CHCA para ionização da molécula COC.

Para facilitar a compreensão deste resultado, a Tabela 7 mostra os dados dos espectros de massa MALDI(+) adquiridos, onde é destacada a menor concentração da matriz CHCA testada (por exemplo, 1,5 mg mL⁻¹), comprovando a maior sensibilidade e eficiência na ionização do analito COC, com valor de TIC_(CHCA = 1,5 mg/mL) = 1,8x10⁴, enquanto as demais concentrações da matriz resultaram na detecção desta molécula com TIC na faixa de 10³.

Portanto, o CHCA $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ foi escolhido para prosseguir com o desenvolvimento do método de análise toxicológica de cabelos por MALDI(+)-TOF MS.

Tabela 7. MALDI(+) TOF MS do padrão COC a 1 mg mL^{-1} em I com matriz CHCA de $1,5$ a 10 mg mL^{-1} .

CHCA concentração de matriz	Molécula	Formula Molecular	<i>m/z</i> experimental	TIC	I.R (%)
1,5 mg mL⁻¹	COC (1mg mL ⁻¹)	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,1242	1,8X10 ⁴	100
	EME (100µg mL ⁻¹)	[C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ +H] ⁺	200,0807	8X10 ³	16,5
	BZEd3 (100µg mL ⁻¹)	[C ₁₆ D ₃ H ₁₆ NO ₄ +H] ⁺	293,1301	8x10 ²	36,7
3,0 mg mL⁻¹	COC (1mg mL ⁻¹)	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,0573	1,2X10 ³	100
	EME (100µg mL ⁻¹)	[C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ +H] ⁺	200,0774	1X10 ⁴	20,5
	BZEd3 (100µg mL ⁻¹)	[C ₁₆ D ₃ H ₁₆ NO ₄ +H] ⁺	293,1577	4x10 ²	71
7 mg mL⁻¹	COC (1mg mL ⁻¹)	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,0817	2X10 ³	100
	EME (100µg mL ⁻¹)	[C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ +H] ⁺	200,0744	2X10 ⁴	54,4
	BZEd3 (100µg mL ⁻¹)	[C ₁₆ D ₃ H ₁₆ NO ₄ +H] ⁺	293,0388	1,6X10 ⁴	98
10 mg mL⁻¹	COC (1mg mL ⁻¹)	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,1500	4,9X10 ³	100
	EME (100 µg mL ⁻¹)	[C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ +H] ⁺	200,0988	4x10 ²	1.1
	BZEd3 (100µg mL ⁻¹)	-	-	-	-

“-“ Não detectado; CHCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico ; COC: cocaína EME: Ecgonina metil ester; BZE d3: Benzoilecgonina d3; I.R: intensidade relativa; TIC: corrente total de íons

4.2 Estudo do efeito da lavagem (pré-análise) dos fios de cabelo

Não há consenso sobre um protocolo de lavagem específico para descontaminação dos cabelos em etapas anteriores à análise toxicológica.⁷⁴ No entanto, as Diretrizes da *Society of Hair Testing* (SoHT) para testes de drogas no cabelo recomendam etapas de lavagem com produtos orgânicos (solventes) e soluções aquosas.⁷⁵ Assim, neste estudo foram analisados os cabelos de dois indivíduos sem etapas de lavagem (análise direta e sem preparo) e também submetidos às etapas de lavagem com diclorometano; e água:acetona:hexano, separadamente para verificar se há ou não influência significativa da lavagem na etapa de pré-análise.

Foram analisados três fios de cabelo de dois indivíduos, denominados indivíduos “A” e “B”, figuras 20a-b, e a partir dos espectros de massa adquiridos, observou-se no cabelo “A” a detecção exclusivamente de íons

protonados de COC, $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$, m/z 304, com menor valor de TIC quando lavado com água/acetona/hexano, $TIC = 1,5 \times 10^3$, e maior valor de TIC com lavagem com diclorometano, $TIC = 7 \times 10^3$, Tabela 8. A análise sem lavagem mostrou um valor intermediário de TIC 2×10^3 (sem lavagem). Embora os fios pertençam ao mesmo indivíduo, entende-se que a biodisponibilidade dos compostos pode variar, porém, é perceptível a baixa variação na sensibilidade da técnica com e sem a etapa de lavagem dos fios.

Na análise do cabelo “B”, além da detecção de COC, também foram detectados os compostos BZE, ECG, EME e Lidocaína como moléculas protonadas, $[M+H]^+$ (COC, BZE, ECG, EME, e lidocaína) e com aduto de sódio, $[M+Na]^+$ (EME e BZE), Tabela 8. Maiores valores de TIC foram observados quando se utilizou lavagem com água:acetona:hexano, por exemplo, na detecção de COC, $TICs = 1 \times 10^4$ (água :acetona:hexano), 8×10^3 (DCM) e 3×10^3 (sem lavagem). Esses resultados, e os demais valores observados nesta etapa da análise, mostram a variação mínima na sensibilidade da técnica MALDI MS com e sem a etapa de lavagem. Além disso, embora a lavagem com água:acetona:hexano tenha permitido a detecção de mais analitos (seis) do que as análises com lavagem com DCM (três analitos) e sem lavagem (três analitos), os três métodos resultaram na detecção de analitos semelhantes. Portanto, para prosseguir com as análises, a sequência foi padronizada sem etapa prévia de lavagem, ampliando a etapa de pré-análise e otimizando assim o tempo de todo o processo.

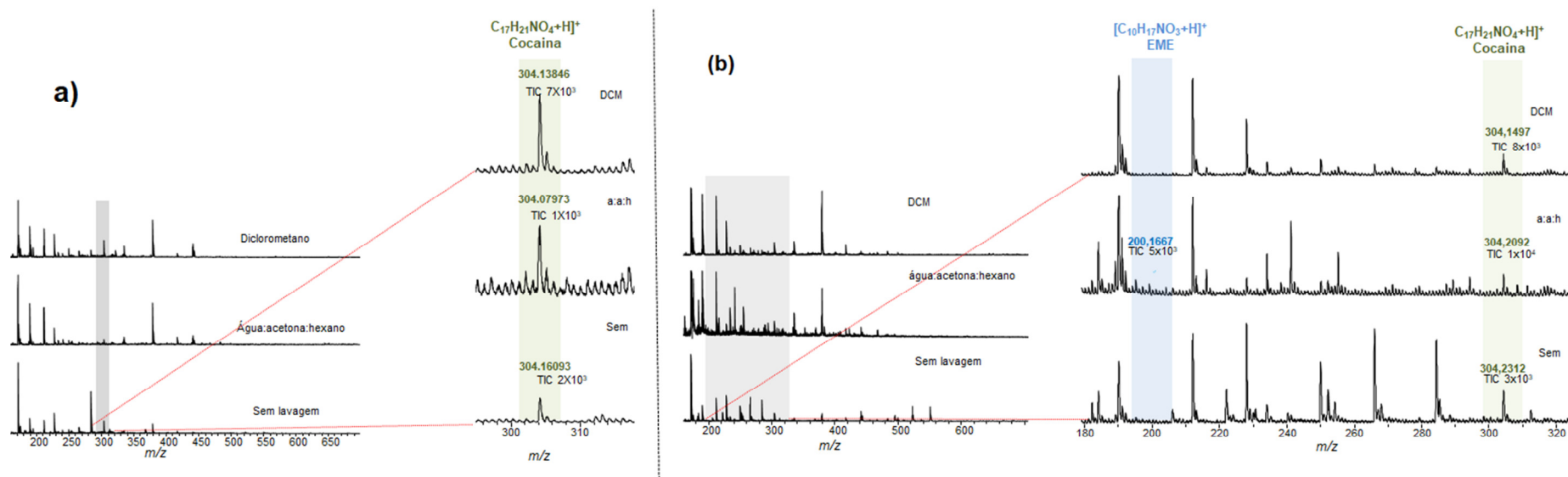


Figura 20. Espectros das amostras a) “A” e b) “B” com matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) $1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ com dois métodos de lavagem (diclorometano e água:acetona:hexano) e sem lavagem

Tabela 8. Amostras “A” e “B” com matriz CHCA 1,5 mg.mL⁻¹ com moléculas detectadas no espectro de massa MALDI(+) e suas respectivas lavagens.

Individuo	Molécula	Formula Molecular	m/z	TIC	I.R (%)	Lavagem
“A”	COC	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,1385	7X10 ³	31,5	diclorometano
	COC isóbaro	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,0797	1,5x10 ³	8,48	Água:acetona:hexano
	COC	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,1609	2x10 ³	18,2	Sem lavagem
“B”	COC	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,1497	8x10 ³	20	diclorometano
	BZE	[C ₁₆ H ₁₉ NO ₄ +H] ⁺	290,1799	1x10 ³	3,6	
		[C ₁₆ H ₁₉ NO ₄ +Na] ⁺	312,2086	1x10 ³	3,3	
	Lidocaina	[C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O+H] ⁺	235,1687	1x10 ³	3,7	
	Benzocaina	[C ₉ H ₁₁ NO ₂ +H] ⁺	166,0867	4x10 ³	8,9	Água:acetona:hexano
	ECG	[C ₉ H ₁₅ NO ₃ +H] ⁺	186,1724	6x10 ³	12,6	
	EME	[C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ +H] ⁺	200,1667	5x10 ³	10,6	
		[C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ +Na] ⁺	222,1852	5x10 ³	11	
	Lidocaina	[C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O+H] ⁺	235,1163	6x10 ³	12,2	
	BZE	[C ₁₆ H ₁₉ NO ₄ +H] ⁺	290,2083	6x10 ³	12,3	
	COC	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,2092	1x10 ⁴	25,5	
	EME	[C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ +Na] ⁺	222,0689	3x10 ³	13,5	Sem lavagem
	COC	[C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +H] ⁺	304,2312	3x10 ³	13	
BZE	[C ₁₆ H ₁₉ NO ₄ +Na] ⁺	312,3490	1x10 ³	5,4		

CHCA: Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico ; COC: cocaína EME: Ecgonina metil ester; BZE d3: Benzoilecgonina d3; I.R: intensidade relativa; TIC: corrente total de íons

4.3 Avaliações de amostras de fios de cabelo de indivíduos suspeitos de serem usuários de drogas

Após avaliar a eficiência da matriz MALDI e sua melhor concentração, e determinar a análise sem a etapa de lavagem, dez amostras de cabelos de indivíduos suspeitos de usuários de drogas de abuso foram analisadas pelo MALDI(+)TOF MS, sem etapa de lavagem, e com a adição da matriz CHCA, na concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Destaque que o modo de análise positivo foi escolhido porque favorece a ionização de compostos polares, como a molécula COC e seus principais metabólitos.⁷⁰

As análises por MALDI(+)TOF MS permitiram a detecção de COC ou COC e BZE em nove das dez amostras de cabelo, Figura 21a-j. Além disso, COC e BZE são marcadores, entre outros possíveis marcadores existentes conhecidos, que auxiliam na identificação de usuários de cocaína em testes toxicológicos.⁷² Principalmente quanto à detecção da molécula COC, sinal predominante em nove das dez amostras analisadas, os maiores valores de TIC foram observados para as amostras “D” e “E”, com TICs = 2×10^4 e 1×10^4 , respectivamente. O menor valor de TIC foi observado para a amostra “H” com TIC = 6×10^2 .

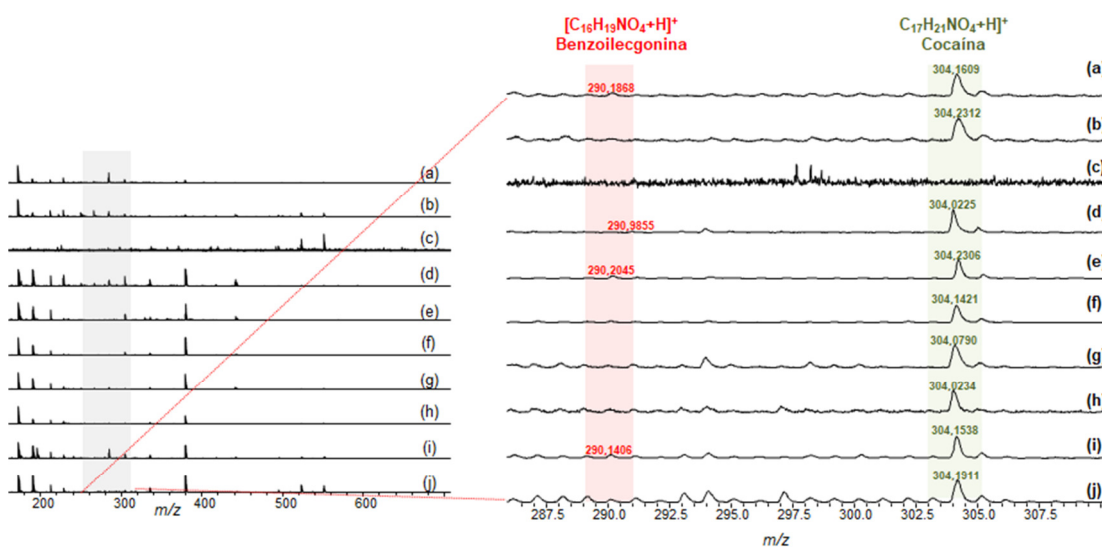


Figura 21(a-j). Espectros com 10 amostras de fios de cabelo com matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ sem lavagem com faixa de expansão espectral (m/z 287 a 307) para visualização de moléculas de BZE e COC.

Os resultados obtidos pelo MALDI(+)-TOF MS foram comparados com análises da técnica clássica para estudos toxicológicos em cabelos; GC-MS. As análises quantitativas alvo de GC-MS mostraram valores de concentração de cocaína, detectados em oito das dez amostras analisadas, variando de 1,1 ng/mg (amostra “I”, valor mais baixo) a 4,1 ng/mg (amostra “E”, valor mais alto). A Figura 23 exemplifica o cromatograma obtido na análise da amostra “E” nas transições m/z 182-82 (Figura 22a) e seu espectro de massa correspondente (Figura 22b), e o cromatograma na transição m/z 303-82 (Figura 22c) e seu espectro de massa correspondente (Figura 22d).

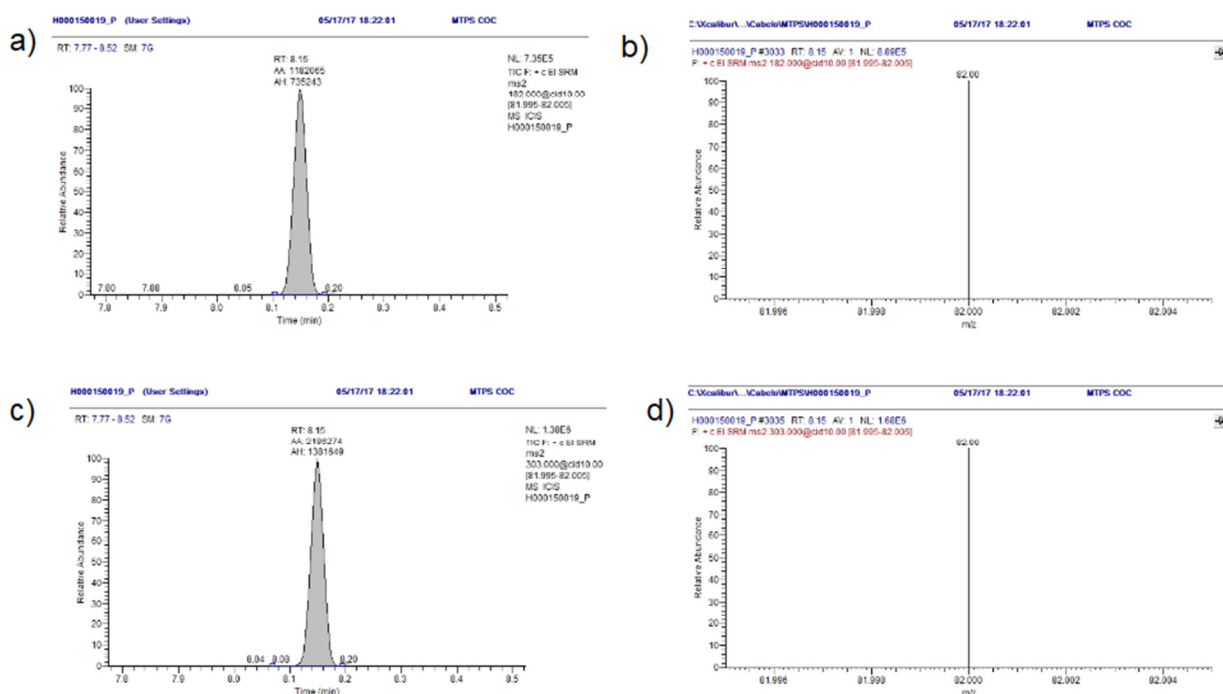


Figura 22. Cromatograma de GC-MS da amostra de cabelo “E” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “E” na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

De modo geral, foi observada relação em 70% das amostras com os mesmos sinais detectados pelas duas técnicas, MALDI(+) MS e GC-MS, Tabela 9. Por outro lado, os 30% que apresentaram divergência na resposta podem ser justificado pela possível variabilidade da biodisponibilidade dos analitos nos cabelos, por se tratarem de amostras reais, o que indica a necessidade de desenvolvimento de estudos com réplicas para confirmação do resultado.

Além disso, não foi observada relação linear entre as concentrações dos analitos quantificados pela técnica de GC-MS e os valores de TIC obtidos nas

análises MALDI(+)TOF MS. Porém, vale ressaltar que o cabelo que apresentou menor valor de concentração, por GC-MS, foi detectado pelo MALDI(+)TOF MS, evidenciando assim a sensibilidade e eficiência da técnica. Além disso, MALDI(+) possui menor tempo de análise, devido à exclusão da etapa de pré-análise (lavagem).

Tabela 9. Informações da fórmula molecular, m/z , IR, TIC das moléculas de interesse encontradas nas 10 amostras de fios de cabelo analisadas por MALDI(+)TOF MS e concentração de analitos detectados por GC-MS.

Amostra	Composto	MALDI(+) TOF MS				GC-MS
		Fórmula Molecular	m/z	TIC	I.R (%)	Concentração (ng/mg)
A	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,1609	2×10^3	18,2	-
	BZE	$[C_{16}H_{19}NO_4+H]^+$	290,1868	4×10^2	3,5	-
	THC	-	-	-	-	0,1
B	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,2312	3×10^3	13	3,5
	BZE	$[C_{16}H_{19}NO_4+Na]^+$	312,3490	1×10^3	5,4	-
	EME	$[C_{10}H_{17}NO_3+Na]^+$	222,0689	3×10^3	13,5	-
	COCE	-	-	-	-	0,2
C	COC	-	-	-	-	0,6
D	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,2842	2×10^4	57,3	1,4
	BZE	$[C_{16}H_{19}NO_4+H]^+$	290,9855	1×10^3	4	-
E	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,2306	1×10^4	33,6	4,1
	BZE	$[C_{16}H_{19}NO_4+H]^+$	290,2045	2×10^3	5,2	-
		$[C_{16}H_{19}NO_4+K]^+$	328,3233	7×10^3	15,6	-
F	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,1421	5×10^3	17,2	1,6
	COCE	-	-	-	-	0,05
G	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,0790	$1,6 \times 10^3$	3,75	0,6
H	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,0234	6×10^2	4,5	2,5
	COCE	-	-	-	-	0,1
I	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,1583	9×10^3	28,3	1,1
	BZE	$[C_{16}H_{19}NO_4+H]^+$	290,1406	1×10^3	5	-
		$[C_{16}H_{19}NO_4+Na]^+$	312,2742	1×10^3	5,4	-
	COCE	-	-	-	-	0,4
J	COC	$[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$	304,1911	6×10^3	12,4	-
	BZE	$[C_{16}H_{19}NO_4+Na]^+$	312,2841	3×10^3	6,5	-
	MDMA	-	-	-	-	3,6

“-“ Não detectado; COC: cocaína COCE: cocaetileno; EME: Ecgonina metil ester; BZE : Benzoilecgonina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; THC: tetrahydrocannabinol I.R: intensidade relativa; TIC: corrente total de íons

4.4 Efeito do tratamento químico (clareamento) nos cabelos

Por fim, a sensibilidade da detecção de cocaína foi verificada em cabelos com e sem tratamento de descoloração com peróxido de hidrogênio, que foi fortificado com solução de cocaína, 1mg mL^{-1} , e analisado por MALDI(+)-TOF MS, com matriz de CHCA na concentração de $1,5\text{ mg mL}^{-1}$. Este estudo foi realizado porque, segundo Cuypers et al. (2014), o processo de descoloração dos cabelos com água oxigenada pode influenciar e reduzir a detecção de cocaína nos fios, pois as ligações cocaína-melanina são quebradas, e a cocaína é parcialmente degradada neste processo .⁶²

A Figura 23a-b mostra os perfis espectrais distintos dos cabelos sem (Figura 23a) e com (Figura 23b) tratamento clareador. Porém, a partir da expansão espectral na região de m/z 250 a 350, região do analito de interesse, é possível observar que o COC protonado é o íon mais abundante $[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4+\text{H}]^+$, m/z 304,0623, IR 100%, TICcoc 1×10^4 , em cabelos naturais (sem tratamento descolorante), é o mesmo sinal, m/z 304,2197, IR 14,5, TICcoc 5×10^3 , em cabelos com tratamento prévio de clareamento com peróxido, Tabela 10. Esses dados estão de acordo com a literatura e mostram qualitativamente a maior abundância de COC em cabelos sem tratamento descolorante, ou seja, cabelos que não apresentam perda de melanina em sua composição, já que um dos principais fatores na incorporação de medicamentos aos cabelos é a afinidade pela melanina.^{62,76,77}

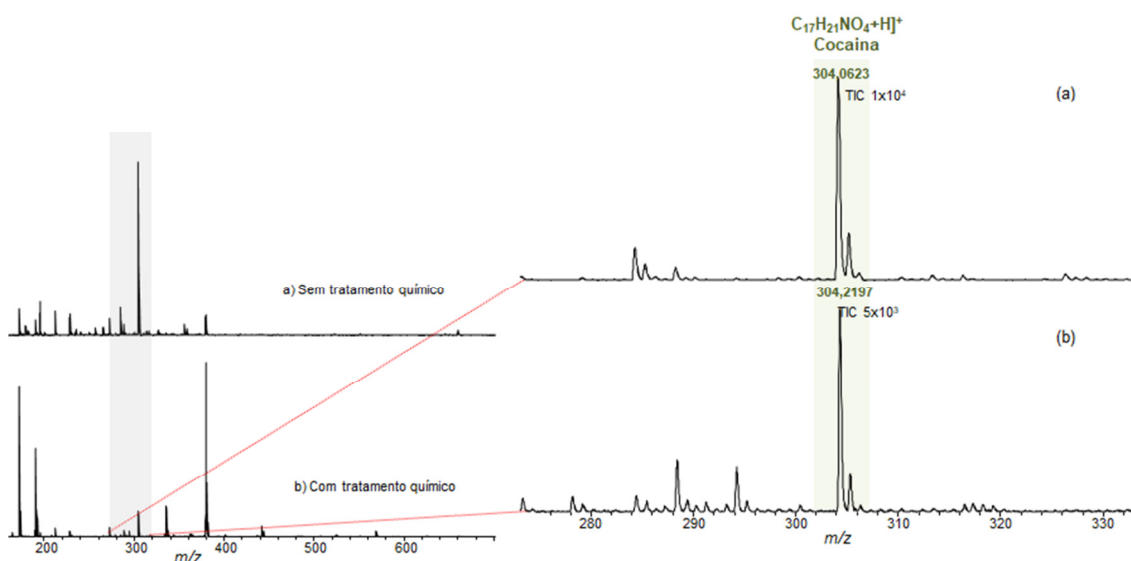


Figura 23. Amostra de cabelos dopados com 1mg mL^{-1} de COC em metanol para avaliação da eficiência de ionização com (a) cabelos sem tratamento químico e (b) cabelos com tratamento

químico em matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Tabela 10. Informações da fórmula molecular, m/z TIC e IR da molécula COC em amostras de cabelo com e sem tratamento químico.

Amostra	Molécula	Fórmula Molecular	m/z	TIC	I.R (%)
Sem tratamento químico	COC	$[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4+\text{H}]^+$	304,0623	1×10^4	100
Com tratamento químico	COC	$[\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_4+\text{H}]^+$	304,2197	5×10^3	14,5

COC: Cocaína; I.R: intensidade relativa; TIC: corrente total de íons

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a triagem dos fatores que influenciam a ionização da droga cocaína e seus metabólitos: BZE e EME em fios de cabelo foi realizada pela técnica MALDI(+)TOF MS. Além disso, a influência da lavagem com solvente e da análise direta (sem lavagem) foi testada na etapa de pré-análise e, devido à diferença mínima, foi padronizada a análise direta dos cabelos de usuários suspeitos pelo MALDI(+)TOF MS.

Os resultados obtidos nas análises do método proposto foram relacionados à técnica clássica de análise de cabelos de usuários suspeitos; GC-MS. O método quantitativo apresentou dados relativos a 70% das amostras analisadas, evidenciando a sensibilidade e precisão da técnica MALDI(+)TOF MS na análise de amostras reais de cabelos de usuários, incluindo baixas concentrações do analito monitorado (COC, 1,1 ng /mg).

Por fim, este estudo também investigou a influência do tratamento clareador capilar na incorporação do fármaco nos cabelos, o que evidenciou a baixa eficiência da incorporação do COC nos cabelos tratados quando comparados aos cabelos naturais. Todos esses resultados cooperativos afirmam a aplicabilidade da técnica MALDI(+)TOF MS para detecção eficiente de fármacos em cabelos, de forma rápida e direta, pois extingue as etapas de pré-análise (lavagem) e etapas de separação cromatográfica.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROMÃO, Wanderson et al. Química forense: perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. **Química Nova [online]**. 2011, v. 34, n. 10 [Acessado 30 Setembro 2021], pp. 1717-1728. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000005>>. Epub 06 Dez 2011. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000005>.
2. BRUNI, Aline Thais; VELHO, Jesus Antônio; OLIVEIRA, Marcelo Firmino de (org.). **Fundamentos da Química Forense**. 2. ed. Campinas: Millennium, 2019. 380 p.
3. UNODC- United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2022** (United Nations publication, 2022).
4. BASTOS, Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro et al. (Org.). III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.- Material complementar Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 2019. 528 p.
5. SANTOS, Layla Paixão. **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ANÁLISES FORENSES DE DROGAS DE ABUSO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN PORTÁTIL E QUIMIOMETRIA**. 2021. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Ufes, Vitória, 2021. Disponível em: http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_15374_Disserta%E7%E3o-Layla%20Paix%E3o%20Santos.pdf.
6. DORTA, Daniel Junqueira; YONAMINE, Mauricio; COSTA, José Luiz da; MARTINIS, Bruno Spinosa de. **Toxicologia forense**. São Paulo: Blucher, 2018. 750 p.
7. MUSSHOFF, F.; ROSENDAHL, W.; MADEA, B.. Determination of nicotine in hair samples of pre-Columbian mummies. **Forensic Science International**, [S.L.], v. 185, n. 1-3, p. 84-88, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.12.016>. 46
8. LIMA, Elizabete Campos de; SILVA, Clóvis Lúcio da. Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso. **NewsLab**, São Paulo, v. 1, n. 82, p. 156-169, out. 2007.
9. ROBBINS, C. R. **Chemical and physical behavior of human hair**. 4. ed. New York: Springer-Verlag, 2002. 483 p.

10. PHILIPSEN, Mai H.; HAXEN, Emma R.; MANAPRASERTSAK, Auraya; MALMBERG, Per; HAMMARLUND, Emma U.. Mapping the Chemistry of Hair Strands by Mass Spectrometry Imaging—A Review. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 24, p. 7522, 11 dez. 2021.
11. UEKI, R., FUKUSAKI, E., & SHIMMA, S. History of hair analysis by mass spectrometry imaging. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Elsevier B.V. v. 133, n. 2, p. 89-97, fev. 2022
12. CONE EJ. Mechanisms of drug incorporation into hair. **Ther Drug Monit.** 1996 Aug;18(4):438-43. doi: 10.1097/00007691-199608000-00022. PMID: 8857565.
13. KINTZ P. Value of the concept of minimal detectable dosage in human hair. **Forensic Sci Int.**, 2012, 218:28-30.
14. XU, Rensheng; ZHAO, Weimin; YE, Yang (ed.). **Introduction to Natural Products Chemistry**. Eua: Crc Press, 2012. 363 p.
15. OLIVEIRA, Fillipe Herbert de. **Consolidação de análise cromatográfica e aplicação de ferramentas quimiométricas à análise de alcaloides minoritários em amostras reais de cocaína**. 2018. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Química e Biológica, Unb, Brasília, 2018.
16. RODRIGUES, Nathália Valle Souza. **Caracterização química e análise quimiométrica de amostras de cocaína apreendidas em Minas Gerais pelo Departamento de Polícia Federal**. 2010. 74 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, UFMG, Belo Horizonte, 2010.
17. BOTELHO, Élvio Dias. **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)**. 2011. 174 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Unb, Brasília, 2011.
18. PLOWMAN, T., L. RIVIER. "Cocaine and Cinnamoylcocaine Content of *Erythroxylum* Species." **Annals of Botany**, vol. 51, no. 5, 1983, pp. 641–59. *JSTOR*, <http://www.jstor.org/stable/42756923>.
19. DOCIMO, T., REICHEL, M., SCHNEIDER, B. *et al.* The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. **Plant Mol Biol** **78**, 599–615 (2012). <https://doi.org.ez43.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11103-012-9886-1>
20. HOYE TR, BJORKLUND JA, KOLTUN DO, RENNER MK. *N*-methylputrescine oxidation during cocaine biosynthesis: Study of prochiral methylene hydrogen discrimination using the remote isotope method. **Organic**

Lett 2(1):3–5 ,2000.

21. LEETE E. Biosynthesis of cocaine and cuscohygrine in *Erythroxyton-Coca*. **J Chem Soc Chem Commun** (23):1170–1171 , 1980.

22. LEETE E, BJORKLUND JA, COULADIS MM, Kim SH. Late intermediates in the biosynthesis of cocaine: 4-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoate and methyl ecgonine. **J Am Chem Soc** 113(24):9286–9292 , 1991.

23. SANTOS, Nayara Araujo dos. **Estudo da distribuição espacial de canabinoides e alcaloides em folhas de Cannabis sativa e Erythroxyton coca por Imaging Mass Spectrometry**. 2022. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Ufes, Vitória, 2022. Disponível em: https://sappg.ufes.br/tese_drupal//tese_16065_Boneco_Tese%20de%20Doutorado_Nayara%20Araujo%20dos%20Santos.pdf. Acesso em: 20 dez. 2022.

24. BORTOLOTTI F, GOTTARDO R, PASCALI J, TAGLIARO F. Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. **Curr Med Chem**. 2012;19(33):5658-63. doi: 10.2174/092986712803988794. PMID: 22856660.

25. JENKINS, A.J.,CONE E.J. in Drug Abuse Handbook, Karch S.B, Ed., CRC press, Boca Raton, 1998, pp. 184-187

26. CARRERA, M.R.C; MEIJLER, M.M; JANDA, K.D.. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004;12:5019- 5030.

27. BASELT, R.C. In Disposition of toxic drugs and chemicals in man, **Biomedical Publications**, Foster city, California, 2008, 8th edition, pp. 349-355.

28. CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **J Anal Toxicol.**,1995, 19, 459-478.

29. ISENSCHMID, D.S. Cocaine. **Principles of Forensic Toxicology** 3 ed. In Levine ed. New York 2010, p 245-268

30. JENKINS, A.J. Pharmacokinetics of Specific Drugs. Karch, S.B ed. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of abused drugs**. New York. 2008. P 38-42

31. KLOSS, M.W. ROSEN, G.M., RAUCKMAN, E.J. Cocaine-mediated hepatotoxicity a critical review. **Biochemical pharmacology**, 1984. P 169-173.

32. KOLBRICH, E.A.; BARNES,A.J.; GORELICK,D.A. Major and minor metabolites of cocaine in human plasma following controlled subcutaneous cocaine administration. **Journal of analytical toxicology**, 2006 p 501-510.

33. KOVACIC, P. Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. **Medical hypotheses**. 2005 p350-356.
34. BEASLEY E., FRANCESE S., BASSINDALE T. (2016) Detection and mapping of cannabinoids in single hair samples through rapid derivatization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Anal Chem** **88(20)**:10328–10334
35. VERSTRAETE, A.G. Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. **Ther Drug Monit.**, 2004, 26:200-205.
36. GARCIA-BOURNISSEN, F.; MOLLER, M.; NESTERENKO, M.; KARASKOV, T.; KOREN G. Pharmacokinetics of disappearance of cocaine from hair after discontinuation of drug use. **Forensic Sci Int.**, 2009, 189:24-27
37. MENEZES, Matheus Manoel Teles de. “**Desenvolvimento de sensores voltamétricos e piezelétricos modificados quimicamente com cucurbiturilas para análises de cocaína em amostras de interesse forense**”. 2014. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Usp, Ribeirão Preto, 2014.
38. DONATO, Enrico di; MARTIN, Carmen Cinira Santos; MARTINIS, Bruno Spinosa de. Determination of cocaine in Brazilian paper currency by capillary gas chromatography/mass spectrometry. **Química Nova**, Ribeirão Preto-Sp, v. 30, n. 8, p. 1966-1967, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000800031>.
39. MARCELO, M.C.A.; MARIOTTI, K.C.; ORTIZ, R.s.; FERRÃO, M.F.; ANZANELLO, M.J.. Scott test evaluation by multivariate image analysis in cocaine samples. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 127, p. 87-93, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.02.012>
40. TOLEDO, Escobar; EUGENIA, Isabel; MEJIA, Berrouet; CLAIRE, Marie; RAMIREZ, Gonzalez; MAURICIO, Diego. Mecanismos moleculares de la adicción a la marihuana. **Revista Colombiana de Psiquiatría**, Colombia, v. 38, n. 1, p. 126-142, mar. 2009
41. ALMEIDA, Camila Medeiros de. **Análise da distribuição espacial de designer drugs em selos por MALDI FT-ICR Imaging MS**. 2020. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Ciências Exatas, Ufes, Vitória, 2020.
42. VOGLIARDI S., FAVRETTO D., FRISON G., FERRARA S.D., SERAGLIA R., TRALDI P. (2009) A fast screening MALDI method for the detection of cocaine and its metabolites in hair. **J Mass Spectrom** 44(1):18–24

43. SANTOS, Nayara Araújo dos. **Análises de Padrões Isoméricos de Canabinóides e Produtos de Cannabis por GC MS, GCxGC qMS e UPLC Acoplado a Espectrometria de Massas de Mobilidade Iônica (TWIM MS)**. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Ciências Exatas, Ufes, Vitória, 2018.
44. SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2007. 999 p. Tradução de Marco Grassi.
45. LEITE, Júlia de Almeida. **Estudo do Perfil Químico de Apreensões de Maconha por RMN de 1H e Outras Técnicas Analíticas**. 2017. 222 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Ufes, Vitória, 2017.
46. PEGO, A.M.F. *et al.* Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Forensic Science International**, [S.L.], v. 274, p. 83-90, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.024>.
47. LACHENMEIER, Katrin *et al.* Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation. **Forensic Science International**, [S.L.], v. 159, n. 2-3, p. 189-199, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.08.009>.
48. HARRIS, Daniel C.. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: Ltc, 2015.
49. D'AVILA, Felipe Bianchini *et al.* Analysis of cocaine/crack biomarkers in meconium by LC–MS. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1012-1013, p. 113-117, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.019>.
50. OIYE, Érica Naomi. “**Estudo eletroanalítico e cromatográfico para a análise de LSD em química forense**”. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/Usp, Ribeirão Preto, 2015.
51. ROMÃO, W. **NOVAS APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM QUÍMICA FORENSE**. *Tese de Doutorado*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 201 p. 2010.
52. BRONZEL JUNIOR, João Luiz. **Técnicas de análise direta em espectrometria de massas: soluções simples para complexas questões**

- da química de produtos naturais à análise forense.** 2020. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Unesp, Araraquara, 2020.
53. MARIOTTI, K. C.. Perícia Papiloscópica: métodos espectrométricos e espectroscópicos aplicados à análise química de impressões digitais. **Brazilian Journal Of Forensic Sciences, Medical Law And Bioethics**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 210-228, 2020. Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics. [http://dx.doi.org/10.17063/bjfs9\(2\)y2020210](http://dx.doi.org/10.17063/bjfs9(2)y2020210). Disponível em: <http://www.ipebj.com.br/forensicjournal/edicoes?volume=9&numero=2&artigo=378>. Acesso em: 16 out. 2021.
54. BRONZEL JUNIOR, João Luiz. **Matrizes iônicas: Detecção e Quantificação de Cianotoxinas por MALDI-MS.** 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Unesp, Araraquara, 2015.
55. **21 SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS (SWGDRUG) RECOMMENDATIONS.** UNITED STATES DEPARTMENT OF JUSTICE- DRUG ENFORCEMENT ADMINISTRATION. Washington, 2019.p.83.
56. HOFFMANN E. STROOBANT, V. **Mass spectrometry, principles and applications.** Chichester. 3ª Ed. Inglaterra: Editora Wiley, 2007 489 p.
57. JASKOLLA, Thorsten W.; KARAS, Michael. Compelling Evidence for Lucky Survivor and Gas Phase Protonation: the unified maldi analyte protonation mechanism. **Journal Of The American Society For Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 976-988, 8 mar. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-011-0093-0>.
58. PRODUCTS and Solutions mass-spectrometry. 2023. Disponível em: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/qtof.html>. Acesso em: 25 maio 2023.
59. PHILIPSEN, Mai H.; HAXEN, Emma R.; MANAPRASERTSAK, Auraya; MALMBERG, Per; HAMMARLUND, Emma U.. Mapping the Chemistry of Hair Strands by Mass Spectrometry Imaging—A Review. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 24, p. 7522, 11 dez. 2021.
60. FLINDERS, Bryn; CUYPERS, Eva; ZEIJLEMAKER, Hans; TYTGAT, Jan; HEEREN, Ron M. A.. Preparation of longitudinal sections of hair samples for the analysis of cocaine by MALDI-MS/MS and TOF-SIMS imaging. **Drug Testing And Analysis**, Netherlands, v. 7, n. 10, p. 859-865, 18 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dta.1812>
61. PORTA T, GRIVET C, KRAEMER T, VARESIO E, HOPFGARTNER G.

Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging. **Anal Chem** 83(11):4266–4272, 2011.

62. CUYPERS, E., FLINDERS, B., BOSMAN, I. J., LUSTHOF, K. J., VAN ASTEN, A. C., TYTGAT, J., and HEEREN, R. M. A.: Hydrogen peroxide reactions on cocaine in hair using imaging mass spectrometry, **Forensic Sci. Int.**, 242, 103e110, 2014.

63. VOGLIARDI S., FAVRETTO D., FRISON G., MAIETTI S., VIEL G., SERAGLIA R., TRALDI P., FERRARA S.D. (2010) Validation of a fast screening method for the detection of cocaine in hair by MALDI-MS. **Anal Bioanal Chem** 396(7):2435–2440

64. WANG H., WANG Y. (2017) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging for the rapid segmental analysis of methamphetamine in a single hair using umbelliferone as a matrix. **Anal Chim Acta** 975:42–51

65. FLINDERS B., BEASLEY E., VERLAAN R.M., CUYPERS E., FRANCESE S., BASSINDALE T., CLENCH M.R., HEEREN R.M.A. (2017) Optimization of sample preparation and instrumental parameters for the rapid analysis of drugs of abuse in hair samples by MALDI-MS/MS imaging. **J Am Soc Mass Spectrom** 28(11):2462–2468

66. KERNALLEGUEN A., ENJALBAL C., ALVAREZ J.C., BELGACEM O., LEONETTI G., LAFITTE D., PELISSIER-ALICOT A.L. (2018) Synthetic cannabinoid isomers characterization by MALDI-MS3 imaging: application to single scalp hair. **Anal Chim Acta** 1041:87–93

67. FRANCESE, Simona (ed.). **Emerging Technologies for the Analysis of Forensic Traces: advanced sciences and technologies for security applications**. Sheffield, South Yorkshire: Springer, 2019. 287 p.

68. PAULO, Breno Frederico Pereira. **Desenvolvimento de método para determinação de anfetaminas e benzoilecgonina em amostras de cabelo por LC-MS/MS**. 2017. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, UFMG, Belo Horizonte, 2017.

69. DOS SANTOS, N. A., de Almeida, C. M., Gonçalves, F. F., Ortiz, R. S., Kuster, R. M., Saquetto, D., & Romão, W. (2021). Analysis of Erythroxylum coca Leaves by Imaging Mass Spectrometry (MALDI–FT–ICR IMS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(4), 946-955.

70. BURTON, R. D., Watson, C. H., Eyler, J. R., Lang, G. L., Powell, D. H., & Avery, M. Y. (1997). Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(5), 443-446.

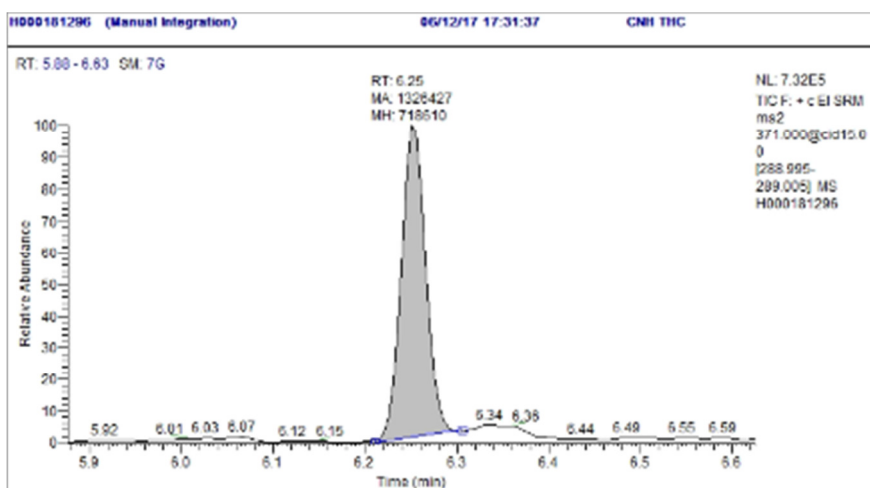
71. Nazim Boutaghou, M., & Cole, R. B. (2012). 9,10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(8), 995–1003. Doi:10.1002/jms.3027
72. JEANVILLE, P. M., ESTAPÉ, E. S., DE JEANVILLE, I. T. N. The effect of liquid chromatography eluents and additives on the positive ion responses of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester using electrospray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.*, 227(2), 247, 2003.
73. Dale Hart E, Vikingsson S, Winecker Ruth E, EVANS L. A. CONE E.J., Mitchell M.J., Hayes E.D., Flegel R.R.(2023) Performance of Hair Testing for Cocaine Use—Comparison of Five Laboratories Using Blind Reference Specimens, **Journal of Analytical Toxicology**, Volume 47, Issue 2, March 2023, Pages 154–161,
74. COOPER GA, KRONSTRAND R, KINTZ P (2012) Society of hair testing guidelines for drug testing in hair. **Forensic Sci Int** 218(1–3).
75. CIRIMELE, V., KINTZ, P., & MANGIN, P. (1995). Drug Concentrations in Human Hair after Bleaching. **Journal of Analytical Toxicology**, 19(5), 331–332. Doi:10.1093/jat/19.5.331
76. NAKAHARA, Yuji; KIKURA, Ruri. Hair analysis for drugs of abuse: VII. The incorporation rates of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester into rat hair and hydrolysis of cocaine in rat hair. **Archives of toxicology**, v. 68, p. 54-59, 1994.
77. CHASIN AA da M, SILVA ES da, CARVALHO VM. Central Nervous System Stimulants. In: OGA S, CAMARGO MMDA, BATISTUZZO JADO, editors. **Fundamentals of Toxicology**. 4th ed. São Paulo: ATHENEU; 2014. pp. 366–83.

ANEXOS

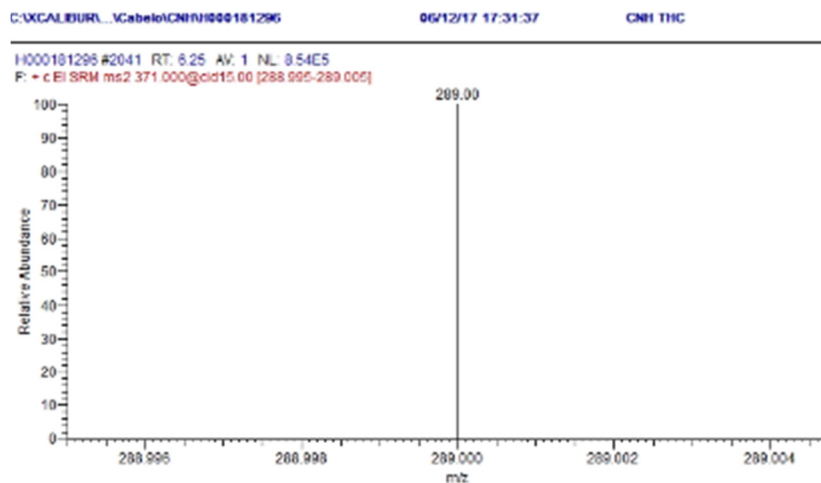
CROMATOGRAMAS POR CG-MS DAS AMOSTRAS ANALISADAS

A Figura 1 ilustra o sinal de THC detectado na amostra "A"

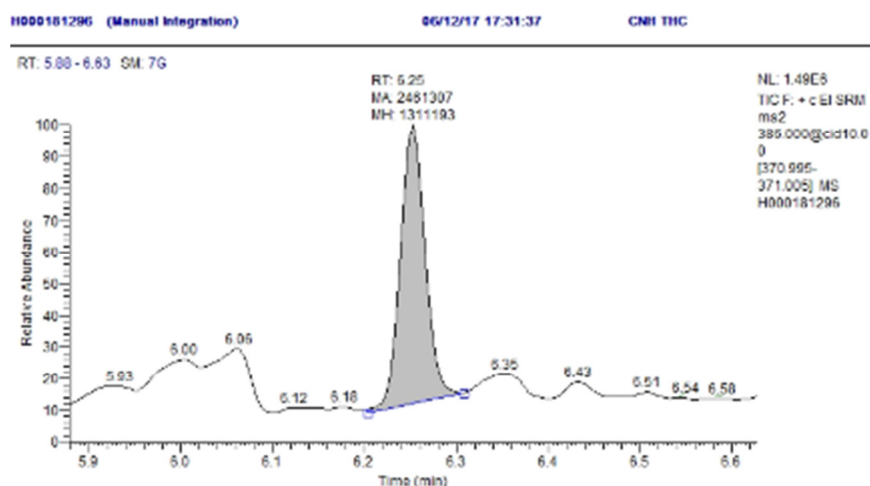
(a)



(b)



C)



(d)

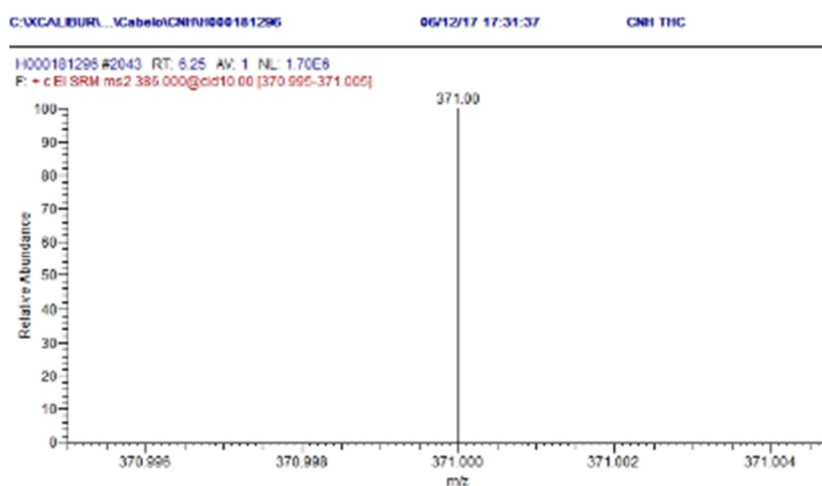


Figura 1. Cromatograma da amostra “A” na transição m/z 371-289 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “A” na transição m/z 386-371 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

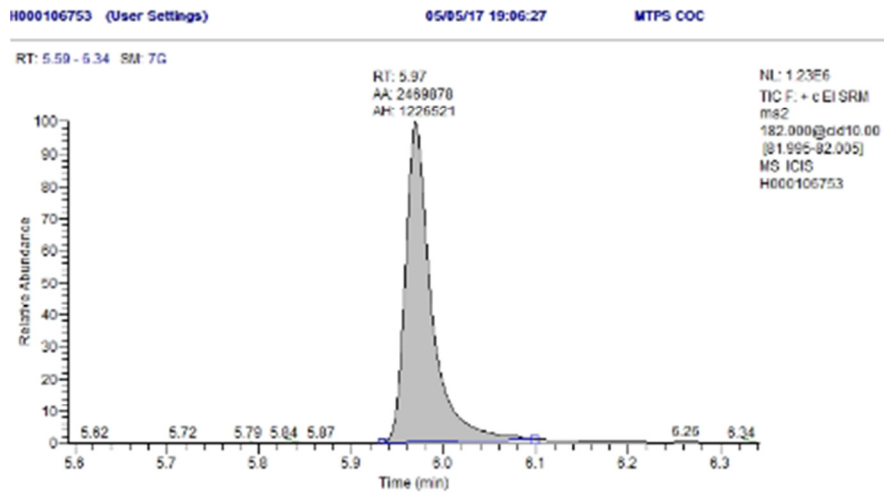
A Tabela 1 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “A”

Amostra:	“A”
Analito identificado:	THC
Tempo de retenção (min):	6,25
Concentração (ng/mg):	0,1

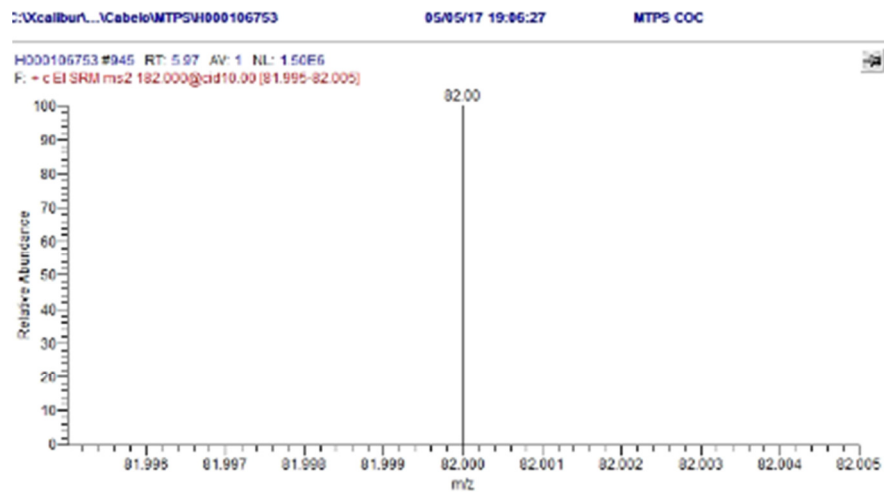
Tabela 1: Resultados da análise da amostra “A” por CG-MS/MS

A Figura 2 ilustra o sinal de COC detectado na amostra "B".

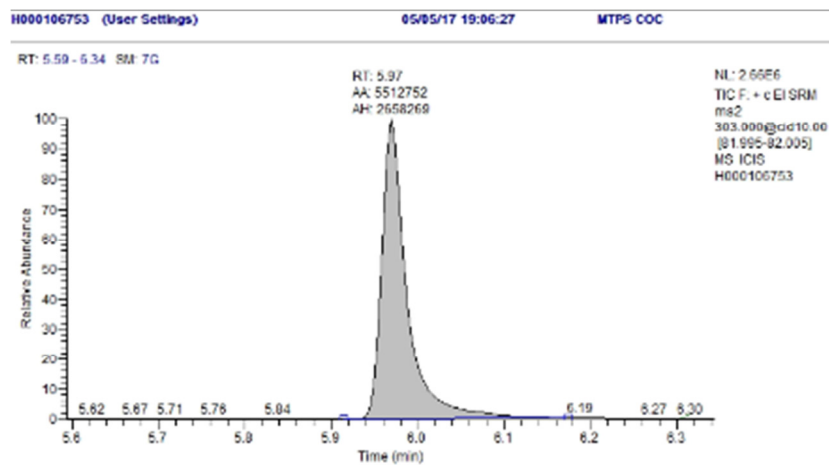
(a)



(b)



(c)



(d)

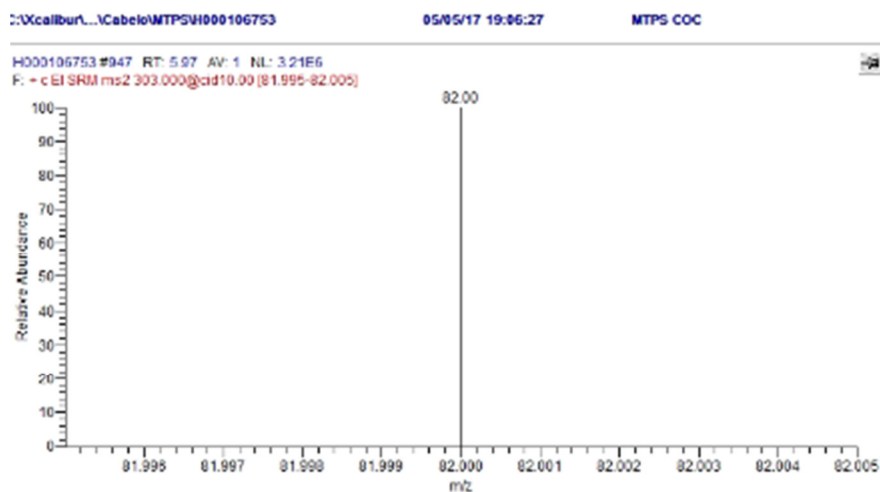


Figura 2. Cromatograma da amostra “B”. na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “B”. na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

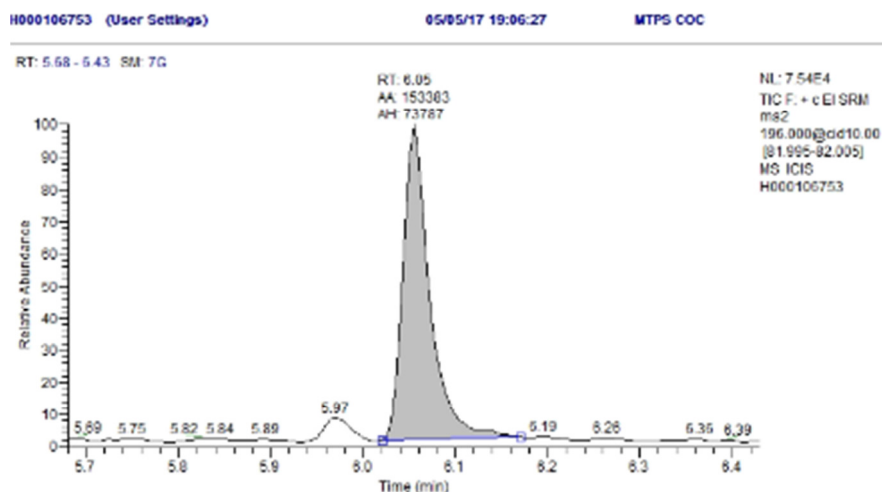
A Tabela 2 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “B”.

Amostra:	“B”
Analito identificado:	COC
Tempo de retenção (min):	5,97
Concentração (ng/mg):	3,5

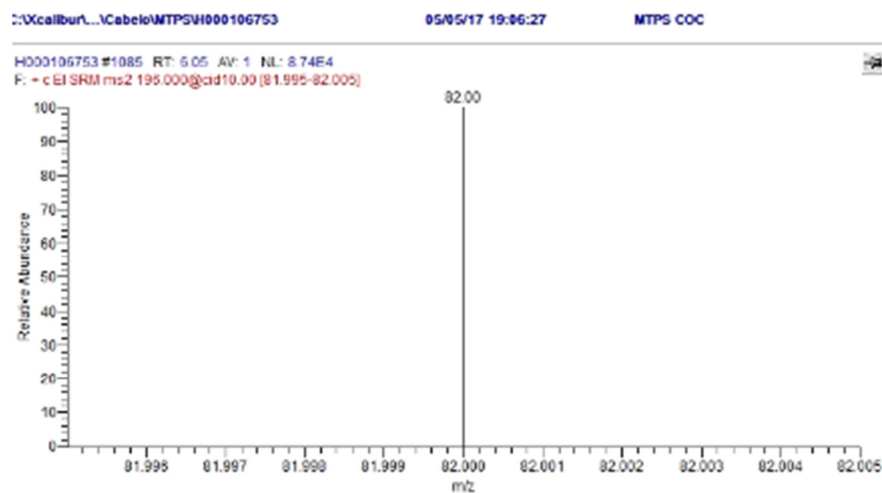
Tabela 2: Resultados da análise da amostra “B” por CG-MS/MS

A Figura 3 ilustra o sinal de COCE detectado na amostra “B”.

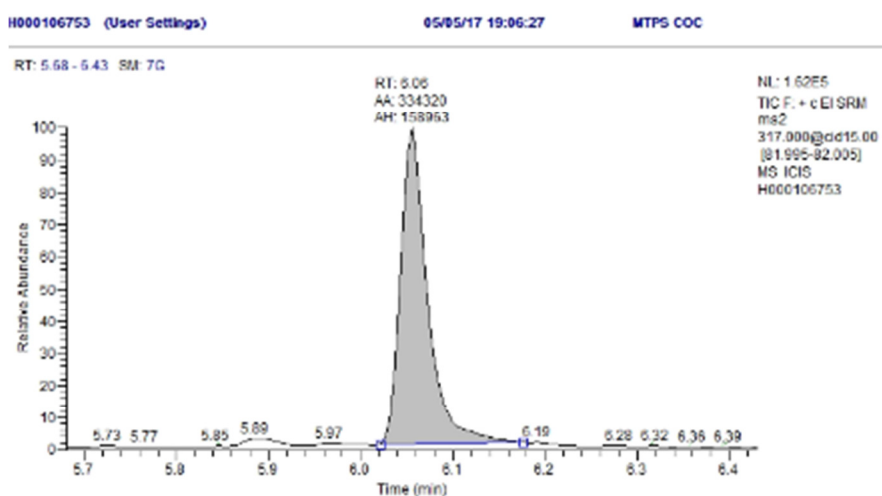
(a)



(b)



(c)



(d)

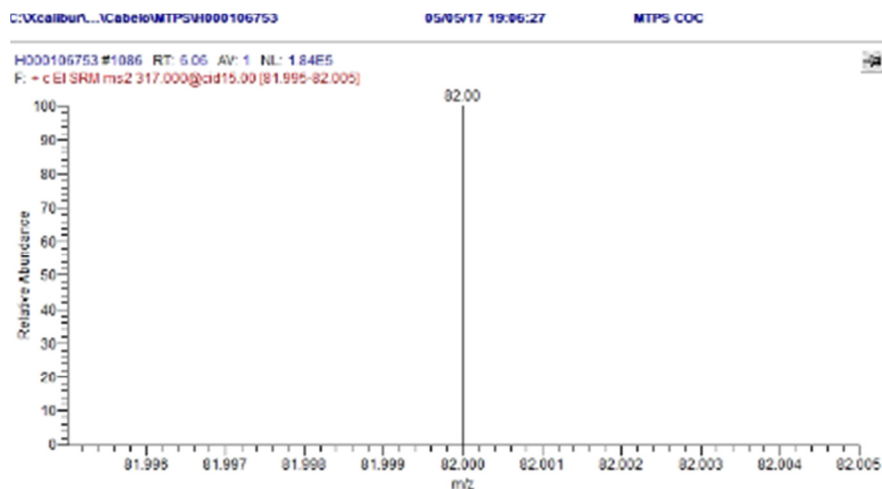


Figura 3. Cromatograma da amostra “B” na transição m/z 196-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “B” na transição m/z 317-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

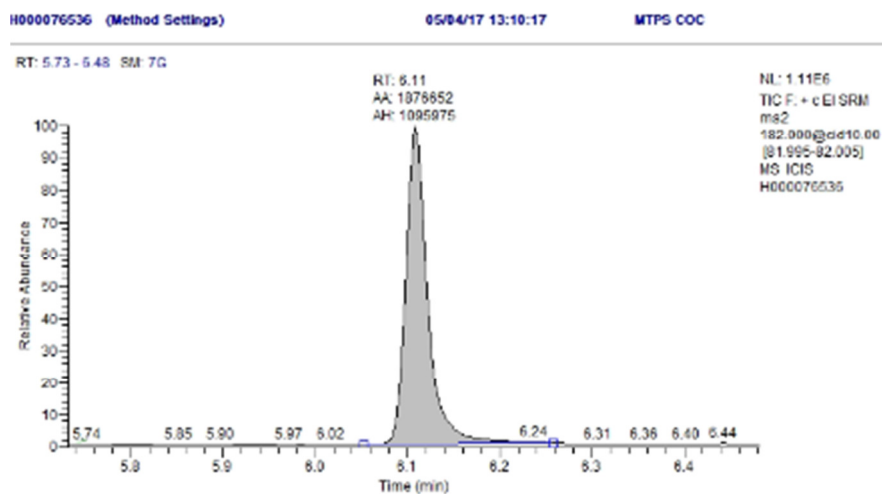
A Tabela 3 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “B”.

Amostra:	“B”
Analito identificado:	COCE
Tempo de retenção (min):	6,05
Concentração (ng/mg):	0,2

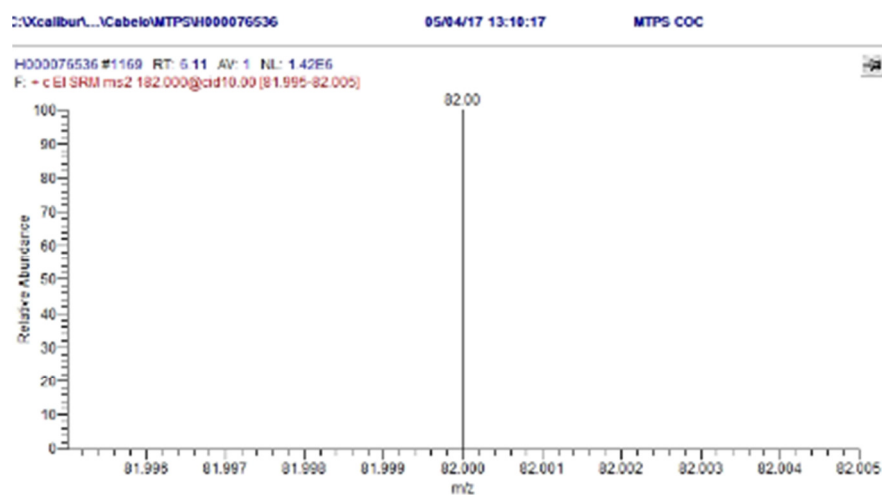
Tabela 3: Resultados da análise da amostra “B” por CG-MS/MS

A Figura 4 ilustra o sinal de COC detectado na amostra "C"

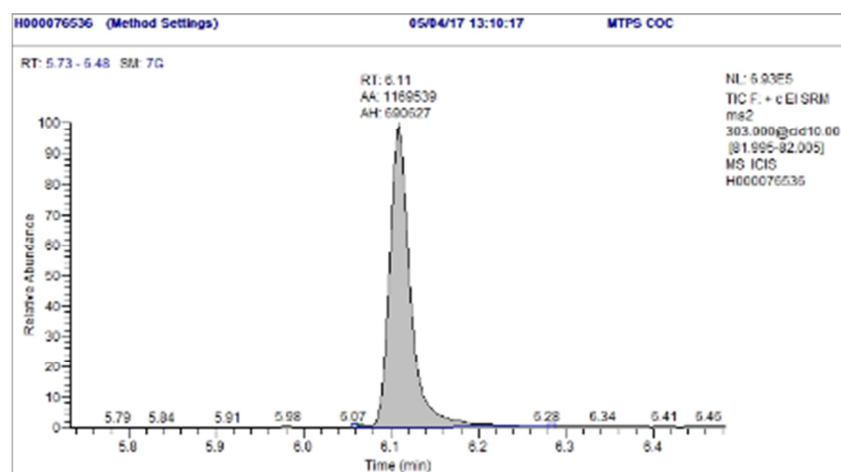
(a)



(b)



(c)



(d)

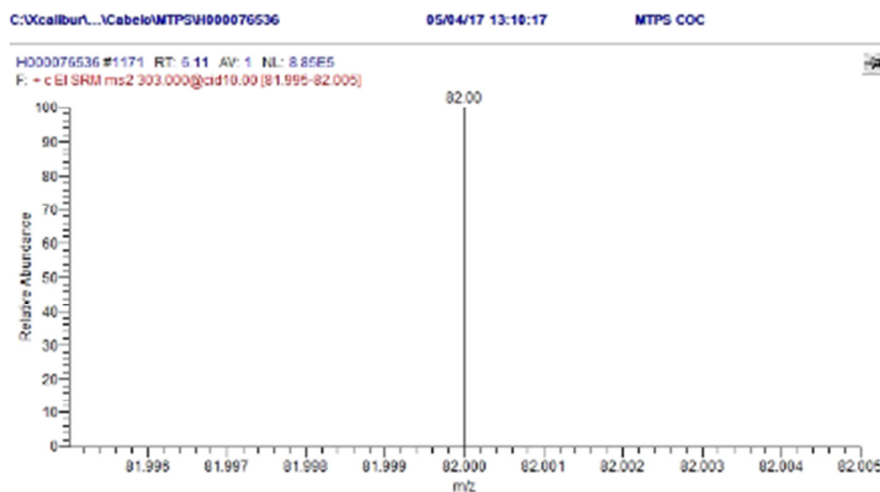


Figura 4. Cromatograma da amostra “C” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “C” na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

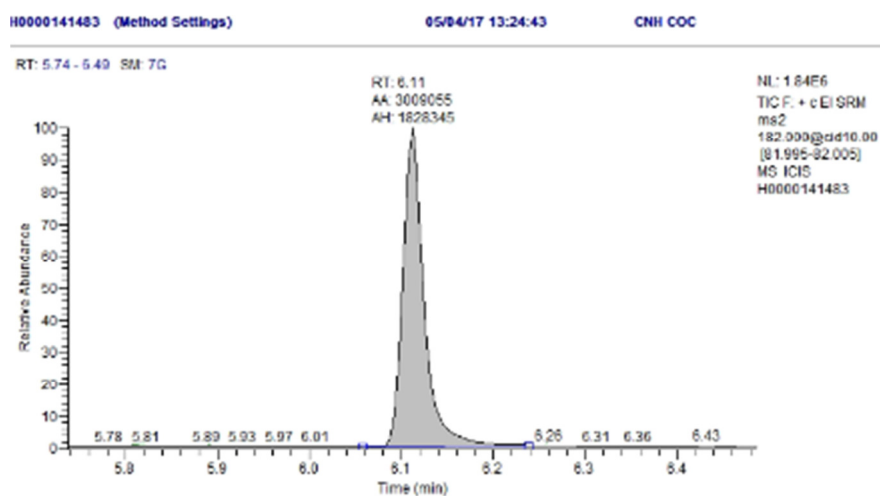
A Tabela 4 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “C”

Amostra:	“C”
Analito identificado:	COC
Tempo de retenção (min):	6,11
Concentração (ng/mg):	0,6

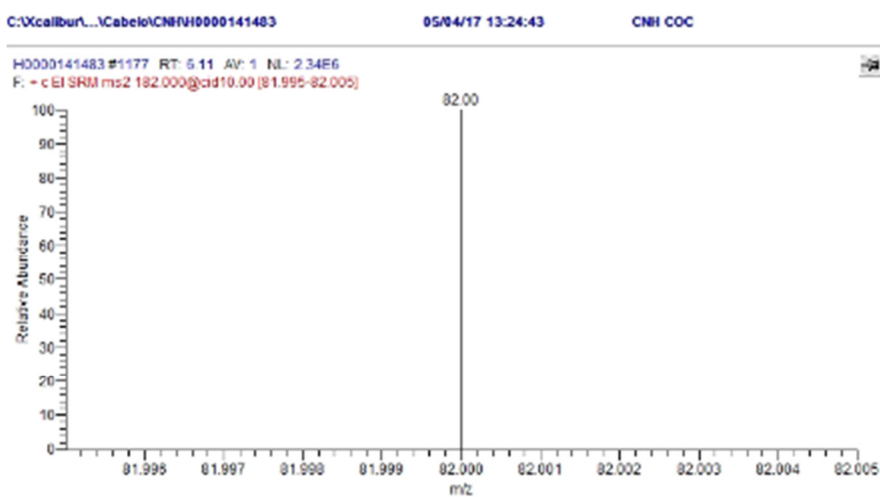
Tabela 4: Resultados da análise da amostra “C” por GC-MS/MS

A Figura 5 ilustra o sinal de COC detectado na amostra "D".

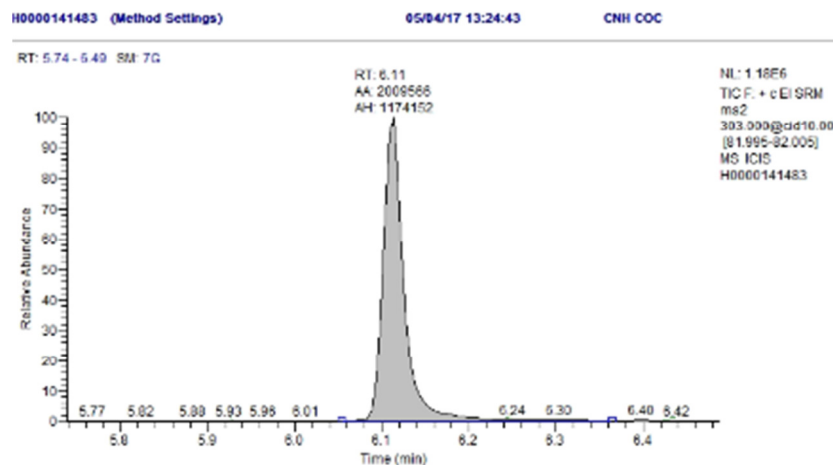
(a)



(b)



(c)



(d)

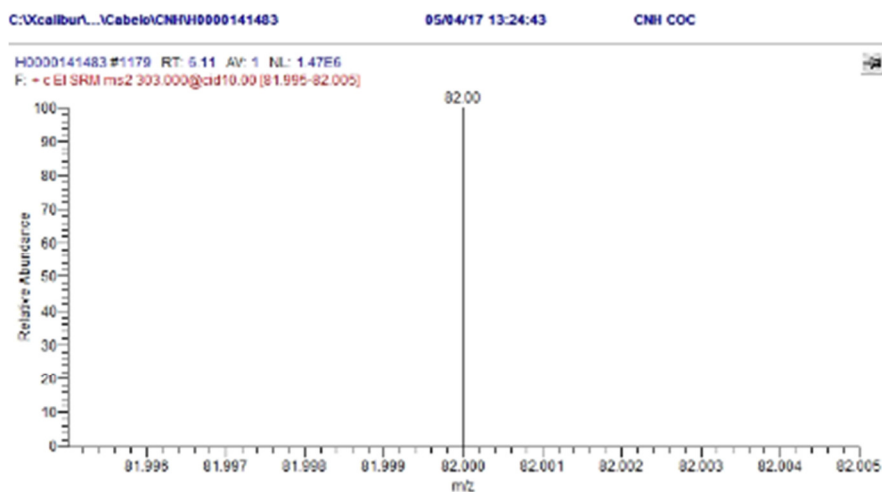


Figura 5. Cromatograma da amostra “D” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “D”. na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

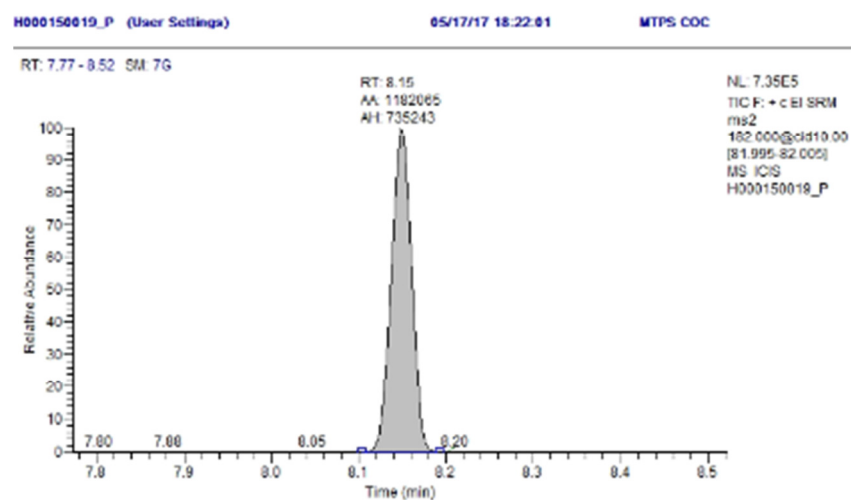
A Tabela 5 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “D”

Amostra:	“D”.
Analito identificado:	COC
Tempo de retenção (min):	6,11
Concentração (ng/mg):	1,4

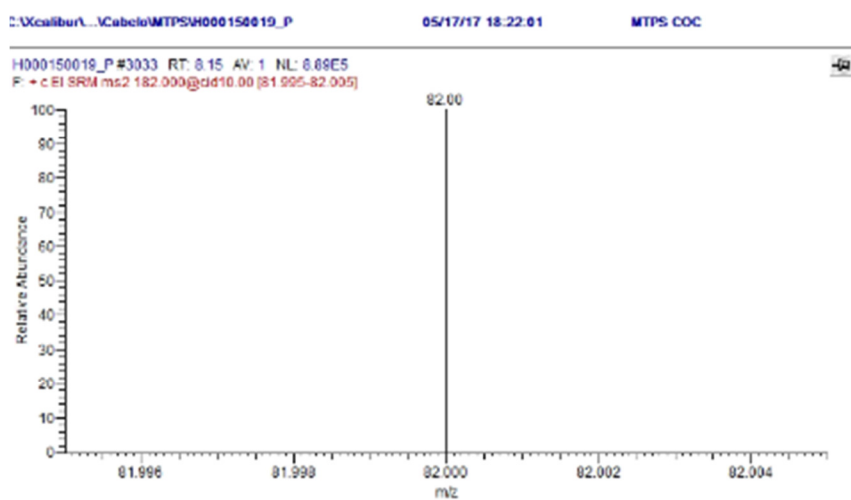
Tabela 5: Resultados da análise da amostra “D”. por GC-MS/MS

A Figura 6 ilustra o sinal de COC detectado na amostra "E"

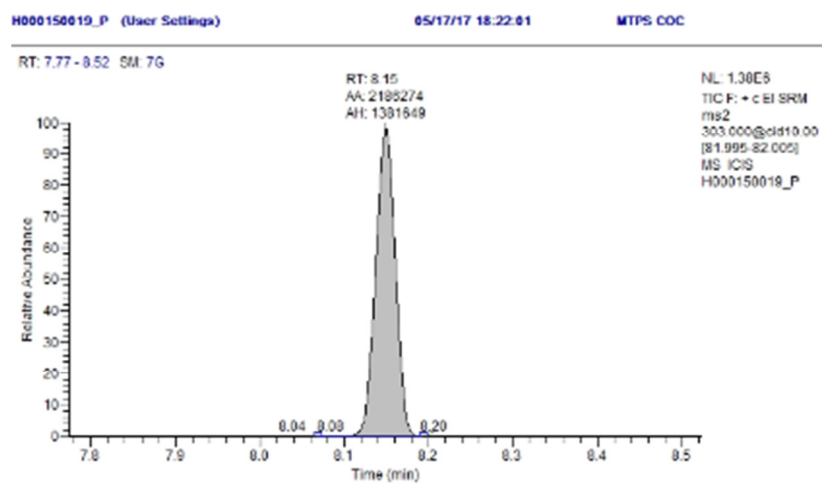
(a)



(b)



(c)



(d)

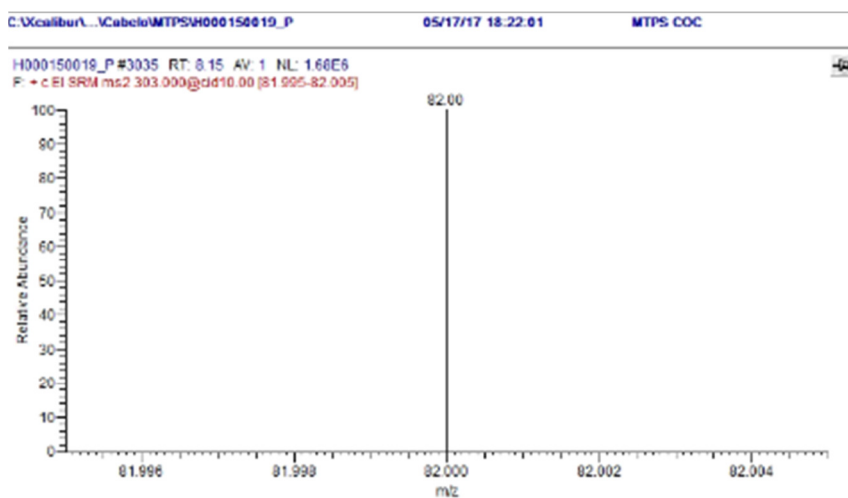


Figura 6. Cromatograma da amostra “E” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “E” na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

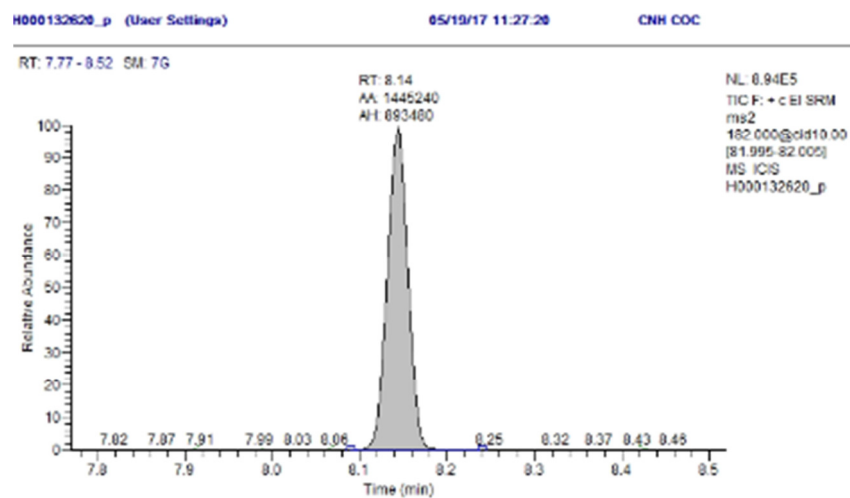
A Tabela 6 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “E”

Amostra:	“E”
Analito identificado:	COC
Tempo de retenção (min):	8,15
Concentração (ng/mg):	4,1

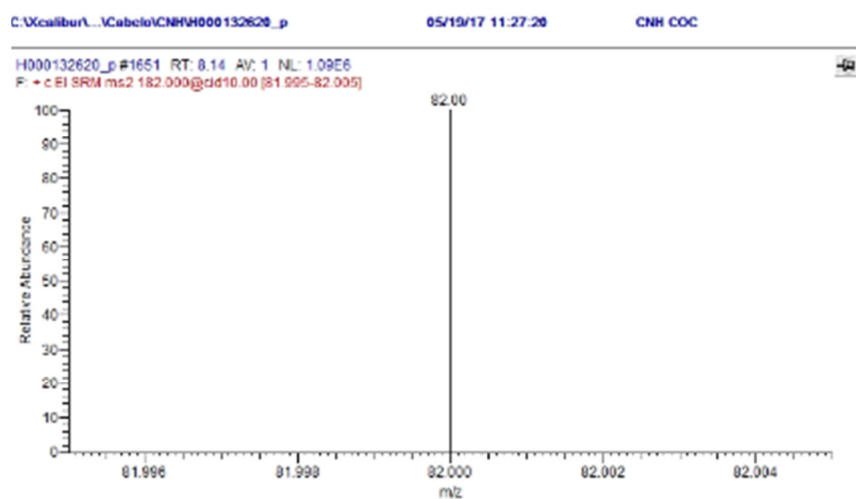
Tabela 6: Resultados da análise da amostra “E” por GC-MS/MS

A Figura 7 ilustra o sinal de COC detectado na amostra "F"

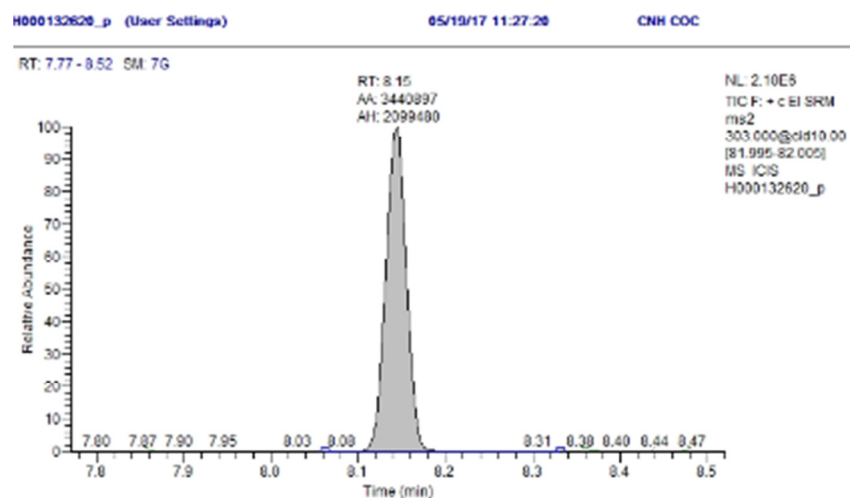
(a)



(b)



(c)



(d)

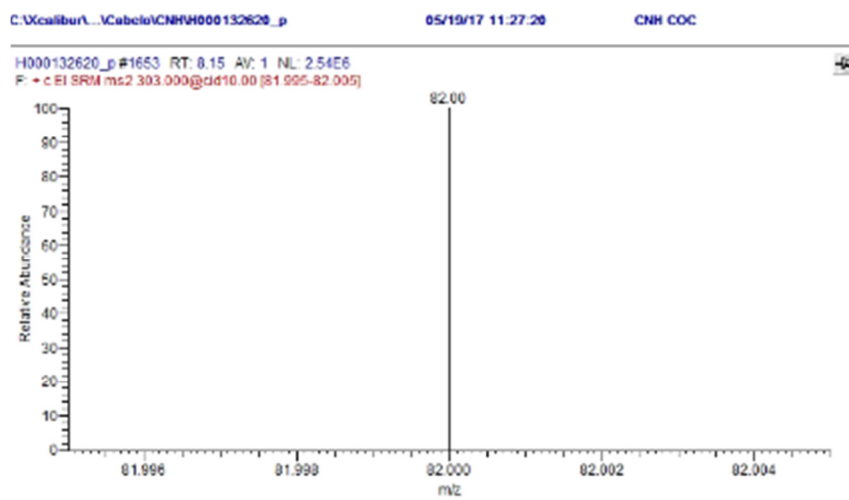


Figura 7. Cromatograma da amostra “F” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “F” na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

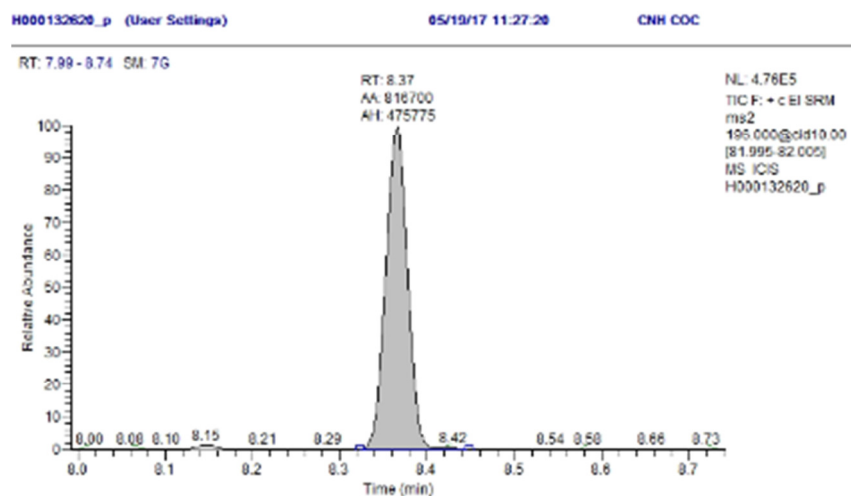
A Tabela 7 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “F”.

Amostra:	“F”
Analito identificado:	COC
Tempo de retenção (min):	8,14
Concentração (ng/mg):	1,6

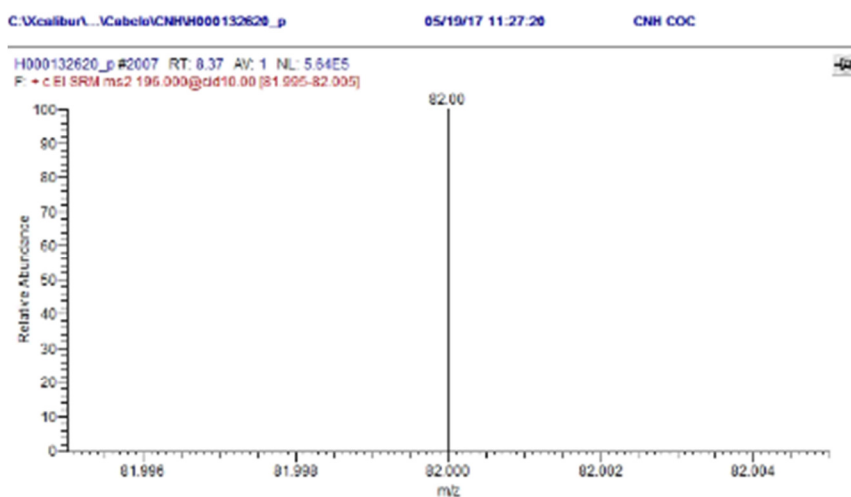
Tabela 7: Resultados da análise da amostra “F” por GC-MS/MS.

A Figura 8 ilustra o sinal de COCE detectado na amostra "F"

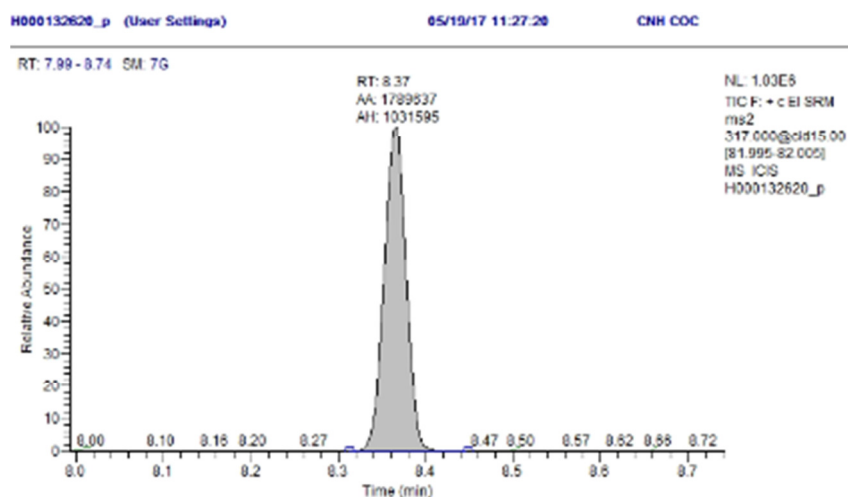
(a)



(b)



(c)



(d)

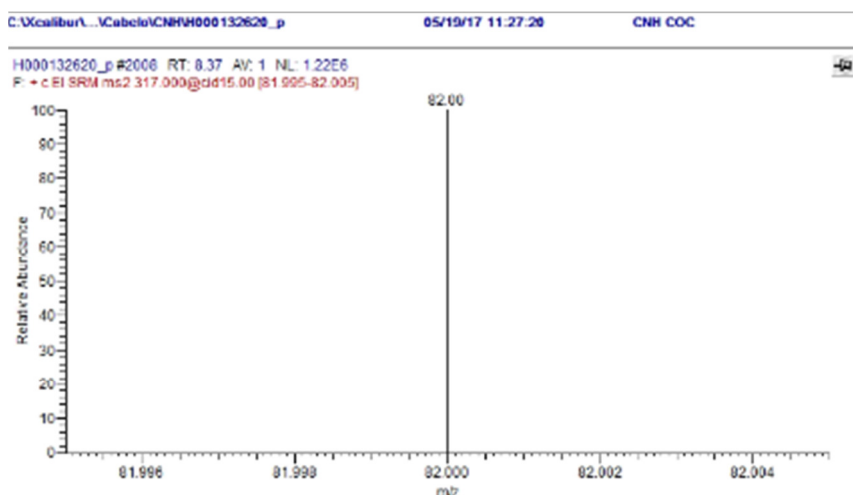


Figura 8. Cromatograma da amostra “F” na transição m/z 196-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “F” na transição m/z 317-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

A Tabela 8 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “F”

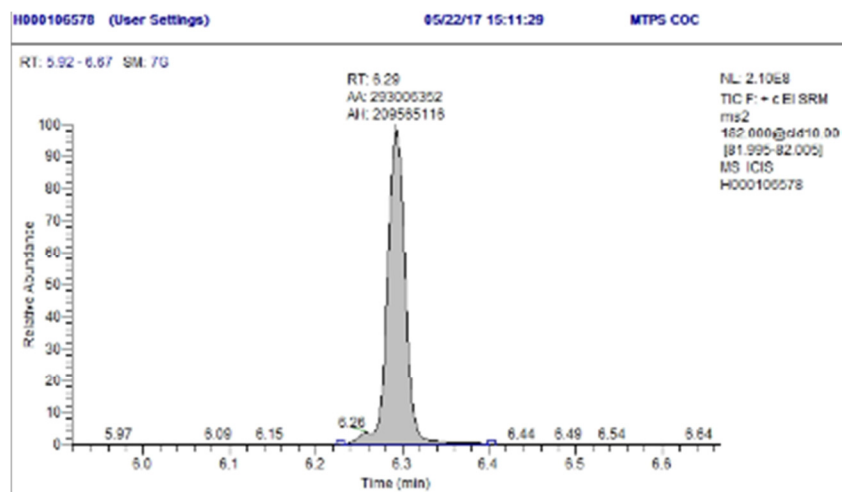
Amostra:	“F”
Analito identificado:	COCE
Tempo de retenção (min):	8,37
Concentração (ng/mg):	0,05

Tabela 8: Resultados da análise da amostra “F” por GC-MS/MS

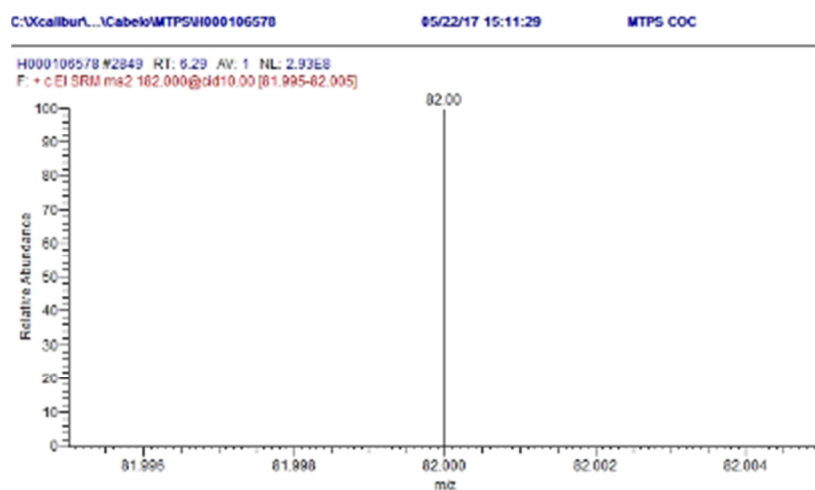
Dados da amostra “G” não disponíveis .

A Figura 9 ilustra o sinal de COC detectado na amostra "H"

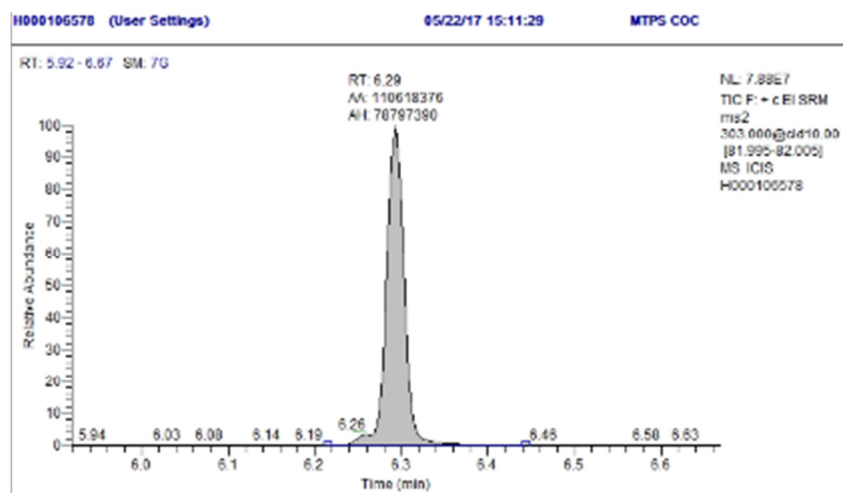
(a)



(b)



(c)



(d)

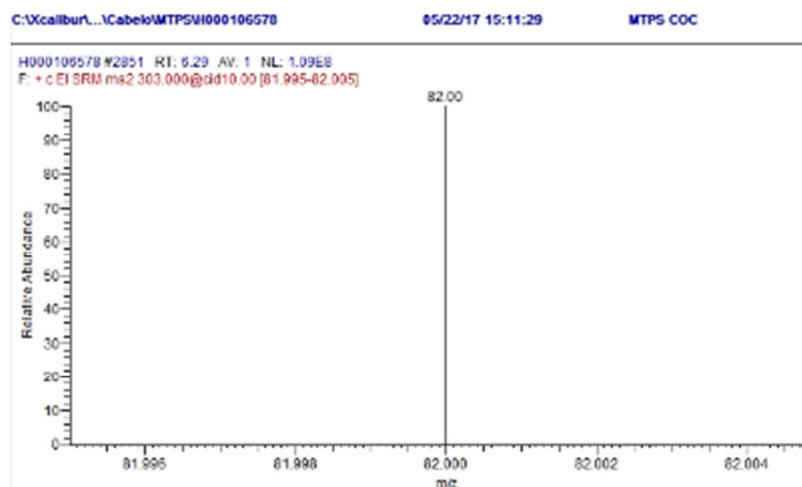


Figura 9. Cromatograma da amostra “H” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “H” na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

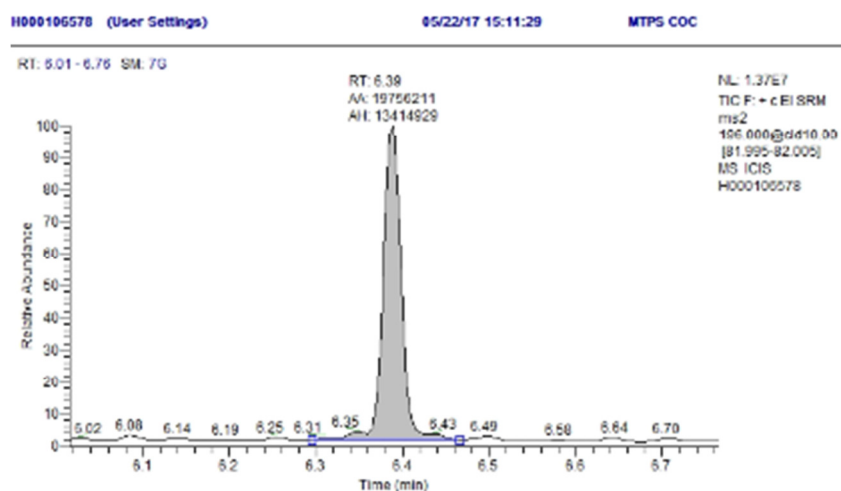
A Tabela 9 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “H”

Amostra:	“H”
Analito identificado:	COC
Tempo de retenção (min):	6,29
Concentração (ng/mg):	2,5

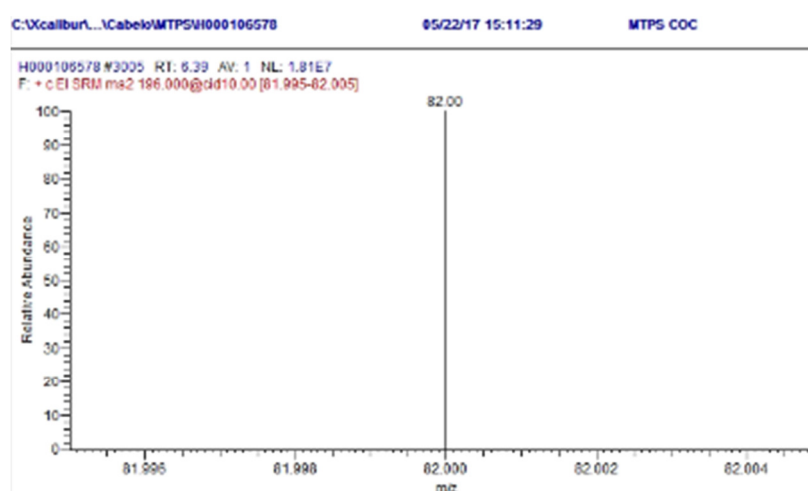
Tabela 9: Resultados da análise da amostra “H” por GC-MS/MS.

A Figura 10 ilustra o sinal de COCE detectado na amostra "H".

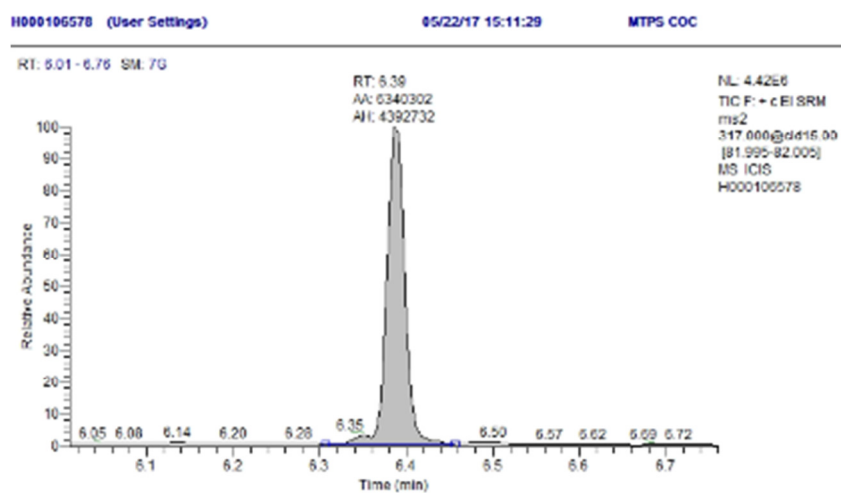
(a)



(b)



(c)



(d)

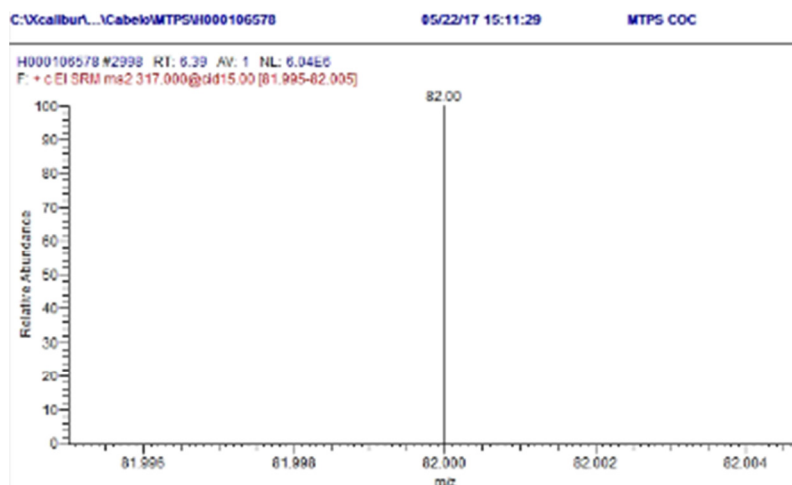


Figura 10. Cromatograma da amostra “H” na transição m/z 196-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “H” na transição m/z 317-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

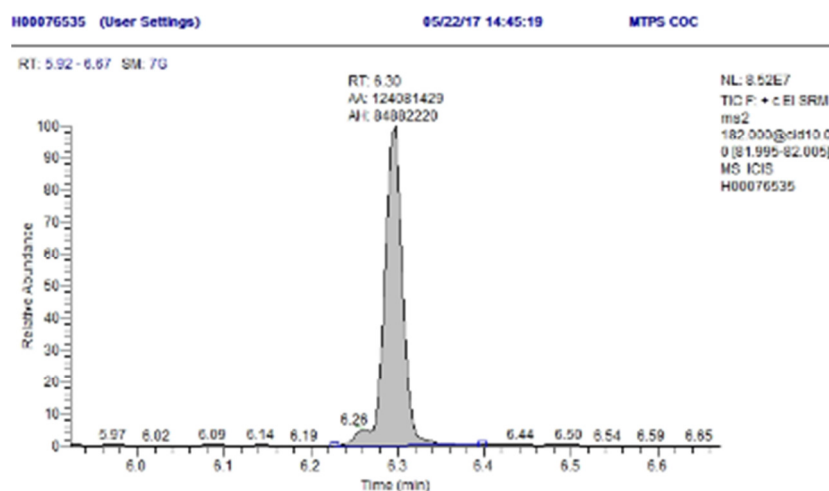
A Tabela 10 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “H”

Amostra:	“H”
Analito identificado:	COCE
Tempo de retenção (min):	6,39
Concentração (ng/mg):	0,1

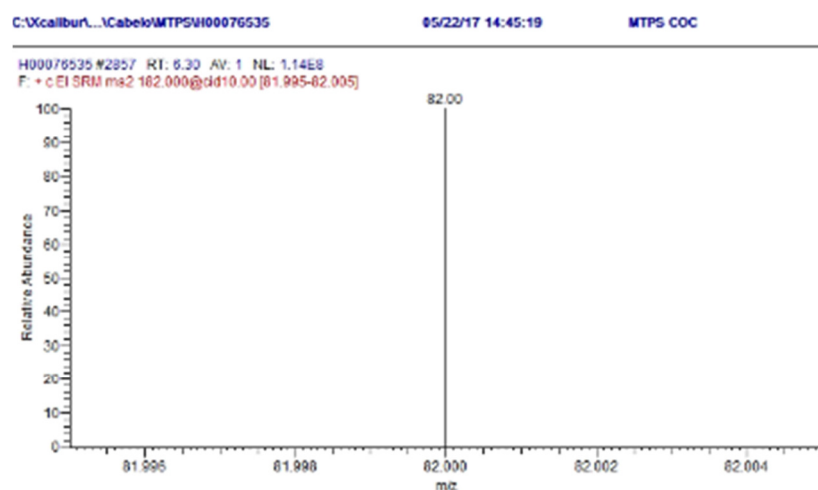
Tabela 10: Resultados da análise da amostra “H” por GC-MS/MS

A Figura 11 ilustra o sinal de COC detectado na amostra "I".

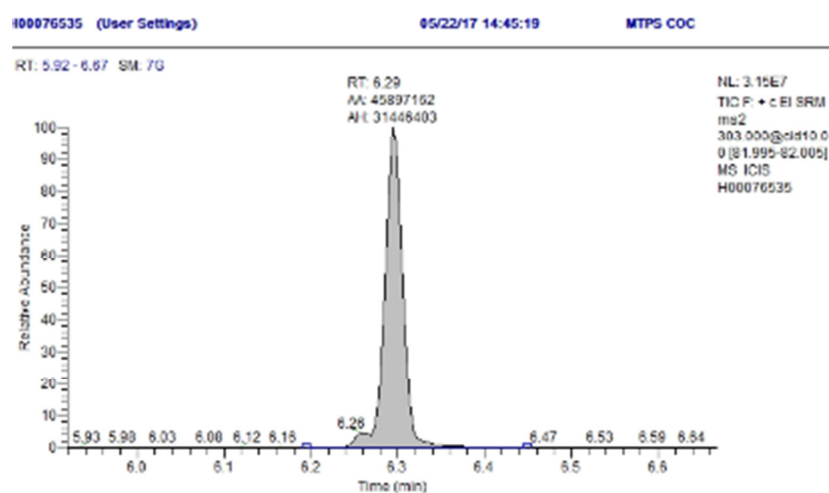
(a)



(b)



(c)



(d)

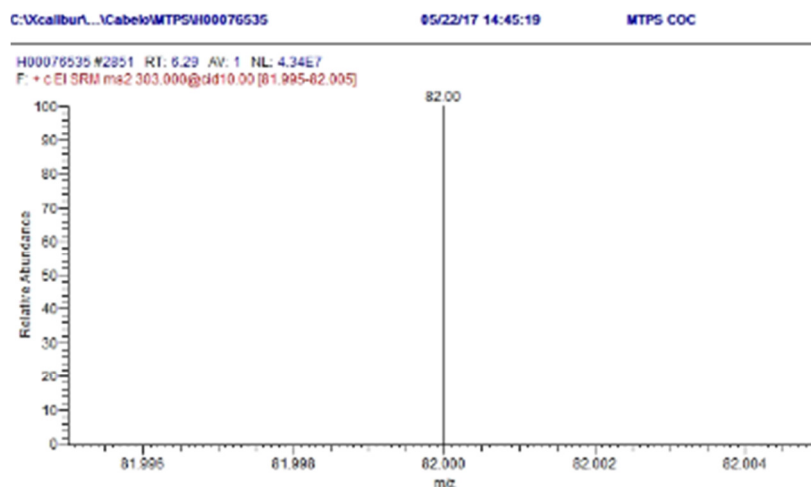


Figura 11 Cromatograma da amostra “I” na transição m/z 182-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “I” na transição m/z 303-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

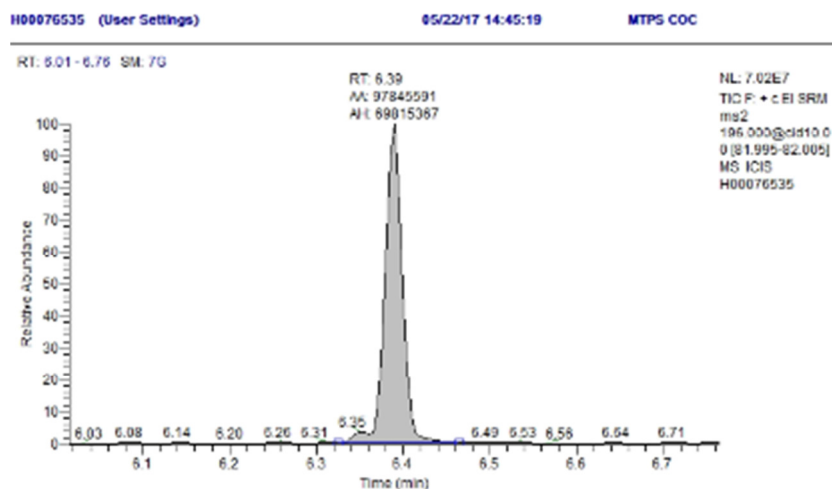
A Tabela 11 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “I”

Amostra:	“I”
Analito identificado:	COC
Tempo de retenção (min):	6,30
Concentração (ng/mg):	1,1

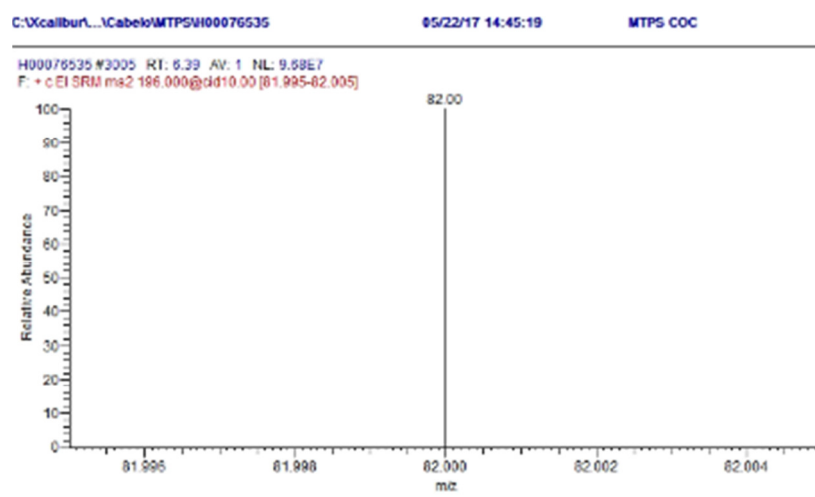
Tabela 11: Resultados da análise da amostra “I” por GC-MS/MS

A Figura 12 ilustra o sinal de COCE detectado na amostra "I"

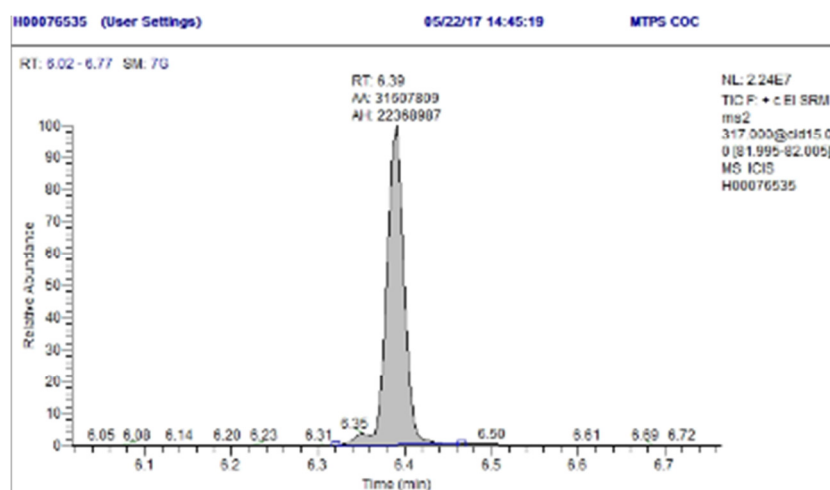
(a)



(b)



(c)



(d)

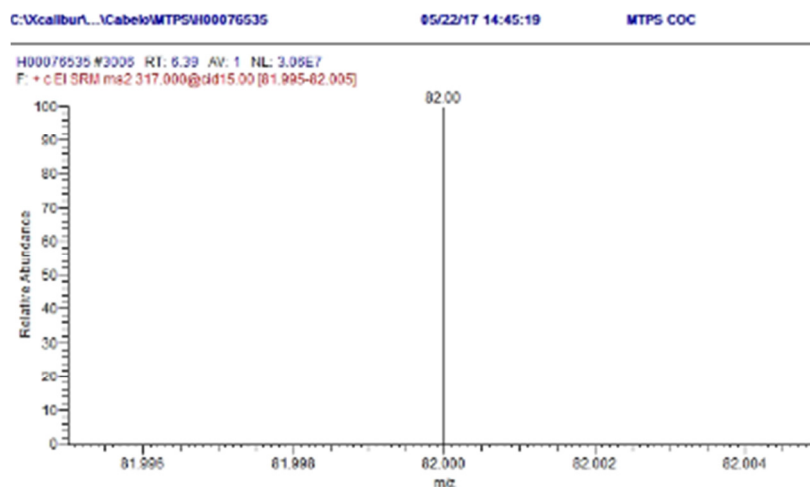


Figura 12. Cromatograma da amostra “I” na transição m/z 196-82 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “I” na transição m/z 317-82 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

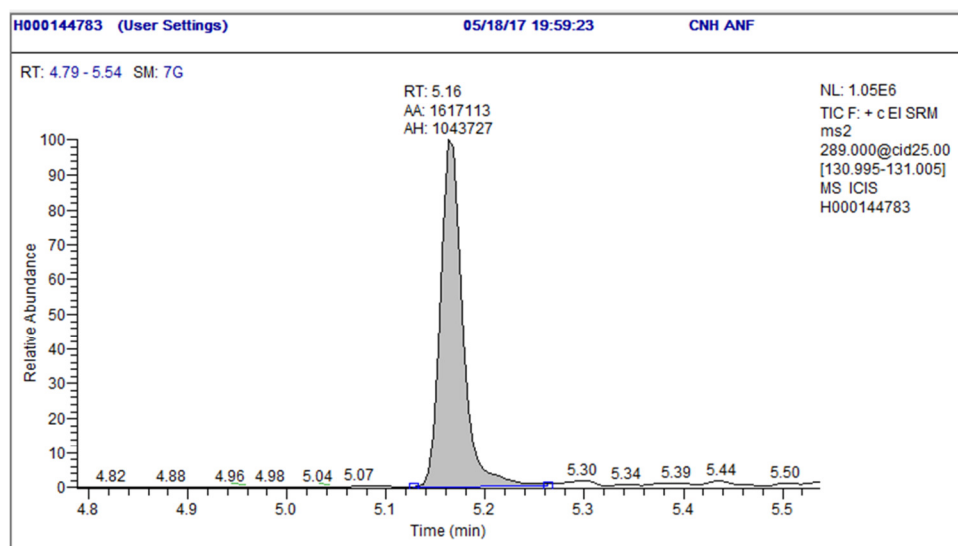
A Tabela 12 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “I”

Amostra:	“I”
Analito identificado:	COCE
Tempo de retenção (min):	6,39
Concentração (ng/mg):	0,4

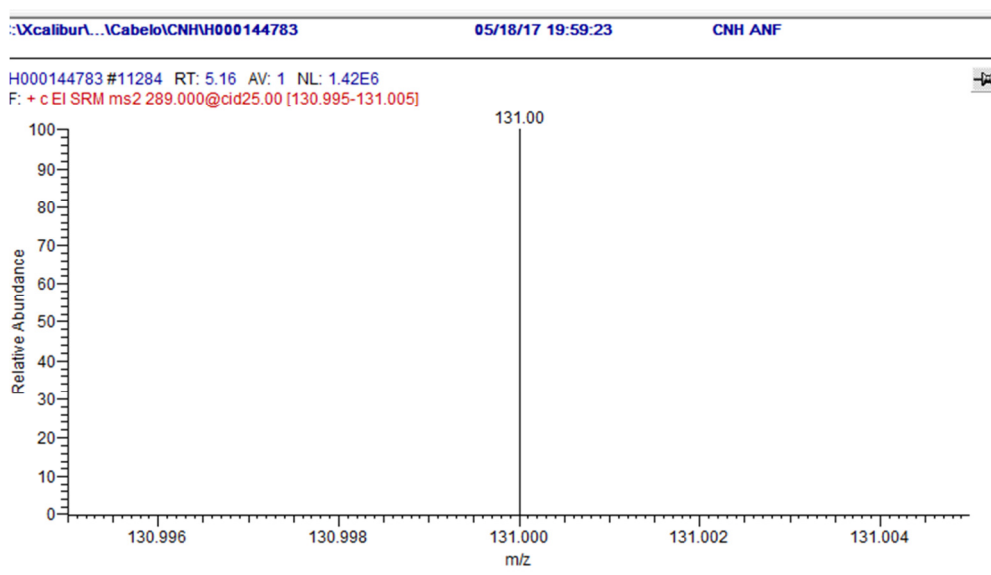
Tabela 12: Resultados da análise da amostra “I” por GC-MS/MS.

A Figura 13 ilustra o sinal de MDMA detectado na amostra "J"

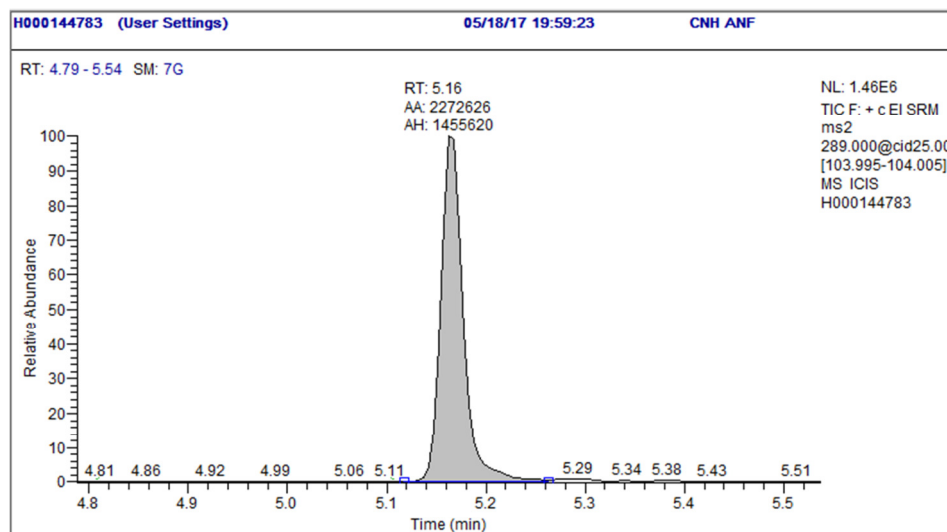
(a)



(b)



(c)



(d)

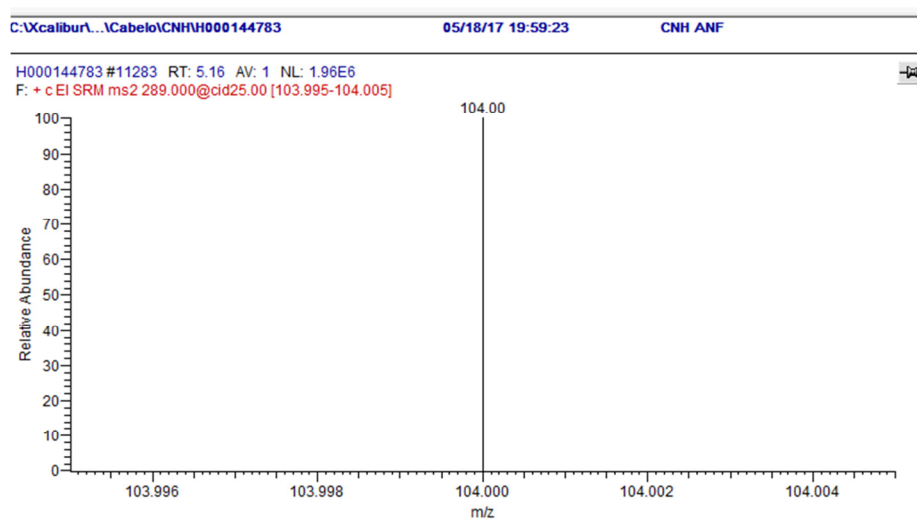


Figura 13. Cromatograma da amostra “J” na transição m/z 289-131 (a) e seu espectro de massa correspondente (b). Cromatograma da amostra “J” na transição m/z 289-104 (c) e seu espectro de massa correspondente (d).

A Tabela 13 lista os resultados de detecção e quantificação referentes à análise da amostra “J”

Amostra:	“J”
Analito identificado:	MDMA
Tempo de retenção (min):	5,16
Concentração (ng/mg):	3,6

Tabela 13: Resultados da análise da amostra “J” por GC-MS/MS