

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

**Desenvolvimento de Novos Métodos Analíticos em
Química Forense e Petroleômica por Espectrometria de
Massas Ambiente (*Paper Spray*) e Espectroscopia Portátil
na Região do Infravermelho Próximo (MICRONIR).**

Eloilson Domingos

Tese de Doutorado em Química

**Vitória
2017**

Eloilson Domingos

Desenvolvimento de Novos Métodos Analíticos em Química Forense e Petroleômica por Espectrometria de Massas Ambiente (Paper Spray) e Espectroscopia Portátil na Região do Infravermelho Próximo (MICRONIR).

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

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química Forense.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

**VITÓRIA
2017**

**Desenvolvimento de Novos Métodos Analíticos em
Química Forense e Petroleômica por Espectrometria de
Massas Ambiente (*Paper Spray*) e Espectroscopia Portátil
na Região do Infravermelho Próximo (MICRONIR).**

Eloilson Domingos

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

Aprovado em 30 de novembro de 2017 por:

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

**Prof. Dr. Ernesto Correa Ferreira
Instituto Federal do Espírito Santo**

**Prof. Dr. Juliano Souza Ribeiro
Instituto Federal do Espírito Santo**

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

**Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, novembro de 2017**

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

Domingos, Eloilson, 1982- B277e
R672e Desenvolvimento de Novos Métodos Analíticos em Química Forense e
Petróleo por Espectrometria de Massas Ambiente por Paper Spray e
Espectroscopia Portátil na Região do Infravermelho Próximo. / Eloilson
Domingos. – 2017. 108 f. : il.

Orientador: Wanderson Romão
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências Exatas.

1. Fonte ambiente. 2. Forense. 3. Espectroscopia de infravermelho próximo. 4.
Espectrometria de massa. 5. Petróleo. I. Romão, Wanderson. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

”Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo”.

(Albert Einstein)

“Aquele que não ama não conhece a Deus; porque Deus é amor”.

(1 João 4:8, Bíblia)

*A Deus,
Minha esposa Fabiane,
Meu filho Miguel.*

AGRADECIMENTOS

“Mesmo que a palavra "obrigado" signifique tanto, não expressará por inteiro o quanto todos estes foram importante para mim.”

A Deus, por ser meu refúgio e fortaleza, socorro presente nas tribulações.

Aos amores da minha vida, minha esposa Fabiane e meu filho Miguel, pelo amor incondicional demonstrado a mim, sou quem sou por que somos uma família.

À minha grande família, minha mãe Graça, meu pai Domingos, meus irmãos Eliane, Eloisio, Nito e Thiago, minhas cunhadas, cunhados, meus sobrinhos, marquinho e Constância; pelo amor, confiança e orações.

Ao amigo e orientador prof. Dr. Wanderson Romão, por confiar a mim tamanha responsabilidade e por doar o seu tempo para a minha formação, sua dedicação é fonte de inspiração.

Ao amigo e Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras por todos os anos de ensinamentos proporcionados a minha formação, por inúmeros tratamentos químiométricos e por fazer parte de todas as etapas desta longa caminhada.

Ao Prof. Dr. Ernesto Correa Ferreira por sua grande contribuição no trabalho de combustíveis juntamente com suas alunas Layla, Stefany e Brenda.

Ao amigo e prof. Dr. Geovane Lopes de Sena, um amigo para todas as horas.

Aos amigos do laboratório de Massas: Lindamara, Lilian, Heloá, Flávia, Nayara, Radigya, Fernanda, Bruno, Rayana, Lívia, Larissa... uma equipe fantástica com qualidades jamais superadas.

Aos amigos Vitor Pegorett, Pedro Vitor, Abel Pazini, Joalbert, Ketiner, Ernane, Ricardo, Ariana, Thiago Limeira, Heloísa, Eliane, Samantha, Cris Sad, Léo e Josiley. Os fardos foram mais leves com vocês ao meu lado!

Ao PPGQUI, UFES, NCQP e Columbia Tecnologia em Petróleo e Serviços SA. por todo apoio prestado na minha formação.

E todos que me incentivaram e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Curriculum Vitae

Formação acadêmica

Doutorando em Química – 2014 a 2017. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória - ES.

Mestre em química – área Físico-Química, 2011. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória - ES.

Bacharel e licenciado em Química, 2008. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória - ES.

Atividades acadêmicas

Artigos publicados durante o doutorado

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

2. DOMINGOS, ELOILSON; DE CARVALHO, THAYS C.; PEREIRA, IGOR; VASCONCELOS, GÉSSICA A.; THOMPSON, CHRISTOPHER J.; AUGUSTI, RODINEI; RODRIGUES, RAYZA R. T.; TOSE, LILIAN V.; SANTOS, HELOA; ARAUJO, JOYCE R.; Vaz, Boniek G.; ROMÃO, Wanderson. Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry - drugs of abuse, inks and questioned documents. *Analytical Methods*, v. 9, p. 4400-4409, 2017.

3. CORREIA, RADIGYA M.; DOMINGOS, ELOILSON; CÁO, VAGNE M.; ARAUJO, BRENDA R.F.; SENA, STHEFANY ; PINHEIRO, LAYLA U. ; FONTES, ANDRÉ M. ; AQUINO, LUIZ FELIPE M. ; FERREIRA, ERNESTO C. ; FILGUEIRAS, PAULO R. ; ROMÃO, Wanderson . Portable near infrared spectroscopy applied to fuel quality control. *TALANTA*, v. 176, p. 26-33, 2017.

4. CORREIA, RADIGYA M.; TOSATO, FLAVIA ; DOMINGOS, ELOILSON ; RODRIGUES, RAYZA R.T. ; AQUINO, LUIZ FELIPE M. ; FILGUEIRAS, PAULO R. ; LACERDA, VALDEMAR ; ROMÃO, Wanderson . Portable near infrared spectroscopy applied to quality control of Brazilian coffee. *TALANTA*, v. 176, p. 59-68, 2017.

5. BESSA, CARLIANI; DE ANDRADE, JEAN; DE OLIVEIRA, RENATA ; DOMINGOS, ELOILSON ; SANTOS, HELOA ; Romão, Wanderson ; BASTIDA, JAUME ; BORGES, WARLEY . Identification of Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) Using CGC-MS and Ambient Ionization Mass Spectrometry (PS-MS and LS-MS). *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 00, p. 1-12, 2016.

6. DOS SANTOS, NAYARA A.; SOUZA, LINDAMARA M.; Domingos, E.; FRANÇA, HILDEGARDO S.; LACERDA, VALDEMAR; BEATRIZ, ADILSON; Vaz, Boniek G.; RODRIGUES, RAYZA R.T.; CARVALHO, VERÔNICA V.; MERLO, BIANCA B.; KUSTER, RICARDO M.; ROMÃO, Wanderson. Evaluating the Selectivity of Colorimetric Test (Fast Blue BB Salt) for the Cannabinoids Identification in Marijuana Street Samples by UV-Vis, TLC, ESI(+)-FT-ICR MS and ESI(+)-MS/MS. *Forensic Chemistry*, v. 1, p. 13-21, 2016.

7. LOPES, E. S.; Domingos, E. ; NEVES, R. S. ; Romão, W. ; SOUZA, K. R. ; VALASKI, R. ; ARCHANJO, B. S. ; SOUZA JR., F. G. ; SILVA, A. M. ; KUZNETSOV, A. ; ARAUJO, J. R. . The role of intermolecular interactions in polyaniline/polyamide-6,6 pressure-sensitive blends studied by DFT and ¹H NMR. *European Polymer Journal*, v. 85, p. 588, 2016.

8. PEREIRA, IGOR ; RODRIGUES, STÉFANY R. M. ; DE CARVALHO, THAYS C. ; CARVALHO, VERÔNICA V. ; LOBÓN, GERMÁN S. ; BASSANE, JOÃO F. P. ; DOMINGOS, ELOILSON ; Romão, Wanderson ; AUGUSTI, RODINEI ; VAZ, BONIEK G. . Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate?. *Analytical Methods (Print)*, v. 8, p. 6023-6029, 2016.

9. CORREIA, RADIGYA , DOMINGOS, ELOILSON, TOSATO, FLÁVIA , ARAUJO, NAYARA , ALMEIDA, JULIA, SILVA, MAYARA, MARCELO, MARCELO, ORTIZ, RAFAEL, FILGUEIRAS, PAULO. ROMÃO, WANDERSON. Portable near infrared spectroscopy (MICRONIR) applied to abuse drugs and medicines analyses. Analytical Methods (SUBMETIDO).

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação esquemática de um Espectrômetro de Massas.	22
Figura 2.2. Ilustração do esquema experimental do método Paper Spray Ionization.	26
Figura 2.3. (A) imagem da formação do cone de Taylor (B) estágios de ionização .	29
Figura 2.4. Tamanho da gota formada em função da distância da ponta do papel em relação à entrada do espectrômetro de massas	30
Figura 2.5. (a) Sprays sobre um substrato de papel retangular. (b) Substratos de papel com diferentes ângulos nas pontas: 30°, 60°, 90°, 120° ou 150°. (c) imagens de Spray gravados para o papel com os ângulos nas pontas de 30°, 60°, 90° e 120°. (e) Intensidade do pico de cocaína íon m/z 182 e (f) corrente do Spray em função da tensão de pulverização.	33
Figura 2.6. Método de aplicação da amostra e solvente desenvolvido por LIU et al.	35
Figura 2.7. Regiões do espectro infravermelho onde ocorrem transições de ligações específicas.	37
Figura 2.8. Equipamento microNIR acoplado a um tablet com o acessório para análise de sólidos em um vial de vidro.....	38
Figura 3.1. Fluxograma de montagem.....	46
Figura 3.2 Dispositivo detalhado	47
Figura 3.3. Acessório para fonte ambiente PS, LS no equipamento FT-ICR da Brucker a) desenho em 3D b) fotografia.	48
Figura 4.1. Espectros de PS(+) -MS (a-d) e ESI-MS (e-h) para quatro amostras de selos contendo 25I-NBOMe.	56
Figura 4.2. Espectros de ESI(+) -MS (a-d) e PS(+) -MS (e-h) para quatro amostras de canabinóides sintéticos contendo os ingredientes ativos JWH-073, 5F-AKB48, JWH-122, JWH-250 e JWH-210 detectados como cátions $[M+H]^+$ e $[2M+H]^+$ onde M corresponde à fórmula molecular.	58
Figura 4.3. (a) Cromatograma para soluções de cocaína (1 a 40 mg mL ⁻¹) em CH ₃ OH:NH ₄ OH (99,5: 0,5 %v/v) revelado com Dragendorf; (b) espectros de PS(+)	

MS a partir dos spots revelados e (c) curva de quantificação para cocaína (detectada como íon $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$ de m/z 304,1547.	59
Figura 4.4. Espectros de LS(+)-MS e PS(+)-MS obtidos diretamente da folha e do extrato da planta <i>Cannabis sativa</i> L. Em ambos os casos, o Δ^9 -THC é detectado como molécula protonada, íon $[M+H]^+$ de m/z 315,2321.	60
Figura 4.5. Curvas de calibração de drogas ilícitas usando PS(+)-MS.	61
Figura 5.1. Folhas 1, 3 e 6 analisadas pela técnica de PS(+)-MS. Repare que a análise é não destrutível, conservando a integridade do papel. O triângulo avermelhado representa o papel utilizado para a extração da tinta em ambiente metanólico.	67
Figura 5.2. Principais corantes utilizados em canetas esferográficas de coloração azul registrados na literatura.	68
Figura 5.3. Espectros de PS(+)-MS de seis diferentes marcas de canetas azuis.	69
Figura 5.4. Análise de PS(+)-MS de cruzamento de traços produzidos por canetas de mesma marca (traço 2 sobre traço 1 usando uma caneta 2). Note que o traço 2 foi produzido em um período de tempo de 7 dias após o traço 1. MODIFICADA	70
Figura 5.5. Estudo de caso: espectros de PS(+)-MS de cinco rubricas analisadas em um documento questionado. Note que das cinco assinaturas, as assinaturas I e II foram realizadas usando a mesma caneta, enquanto que as outras utilizaram canetas diferentes.	72
Figura 5.6. Espectros de PSI(+)-MS de seis rubricas analisadas na folha 3 (terceira folha) do documento.	73
Figura 5.7. Espectros de PSI(+)-MS das assinaturas da última folha do documento.	74
Figura 5.8. Espectro de PS(+)-MS de cédulas de (a) R\$ 100 autênticas, (d-e) falsas e (b-c) homemade a partir das impressoras Deskjet® e Laserjet®.	76
Figura 6.1. PS(+)-MS de quatro medicamentos de emagrecimento de ervas adulterados. [48].	80
Figura 7.1. Acessório para líquidos.	86
Figura 7.2. Original (a, c, e, g) e primeira derivada (b, d, f, h) de microNIR espectros das misturas de biodiesel/Diesel; misturas Diesel S500/S10; Combinação de gasolina/etanol/metanol ternário; e das misturas ternárias etanol/água/metanol, respectivamente.	89

Figura 7.3. Teor de biodiesel nas misturas de biodiesel / Diesel e seu (a) valor previsto a partir do modelo PLS construído com 5 variáveis latentes, bem como seu (b) modelo de resíduos.	91
Figura 7.4. Relação entre o teor de enxofre em amostras de Diesel e seus valores previstos pelo modelo PLS usando o método de validação cruzada repetida. A linha diagonal representa a função $y = x$	92
Figura 7.5. (a) (a) Teste de permutação aplicado na avaliação de tendência do modelo PLS (b) residual do modelo PLS.	94
Figura 7.6. Relação entre referência e valores previstos para a gasolina (a), etanol (b) e metanol (c) conteúdo em gasolina de tipo C usando o modelo PLS.....	95
Figura 7.7. Relação entre a referência e os valores previstos para o teor de etanol (a), água (b) e metanol (c) no combustível EHC usando o modelo PLS.	97
Figura 7.8. VIP versus comprimento de onda de (a) biodiesel/Diesel (b) misturas diesel S500/S10; e de misturas ternais contendo (c) etanol (d) água (e) metanol; e (f) gasolina (g) etanol (h) metanol.	99
Figura A.1. Relação entre valores de referência e preditos pelo modelo PLS usando o método de validação cruzada repetida para (a) gasolina, (b) etanol e (c) conteúdo de metanol em gasolina de tipo c. As barras verticais representam o intervalo de confiança de 95% e a linha diagonal representa a função de identidade.....	125
Figura A.2. Relação entre a referência e os valores previstos pelo modelo PLS usando o método de validação cruzada repetida para (a) metanol, (b) água e (c) conteúdo de metanol no combustível EHC. As barras verticais representam o intervalo de confiança de 95% e a linha diagonal representa a função de identidade.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Métodos de ionização ambiente.....	24
Tabela 4.1. Valores da equação de calibração, R^2 , LD, e LQ para oito drogas ilícitas.	62
Tabela 5.1. Comparação dos valores de R_{II372} com a literatura e a variação esperada desses valores por ano. A variação observada para os valores de R_{II372} para a assinatura do Sr. Paulo foi de 0,08	75
Tabela 7.1. Resultados do modelo de calibração para quantificação de biodiesel em misturas de biodiesel / Diesel.	91
Tabela 7.2. Resultados do modelo de calibração para quantificação de biodiesel em misturas de biodiesel / Diesel e enxofre total em misturas de Diesel usando regressão PLS.....	93
Tabela 7.3. Resultados do modelo de calibração para quantificação de gasolina, etanol e metanol em gasolina de tipo c usando regressão PLS. Portanto, os valores de RMSEP (0,81 a 3,81% m/m), relatados no trabalho, são de acordo com literatura.	96
Tabela A.1. Valores experimentais das composições Diesel/biodiesel.	117
Tabela A.2 Valores experimentais das composições Diesel S10 e S500.....	122
Tabela A.3. Valores experimentais das composições de gasolina, etanol e metanol.	123
Tabela A.4. Valores experimentais das composições etanol, água e metanol.	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

API - *Atmospheric Pressure Ionization*

AP-MALDI-MS - *Atmospheric Pressure Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry*

ASTM – American Society for Testing and Materials

ASAP - *Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe*

CE - Capillary Electrophoresis

DART - Direct Analysis in Real Time

DAPPI - *Desorption Atmospheric Pressure Photon Ionization*

DAPCI - *Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

DESI - *Desorption Electrospray*

EASI - *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization*

EAC - Etanol Anidro

EHF - Etanol Hidratado

ELDI-MS - *Electrospray-Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry*

ESI – Electrospray Ionization

FTIR-ATR – Fourier Transform-Infrared Spectroscopy by Attenuated total reflection

HEAF - Hydrated Ethyl Alcohol Fuel

JWH-122 - 4-methyl-1-naphthyl-1-pentylindol-3-yl-methanone

JWH-250 - 2-(2-methoxyphenyl)-1-(1-pentylindol-3-yl)ethanone

JWH-210 - 4-ethylnaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone

JWH-073 - naphthalen-1-yl-(1-butylindol-3-yl)methanone

5F-AKB48 - n-(adamantan-1-yl)-1-(4-fluorobutyl)-1Hindazole-3-carboxamide

LAESI - *Laser Ablation Electrospray Ionization*

LD – Limite de Detecção

LIF - *Laser-Induced Fluorescence*

LC-ESI-MS - *Liquid Chromatography Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*

LQ – Limite de Quantificação

LS - *Leaf-Spray*

LTP - *Low-Temperature Plasma Ionization*

LVF - Linear-Variable Filter

MS - *Mass Spectrometry*

NAPS-MS - *nib assisted paper spray-mass spectrometry*

m/z – Razão massa/carga

$[M + H]^+$ – Íon Protonado

$\Delta m_{50\%}$ - integral do pico m/z 304

NCQP – Núcleo de Competências em Química do Petróleo.

OMS - Organização Mundial da Saúde

PADI - *Dielectric barrier Discharge Ionization*

PS – Paper Spray Ionization

PLS – Partial Least Squares

RMSE – Root Mean Square Error

RMSEC –Root Mean Square Error of Calibration

RMSECV – Root Mean Square Error of Cross Validation

RMSEP –Root Mean Square Error of Prediction

rdCV - Repeated Double Cross Validation

VIP - Variable Importance in the Projection

VL – Variáveis Latentes

RESUMO

Com o advento de uma nova família de técnicas de ionização, a espectrometria de massas (MS) ambiente foi introduzida como uma maneira simples de gerar íons na MS. Entre elas, a técnica de ionização por “*paper spray*” (PS) demonstrou-se versátil para resolver inúmeros problemas. Neste trabalho, a técnica de PS-MS no modo de ionização positiva (PS(+)-MS) foi aplicada em três subáreas da química forense: drogas de abuso e documentoscopia e ervas fitoterápicas. Na primeira, a técnica PS-(+)-MS determinou o perfil químico de drogas sintéticas tais como selos contendo 25I-NBOMe (2-(4-iodo-2,5-dimetoxifenil)-*n*-[(2-Metoxifenil) metil] etamina), extratos e folhas de canabinóides naturais (Δ^9 -THC) e canabinóides sintéticos (JWH-073; 5F-AKB48; JWH-122; JWH-250; e JWH-210). Em todos os casos, as moléculas foram facilmente detectadas na sua forma protonada ($[M+H]^+$) com resolução, $m/\Delta_{m50\%} = 67,000$ e uma precisão de massa menor que <2 ppm. O desempenho da técnica PS(+)-MS foi comparado com o de outras fontes de ionização: *leaf Spray* (LS-MS) e *electrospray* (ESI-MS). Além disso, um método foi desenvolvido para quantificar uma série de drogas ilícitas (de 1 a 110 $\mu\text{g L}^{-1}$, com linearidade de $R^2 > 0,99$). Em documentoscopia, a técnica PS(+)-MS foi capaz de obter com sucesso o perfil químico de diferentes canetas vendidas no comércio. A intensidade relativa ($R_{I_{372}}$) do corante azul de metileno foi monitorada para discriminar os cruzamentos de traços de canetas e, até a data, os documentos questionados. O perfil químico das notas brasileiras de segunda geração de R\$ 100,00 (reais) também foi explorado. A técnica PS(+)-MS foi capaz de classificar as notas em autêntico ou falsificadas. Constatando que amostras falsas possuem um perfil químico similar às notas caseiras da impressora Deskjet®. Finalmente, aplicamos PS(+)-MS para verificar a autenticidade de ervas usadas para perda de peso. Quinze diferentes medicamentos à base destas ervas foram analisados por PS(+)-MS. Encontrando diferentes tipos de compostos: sibutramina (m/z 280), cafeína (m/z 195), glicose (m/z 203 $[M+Na]$, m/z 219 $[M+K]$) e sacarose (m/z 381 $[M+K]$). Todas essas substâncias não estavam listadas em seus rótulos. Em geral, a técnica PS(+)-MS mostrou ser uma excelente ferramenta analítica em química forense. O segundo estudo abordado foi o controle de qualidade de combustíveis com aplicação do micro-espectrômetro portátil na região do infravermelho próximo (MICRONIR). Neste trabalho, verificou-se a potencialidade do MICRONIR no controle da qualidade do combustível. Assim, modelos quimiométricos (usando o PLS - regressão por mínimos quadrados parciais) foram desenvolvidos para quantificar biodiesel em Diesel ($LD=0,5$ wt%; $LQ=1,8$ wt%, e $RMSEP=1,8$ wt%); enxofre em Diesel ($LD=2,4$ mg L^{-1} ; $LQ=8,0$ mg L^{-1} , e $RMSEP=13,2$ mg L^{-1}); gasolina, etanol e metanol em gasolina tipo C ($LD_{gas}=0,55$ wt%; $LQ_{gas}=1,84$ wt%, e $RMSEP_{gas}=0,81$ wt%; $LD_{et}=0,75$ wt%; $LQ_{gas}=2,50$ wt%, e $RMSEP_{eth}=3,81$ wt%; $LD_{met} = 0,85$ wt%; $LQ_{met} = 2,84$ wt%, e $RMSEP_{met} = 1,80$ wt%); e água, metanol e etanol em etanol combustível hidratado ($LD_{H_2O} = 0,04$ wt%; $LQ_{H_2O}=1,29$ wt%, e $RMSEP_{H_2O}=1,05$ wt%; $LD_{met} = 0,52$ wt%; $LQ_{met} = 1,73$ wt%, e $RMSEP_{met} = 2,78$ wt %; $LD_{et}=1,22$ wt%; $LQ_{et}=4,07$ wt%, e $RMSEP_{et}= 4,41$ wt%). O método proposto apresentou alta precisão e exatidão em todos os casos, e os resultados mostraram que a técnica MICRONIR teve excelente desempenho no controle da qualidade do combustível.

Palavras-chave: *Paper Spray; Droga de abuso; Documentoscopia; PLS; MICRONIR; Controle de qualidade; Combustíveis.*

ABSTRACT

With the advent of a new family of ionization techniques, ambient mass spectrometry (or ambient MS) was introduced as a simple way of generating ions in MS. Among them, the paper spray ionization (PS-MS) technique has demonstrated to be versatile to solve numerous problems in many areas of science. In this work, the PS-MS technique in the positive ionization mode (PS(+)-MS) was applied in three subareas of forensic chemistry: drugs of abuse, documentoscopy, and herbal medicines. In the first, the PS(+)-MS technique was applied to obtain the chemical profiles of illicit drugs such as drug stamps containing 25I-NBOMe, extracts and leaves of natural cannabinoids (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) and synthetic cannabinoids (JWH-073; 5F-AKB48; JWH-122; JWH-250; e JWH-210). In all cases, molecules were easily detected in their protonated form ($[M + H]^+$) with resolution of $m/\Delta m_{50\%}=67,000$ and a mass precision <2 ppm. The performance of the PS(+)-MS technique was compared with other sources of ionization: leaf spray (LS-MS) and electrospray (ESI-MS). In addition, a method was developed to quantify a series of illicit drugs (from 1 to 110 $\mu\text{g L}^{-1}$, with linearity of $R^2 > 0.99$). In documentoscopy, the PS(+)-MS technique was able to successfully obtain the chemical profile of different pens commercially sold in stores. The relative intensity ($R_{II_{372}}$) of the methylene blue dye was monitored to discriminate crossing pen traces and, to date, questioned documents. The chemical profile of second-generation Brazilian notes of R\$ 100.00 (reais) was also explored. The PS(+)-MS technique was able to classify notes into either authentic or counterfeit. Finding that fake samples have a chemical profile similar to the homemade notes of the Deskjet® printer. Finally, PS-MS was applied to verify the authenticity of herbs used for weight loss. Fifteen different herbal medicines were analyzed by PS(+)-MS, substances such as: sibutramine (m/z 280), caffeine (m/z 195), and glucose (m/z 203 $[M + Na]$, m/z 219 $[M + K]$) and sucrose (m/z 381 $[M + K]$) were found in samples where they were not listed in the herbal medicine label. In general, the PS(+)-MS technique proved to be an excellent analytical tool in chemistry forensic. A second study developed was quality control of fuel with the application of the portable micro-spectrometer in the near infrared region (MICRONIR), which has proven to be an excellent analytical technique in the quality control of several products. In this work, the potential of the MICRONIR in the control of fuel quality was verified. Thus, chemometric models (PLS-Partial Least Squares regression) were developed using near-infrared data acquired in the MICRONIR to determine the amount of biodiesel in Diesel (LOD=0.5 wt%; LOQ=1.8 wt%, RMSEP=1.8 wt%); sulfur in Diesel (LOD=2.4 mg L⁻¹; LOQ=8.0 mg L⁻¹, RMSEP=13.2 mg L⁻¹); gasoline, ethanol and methanol in gasoline type C (LOD_{gas}=0.55 wt%; LOQ_{gas}=1.84 wt%, RMSEP_{gas}=0.81 wt%; LOQ_{gas}=2.50 wt%, RMSEP_{eth}=3.81 wt%, LOD_{met} = 0.85 wt% LOQ_{meth} = 2.84 wt%, RMSEP_{meth}=1.80 wt% ; and water, methanol and ethanol in ethanol hydrated fuel (LOD_{H2O}=0.04 wt%; LQ_{H2O}=1.29 wt%, RMSEP_{H2O}=1.05 wt% ; , LOQ_{meth}=1.73 wt%, RMSEP_{meth}=2.78 wt%). The proposed method presented high precision and accuracy in all cases, and the results showed that the MICRONIR technique had excellent performance in the control of fuel quality.

Keywords: Paper Spray; PS-MS; Abuse drug; Documentoscopy; PLS; MICRONIR; Quality Control; Fuel.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Espectrometria de massas	22
2.2 Fonte de Ionização	23
2.3 Fonte de Ionização Ambiente	23
2.4 Paper Spray Ionization	26
2.5 A espectroscopia no infravermelho próximo.	36
2.6 Quimiometria	40
3. CONSTRUÇÃO DE UMA FONTE HOMEMADE DE PS-MS	44
3.1 Introdução	44
3.2 Objetivo	45
3.3 Construção do dispositivo de PS-MS	45
3.4 Descrição do dispositivo	46
3.5 Conclusão	48
4. PS-MS: APLICAÇÃO NA ANÁLISE DE DROGAS DE ABUSO.	49
4.1 Introdução	49
4.2 Objetivos	51
4.3 Metodologia	51
4.3.1 Materiais e Reagentes	51
4.3.2 Preparo das amostras	52
4.4 Resultados e discussão	55
4.4.1 Drogas de Abuso	55
4.5 Conclusão	62
5. PS-MS: APLICAÇÃO EM DOCUMENTOSCOPIA.	63
5.1 Introdução	63
5.2 Objetivos	65
5.3 Metodologia	65
5.3.1 Materiais e Reagentes	65
5.3.2 Preparo das amostras	65

5.4	Resultados e discussão	68
5.4.1	Documentoscopia.....	68
5.5	Conclusão	76
6.	PS-MS: APLICAÇÃO EM PLANTAS FITOTERÁPICAS.	78
6.1	Introdução	78
6.2	Objetivos	79
6.3	Metodologia.....	79
6.4	Resultados e discussão	79
6.5	Conclusão	80
7.	MICRONIR APLICADO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE COMBUSTÍVEIS	82
7.1	Introdução	82
7.2	Objetivos	84
7.3	Metodologia.....	84
7.3.1	Preparação da Mistura	84
7.3.2	MicroNIR	85
7.3.3	Análise quimiométrica	86
7.4	Resultados e discussões.....	87
7.4.1	Quantificação de biodiesel em misturas de biodiesel/Diesel	89
7.4.2	Quantificação Diesel S500/Diesel S10	92
7.4.3	Quantificação de gasolina/metanol/etanol.....	94
7.4.4	Quantificação de etanol/água/metanol	96
7.5	Conclusões	100
8.	REFERÊNCIAS	101
9.	ANEXOS	117

1. INTRODUÇÃO

A simplificação no pré-tratamento da amostra possui como benefícios a redução do tempo gasto nessa etapa; diminuição da exposição a reagentes tóxicos; menor perda de analito; menor geração de resíduos. Porém, um método analítico de análise direta para ser aplicado exige a criação de modelos quimiométricos específicos para cada tipo de amostra, para evitar que o efeito matriz se torne relevante a ponto de inviabilizar o método.

A busca por métodos de análise qualitativa e quantitativa que reduza ou elimine etapas de preparação das amostras; proporcione a redução dos custos das análises; apresente resultados mais rápidos e com confiabilidade equiparada aos métodos consolidados tem se tornado de grande relevância para a sociedade pós-moderna.

Nos últimos anos houve um avanço expressivo na instrumentação analítica, e a espectrometria de massa (MS) tem acompanhado este progresso devido à revolução nos mecanismos de ionização, proporcionando a identificação de substâncias complexas e de alta massa molecular. O método *paper spray* (PS) *ionization* tem sido utilizado para diferentes análises diretas: sangue bovino, sangue humano, urina, saliva, colônia de bactérias, colônia de fungos, microalgas, monitoramento de reações, resíduo de cocaína, diversos tipos de alimentos e bebidas, canetas, pigmentos, entre outros abordados na revisão de Klampfl e Himmelsbach[1]. Os estudos mostram a identificação de inúmeros tipos de moléculas (LSD, DOC, NBOMe, peptídios, nucleotídeos, hemoglobina, fosfolipídios, lidocaína, verapamil, nicotina, subitinib, tiabendazol e outros) e até átomos, como é o caso do trabalho de Cody e Dane [2] na identificação de 21 tipos de metais. Já a espectroscopia no infravermelho próximo, com um equipamento portátil (MICRONIR), tem possibilitado o monitoramento de processos, caracterização e identificação de adulterantes em fármacos, resultando no controle de qualidade de produtos, reduzindo assim, o tempo e custo de análise em diferentes indústrias[3–5]. Recentemente, o instrumento MICRONIR foi aplicado na área de química forense, como: na classificação de diferentes espécies de drogas psicoativas [6]; na classificação e quantificação de óleo vegetal adulterado com banha de porco[7]; e

na detecção de adulteração de diferentes combustíveis [5,8,9]. Em geral, os modelos quimiométricos possibilita a construção de modelos para classificação, quantificação e acompanhamento de processos.

Neste trabalho foi construído um dispositivo que viabiliza a utilização de diferentes fontes de ionização ambiente em espectrometria de massas para a utilização da fonte *Paper Spray* e *Leaf Spray* como métodos analíticos diretos em três diferentes grupos de amostras (Drogas de abuso, Documentoscopia e Medicamentos fitoterápicos). De forma inovadora, foi utilizado o MICRONIR em análises direta em diferentes amostras de combustíveis (gasolina, etanol e metanol; etanol, metanol e água; Diesel S10 e S500; biodiesel e Diesel). A potencialidade de cada método foi devidamente verificada fazendo uso de ferramentas quimiométricas nos casos mais adequados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS) é uma técnica analítica que ioniza e separa moléculas ou átomos pela medida da relação massa/carga (m/z) de seus íons. Destaca-se entre os equipamentos como uma ferramenta analítica importante devido a sua sensibilidade, velocidade de análise, limite de detecção e diversidade de aplicação. Além disso, a espectrometria de massas é capaz de determinar a composição elementar, estrutura molecular, análise qualitativa e/ou quantitativa, e o padrão isotópico em amostras de alta complexidade. [10]

Um espectrômetro de massas é composto de quatro partes principais (**Figura 2.1**): um sistema de introdução de amostra, que pode ser por inserção direta ou utilizando alguma técnica de separação; uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Enquanto a fonte de ionização converte moléculas em íons, o analisador de massas resolve estes íons em função da sua relação massa/carga (m/z) e posteriormente são medidos pelo detector. [11]

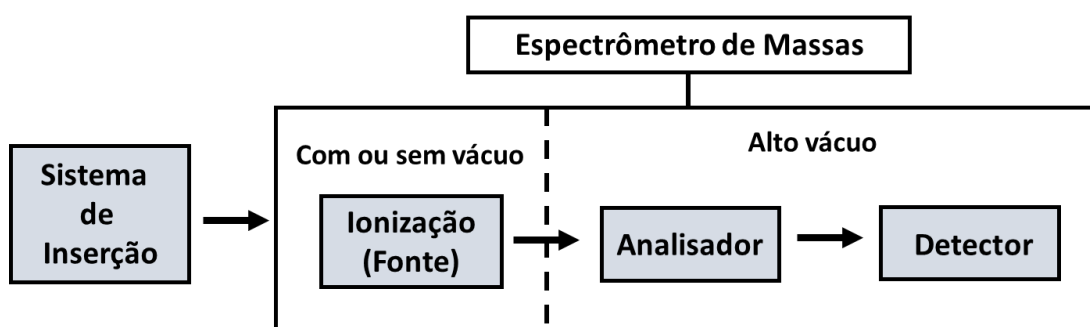


Figura 2.1. Representação esquemática de um Espectrômetro de Massas. MODIFICADA[11].

2.2 Fonte de Ionização

A espectrometria de massas é uma técnica que a geração de íons na fase gasosa na fonte de ionização, são detectados conforme sua razão massa/carga (m/z). As fontes de ionização são essenciais na espectrometria de massas, visto que a técnica não analisa moléculas ou átomos neutros, e sim íons. Inúmeros métodos para geração de íons foram desenvolvidos ao longo da história da espectrometria de massas com diferentes formas de ionização [10]. Desse modo, há métodos de ionização aplicáveis a uma grande variedade de analitos, desde moléculas apolares e voláteis (como a *electron ionization* (EI), ou a *chemical ionization* (CI)) passando por moléculas polares e de alta massa molar (como a *ionization eletrospray* (ESI), e *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI)), até técnicas de ionização ambiente como a *direct analysis in real time* (DART), *desorption electrospray* (DESI) e *easy ambient sonic-spray ionization* (EASI), que tornaram a introdução da amostra em MS mais simples e prática[12].

A fonte de ionização deve possuir as seguintes características: (1) elevada eficiência de ionização (requisito para sensibilidade de detecção elevada), (2) um feixe de íons estável, (3) um espalhamento de baixa energia no feixe de íons secundários, (4) corrente de íons de fundo mínimo e (5) contaminação cruzada mínima entre amostras sucessivas.

2.3 Fonte de Ionização Ambiente

O primeiro componente de um espectrômetro de massas é a fonte geradora dos íons a serem analisados. Neste local há diversas maneiras de ionizar as substâncias de interesse, sendo um grande desafio a obtenção de um único tipo de fonte que ionize qualquer tipo de molécula. A simplicidade de operação, rapidez na obtenção dos dados, baixo custo na análise e por ser realizada em condições de ambientes sem a necessidade de vácuo são os principais motivadores de inúmeras pesquisas[12–15]. Estas fontes são reconhecidas como ambientes e sua importância na espectrometria de massa pode ser entendida pelas pesquisas já realizadas e de

áreas ainda não exploradas[1,14]. As fontes ambientes podem ser subdivididas em quatro métodos básicos de ionização: (1) Spray, (2) Plasma, (3) Laser e (4) Inlet, que podem gerar uma variedade maior de fontes. Na **Tabela 2.1** são apresentadas algumas destas fontes. Monge *et al.*[12] até o ano de 2013 registou em sua pesquisa mais de 40 tipos de fontes ambientes.

Tabela 2.1. Métodos de ionização ambiente.

Método de Ionização	Fontes Ambientes	Siglas
<i>Spray</i>	<i>Desorption electrospray ionization</i> [15] <i>Easy ambient sonic-spray ionization</i> <i>Paper Spray Ionization</i> [16] <i>Leaf Spray</i>	DESI EASI PS LS
<i>Plasma</i>	<i>Direct Analysis in Real Time</i> <i>Low Temperature Plasma</i> <i>Desorption Atmospheric Pressure</i> <i>Chemical Ionization</i>	DART LTP DAPCI
<i>Laser</i>	<i>Electrospray-assisted Laser</i> <i>Desorption/Ionization</i> <i>Laser Ablation Electrospray Ionization</i> <i>Matrix-Assisted Laser Desorption</i> <i>Electrospray Ionization</i>	ELDI LAESI MALDESI
<i>Inlet</i>	<i>Matrix Assisted Inlet Ionization</i>	MAII

Um marco importante no aparecimento das fontes ambientes foi o trabalho de Fenn *et al.*[17] em 1989 com o desenvolvimento da ionização por *electrospray* (ESI). Esta técnica permitiu uma nova visão da forma de ionização na espectrometria de massa na análise de biomacromoléculas. Porém, existem amostras em que o efeito matriz interfere significativamente, assim não produz bons resultados no ESI, que torna um grande desafio à análise direta de amostras complexas.

O primeiro trabalho a se destacar com uma fonte ambiente foi o de Cooks *et al.* [15] em 2004, que desenvolveram uma fonte de ionização ambiente especial denominada de DESI (*Desorption Electrospray Ionization*) com base na ESI. Neste artigo, os autores apresentaram uma nova perspectiva para as análises qualitativas

e quantitativas na espectrometria de massas. Esta fonte parte de uma análise direta da superfície de uma amostra sólida sem a extração prévia das moléculas de interesse ou qualquer outro pré-tratamento da amostra. Em seu trabalho é mencionada a aplicação para diferentes tipos de analitos, desde aminoácidos simples a moléculas mais complexas como: alcalóides, terpenóides e esteróides, peptídeos e proteínas. Os autores[15] também já previam sua aplicação para a área de forenses e de segurança pública, incluindo análise de sangue seco a detecção de explosivos.

Com a mesma filosofia de análise em abril de 2005, Cody *et al.*[18] publicaram um estudo com uma fonte de íons denominada “análise direta em tempo real” (DART) demonstrando a versatilidade desta fonte para a análise rápida na superfície das amostras sem nenhum pré-tratamento. Os autores aplicaram o método a superfícies de centenas de produtos químicos polares e apolares incluindo fármacos, metabolitos, peptídeos e oligossacarídeos, compostos orgânicos sintéticos e organometálicos, drogas de abuso, explosivos e produtos químicos tóxicos industriais, concreto, asfalto, pele humana, moeda, frutas, vegetais, especiarias, bebidas, fluidos corporais, plásticos, folhas hortícolas e outros tipos de amostras. Em seu trabalho foi explorada também a identificação do *gamma hidroxibutirato* (GHB), um depressivo conhecido como "droga de estupro" que é oferecido em bebidas alcoólicas às vítimas.

Entre os anos de 2005 a 2009 após o aparecimento das fontes DESI e DART mais de 20 outras fontes ambientes surgiram, sendo algumas delas derivações das fontes ESI, APPI e APCI[14,16,19–22], até que surgisse em 2010 a fonte *paper spray ionization*.

2.4 Paper Spray Ionization

Em 2010 He Wang *et al.*[16] sob a orientação do professor Cooks desenvolveram um novo método de ionização ambiente em espectrometria de massa, denominada “*Paper Spray Ionization*” (PS). O método consiste na aplicação da amostra sobre um papel triangular, fixado a uma garra e umedecido com um solvente apropriado. Logo após, o papel é posicionado na entrada do espectrômetro e para a formação do spray é aplicada uma tensão entre 0-5 kV sem a utilização de gás (**Figura 2.2**). A geração de íons no PS e no ESI possuem o mesmo padrão de formação, em que uma solução é submetida a um *spray* eletrolítico e a uma pressão atmosférica no formato similar ao cone de Taylor relatado por Fenn na fonte ESI[17]. A diferença elevada do potencial faz com que as gotas formadas passem a possuir um excesso de carga positiva (ou negativa), com a evaporação do solvente o volume da gota vai se reduzindo a ponto de haver a molécula isolada e carregada[23].

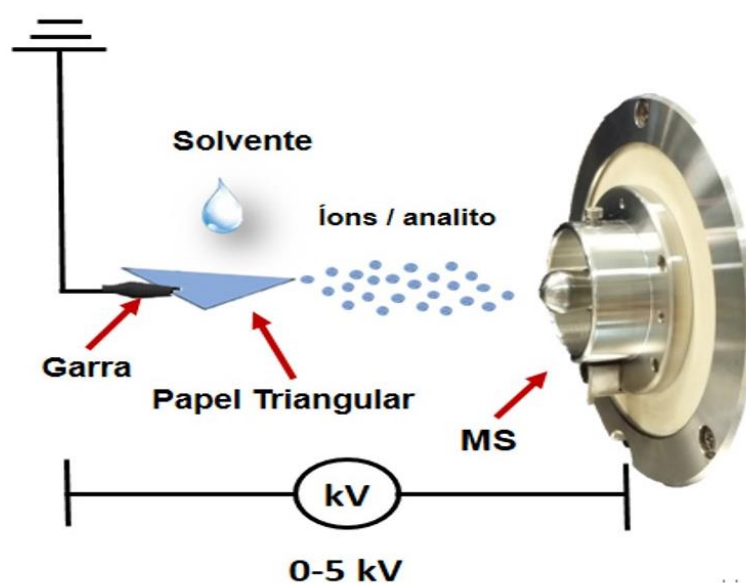


Figura 2.2. Ilustração do esquema experimental do método *Paper Spray Ionization*.

Wang *et al.*[16] investigaram seis tipos diferentes de papéis: 4 tipos de papéis de filtro com diferentes diâmetros de poros, um papel cromatográfico e um papel de fibra de vidro, sendo este o único diferente de celulose. O papel cromatográfico apresentou os melhores resultados, enquanto o de fibra de vidro apresentou a pior

performance na geração dos perfis químicos e na razão sinal ruído. Neste trabalho os autores analisaram a droga terapêutica *imatinib* (Gleevec) usada no tratamento de leucemia mielóide crônica, que por sua vez só é eficaz em uma estreita faixa de concentrações. Os autores utilizaram sangue bovino seco, sendo adicionadas diferentes concentrações de *imatinib* para construção de uma curva analítica, visando demonstrar a sensibilidade do método PS com a variação do analito em uma mistura complexa.

No mesmo ano Liu *et al.*[24], inspirados pelos resultados obtido pelo grupo, publicaram um estudo da relação do tempo de spray, a evaporação do solvente e do volume de amostra aplicada durante o spray. Constatou-se que a análise realizada logo após a aplicação do analito é diferente da análise após a secagem da amostra, pois o analito move-se até a ponta do papel triangular por capilaridade enquanto a amostra está secando. Assim, foi desenvolvido neste estudo um método para aumentar o tempo de análise com a inibição da evaporação do solvente utilizado, que consistia na aplicação de um filme polimérico de PTFE (Politetrafluoretileno) sobre o triângulo de papel enquanto se esperava o tempo de secagem antes de ser posicionado em frente ao MS. Este estudo foi aplicado na identificação de heroína em urina seca, em fármacos terapêuticos (foram identificados no modo positivo: serina, 2-9 bradicinina, citocromo C, atrazina, roxitromicina e no modo negativo o ácido esteárico) e em manchas secas de sangue bovino e dos fungicidas *imazalil* e tiabendazol na casca do limão, os quais apresentaram resultados promissores.

Ainda em 2010, Manicke *et al.*[25] desenvolveram o primeiro trabalho quantitativo com PS, sendo utilizados os fármacos propranolol (PRN) e atenolol (ATN) em amostras de sangue bovino seco, que apresentou potencial quantitativo para o método PS em análises de moléculas pequenas com a utilização de padrão interno. No ano seguinte, Manicke *et al.*[26] publicaram outro trabalho de quantificação pelo método PS. Foram investigados os limites de detecção para um conjunto de 15 medicamentos terapêuticos quimicamente diferentes, sendo detectadas com 1 ng mL^{-1} aproximadamente. As concentrações dos fármacos foram mensuradas quantitativamente em várias ordens de grandeza, com precisão e desvio padrão dentro de 10%, sendo utilizado uma solução padrão interna do próprio analito no papel antes da aplicação da amostra de sangue para garantir uma referência única ao longo da curva analítica construída. Os dados analíticos obtidos

de alta qualidade indicaram que a técnica é uma opção viável no monitoramento de medicamentos terapêuticos detectáveis nesta faixa de concentração próxima de 1 ng mL⁻¹.

Li *et al.*[27], com o interesse em variar as aplicações do PS, usaram solventes apolares, hexano e tolueno, em analitos, como: peptídeos, nucleotídeos, fosfolipídios e derivados do colesterol e verificaram o perfil de formação dos íons por PS. Os resultados foram comparados com o método ESI. Concluindo que o PS independe do solvente da solução contendo analito para que ocorra de forma eficaz a ionização; enquanto o ESI depende da mistura de solventes com diferentes polaridades para ter respostas de íons mais polares.

Zhang *et al.*[28] verificaram em seus estudos a influência do solvente na intensidade do sinal de drogas terapêuticas em amostras de sangue. Para isso, os autores trabalharam com papel grade SG81 revestido com sílica visando bloquear os microporos do substrato celulósico, proporcionando uma melhor eluição dos analitos na análise de fármacos com diferentes solventes (água, hexano, diclorometano, metanol, etanol, isopropanol e butanol) e algumas misturas de solventes (diclorometano/isopropanol 9:1 (V/V); metanol/água 9:1(V/V)). Foi constatado pelos autores que o papel grade SG81, utilizando amostras de sangue secas em DBS (*Dried Blood Spots*), alcançou maior sensibilidade de análise de 5 a 50 vezes para análise dos fármacos verapamil, citalopram, amitriptilina, lidocaína e sunitinib quando comparados aos papéis cromatográficos Grade 4 e cromatográfico Grade 31ET. Foi verificada a dependência da eficiência na ionização com a polaridade e a volatilidade do solvente na formação do *spray*; em alguns casos a mistura de solventes com polaridades e volatilidades diferentes apresentou melhora no processo. A eficiência da recuperação dos analitos, com o papel revestido por sílica, foi significativamente melhorada, gerando um limite de quantificação (LQ) para a análise dos fármacos de 0,1 ng mL⁻¹, usando um espectrômetro de massa triplo quadrupólo comercial. Ainda neste manuscrito Zhang *et al.*[28] testaram o PS em um espectrômetro de massa portátil (Mini 11) alcançando resultados de LQs na faixa de 10-20 ng mL⁻¹ para os medicamentos testados, o que é suficiente para cobrir as necessidades de acompanhamento terapêutico desses medicamentos. Em 2015 Ma *et al.* [29] utilizaram o espectrômetro Mini 12 para a quantificação de canabinóides sintéticos, apresentando bons resultados para a finalidade de um equipamento portátil.

Espy *et al.*[30] estudaram o mecanismo da ionização do PS com imagens de alta resolução possibilitando o dimensionamento das gotas formadas. Uma de suas constatações é a confirmação da formação do spray na forma de um cone de Taylor (**Figura 2.3 A**), semelhantemente apresentado no ESI[17]. Foram observados pelos pesquisadores dois estágios de ionização em função da dimensão das gotículas formadas durante o consumo de solvente (**Figura 2.3 B**). Estes diferentes estágios de spray foram correlacionados aos padrões de ionizações adquiridos, sendo o primeiro com o fluxo de solvente mais elevado, formando múltiplos *sprays* com baixa corrente e de fácil aquisição dos espectros. Diferentemente, o segundo estágio do spray foi formado por um único cone com corrente mais elevada e de maior dificuldade na aquisição dos sinais.

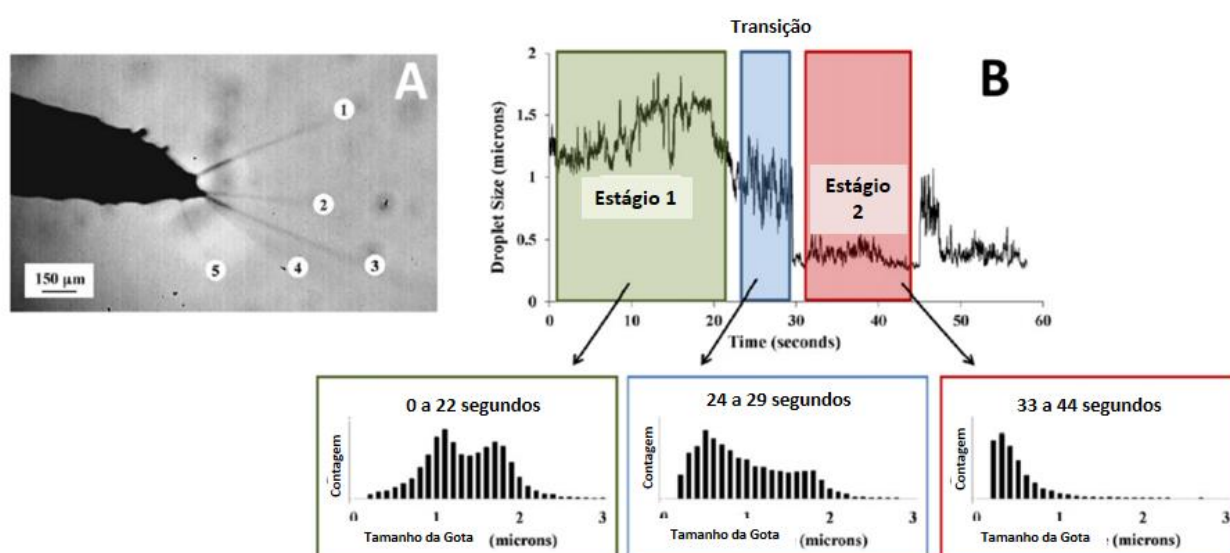


Figura 2.3. (A) imagem da formação do cone de Taylor (B) estágios de ionização (MODIFICADA)[30].

Conforme os autores, os tamanhos das gotas foram correlacionados com suas respectivas velocidades para o estágio 1 de ionização (**Figura 2.3 B**). Os resultados foram obtidos por um PDPA (*Particle Doppler Phase Anemometer*) mostrando que, independentemente do tamanho, cada gota possuía uma mesma distribuição de velocidade. Fenômeno atribuído à densidade de carga constante nas

gotas, por estarem sendo aceleradas dentro de um mesmo campo, entre o papel e a entrada do MS, que por sua vez é proporcional à tensão aplicada[30].

Outra informação adquirida a partir dos experimentos pelo grupo de Espy[30] foi que a formação e a estabilidade do spray é influenciada pelas orientações das fibras do papel na ponta do triângulo formado. Ainda neste estudo, foi apresentada a distância ótima da ponta do papel em relação à entrada do MS como sendo entre 4-5mm de distância (**Figura 2.4**), pois acima desta distância, os íons chegam em menor quantidade no analisador e com tamanho de gota maior na entrada do espectrômetro de massas, havendo assim maiores perdas por evaporação.

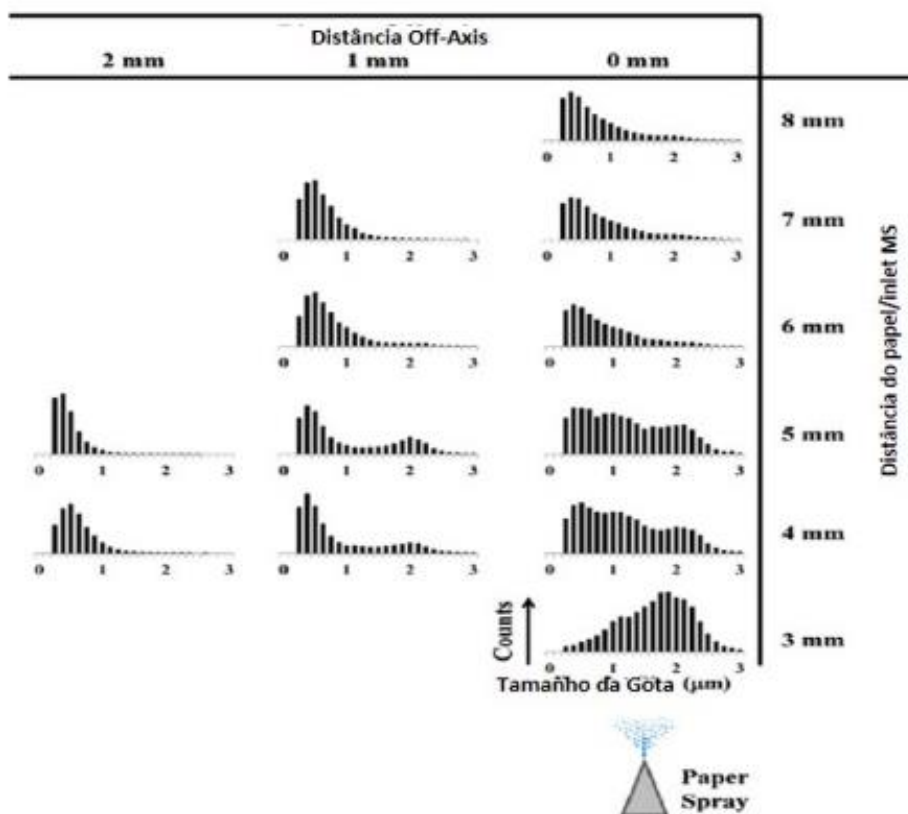


Figura 2.4. Tamanho da gota formada em função da distância da ponta do papel em relação à entrada do espectrômetro de massas [30]

Uma importante variável na elucidação do processo de ionização ocorrida no PS é quanto à qualidade do papel utilizado. A formação estrutural do papel é basicamente de celulose e hemicelulose, predominando em sua superfície grupos hidroxilas com interações fortes a moderadas, exercendo a função de separação

cromatográfica dos diferentes compostos de acordo com sua polaridade. O PS pode ser considerado como um processo que ocorre em três passos sobre o substrato: extração, transporte/separação e ionização dos analitos. Na etapa de extração, os analitos de interesse e outros compostos químicos da matriz são retirados da amostra pelo solvente de eluição sobre o substrato, como um ponto de sangue seco ou uma amostra de tecido biológico. As diferenças na eficiência de extração são dependentes das propriedades químicas dos analitos em termos da interação com o substrato e sua dissolução no solvente. As espécies químicas são discriminadas pela migração do solvente ao longo do campo elétrico, e então transportadas em direção à ponta do papel onde se forma o spray. A separação cromatográfica que ocorre no papel durante o transporte é devido às diferenças nas interações amostra-substrato. A separação pode potencializar a sensibilidade da análise, mas também pode causar a perda dos analitos. Este processo também pode ser altamente afetado pelos meios de aplicação do solvente[31].

Ren *et al.*[31] investigaram os impactos realizados por diferentes substratos, solventes e o método de eluição sobre a ionização das amostras de sangue. Os autores estudaram a ionização da hemoglobina a partir de amostras de sangue fresco em papel silanizado e a partir de manchas de sangue seco em papel revestido de sílica. Estudando também o processo de separação na superfície do substrato com a mistura dos pigmentos orgânicos violeta de metilo 2B e azul de metileno. O modo de aplicação do solvente de spray foi encontrado com significativo impacto na separação. Os resultados deste estudo levaram a uma melhor compreensão da eluição do analito, separação no papel, bem como os processos de ionização do papel spray.

Su *et al.*[32] realizaram um tratamento do papel com água, HNO₃ ou NaClO a fim de eliminar resíduos químicos provenientes da fabricação do papel, que possam interferir na análise. O tratamento do papel com água não demonstrou melhorias significativas para diminuição da interferência. Com HNO₃, apresentou uma melhora significativa, mas com ruídos presentes. Porém, com NaClO, mostrou ser o melhor tratamento, por não apresentar nenhum traço de interferentes[32]. A comparação da relação sinal-ruído de benzoilecgonina(Ben), oxicodona (Oxy) e buprenorfina (Bup) antes e depois do tratamento com as soluções aquosas de HNO₃ e NaClO

apresentaram um aumento significativo devido à diminuição do ruído presente na superfície do papel cromatográfico 31ET sem tratamento.

Outros autores estudaram o PS com papel revestido de grafeno mesoporoso[33]. Devido a boa condutividade elétrica deste material, houve a diminuição da tensão aplicada, sua alta área superficial específica melhorou a eficiência de separação e as propriedades eletrostáticas características do grafeno atribuíram melhora significativa na eluição. Este PS modificado foi usado com sucesso para análise de anfetaminas em um pequeno volume de amostra (0,5 μL) de saliva. Os resultados de LQ abaixo de 1 pg mL^{-1} para o PS revestido de grafeno foram 10 vezes melhores quando comparados ao papel cromatográfico, que podem ser analisados imediatamente após a aplicação rápida sem nenhum pré-tratamento da amostra.

Um método utilizado por Carvalho *et al.*[34] é a implementação de uma barreira de parafina impressa sobre o papel cromatográfico de forma simples, rápida e barata. Em seu trabalho foram avaliadas as condições típicas de operação com o PS, tais como o volume de solvente aplicado na superfície do papel e o tipo de substrato do papel. Quando comparado o PS com barreiras de parafina ao papel convencionalmente usado e o papel com dois cantos arredondados, para amostras de licores de um processo de etanol de segunda geração, açúcares e seus inibidores no bagaço de cana-de-açúcar, o desempenho do PS com barreira de parafina provou ser excelente, apresentando bons resultados para a quantificação de glicose em licores de hidrólise com linearidade ($R^2 = 0,99$), limites de detecção (2,77 mmol L^{-1}) e quantificação (9,27 mmol L^{-1}).

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade, o tempo do *spray*, a estabilidade do sinal, a diminuição da evaporação, dentre outros fatores, o trabalho de Yang *et al.*[35] tem o foco na compreensão da ionização por PS, desenvolvendo um suporte para posicionar o papel com o propósito de diminuir a evaporação, fixando a aplicação da amostra e do solvente sobre o papel, aumentando o campo elétrico na ponta do papel à frente do *MS Inlet* e, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade da técnica do PS. Outros parâmetros foram analisados, entre eles se destacam: ângulo da ponta do papel triangular; a voltagem aplicada ao papel; intensidade de corrente iônica total; posicionamento do papel em relação ao *MS Inlet* e à tensão aplicada. O número de íons que entra no espectrômetro de massas

depende do diâmetro do cone de Taylor, que atinge sua condição ideal quando o ângulo da ponta do papel está próxima de 60° (**Figura 2.5**). Já a tensão aplicada ao papel, que pode variar de 0 a 5 kV[36,37], possui uma relação direta com o diâmetro do cone de Taylor produzido, sendo um parâmetro relevante. A intensidade de corrente iônica total também é influenciada pelo ângulo do papel, atingindo seu máximo entre 30° e 90°.

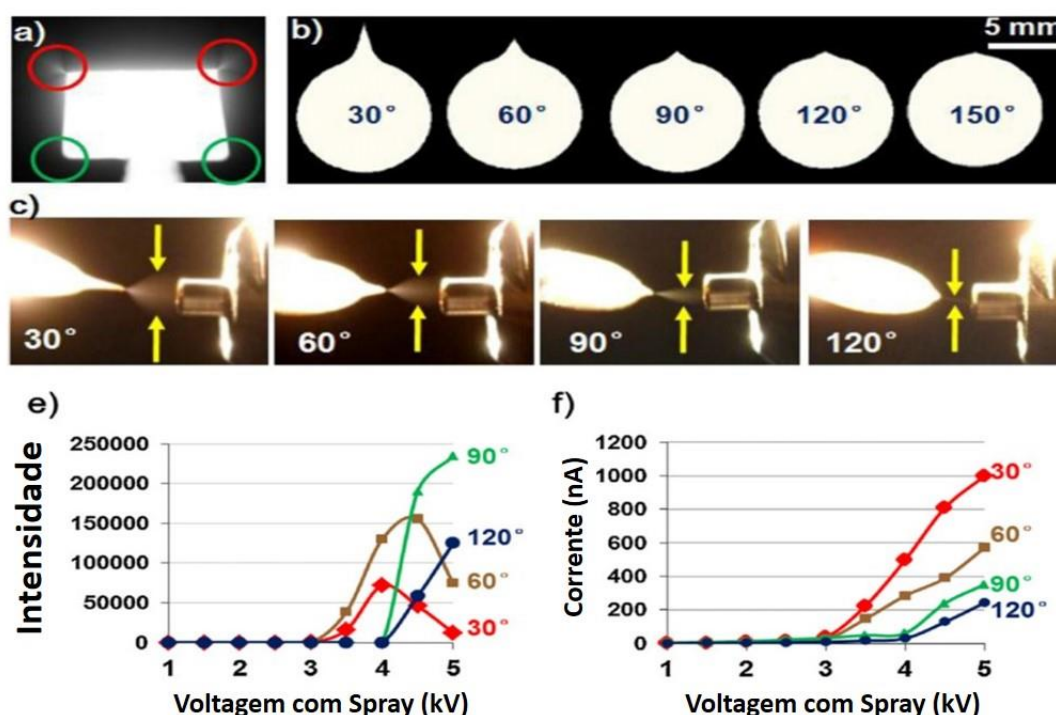


Figura 2.5. (a) Sprays sobre um substrato de papel retangular. (b) Substratos de papel com diferentes ângulos nas pontas: 30°, 60°, 90°, 120° ou 150°. (c) imagens de Spray gravados para o papel com os ângulos nas pontas de 30°, 60°, 90° e 120°. (e) Intensidade do pico de cocaína íon m/z 182 e (f) corrente do Spray em função da tensão de pulverização. [35]

Outro grupo de pesquisadores desenvolveram um suporte que possibilitava colocar sobre o papel um fluxo constante de solvente por meio de uma bomba acoplada a uma seringa, resultando em um aumento no tempo do *spray*[38]. Neste estudo, foram selecionados os compostos modelo *o*-, *m*-, *p*-cloroanfetamina e *o*-, *m*-, *p*-fluoroanfetamina em saliva humana para serem comparados pelos métodos de ionizações nas fontes AP-MALDI-MS (*Atmospheric Pressure Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry*), ELDI-MS (*Electrospray-Assisted Laser*

Desorption Ionization-Mass Spectrometry) e NAPS-MS (*nib assisted paper spray-mass spectrometry*). Estes três métodos foram comparados aos métodos CE (Capillary Electrophoresis) com os detectores UV, LIF (*Laser-Induced Fluorescence*) e MS (*Mass Spectrometry*) separadamente e LC-ESI-MS (*Liquid Chromatography Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*). A fonte NAPS-MS apresentou os menores valores de limite de detecção para todos os analitos, sendo amplamente recomendada pelos autores para quantificação de drogas ilícitas e terapêuticas. Com o mesmo propósito Salentijn *et al.*[39] desenvolveram em uma impressora 3D um cartucho de ionização por PS com aplicação de solvente de forma rápida e um fornecimento contínuo de solvente durante a análise. O cartucho de material de suporte para o PS foi aplicado à análise de lidocaína como forma demonstrativa.

Espy *et al.*[40] desenvolveram um dispositivo para a realização da ionização por PS, possibilitando a aplicação da amostra e do solvente de forma precisa e sistemática, garantindo, assim excelentes valores de repetitividade e reprodutibilidade nas análises, sendo demonstrado que um arranjo experimental mais adequado torna mais viável trabalhos com quantificação. Em seu trabalho foram quantificadas anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioxi-N-metilanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxi-N-etilanfetamina (MDEA), morfina e cocaína, e Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). Os limites de detecção para todas as drogas ficaram abaixo dos níveis fisiológicos e toxicológicos típicos.

No trabalho de Liu *et al.* foi desenvolvido um método para a aplicação da amostra e do solvente por um tubo capilar sob a ação da gravidade e a atração eletrostática (**Figura 2.6**). A partir deste método, com o controle dos volumes de amostra e solvente por capilares diferentes e o tempo de aquisição, os autores monitoraram a reação de condensação amina-aldeído de butilamina em benzaldeído e a distribuição de moléculas em frutos demonstrando um grande potencial na aplicação desta abordagem[41].

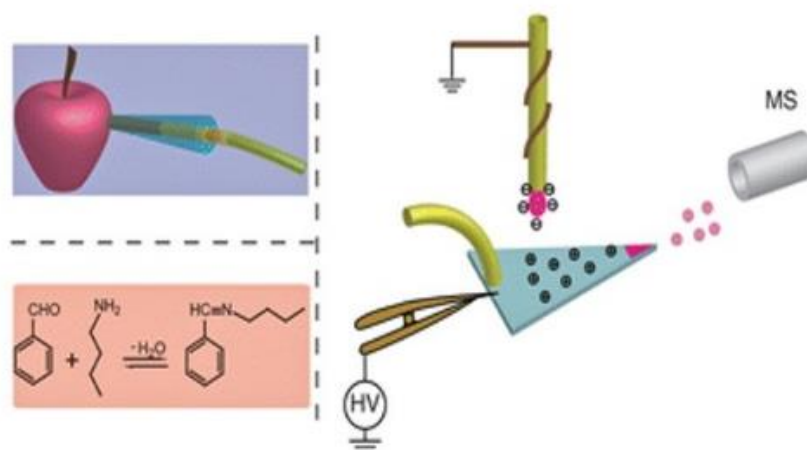


Figura 2.6. Método de aplicação da amostra e solvente desenvolvido por LIU *et al.* [41].

Pei *et al.*[42] desenvolveram um método de ionização para o acompanhamento de intermediários de reações químicas orgânicas, denominado “PATI” (*Paper Assisted Thermal Ionization*), sendo possível controlar a temperatura ao longo da análise. As reações estudadas foram (1) Metilação de Eschweiler-Clarke em alta temperatura e (2) dioxigenação de alceno à temperatura ambiente, sendo demonstrado o potencial do método PS no acompanhamento de reações online com controle de temperatura.

Baseados na PS Zhang *et al.*[43] desenvolveram um método de análise direta do analito em sua matriz nativa, sem precisar transferi-lo para um substrato, no caso o papel. Esse método é o *Leaf Spray* (LS), que ao invés de aplicar a alta voltagem no papel triangular com amostras, aplica-se na folha da planta. Em seus estudos foram testados uma série de solventes orgânicos com diferentes polaridades e constantes dielétricas, como: metanol, diclorometano, hexano, acetonitrilo, acetona e clorofórmio, produzindo espectros significativamente diferentes. Os procedimentos adotados para o LS não se limitam a apenas materiais foliares, seus espectros são característicos em cada parte da planta, incluindo raiz, caule, flor, fruta e semente. Uma grande variedade de vegetais foram utilizados neste estudo, com uma extensa variedade.

Os trabalhos publicados utilizam, em sua totalidade, equipamentos da *Thermo Scientific*, havendo pouca pesquisa com espectrômetros na *Bruker Daltonics*. Diante

deste potencial a ser explorado na construção de um acessório para o desenvolvimento de fontes ambientes para os equipamentos da *Bruker* e sua aplicação na área forense, este estudo teve como objetivo atender a essa demanda.

2.5 Espectroscopia no infravermelho próximo.

A espectroscopia na região do infravermelho (MIR) se baseia no fato de que as ligações químicas possuem frequências de vibrações específicas que correspondem a níveis de energia vibracionais bem definidos caracterizando as ligações e, conseqüentemente, possibilitando a identificação de grupos funcionais presentes nas moléculas.[44] Em muitos casos, são realizadas análises quantitativas por meio desta técnica, considerando-se que a resposta do sinal obtido pelo espectro de IR está diretamente associada à concentração do analito na amostra (Lei de Beer).[44,45]

A região do infravermelho próximo (NIR) emprega a energia nos comprimentos de onda entre 800 e 2500 nm e fornece informações espectrais denominadas de bandas de combinação e sobretons. Os sobretons são bandas com valores de frequências correspondentes a múltiplos inteiros daqueles das vibrações normais e as bandas de combinação são combinações lineares das frequências normais ou múltiplos inteiros destas. Apresentando-se na região do infravermelho próximo com uma intensidade mais baixa.

Com a variação da amplitude de vibração da ligação entre átomos provocada pela radiação incidida sobre uma molécula, como efeito, ocorre a variação do nível vibracional da molécula (Δv). Essa variação é prevista por um modelo quântico que descreve a energia proveniente da movimentação de átomos que compartilham uma ligação química e é objeto de estudo da espectroscopia vibracional.[46,47] As transições vibracionais proibidas são consideradas como sobretons por possuírem transições vibracionais com $\Delta v > 1$, sendo transições identificadas na região do NIR. As transições ocorrem em regiões específicas do NIR, de acordo com os átomos envolvidos na ligação, podendo se repetir ao longo do intervalo espectral do NIR, Com sensibilidade a pequenas mudanças no momento de dipolo de vibrações moleculares axiais (C-H, O-H, N-H e S-H) conforme apresentado na **Figura 2.7**. [46]

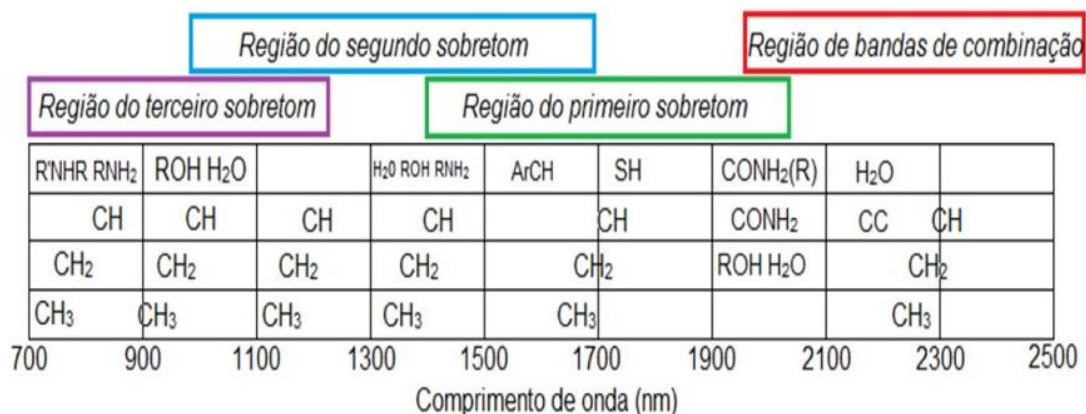


Figura 2.7. Regiões do espectro infravermelho onde ocorrem transições de ligações específicas.[46]

Micro espectrômetro portátil na região do infravermelho próximo (MICRONIR)

Com os avanços tecnológicos, novas metodologias analíticas têm surgido simplificando as análises[48–50]. O uso de instrumentos portáteis tem alcançado grande destaque no mercado, pois possibilita ao analista o monitoramento e determinações de parâmetros físicos e químicos no local de coleta, as vantagens podem ser enumeradas: a) rápido tempo de análise; b) baixos custos de aquisição e operação; c) baixo consumo de energia; d) baixo ou nenhum uso de reagentes; e) pouco ou nenhum tratamento da amostra; f) alta segurança do analista; g) fácil operação e h) fontes de erros de transportes das amostras são eliminadas. As agências governamentais têm aprovado a utilização destes equipamentos portáteis devido ao aumento da qualidade dos métodos desenvolvidos[51]. Os algoritmos de seleção de variáveis e os novos instrumentos fabricados têm conseguido diminuir os aspectos negativos em relação à confiabilidade dos dados[52]. Inicialmente estes métodos podem ser utilizados na triagem das amostras, no laboratório ou mesmo nos pontos de captação, e posteriormente, poderão ser aplicadas análises de rotina para os grupos selecionados.

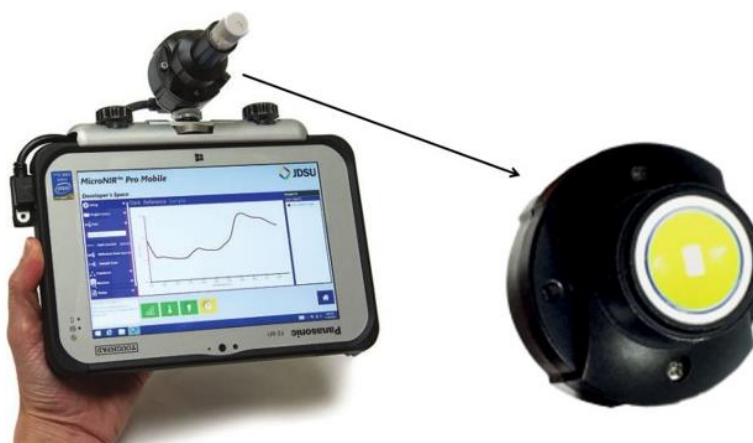


Figura 2.8. Equipamento MICRONIR acoplado a um *tablet* com o acessório para análise de sólidos em um *vial* de vidro.

Novos avanços em análises químicas garantem confiabilidade e rapidez analítica, através de equipamentos mais compactos, sensíveis e não destrutivos, como por exemplo, o MICRONIR (**Figura 2.8**). O MICRONIR, assim como outros espectrômetros, possui a capacidade de caracterizar e quantificar diversos analitos simultaneamente. No entanto, possui como diferencial a portabilidade, que resulta na maior acessibilidade às amostras de interesse e à possibilidade de obter resultados instantâneos com pouco ou nenhum preparo de amostra. A miniaturização oferecida com o MICRONIR é estimulada pela necessidade do equipamento ser usado no local desejado, como análises de uso pontual em aplicações de normalizações, segurança interna, segurança alimentar, controles de processos *on-line*, detecção de falsificação de produtos, dentre outros. A portabilidade se torna promissora nas análises laboratoriais, e este equipamento pode ser conduzido em campo acoplado a um laptop, tablet, ou mesmo um *smartphone*. [48,49]

Os primeiros instrumentos analíticos portáteis apareceram nas últimas décadas, principalmente entre o período de 2000 a 2016 [53]. Com os avanços tecnológicos, eles diminuem o tempo e o custo da análise [53–55]. A miniaturização do NIR, por exemplo, é baseada em duas lâmpadas de tungstênio ($\varnothing \approx 4$ mm) associadas a um Linear Variable Filter (LVF), no qual é usado como elemento

dispersivo, alimentado pela porta USB do computador. O LVF pode ser comparado a um interferômetro de Fabry-Perot de varredura [56]. Desta forma, a fonte de luz, o sistema de coleta de espectro óptico (matriz de diodos) e a eletrônica estão totalmente integrados em um dispositivo de tamanho de uma maçã. Assim, a miniaturização da técnica supera as abordagens tradicionais, especialmente na análise de combustível.

Os instrumentos NIR portáteis associados a *softwares* com modelos estatísticos avançados têm apresentado potencialidades semelhantes aos NIRs não portáteis [3,5,52,57]. Recentemente alguns trabalhos têm sido descritos na literatura utilizando NIR portátil: Paiva *et al.* [5] usaram um NIR portátil para quantificar óleos vegetais em misturas de biodiesel/Diesel através do modelo PLS. Neste trabalho foram construídos e comparados alguns tipos de modelos de calibração multivariados, são eles: PLS, PLS-JK e MLR-SPA. Os resultados apontam para MLR-SPA como a melhor estratégia de modelagem. Lutz *et al.* [9] utilizaram NIR portátil para quantificação de etanol em gasolina produziu um modelo preciso, reprodutível e econômico, estabelecendo um nível de qualidade equivalente ao relatado com um espectrômetro não portátil. Rojas *et al.* [58] quantificaram teor de gordura, humidade e proteína com erro padrão de valores de precisão de 0,72%, 0,73% e 0,66% respectivamente. Os dados foram transferidos para compor o banco de dados para posteriores análises. Em 2016, Zumba e Rodgers [59] verificaram a capacidade do equipamento em quantificar os componentes responsáveis pela qualidade das fibras de algodão. Correia *et al.* usaram a técnica de MICRONIR para monitoramento do controle da qualidade de cafés através de identificação e quantificação de adulterações de cafés arábica com café conilon (em diferentes níveis de torrefações); milho; cascas e paus, aliada ao PLS e PCA.[48].

Em geral, o uso dessas técnicas é feito combinando o conjunto de dados com os métodos multivariados, como modelos supervisionados, como a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) [60], sem supervisão, como a análise discriminante linear (LDA), análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) [60–62] e quantitativas, como os mínimos quadrados parciais (PLS) [61,63–65]. A espectroscopia NIR tem sido usada para monitorar várias aplicações no controle da qualidade do combustível, tais como: quantificação de água e metanol em combustíveis de etanol e gasolina [66,67,63];

quantificação de biodiesel e teor total de enxofre no gasóleo [68,64,69] e determinação de propriedades físico-químicas como viscosidade, teor de enxofre, densidade, entre outros, para vários combustíveis [70–72]. Além do NIR, a espectroscopia MIR também foi aplicada principalmente na quantificação de biodiesel em Diesel [62,65,73]; na determinação do número de octanas [74]; e na predição da densidade de combustíveis [75].

2.6 Quimiometria

A quimiometria é uma área da química que faz uso de ferramentas estatísticas e matemáticas para resolver sistemas químicos. Com o avanço tecnológico a quimiometria passou a ser objeto de estudo e pesquisa nos laboratórios de química, devido ao desenvolvimento e utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas para extrair mais informação dos dados gerados.[76]

Pré-processamento de dados

Algoritmo Savitzky-Golay

O pré-processamento de dados baseia-se na adequação das informações adquiridas para posterior aplicação de técnicas quimiométricas. Este ajuste consiste na manipulação matemática para remover ou reduzir variações que são irrelevantes e poderiam prejudicar a análise. Efeitos como interferências, espalhamento, interação molecular são possíveis fontes de variações indesejadas[77]. Considerando, obviamente, a natureza química dos dados, qualquer técnica de pré-processamento pode ser empregada antes de submeter os dados a técnicas quimiométricas, entre as mais comuns está a aplicação da primeira derivada que equivale à remoção dos termos constantes (*offsets*) a todos os comprimentos de onda, ajustando assim o deslocamento da linha de base.

A aplicação da derivada pelo método Savitzky-Golay tem o objetivo de corrigir a linha de base espectral e melhorar a resolução. No entanto, o cálculo da derivada aumenta o ruído do espectro, por isso é importante suavizar o espectro. Corrigindo a

linha de base espectral e suavizando o espectro, a normalização pode ser utilizada para deixar os dados na mesma escala.[78]

Calibração multivariada

O uso dos métodos espectroscópicos em análise quantitativa geralmente está associado ao uso de ferramentas quimiométricas. Modelos de calibração por PLS (Partial Least-Square Regression - regressão por mínimos quadrados parciais) são os mais utilizados. [79] O desenvolvimento do método de calibração consiste em duas etapas: calibração e validação. A etapa de construção do modelo de calibração começa com a seleção de dois conjuntos de amostras (calibração e validação). A seleção pode ser realizada com algoritmos específicos, como por exemplo *Kennard-Stone*. Para a validação dos dados pode ser utilizado um conjunto específico de amostras previamente selecionadas ou utilizar-se de algoritmos para validação cruzada, como será utilizado, neste trabalho, o *Repeated Double Cross Validation*.

Partial Least Squares (PLS)

O método dos mínimos quadrados parciais ou regressão por PLS é o método de regressão mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir dos dados sem tratamento prévio. A PLS é um método para construção de modelos de predição utilizado quando se tem um grande número de variáveis [79]. Os cálculos utilizam uma matriz de variáveis dependentes \mathbf{X} e o vetor \mathbf{y} contendo a propriedade de interesse. Para se obter uma relação entre eles, ambos são decompostos simultaneamente em uma soma de “n” variáveis latentes (VL), sendo:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad \text{Equação 2.1}$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{U}\mathbf{q}^T + \mathbf{f} \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde \mathbf{T} e \mathbf{U} são os *scores*; \mathbf{P} e \mathbf{q} os *loadings* (pesos) e \mathbf{E} e \mathbf{f} os resíduos da matriz \mathbf{X} e do vetor \mathbf{y} respectivamente. A matriz de *scores* \mathbf{T} é estimada pela combinação linear de \mathbf{X} com coeficientes ponderados por \mathbf{W} (pesos):

$$\mathbf{T}=\mathbf{XW}$$

Equação 2.3

Uma importante informação adquirida a partir dos coeficientes ponderados (\mathbf{W}) é a importância da Variável na Projeção (Variable Importance in the Projection - VIP). O VIP é frequentemente utilizado com o propósito de selecionar variáveis que mais influenciam na construção do modelo PLS, otimizando assim o número de variáveis latentes[80,81].

A partir de \mathbf{W} , os coeficientes de regressão do modelo PLS podem ser estimados por:

$$\mathbf{b}_{\text{PLS}}=\mathbf{W}(\mathbf{P}^T\mathbf{W})^{-1}\mathbf{q}^T$$

Equação 2.4

O modelo linear PLS pode ser representado por:

$$\mathbf{y}=\mathbf{Xb}_{\text{PLS}}$$

Equação 2.4

Onde valores da propriedade de interesse para amostras futuras podem ser estimados pelo modelo utilizando a combinação linear do vetor \mathbf{x}_i amostral pelos coeficientes do modelo. Na construção do modelo de regressão PLS é necessário otimizar o número de variáveis latentes[79,82–84].

Algoritmo de Kennard-Stone

Este método é utilizado na divisão das amostras em dois conjuntos, amostras de calibração e validação, de forma que as amostras de validação sejam bem representadas pelas amostras de calibração[85]. No algoritmo de Kennard-Stone é selecionada uma primeira amostra que apresenta a maior distância em relação à média das amostras[86]. A segunda amostra a ser selecionada será a que apresentar maior distância em relação à primeira amostra selecionada. A próxima amostra a ser selecionada apresentará maior distância em relação à última amostra

selecionada, e assim sucessivamente até atingir o número de amostras desejadas[86]. Normalmente, esse algoritmo é aplicado para realizar a seleção das amostras que irão compor o conjunto de calibração, uma vez que deste procede a seleção das amostras de maior variabilidade, ou seja, as amostras mais “externas” do conjunto total.

Algoritmo Repeated Double Cross Validation

A *repeated double Cross Validation* (rdCV)[87] é um algoritmo utilizado para otimizar a complexidade dos modelos de regressão e para uma estimativa realista dos erros de predição quando o modelo é aplicado a novos casos pertencentes a população de dados utilizados. Esta estratégia se adequa bem a conjuntos de dados pequenos e é um método complementar a outros métodos de inicialização. Os métodos aplicados para repetição divide os dados em conjuntos de teste e conjuntos de calibração, bem como para a estimativa do número ótimo de componentes no PLS. Depois de terminar o loop externo, para cada objeto, um conjunto de teste previsto Y valor está disponível. O loop interno funciona com um conjunto de calibração como definido no circuito externo. O loop interno novamente consiste em uma *Cross Validation* (CV) para encontrar as melhores condições para o modelo. No rdCV, uma dupla CV é repetida muitas vezes (normalmente 100 vezes) em um loop de repetição adicional com diferentes divisões aleatórias em conjuntos de teste e conjuntos de calibrações[88].

3. CONSTRUÇÃO DE UMA FONTE HOME MADE DE PS-MS

3.1 Introdução

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica química analítica que possibilita a qualificação e quantificação de substâncias químicas presentes em uma amostra, medindo a relação massa-carga (m/z) e abundância de íons na fase gasosa. Existem várias etapas necessárias para realizar a análise MS em amostras complexas. Em algumas utilizações da MS, estas etapas incluem extração, pré-concentração e ionização da amostra. Essas etapas podem fazer com que as análises no MS sejam demoradas, caros e complexos.

A introdução de técnicas com fontes de ionização que operam à *Atmospheric Pressure Ionization* (API) aumentou o número de compostos analisados no MS. Nesta técnica, as moléculas de analito são primeiro ionizadas à pressão atmosférica, onde os íons produzidos são então separados espacialmente e electrostáticamente das moléculas neutras.

A ionização por *electrospray* é particularmente útil para analisar biomoléculas tais como proteínas, oligonucleótidos, péptidos, entre outras inúmeras aplicações. A técnica também pode ser útil para analisar moléculas polares menores tais como benzodiazepinas e conjugados sulfatados. Outros compostos que podem ser eficazmente analisados incluem sais ionizantes e corantes orgânicos.

Algumas moléculas com massa molecular elevada podem adquirir mais de uma carga. O carregamento múltiplo proporciona a vantagem de permitir a análise de moléculas acima de 150 000 Da, mesmo que a faixa de massas (ou mais precisamente a faixa de massa/carga) para um instrumento MS seja cerca de m/z 3000. Ao adquirirem muitas cargas, um processo matemático chamado deconvolução pode ser usado para determinar a massa molecular real do analito.

Novas técnicas de ionização na espectrometria de massas ambientes (ou ambiente MS) [17] foram introduzidas como uma forma simples na geração de íons. Estas fontes de ionização têm surgido como alternativas simplificadas e eficientes para a detecção e quantificação de analitos diretamente das amostras sem pré-tratamento, ou quando colocadas em superfícies auxiliares. As Fontes precursoras e protagonistas desta revolução na espectrometria de massa foram a DESI e DART.

Outras inúmeras técnicas foram construídas com a mesma finalidade (DAPPI, ASAP, DAPCI, PADI, LTP, LAESI, PSI, LS, EASI entre outras) [12]. Porém, para que estas fontes fossem descobertas e utilizadas houve um avanço instrumental e criativo por parte dos pesquisadores para que as fontes ambientes se tornassem uma realidade na espectrometria de massas. Todas as fontes ambientes possuem um arranjo instrumental desenvolvido por cada grupo de pesquisadores.

3.2 Objetivo

Construir um dispositivo capaz de realizar diferentes tipos de ionização ambiente como: *paper spray*, *leaf spray*, *swab touch spray* e *micro-eletrospray* na análises de espectrometria de massas.

3.3 Construção do dispositivo de PS-MS

Para a construção destas fontes há a necessidade de condicionar o sistema elétrico e de segurança do equipamento para este fim. De forma geral, este tipo de automatização é feito pelos pesquisadores e não pelas empresas que fabricam os equipamentos. As fontes ambientes são comuns nos equipamentos da *Thermo Scientific*, por serem mais fáceis de condicionar estes acessórios para a realização do experimento. Já os equipamentos de massas de toda linha da empresa Bruker, possuem condições físicas e eletrônicas mais difíceis para implementação deste tipo de fonte. A construção deste acessório foi realizada na oficina mecânica do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo (CCE-UFES). Na **Figura 3.1** são apresentadas todas as etapas realizadas na montagem do acessório para fonte ambiente no equipamento da Bruker, sendo possível trabalhar com as seguintes fontes ambientes *Paper Spray*, *Leaf Spray*, *Micro-Eletrospray*, *Swab Touch Spray* e outra fonte ainda em estudo.

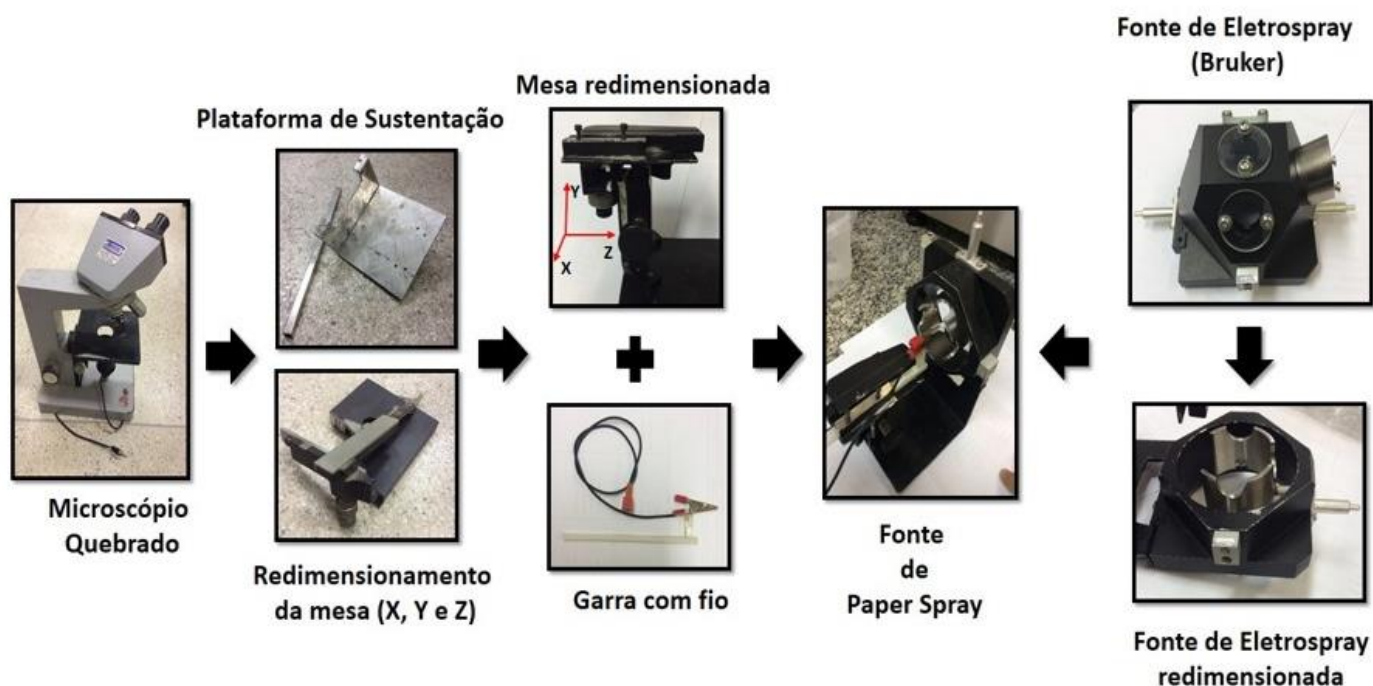


Figura 3.1. Fluxograma de montagem

3.4 Descrição do dispositivo

O acessório é formado basicamente por uma plataforma de trabalho, uma estrutura de ajuste, uma estrutura de estabilização do *spray*, dois espaçadores, um pino, uma dobradiça, uma mesa, base fixadora, três diferentes tipos de haste, como apresentado na **Figura 3.2**.

A **Figura 3.3** apresenta de forma simplificada, os elementos básicos que compõem os acessórios para ionização ambiente na espectrometria de massas em 3D com uma mesa XYZ (item 9) em perspectiva com a garra para fonte *Paper Spray Ionization* (item 11) fixada por um suporte (item 10).

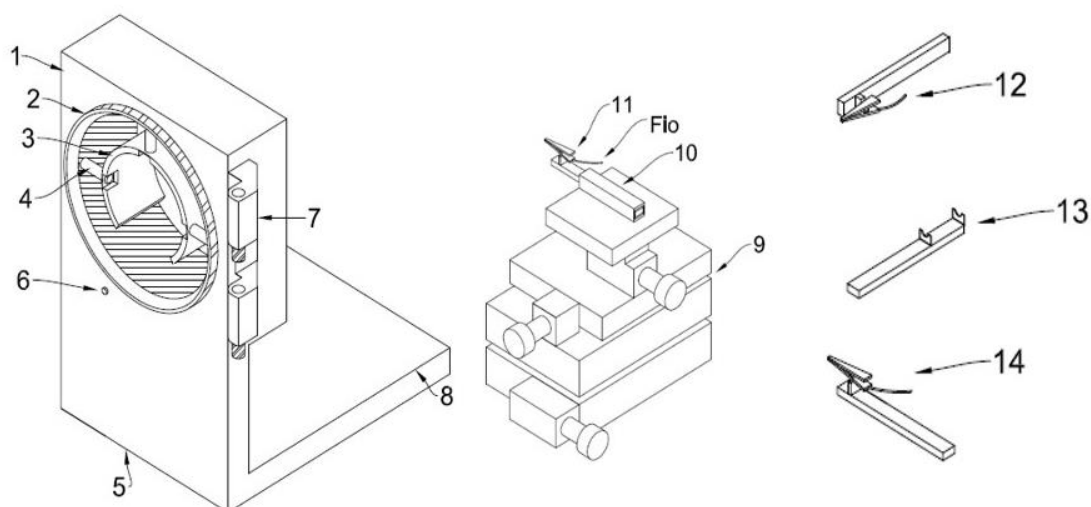


Figura 3.2 Dispositivo detalhado

A **Figura 3.2** apresentam diferentes garras (itens 12 a 14) para diferentes tipos de fontes ambientes. Este acessório é descrito como um dispositivo de ionização que permite a análise através das técnicas de ionização por *paper spray* (item 11), *leaf spray* (item 14), *swab touch spray* (item 12) e *micro-eletrospray* (item 13). Em todas as possíveis configurações, o dispositivo de ionização só permite a dessorção e ionização de íons de amostra sob pressão atmosférica. A amostra aplicada, ou contida no tecido vegetal ou no *swab touch* é ionizada da mesma forma que o *electrospray*, quando uma alta tensão é aplicada na garra em relação à entrada do espectrômetro (**Figura 2.2**). Os íons são introduzidos num espectrômetro de massa devido ao alto campo formado e são conduzidos para dentro do equipamento onde são analisados.

O dispositivo possui uma estrutura para se ajustar à entrada do espectrômetro e uma estrutura responsável pela estabilização do spray **Figura 3.2** item (2) e (3) respectivamente. A estrutura (1), (5) e (8) **Figura 3.2** compõem uma plataforma de trabalho. O item (3), na **Figura 3.2**, é responsável pela estabilização do *spray* gerado devida a diferença de potencial aplicado criando um campo magnético mais uniforme.

O item (4), na **Figura 3.2**, são espaçadores para isolamento elétrico do item (3) produzido com diversos materiais para isolamento elétrico. O item (6) é um pino

responsável pela liberação do espectrômetro para realização das análises, sendo um componente de segurança do equipamento. O item (7) é uma dobradiça para o posicionamento do acessório para ionização ambiente na espectrometria de massas. Item (9) é uma mesa com movimentação nos eixos X, Y e Z construída a partir de um microscópio inutilizável, sendo totalmente redimensionado para se adequar ao dispositivo. O item (10) se trata de uma base fixadora das hastes para diferentes tipos de fontes de ionizações.

A fonte ambiente de *Paper Spray* é a mais aplicada atualmente, logo os detalhes deste acessório são melhor demonstrados na **Figura 3.3 A**.

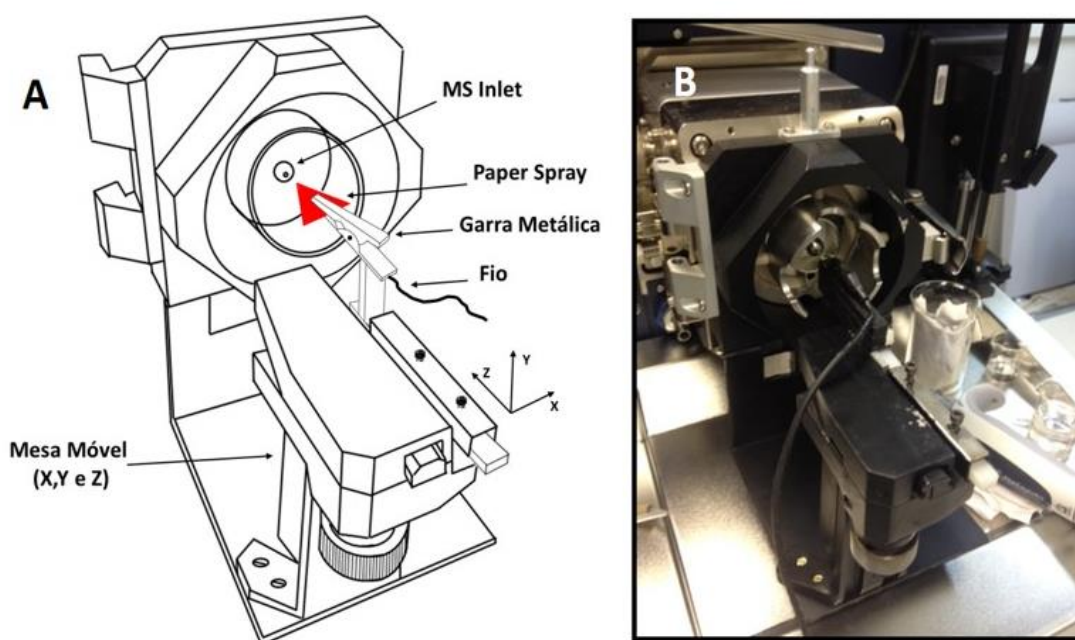


Figura 3.3. Acessório para fonte ambiente PS, LS no equipamento FT-ICR da Bruker a) desenho em 3D b) fotografia.

4. PS-MS: APLICAÇÃO NA ANÁLISE DE DROGAS DE ABUSO.

4.1 Introdução

Com o advento de uma nova família de técnicas de ionização, a espectrometria de massas ambientes (ou ambiente MS)[89,90] foi introduzida como uma forma simples de gerar íons.

Em 2010, Wang *et al.*[16] sob a orientação do prof. Cooks desenvolveram a fonte de “*Paper Spray Ionization*” (PS). A técnica de PS-MS, derivada da *elektrospray* (ESI), consiste na aplicação do analito sobre a superfície de um papel triangular, fixado a uma garra e umedecido com um solvente prótico. O sistema é posicionado na entrada do espectrômetro a uma distância de 3-5 mm. Um potencial de 3 a 5 kV é aplicado, e o *spray* é produzido sem a necessidade de aplicação do gás de dessolvatação. Espectros de massas com excelente exatidão e resolução vêm sendo reportados[91,92], possibilitando assim, análises qualitativas e quantitativas de misturas complexas[1]. Além disso, a fonte de PS-MS pode ser acoplada a espectrômetros de massas portáteis, o que vem permitindo aplicações no ramo das ciências forenses [93]. A potencialidade do PS-MS em diferentes matrizes foi testada em amostras de sangue bovino e humano[16,24], urina, saliva, microalgas, bactérias e fungos[13,94,95], peptídeos, nucleotídeos e fosfolipídios[27], pesticidas[96], monitoramento de cultura de células[97], alimentos e bebidas[98], corantes[21], etc.[1];[2].

Em Química forense, vários trabalhos têm sido desenvolvidos usando a técnica de PS-MS. [19,21,29,36,99–101] Em 2014, Espy *et al.* [40] realizaram a quantificação de oito drogas de abuso (3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioxi-N-metilanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxi-N-ethylamphetamine (MDEA), morfina, cocaína, e Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC) no sangue usando PS na extração, *spray* e análise no MS com tempo inferior a 2 min com a preparação de uma única amostra de sangue. Em 2015, Ma *et al.*[29] identificaram cinco tipos de canabinóides sintéticos (JWH-018, JWH-081, AM-2201, RCS-4 e XLR-11), com vestígios de pó a granel em superfícies ou substâncias no sangue e na urina, atingindo limites de detecção (LD) de 2 ng mL⁻¹ para a detecção de pós vestigiais e 10 ng mL⁻¹, para a análise de amostras de sangue e urina.[29] No mesmo ano,

Ferreira *et al.* [102] desenvolveram uma análise forense rápida e eficaz de tintas em documentos usando PS-MS. Eles demonstraram que canetas de marcas diferentes (um total de doze) fornecem perfis químicos diferentes e característicos. Também aplicaram com sucesso o método para a análise de documentos arquivados e caracterização das linhas de tinta sobrepostas feitas em documentos com falsificação simulada. Em 2016, Carvalho *et al.*[92] usaram o próprio selo de droga sintética como substrato para análise de 2,5-dimetoxi-4-cloroanfetamina (DOC), 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB), 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, e 25I-NBOMe. Mecanismos de fragmentação foram propostos a partir de experiências de *Collision Induced Dissociation*, sugerindo a presença de isômeros na composição química das classes de NBOMe. Os resultados mostraram uma boa concordância com o ESI(+). Na continuidade deste trabalho, o PS-MS foi aplicado ao monitoramento de drogas terapêuticas como o Tacrolimus (FK506, Prograf®), um inibidor da calcineurina, que é amplamente prescrito como uma droga imunossupressora em receptores de transplante de órgãos sólidos.[103] Recentemente, Cooks *et al.* [100] desenvolveram uma nova fonte ambiente, *Swab Touch Spray* para espectrometria de massa, uma análise direta de drogas ilícitas (quatorze drogas ilícitas) de fluido oral, obtendo limites de quantificação e detecção aceitáveis pelas sociedades forenses e toxicológicas internacionais. Mostrando não haver limites para o desenvolvimento de outras fontes.

Uma outra técnica que surge da variação do PS-MS, introduzida recentemente, é o *Leaf Spray* (LS-MS). A diferença entre PS e LS é que, este último usa a própria amostra (um tecido vegetal) para a geração de íons na fase gasosa. Os íons podem ser gerados, sem a adição de solvente no tecido da planta[104]. No entanto, os espectros de massa com melhor relação sinal/ruído pode ser obtido quando o solvente prótico é adicionado[34,105].

4.2 Objetivos

Analisar drogas de abuso (25I-NBOMe, canabinóides sintéticos, cocaína e Δ^9 -THC) por PS(+)-MS.

Aplicar a técnica de *Leaf Spray* (LS) na identificação de Δ^9 -THC diretamente sobre a superfície das folhas de *Cannabis Sativa L.*

Desenvolver um método analítico para quantificar oito drogas ilícitas (MDA, MDMA, MDEA, m-CPP, MA, cocaína, LSD, e DOB).

Construção de um modelo quantitativo para análise de cocaína no papel cromatográfico revelado pelo reagente de Dragendorff e acoplamento ao PS.

4.3 Metodologia

4.3.1 Materiais e Reagentes

Uma solução padrão de cocaína (apreendida com teor de 99%, fornecida pela PC-ES) foi usada para preparar soluções de estoque de 20, 30 e 40 mg mL⁻¹. Quatro selos de NBOMe, folhas da planta *Cannabis sativa L.* foram fornecidos pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo (PC-ES). Quatro extratos de canabinóides sintéticos foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Criminalística (INC) do Departamento da Polícia Federal de Brasília. A cromatografia em papel *office* foi empregada para análise de cocaína. Foram utilizados para a construção das curvas de calibração de dez níveis de concentrações, variando de 1 a 100 μ g mL⁻¹, oito soluções padrões (1 mg mL⁻¹) de MDA, MDMA, MDEA, m-CPP, MA, cocaína, LSD, e DOB (Cerilliant Corporation, Tx, USA).

Os solventes utilizados para análise de PS, ESI, LS e cromatografia em papel foram: metanol grau HPLC (Vetec Química Fina Ltda, Brasil), hidróxido de amônio, ácido fórmico, subnitrato de bismuto, clorofórmio, ácido acético glacial, éter etílico grau HPLC e iodeto de potássio (Sigma Aldrich).

4.3.2 Preparo das amostras

Selos de 25I-NBOMe

As análises de selos foram exploradas pelas técnicas de ESI(+) e PS(+). Para as análises de ESI(+), aproximadamente 1 mg do selo contendo 25-INBOMe foi submetido a um processo de extração com 1 mL de metanol. Foram realizadas duas diluições sucessivas, de 100 µL da solução do extrato em 10 mL metanol e, posteriormente, 100 µL dessa solução resultante em 1 mL de metanol e acidificado com 0,4 %v/v de ácido metanoico, onde este foi submetido à análise de ESI(+). Para a análise de PS(+), o próprio selo foi usado como substrato de análise. Os resultados foram adquiridos e comparados.

Folhas de Cannabis Sativa L.

As folhas de *Cannabis sativa* L. foram analisadas por PS(+) e LS(+). Para as análises de PS(+), 2 mg da amostra foi dissolvida em 1 mL de acetonitrila (ACN), e posteriormente, 20 µL foram aplicados em um papel em forma de triângulo. Após a secagem, o papel foi umedecido com ACN contendo 0,1 % v/v de ácido metanoico e submetido às análises de PS(+)-MS. Para as análises de LS(+), a própria folha foi usada como substrato e a eluição foi feita com ACN.

Cocaína

Um teste colorimétrico barato e rápido para a identificação alcaloides é feito com o reagente Dragendorff. [106] No entanto, ele fornece resultados falso-positivos para alguns dos aditivos de cocaína, como lidocaína e levamisol. Com isso, a seletividade do ensaio colorimétrico utilizando o reagente de Dragendorff foi melhorada a partir de PS(+). Em primeiro lugar, cromatografia em papel foi realizada utilizando papel *office* como fase estacionária e a mistura CH₃OH: NH₄OH (99,5/0,5) como eluente. A sensibilidade foi testada em função da concentração de cocaína, a curva analítica foi construída no intervalo de 1 a 40 mg.mL⁻¹ e registrado o LD. O Fator de retenção (R_f) foi calculado a partir da divisão entre a distância que a

amostra percorreu (DA) e a distância que o solvente percorreu (DS), conforme a **equação 4.1**. Depois, o papel foi seco e revelado com o reagente Dragendorff. As manchas foram então cortadas em triângulos de papel 7(base)x12(altura) mm e fixado em uma “garra de jacaré” a uma distância de 3-5 mm a partir da entrada do MS. O metanol foi gotejado sobre a PS-MS para promover a ionização dos analitos.

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pelo Analito (DA)}}{\text{Distância percorrida pelo solvente (DS)}} \quad \text{Equação 4.1}$$

Ambiente MS (PS(+)) e LS(+)-MS e ESI(+)-MS)

Para a análise por PS(+), foram aplicadas as amostras sobre a superfície de um papel triangular (Whatman Grade 1, GE Healthcare, EUA) com uma base de 7 mm e uma altura de 12 mm. O papel triangular foi fixado a uma “garra de jacaré” aterrado por um fio, e posicionado à entrada do MS a uma distância de aproximadamente 5 mm. Posteriormente, 10-50 μL de metanol ou ACN do solvente acidificado com 0,1% v/v de ácido metanoico foi aplicado na superfície do papel e aplicado com uma tensão elevada (3,8 kV), para gerar os espectros de massa no PS(+).

Na análise por LS(+), as folhas de *Cannabis sativa L.* foram cortadas em triângulos (base e altura de 1 cm) e fixadas por uma “garra de jacaré” a uma distância aproximada de 5mm a partir da entrada de espectrômetro de massa. Aproximadamente 10-50 μL de metanol (grau de pureza HPLC, JTBaker), aplicado diretamente sobre a folha e posteriormente uma tensão de 3 kV para geração dos sinais no LS(+).

As condições da fonte de ESI(+) foram as seguintes: uma pressão de gás nebulizador de 1,5 bar, uma voltagem capilar de 3,8 kV, e uma temperatura capilar de transferência de 250 °C. Os experimentos com PS(+), LS(+) e ESI(+) foram realizados utilizando a espectrometria de massas por Transformada de Fourier de ressonância ciclotron de íons (FT-ICR MS, modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics Bremen, Alemanha)[92]. Acumulação de íons foi 0,060 s e os espectros de massa foram adquiridos com 16 scans de sinais transitórios no domínio do tempo em 512 k-points. Com capacidade de resolução, $m/\Delta m_{50\%} = 67\ 000$ (onde $\Delta m_{50\%}$ é a integral do pico m/z 304) e uma precisão menor que 2 ppm em massa nas atribuições das

fórmulas moleculares inequívocas para os íons moleculares isoladamente carregados. As estruturas propostas para cada fórmula foram atribuídas utilizando o banco de dados ChemSpider (www.chemspider.com). O grau de insaturação para cada molécula pode ser deduzida diretamente a partir do seu valor de DBE de acordo com a equação 4.2. Por fim, todos os espectros de massa foram calibrados externamente utilizando o NaTFA (m/z 200-1200).

$$\text{DBE} = c - h/2 + n/2 + 1 \quad \text{Equação 4.2}$$

onde C, H, e n são os números de carbono, hidrogênio e átomos de nitrogênio, respectivamente, na fórmula molecular.[107]

Para a construção de curvas de calibração de MDA, MDMA, MDEA, mCPP, MA, cocaína, LSD e DOB foram preparados dez níveis de concentrações (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Foram realizadas em triplicatas, as curvas de calibração foram construídas a partir das seguintes razões de transição: MDA = m/z 180→163, MDMA = m/z 193→163, MDEA = m/z 208→163, m-CPP = m/z 197→154, MA = m/z 150→119, cocaína = m/z 304→182, LSD = m/z 324→223 e DOB = m/z 274→257, energia de colisão: 30 V. A energia de colisão variou de 23 para 32 V. O LD e o LQ foram calculados usando as equações 4.3 e 4.4, respectivamente.

$$\text{LD} = 3 * \text{sB}/m \quad \text{Equação 4.3}$$

$$\text{LQ} = 10 * \text{sB}/m \quad \text{Equação 4.4}$$

Onde sB é o desvio padrão do branco e m é o coeficiente angular da curva analítica.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Drogas de Abuso

25I-NBOMe

Uma das recorrentes drogas ilícitas apreendidas no Brasil, nos últimos dois anos, é o 25I-NBOMe ou 2-(4-iodo-2,5-dimetoxifenil)-*n*-[(2-metoxifenil) metil] etamina, estrutura representada dentro da **Figura 4.1**. O 25I-NBOMe é uma droga psicodélica descoberta em 2003 pelo químico Ralf Heim da Universidade de Berlim, sendo classificada como droga ilícita pela União Europeia em 25 de setembro de 2014, por não possuir propósito médico ou legítimo. No Brasil, ela foi proscrita pela Anvisa (Lista F2) na portaria 344/98 em 18 de fevereiro de 2014. Além do 25I-NBOMe, as substâncias 25C-NBOMe e 25B-NBOMe também foram proscritas no mesmo período. Todas essas substâncias têm como principal objetivo imitar os efeitos psíquicos de drogas ilícitas, como por exemplo, o LSD e o MDMA.[108]

A **Figura 4.1a-h** mostra os espectros de PS(+) (4.1 a-d) e ESI(+) (4.1 e-h) de quatro selos contendo o ingrediente ativo 25I-NBOMe ($M = C_{18}H_{22}INO_3$ e $M_w = 427,0639$ Da). Analisando os resultados obtidos pela técnica de PS(+) (4.1 a-d), uma ótima relação sinal/ruído e, conseqüentemente, uma melhor sensibilidade é observada para a identificação do composto 25I-NBOMe em relação à técnica de ESI(+), **Figura 4.1e-h**. O 25I-NBOMe é facilmente detectado como molécula protonada ($[M+H]^+$) e dímero ($[2M+H]^+$) de m/z 428,0726 e 855,1420, respectivamente, diretamente da superfície do selo, sem necessidade de qualquer etapa de extração ou separação. Um erro de massa de até 2,8 ppm e DBE = 8. Analisando os dados de ESI(+) (**Figura 4.1e-h**), além do 25I-NBOMe, vários outros sinais são detectados principalmente na região de m/z 200-700. Essa menor sensibilidade da técnica de ESI(+) pode ser devido a um processo de supressão iônica, provocada pelo efeito de matriz (impurezas extraídas na superfície do selo) ou por um processo de diluição da amostra (50 mg mL⁻¹ de selo).

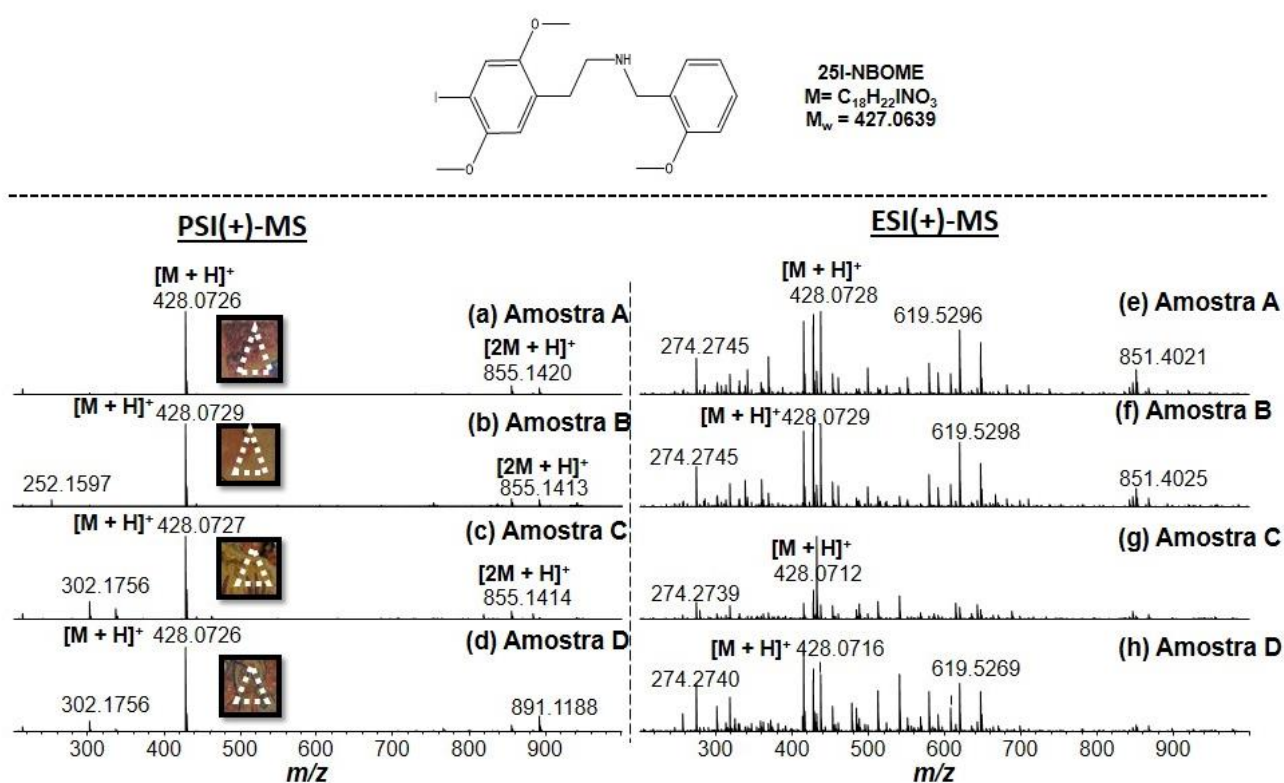


Figura 4.1. Espectros de PS(+)-MS (a-d) e ESI-MS (e-h) para quatro amostras de selos contendo 25I-NBOMe.[50]

Canabinóides Sintéticos

Além dos NBOMes, os canabinóides sintéticos (SCs) também representam o mais recente advento das *designer drugs*, tornaram-se conhecido popularmente por mitigar os efeitos do Δ^9 -THC. Os SCs são dissolvidos em solventes orgânicos e pulverizados com uma mistura de ervas secas[109]. Aqui, PS(+), **Figura 4.2a-d**, foi utilizado para explorar a composição química de quatro amostras de extratos metabólicos à base de plantas, um total de cinco SCs foram identificados (naftalen-1-il-(1-butylandol-3-il) metanona (JWH-073); N-(adamantan-1-il) -1- (4-fluorobutil) -1H-indazole-3-carboxamida (5F-AKB48); 4-metil-1-naftil-1-pentylindol-3-il-metanona (JWH-122); 2- (2-metoxifenil) -1- (1-pentylindol-3-il) etanona (JWH-250); e 4-ethylnaphthalen-1-il-(1-pentylindol-3-il) metanona (JWH-210), o PS(+) identificou SCs como $[M + H]^+$ e $[2M + H]^+$ cátions com valores *m/z* que variam de 300 a 800,

com intensidade relativa de (RI) > 2% e erros de massa inferior a 2 ppm, **Figura 4.2a-d**.

Estes compostos são frequentemente encontrados em produtos à base de plantas, devido à simplicidade de sua rota sintética.[109] Os canabinóides JHW-073 (m/z 328 e $[C_{23}H_{21}NO+H]^+$), JWH-122 (m/z 356 e $[C_{25}H_{25}NO+H]^+$) e JWH-210 (m/z 370 e $[C_{26}H_{27}NO+H]^+$) pertencem à classe dos *naphthoylindoles* (estruturas na **Figura 4.2**). Todas as moléculas têm DBE=14. Este valor é devido à presença dos grupos cetona (DBE=1), nafteno (DBE=7), e indole (DBE=6). Por outro lado, o JWH-250 (m/z 336, $[C_{22}H_{25}NO_2+H]^+$ e DBE=11) pertence à classe dos *phenylacetylindoles*, enquanto que o composto 5F-AKB48 (m/z 384 e $[C_{23}H_{30}FN_3O+H]^+$) pertence aos grupos carboxamidas indazole, com a presença de dois átomos de nitrogênio no ciclopenteno e DBE=11, inseridos na **Figura 4.2**. [109] Além disso, um perfil químico semelhante foi obtido entre as duas fontes de ionização (PS(+), **Figura 4.2a-d**, e ESI (+), a **Figura 4.2e-h**), provando que a técnica PS(+) não causa qualquer efeito de matriz devido o substrato ser de papel. Semelhantemente a NBOMes[92], os SCs são facilmente identificados no modo de ionização positivo, explicado por serem espécies nitrogenadas e excelentes bases de Lewis (contendo baixos valores de pK_b). [109]

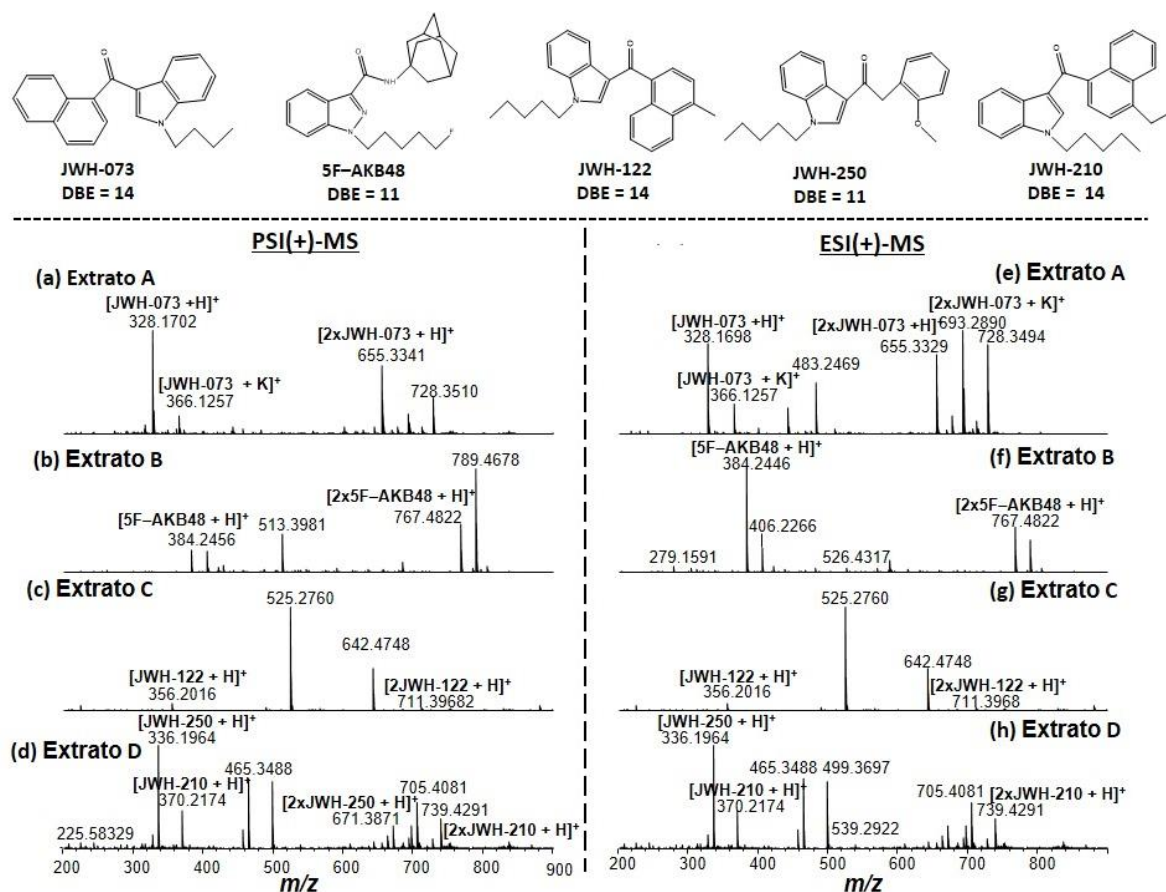


Figura 4.2. Espectros de ESI(+)-MS (a-d) e PSI(+)-MS (e-h) para quatro amostras de canabinóides sintéticos contendo os ingredientes ativos JWH-073, 5F-AKB48, JWH-122, JWH-250 e JWH-210 detectados como cátions $[M+H]^+$ e $[2M+H]^+$ onde M corresponde à fórmula molecular. [50]

Cocaína

O ensaio colorimétrico que utiliza o reagente de Dragendorff é barato e rápido para a identificação de alcalóides[108]. Neste estudo, a sensibilidade e a seletividade deste foi melhorada para PSI(+)-MS, **Figura 4.3a**.

A cromatografia em papel para a cocaína mostra fator de retenção de $0,82 \pm 0,02$ e LD de $3,26 \text{ mg mL}^{-1}$, **Figura 4.3a**. A cocaína é detectada como manchas amarelas na forma de $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$, cátions a m/z 304,1547 em soluções de 5 a 40 mg mL^{-1} , **Figura 4.3b**. A alta precisão de massa é evidenciada com erros de massa muito baixos (erro=1,32 ppm para uma massa teórica de m/z de 304,1543). A capacidade do método PSI(+)-MS na quantificação de cocaína é demonstrado na **Figura 4.3c** pela construção de uma curva analítica, na qual, obteve-se uma boa

linearidade ($R^2 > 0,98$) e baixos valores de LD ($< 1 \text{ mg mL}^{-1}$) são encontrados. Assim, este método pode ser utilizado para identificar e quantificar a cocaína diretamente sobre a superfície do papel utilizando o reagente de Dragendorff com papel office.[110]

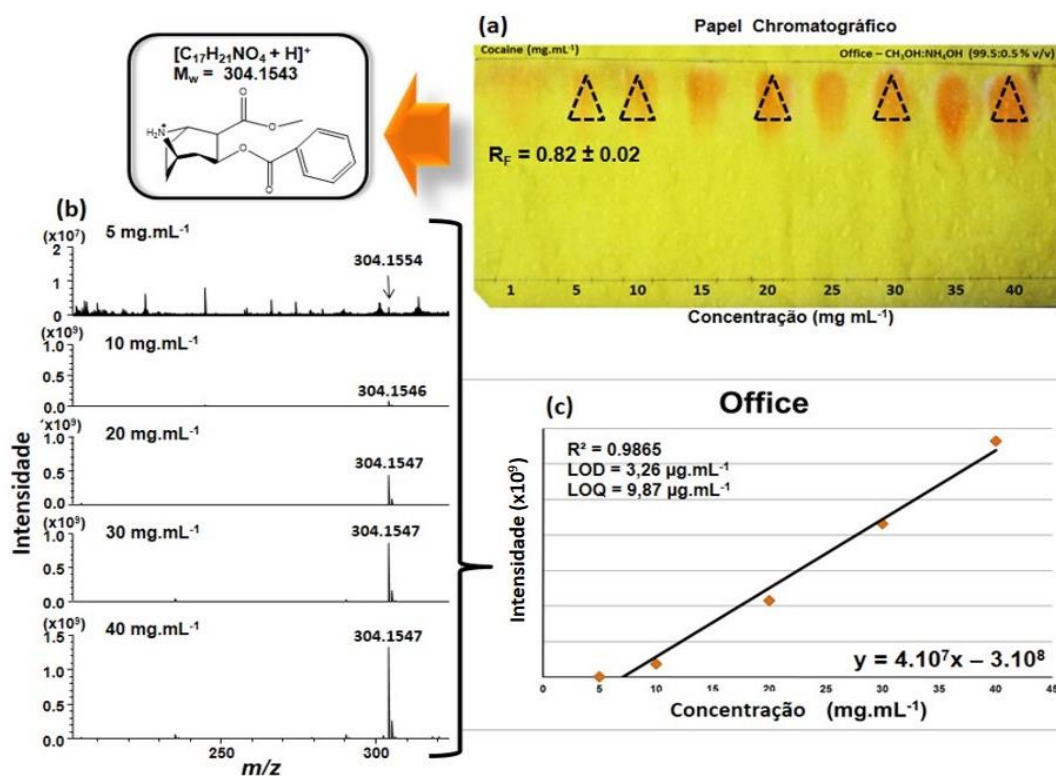
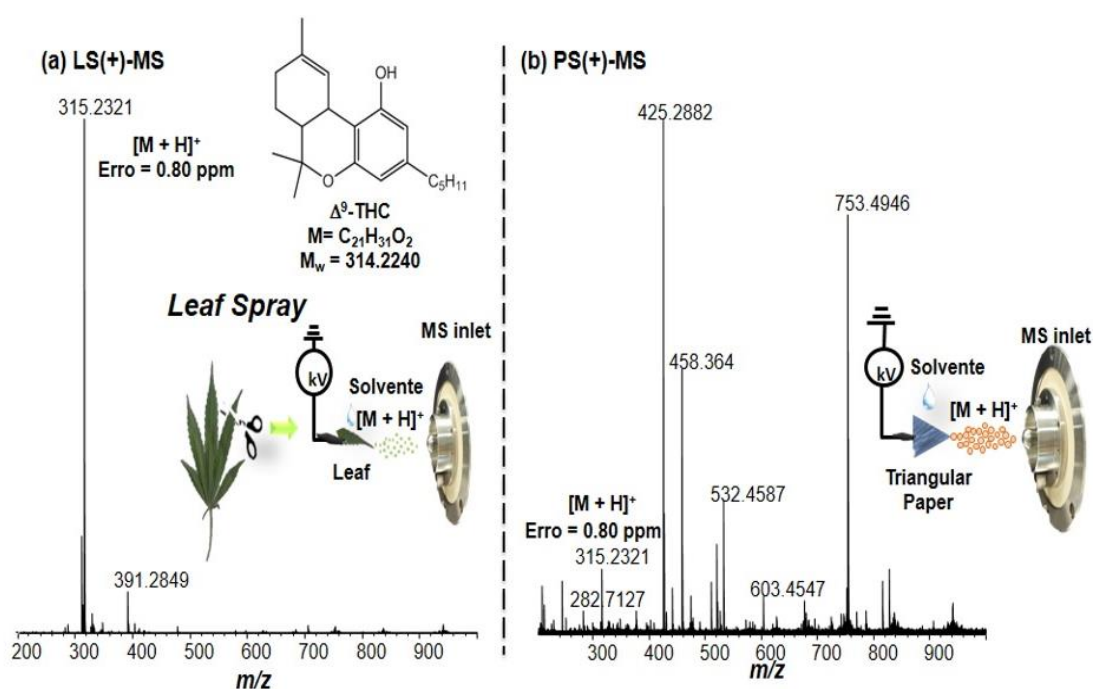


Figura 4.3. (a) Cromatograma para soluções de cocaína (1 a 40 mg mL⁻¹) em CH₃OH:NH₄OH (99,5: 0,5 %v/v) revelado com Dragendorff; (b) espectros de PS(+) MS a partir dos spots revelados e (c) curva de quantificação para cocaína (detectada como íon [C₁₇H₂₁NO₄+H]⁺ de m/z 304,1547).[110]

Δ^9 -THC

A detecção de canabinóides é normalmente realizada em laboratórios forenses brasileiros utilizando o teste colorimétrico contendo o BB azul rápido ou sal B azul rápido. Este teste baseia-se no aparecimento de uma cor específica, normalmente rosa [111]. Em 2015, Romão *et al.* [112] avaliaram a capacidade do teste colorimétrico para a detecção de canabinóides em dez amostras típicas de maconha e as partes da planta *Cannabis sativa L.* (Flor, caule, folhas e sementes). Eles observaram resultados positivos na maioria dos casos (maconha, haxixe, flor, e

tronco). No entanto, resultados negativos ocorreram para as folhas e amostras de sementes. Aqui, ambos extrato de folha e a folha de *Cannabis sativa* L. a 10 mg mL⁻¹ foram analisadas pelas técnicas de LS(+) e PS(+), respectivamente, Figura 6a-b. Um sinal claro e intenso é observado para íons [C₂₁H₃₁O₂ + H]⁺ a *m/z* 315,2321, DBE de 7 e erros de massa iguais a -0,80 ppm, quando a fonte LS(+) é utilizada, **Figura 4.4a**. Este sinal corresponde à molécula Δ⁹-THC ou um dos seus isômeros (Δ⁹-6aS,10aR-*cis*-tetrahydrocannabinol((-)-*cis*-Δ⁹-THC), Δ⁸-*trans*-(6aR,10aR)-tetrahydrocannabinol (Δ⁸-*trans*-THC), (±)-1aS,3aR,8bR,8cR-*cannabicyclol* (CBL-C₅), *cannabichromene* (CBC-C₅), e *cannabidiol* (CBD-C₅)). O sinal a *m/z* 315,2321 também é facilmente detectado para PS(+)-MS, **Figura 4.4b**. Quando se compara a eficiência de ionização entre os métodos LS(+) e PS(+)-MS, **Figura 4.4a-b**, a razão mais baixa de sinal/ruído devido efeito de matriz superior é observado para PS(+)-MS, onde outros íons a *m/z* 425, 458, 532, e 753 são também detectados. Neste caso, LS(+) é mais promissor para a detecção de canabinóides diretamente sobre a



superfície da folha não necessitando de qualquer pré-tratamento da amostra.

Figura 4.4. Espectros de LS(+)-MS e PS(+)-MS obtidos diretamente da folha e do extrato da planta *Cannabis sativa* L. Em ambos os casos, o Δ⁹-THC é detectado como molécula protonada, íon [M+H]⁺ de *m/z* 315,2321. [50]

Drogas sintéticas

O PS(+)-MS também foi aplicado na quantificação de oito drogas ilícitas (MA, MDMA, MDA, MDEA, DOB, mCPP, LSD e cocaína na faixa de 1 a 110 $\mu\text{g L}^{-1}$. A PS-MS mostrou uma proeminente capacidade de triagem de um grande tipo de novas drogas psicoativas[12]. O método PS-MS demonstrou um desempenho quantitativo adequado para muitos compostos de interesse criminal em amostras complexas. Neste caso, as curvas de calibração de todos os oito fármacos são avaliadas e são mostradas na **Figura 4.5**.

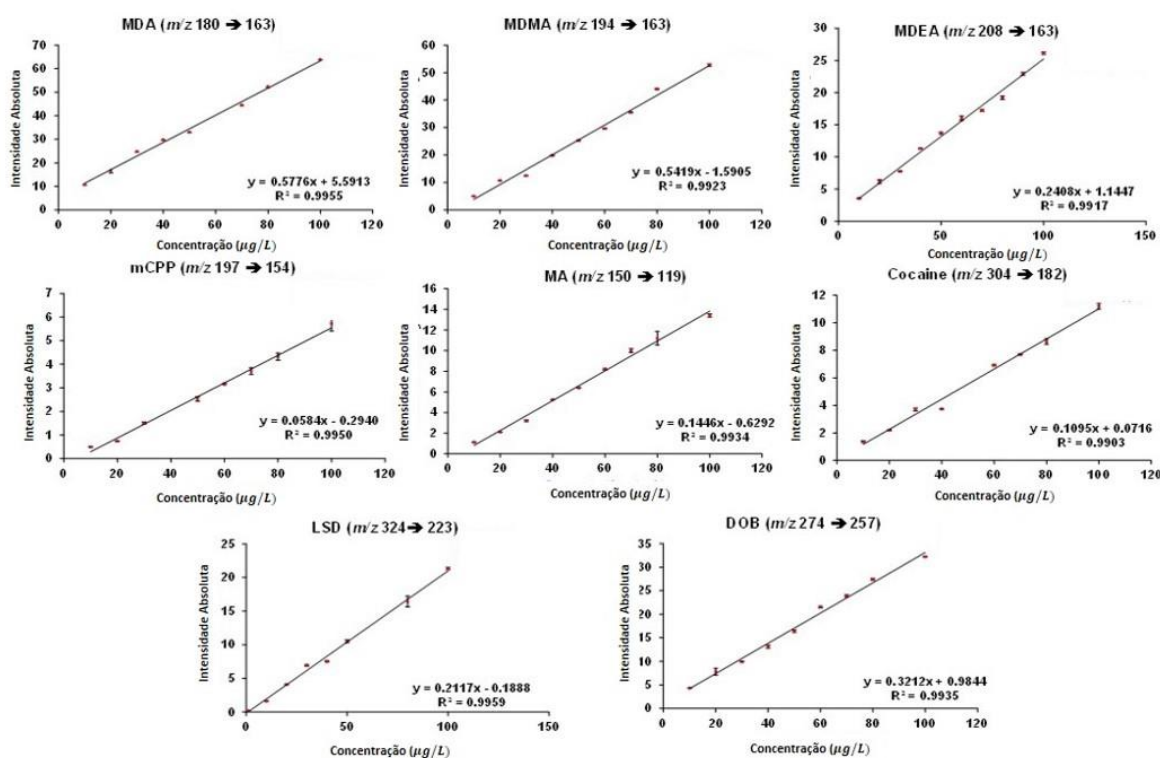


Figura 4.5. Curvas de calibração de drogas ilícitas usando PS(+)-MS. [50]

Os dados experimentais indicam que as razões de intensidade de íons do adulto predominante das transições MS/MS mais abundantes foram lineares no intervalo de 1 a 110 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentando bons valores de LD e LQ como exibido na **Tabela 4.1**. Uma boa linearidade aqui alcançada é proeminente porque foram obtidos sem o uso de padrão interno isotopicamente marcado.

Tabela 4.1. Valores da equação de calibração, R², LD, e LQ para oito drogas ilícitas. [50]

Padrões	Equação	Transições MS/MS	R ²	LQ ^a	LD ^a
MDA	$y = 0,5776x + 5,5913$	180 → 163	0,9955	1,21	0,36
MDMA	$y = 0,5419x - 1,5905$	194 → 163	0,9923	1,64	0,49
MDEA	$y = 0,2408x + 1,1447$	208 → 163	0,9917	3,22	0,96
mCPP	$y = 0,0584x - 0,2940$	197 → 154	0,9950	2,24	0,67
MA	$y = 0,1446x - 0,6292$	150 → 119	0,9934	2,26	0,68
Cocaína	$y = 0,1095x + 0,0716$	304 → 182	0,9903	3,34	1,00
LSD	$y = 0,2117x - 0,1880$	324 → 223	0,9959	0,58	0,17
DOB	$y = 0,3212x + 0,9844$	274 → 257	0,9935	1,96	0,59

a=concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$

4.5 Conclusão

A técnica PS-MS comprova o potencial como uma ferramenta poderosa para elucidação de inúmeros casos em química forense. Este trabalho confirma a diversidade de aplicações na área da ciência forense. A razão sinal/ruído e a sensibilidade na identificação de 25I-NBOMe por PS(+)-MS, sem pré-tratamento da amostra, foi significativamente melhor em comparação com a técnica de ESI(+)-MS, que por sua vez possui um efeito de matriz mais evidente na ionização. Na identificação das quatro amostras de extratos de canabinóides sintéticos analisados pelas duas técnicas de ionização (PS(+)-MS e ESI(+)-MS), o mesmo perfil de químico foi confirmado, provando que não há efeito da matriz na técnica de PS(+)-MS. Em ambos os casos (NBOMe's e SCs) de identificação são favorecidas no modo positivo de ionização. Para analisar extratos de folhas da planta *Cannabis sativa* L., a técnica de LS(+)-MS se mostrou promissora, e devem ser exploradas em trabalhos futuros com o objetivo de identificar o perfil químico de canabinóides em função do envelhecimento da espécie e sua condição de armazenamento.

5. PS-MS: APLICAÇÃO EM DOCUMENTOSCOPIA.

5.1 Introdução

As falsificações de cédulas afeta a economia de vários países. Em 2014, o Banco Central Brasileiro lançou um aplicativo de celular que auxilia na identificação de notas falsas, porém, ele não verifica sozinho a autenticidade das notas, apenas fornece os elementos para que a pessoa fizesse a verificação, a partir da comparação de imagens[113]. A inspeção visual pode levar a falsos negativos, portanto, análises confiáveis e precisas são essenciais. Diversas técnicas analíticas vêm sendo estudadas com este objetivo [114–116] como por exemplo, análises por imagens espectrais de Raman para detecção de explosivos em notas [117]; a espectrometria de massas com fonte de ionização ambiente[118,119]. Em alguns casos são utilizados corantes anti-roubos, denominados ATDs, que são ativados durante o roubo e criam uma nuvem de partículas de corante ou líquido de imersão, que destina-se a provocar manchas nas notas roubadas e em roupas, sapatos e outros objetos pertencentes aos ladrões. No entanto, com os avanços tecnológicos, os ladrões realizam procedimentos de branqueamento das notas manchadas, e técnicas analíticas, acessíveis a população, que consigam identificar tais corantes são necessárias[120].

Os primeiros estudos utilizando a espectrometria de massas direcionadas para a análise de tintas em documentos surgiram no período de 2005-2006.[121,122] As fontes *Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry* (LDI-MS) e *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry* (MALDI-MS)[111] foram utilizados para estudar o envelhecimento dos corantes violeta de metila (MV, m/z 372) e violeta de etila (EV, m/z 456), usados em canetas esferográficas de coloração azul. Envelhecimentos acelerados (temperatura, luz, e umidade) e naturais ($t = 365$ dias) foram estudados.[123] Apesar do seu pioneirismo na documentoscopia, o uso da técnica de MALDI/LDI apresenta algumas desvantagens: **a)** destruição do documento; **b)** uso de matrizes orgânicas: a otimização e a reprodutibilidade das condições de ionização nem sempre são um processo simples; **c)** uso de solventes: caso seja necessário extrair o corante do papel, os estudos de contraprova de documentos questionados não poderiam ser

realizados; **d)** laser: dependendo de sua potência, pode haver degradação do analito.

A partir de 2006, várias fontes de ionização ambiente foram empregadas na área de documentoscopia, são elas: DESI,[102] EASI,[124–127] PS-MS,[21] plasma assisted laser desorption ionization mass spectrometry (PALDI-MS),[128] e electrospray laser desorption ionization mass spectrometry (ELDI-MS)[129–131]. Os principais problemas abordados foram: análise de tintas (perfil químico, envelhecimento, cruzando linhas de tinta azul, e a falsificação de escrita), a classificação das notas (falsificados e autênticos), [118,124,129,130] e documentos de veículo,[19,40,105,108].

As técnicas forenses utilizadas para inspecionar a superfície das notas precisam ser não destrutíveis, rápidas, simples e baratas. Nesta área, a preservação da prova material nas análises periciais é fundamental para manter a integridade da amostra e construção de laudos. Portanto, o desenvolvimento de metodologias analíticas com pouco ou nenhum preparo de amostra (não-destrutivos), de baixo custo de manutenção, de fácil operação [132,133] e que possibilite as análises *in situ* são essenciais.

5.2 Objetivos

Aplicar a técnica PS(+)-MS a seis tipos diferentes de canetas esferográficas azuis a fim de se obter o perfil químico.

Estudo de cruzamento de traços para investigar a sobreposição de linhas de uma mesma caneta.

Analisar documentos a autenticidade de notas de R\$ 100,00 com a técnica PS classificando classificação das notas

Realizar um estudo de caso de documentos questionados de 1996.

5.3 Metodologia

5.3.1 Materiais e Reagentes

Notas de R\$ 100,00 (reais) autênticas, falsas apreendidas e falsificadas (*homemade*) foram estudadas por PS, sendo 3 de cada tipo. As notas falsas apreendidas foram obtidas pela PC-ES. Além disso, notas de R\$ 100,00 foram produzidas pela impressão (Jato de tinta e *LaserJet*) em papel office tipo branco; que foi chamado como notas *homemade*. O solvente utilizado para análise de PS foi o metanol grau HPLC (Vetec Química Fina Ltda, Brasil).

5.3.2 Preparo das amostras

Documentoscopia (Análise de papel moeda e cruzamento de traços)

O perfil químico de seis canetas esferográficas (Bic[®], Compacto[®], Faber Castel[®], Molin[®], Pentel[®], Tech[®]) e cédulas de R\$ 100,00 autênticas, falsas e *homemade* (*Deskjet*[®] e *Laserjet*[®]) foram obtidos pela técnica de PS(+). Para cada análise, um pequeno papel no formato triangular (5(base)x10(altura)) mm foi posicionado sobre a área investigada (rubricas ou traço produzido por canetas esferográficas) e colocado sobre o papel 10 µL de metanol para que ocorra o processo de extração na superfície investigada.

Para estudar os cruzamentos traços, uma caneta (Compacto[®]) foi usado para produzir dois traços com uma diferença de tempo de 7 dias. As análises de PS(+) foram realizadas após um período total de 14 dias. Posteriormente, foram analisados três pontos: trace 1, traço 2 e sobre a intercepção das linhas. Para extrair os corantes, um papel triangular umidificado com metanol foi colocado sobre cada traço. Após 5 minutos de secagem, o papel triangular foi colocado em frente da entrada do analisador (FT-ICR MS)(**Figura 2.2**) e 20 mL de metanol foram usados para produzir o spray. O procedimento foi repetido para o segundo traço e para a sua intercepção.

Os experimentos com PS(+) foram realizados utilizando a espectrometria de massas por Transformada de Fourier de ressonância cíclotron de íons (FT-ICR MS, modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics Bremen, Alemanha)[92]. Acumulação de íons foi 0,060 s e os espectros de massa foram adquiridos com 16 scans de sinais transitórios no domínio do tempo em 512 k-points. Com capacidade de resolução, $m/\Delta m_{50\%} = 67\ 000$ (onde $\Delta m_{50\%}$ é a integral do pico m/z 304) e uma precisão <2 ppm em massa nas atribuições das fórmulas moleculares inequívocas para os íons moleculares isoladamente carregados, com tensão de 3,8Kv.

No estudo de caso o espectrômetro de massas utilizado foi da marca Thermo LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) [21]operado no modo positivo de ionização, localizado na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. As condições instrumentais foram: voltagem = 4,5 kV; voltagem do *tube lens* = 65V; faixa de aquisição de íons: m/z 100 – 1000.

Documentoscopia (Estudo de caso)

O perfil químico orgânico de canetas esferográficas e impressora dos documentos abaixo, **Figura 5.1**, foi analisado usando PS(+) de seis rúbricas presentes nas folhas de numeração 1 e 3 e as assinaturas presentes na última folha do contrato.



Figura 5.1. Folhas 1, 3 e 6 analisadas pela técnica de PS(+)-MS.

Cada rubrica/assinatura foi analisada isoladamente ou separadamente por meio de um processo de extração como mencionado anteriormente.

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Documentoscopia

Perfis de canetas

A **Figura 5.3** mostra espectros obtidos por PS(+)-MS de seis tipos diferentes de canetas esferográficas azuis (canetas 1 - 6). Basicamente são identificados três tipos de corantes: 1,3-dimetil-1,3-ditolylguanidine (m/z 268), MV (ou violeta básico 3) para m/z 372, e azul básico 26 (m/z 470); as suas estruturas são mostradas na **Figura 5.2**. Os íons em m/z 372 e 470 foram detectados como cátions (espécies M_2^+ e M_3^+), enquanto que o íon a m/z 268 foi detectado na sua forma protonada ($[M_1 + H]^+$). Entre eles, o corante MV é principalmente aplicado como "relógio químico". [126] Em 2010, Lalli et al. [126] mostrou os perfis de degradação do violeta de base 3 (m/z 372) e azul básico 26 (m/z 470) corantes da tinta na escrita sobre a superfície do papel exposta à luz durante 72 h. Uma série de decaimento na ordem de m/z 14, típico da degradação de corantes (m/z 372, 358, 344, 330, 316, 302 e 288 para o violeta básico 3 e m/z 470, 456, 442, 428, 414 para azul básico 26), devido à substituição de grupos metilo por hidrogênio.

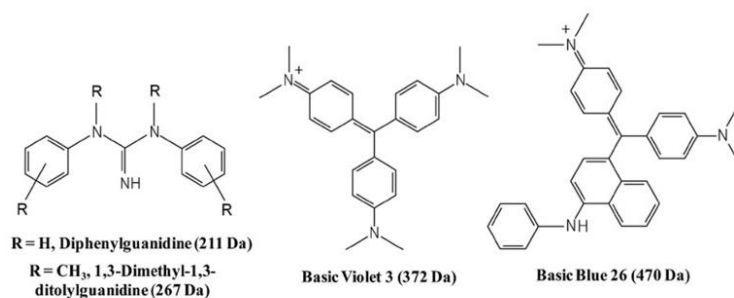


Figura 5.2. Principais corantes utilizados em canetas esferográficas de coloração azul registrados na literatura.[21]

A datação de documentos utilizando como marcador os íons de m/z 372 e 470 é feita a partir do monitoramento de suas intensidades relativas ($R_{II_{372}}$ e $R_{II_{470}}$)[126], equações 5.1 e 5.2, respectivamente:

$$R_{II_{372}} = I_{372} / (I_{372} + I_{358} + I_{344}) \quad \text{Equação 5.1}$$

$$R_{II_{470}} = I_{470} / (I_{470} + I_{456}) \quad \text{Equação 5.2}$$

A partir do perfil químico observado na **Figura 5.3**, as canetas podem ser agrupadas em três grupos distintos: **i)** Caneta 1: contendo os íons de m/z 268 e 372; **ii)** Canetas 2-5: contendo os íons em m/z 372 e 470 e valores similares de $R_{II_{372}}$ (0,53-0,58) e $R_{II_{470}}$ (0,86-0,94); e **iii)** Caneta 6: contendo apenas o íon de m/z 372. Adicionalmente, diferentes valores de $R_{II_{372}}$ foram observados para as canetas da marca caneta 1 ($R_{II_{372}} = 0,95$) e caneta 6 ($R_{II_{372}} = 0,81$) em relação às canetas pertencentes ao grupo **ii**.

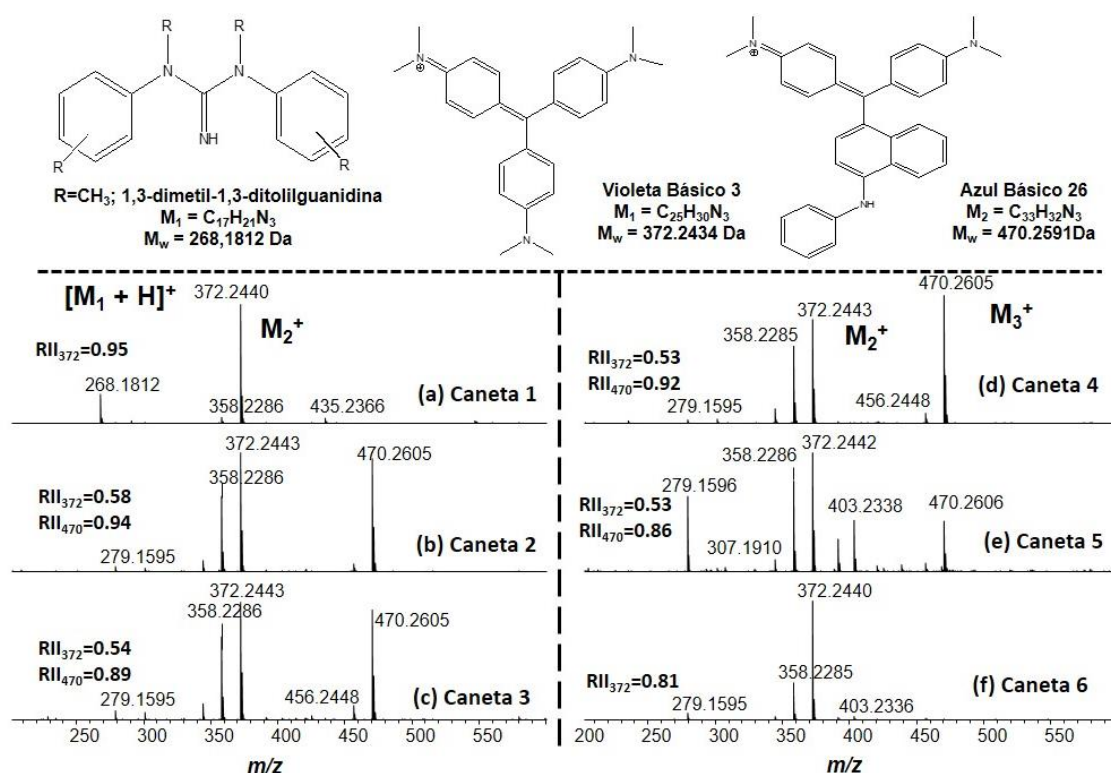


Figura 5.3. Espectros de PS(+)-MS de seis diferentes marcas de canetas azuis. [50]

Cruzamento de traços

As modificações fraudulentas de informações nos documentos podem ser feitas pela superposição de linhas de tinta.[126] Para verificar a capacidade de PS na identificação da sequência de canetas de tinta azul no cruzamentos de traços, uma linha foi escrita com uma caneta azul que contém principalmente Violeta Básico 3 (m/z 372) e azul básico 26 (m/z 470). A primeira linha (traço 1, **Figura 5.4a**) foi então sobreposta por uma segunda linha de tinta (traço 2, **Figura 5.4b**) escrito com a mesma caneta (caneta 2), após o período de 7 dias. Ambas as linhas resultantes de tinta azul (traços 1 e 2, **Figuras 5.4a-b**), bem como a linha de tinta azul de intersecção (**Figura 5.4c**) foram então analisadas por PS depois de um período total de 14 dias. A partir dos valores RII_{372} , no ponto de intersecção das linhas apresentadas como sendo $RII_{372} = 0,60$, semelhantemente ao traço 2 ($RII_{372} = 0,59$). Portanto, o traço 2 se sobrepõe ao traço 1 como era esperado, sendo demonstrado que o PS é capaz de detectar modificações fraudulentas no período de tempo curto.

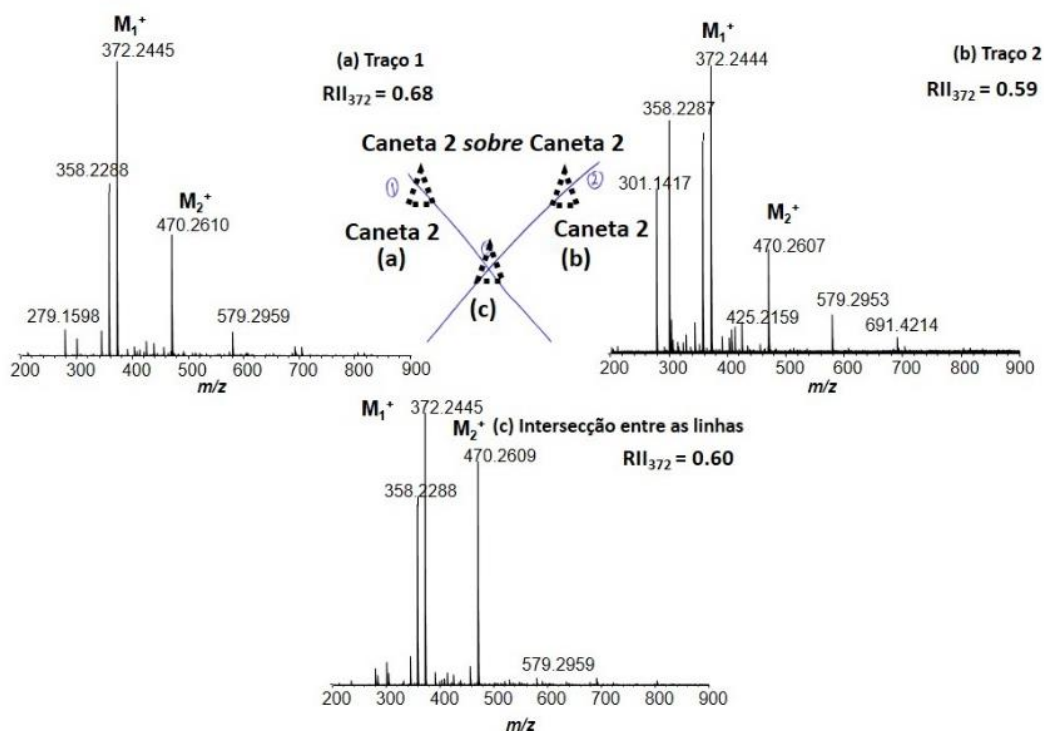


Figura 5.4. Análise de PS(+)-MS de cruzamento de traços produzidos por canetas de mesma marca (traço 2 sobre traço 1 usando uma caneta 2). Note que o traço 2 foi produzido em um período de tempo de 7 dias após o traço 1. MODIFICADA [50]

Estudo de caso

A **Figura 5.5a-e** apresenta os espectros de PS de um documento questionado possuindo cinco rubricas distintas. As questões a serem respondidas são: **i)** a assinatura I é contemporânea com o documento (1996)? e **ii)** se as canetas utilizadas possuem perfis químicos distintos ou similares?

Para a questão 1, percebe-se que as rubricas I e II apresentam o mesmo perfil químico (presença dos sinais de m/z 372, 358, 344 e 470, **Figuras 5.5a-b**, e valores idênticos de $R_{II_{372}}$, $R_{II_{372}} = 0,48$). Portanto, elas mostram perfis químicos similares e distinguíveis das demais (**Figura 5.5c-e**), sendo, portanto, as assinaturas I e II contemporâneas entre si. Para a questão 2, note que as demais rubricas (III (5.5c), IV (5.5d) e V (5.5e)) mostram estas diferenças, totalizando o uso de 4 canetas. O valor de $R_{II_{372}} = 0,75$ para a rubrica III, **Figura 5.5c**, é diferente das assinaturas I e II. Para a rubrica IV, **Figura 5.5d**, nenhum corante foi visualizado enquanto que para a assinatura V, **Figura 5.5e**, dois corantes estão presentes, apresentando $R_{II_{372}}$ e $R_{I_{268}}$ de 0,76 e 0,17, respectivamente.

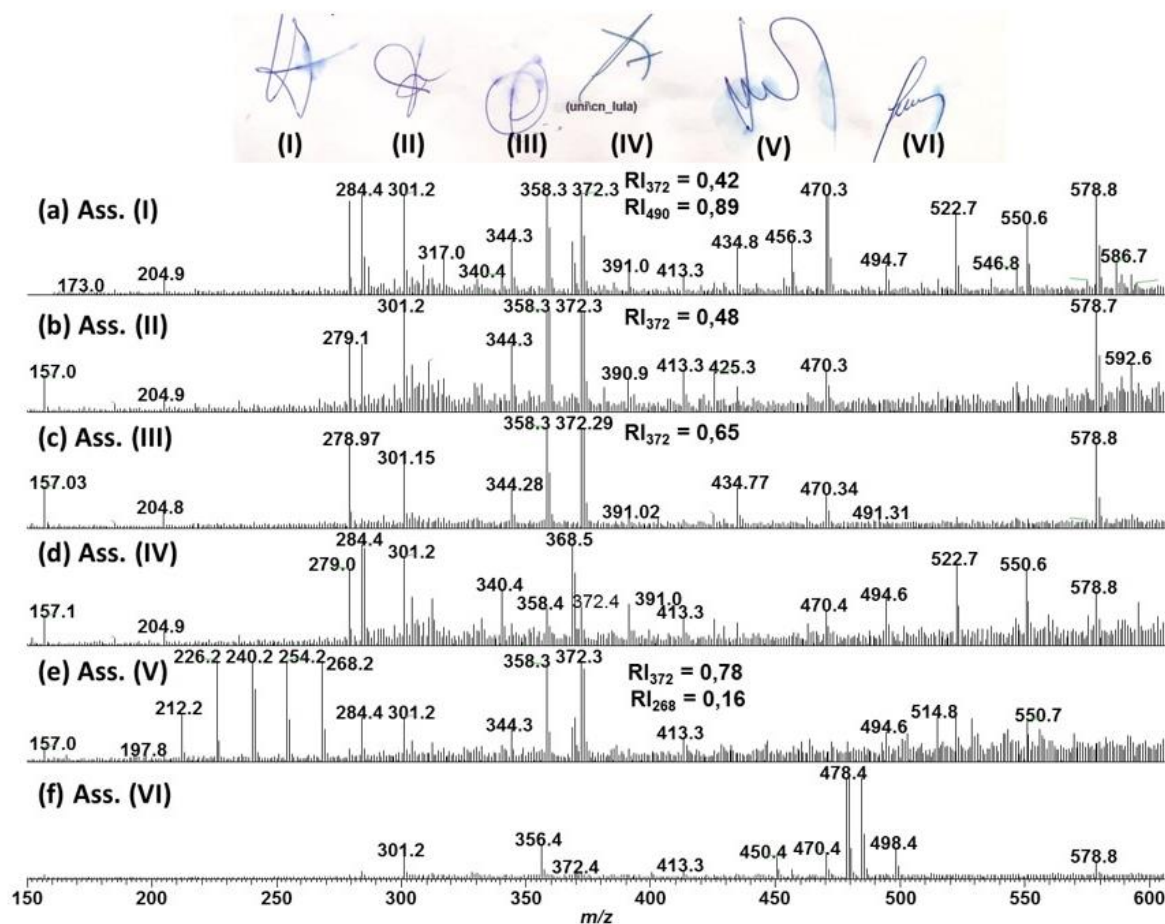


Figura 5.5. Estudo de caso: espectros de PS(+)-MS de cinco rubricas analisadas em um documento questionado. Note que das cinco assinaturas, as assinaturas I e II foram realizadas usando a mesma caneta, enquanto que as outras utilizaram canetas diferentes. [50]

A **Figura 5.6a-f** mostra os espectros de PS(+) das seis rubricas analisadas na folha 3 (terceira folha) do documento (**Figura 5.1**). Similar as considerações observadas para a folha 1, novamente temos que o perfil químico referente as rubricas I e II são semelhantes, e das rubricas III, IV, V e VI distinguíveis entre si. Em geral, percebe-se que não houve variação da composição química das canetas usadas entre as folhas de numeração 1 e 3.

Em relação à datação de tinta, os valores de RI_{372} observados para as rubricas I, II, III e V foram de 0,42, 0,48, 0,65 e 0,76, respectivamente. Em geral, menores valores de RI_{372} foram observados para as rubricas I e III, quando comparado com a folha 1. Isso é um indicativo de imprecisão do método de $\pm 0,06$ ou de uma degradação mais acelerada desses corantes na folha 3.

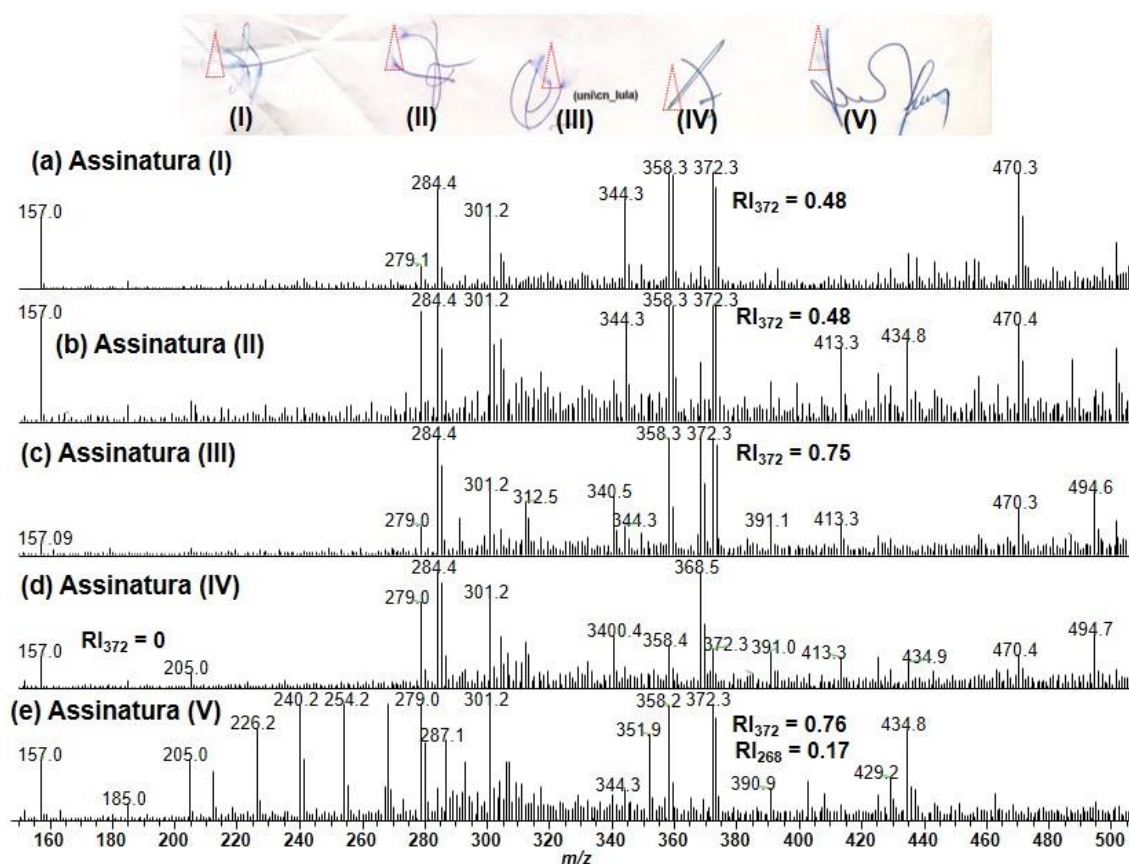


Figura 5.6. Espectros de PSI(+)-MS de seis rubricas analisadas na folha 3 (terceira folha) do documento.

A **Figura 5.7** mostra os espectros de PS de cinco assinaturas, Luiz, Teobaldo, Paulo, Gildázio e LF (perito Sr. Hamílto) que correspondem às rubricas 2, 6, 1, 3 e 5, respectivamente. O espectro de PS mostra um similar perfil químico entre as rubricas (folhas 1 e 3, **Figuras 5.4** e **5.5**, respectivamente) com as assinaturas, **Figura 5.6**, com exceção da assinatura do Sr. Teobaldo, **Figura 5.6b**. Essa assinatura em questão mostra-se similar ao observado com o do perfil químico do Sr. LF, **Figura 5.6e**.

Em relação aos valores de RI₃₇₂ (0,50 e 0,42) para as assinaturas de Paulo e Luiz, rubricas I e II, foram próximos aos observados entre as folhas 1 (RI₃₇₂ = 0,48 e 0,48) e 3 (RI₃₇₂ = 0,42 e 0,48). Em geral a variação dos valores observados para o Srs. Luiz e Paulo foram da ordem de $\pm 0,06$ e $\pm 0,08$, sendo semelhantes e indicando a contemporaneidade entre si. Para o corante com RI₄₇₀ da assinatura correspondente ao Sr. Paulo uma variação de $\pm 0,05$ foi observada.

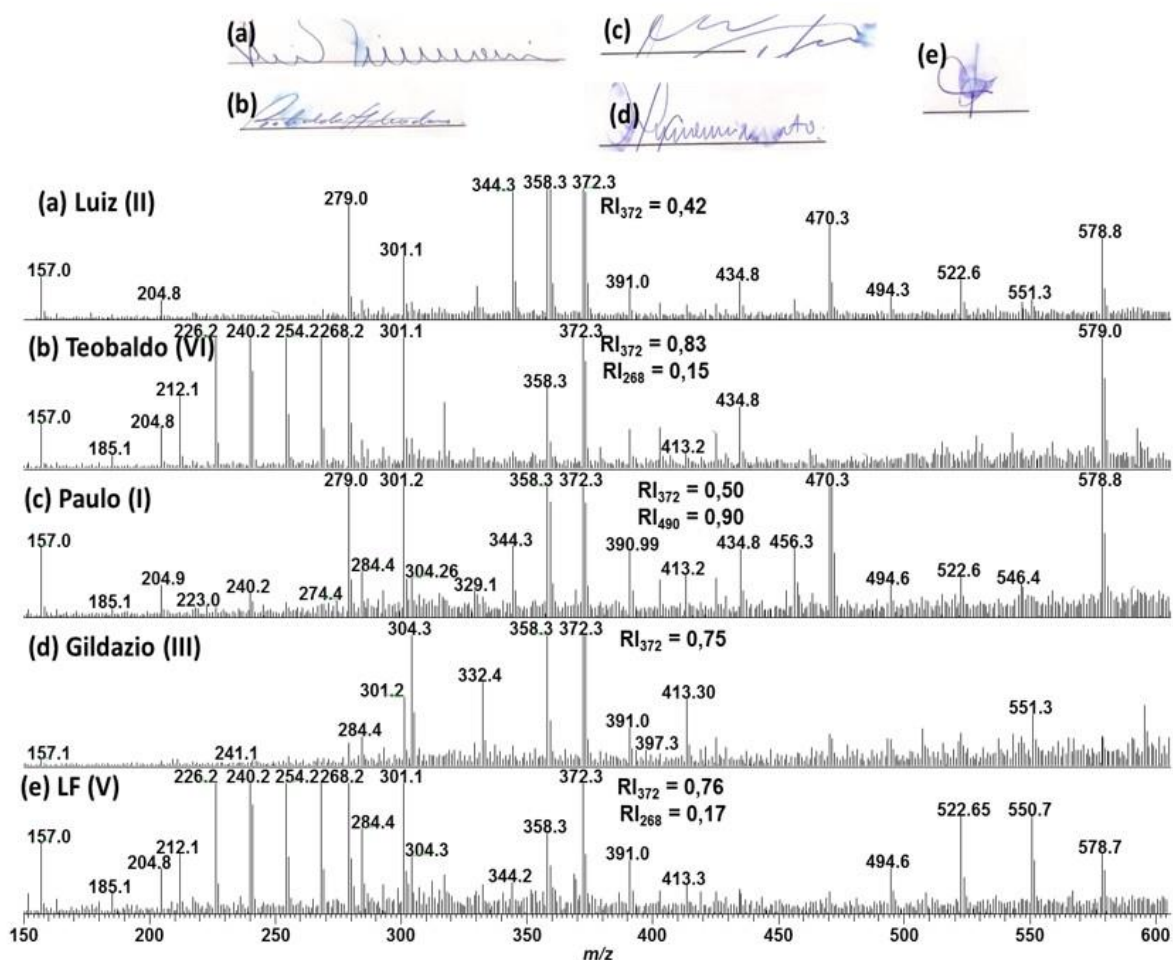


Figura 5.7. Espectros de PSI(+)-MS das assinaturas da última folha do documento.

Com base no trabalho publicado em 2015 por Ferreira *et al.*[21] os valores de RI₃₇₂ usando a técnica de PS para o ano de 2015 de diferentes padrões de caneta esferográfica de coloração azul são mostradas na **Tabela 5.1**. Todos os valores são superiores, quando comparados aos encontrados para as rubricas e assinaturas do Sr Paulo. Um cálculo foi realizado para estimar a variação dos resultados em função do tempo. Uma variação máxima entre as assinaturas e rúbricas podem existir em um intervalo de aproximadamente 7 anos.

Tabela 5.1. Comparação dos valores de RII_{372} com a literatura e a variação esperada desses valores por ano. A variação observada para os valores de RII_{372} para a assinatura do Sr. Paulo foi de 0,08

Canetas	RII_{372}	Varição de RII_{372} * estimada por ano	Varição de $\pm 0,08$ corresponde à:
Caneta H (2015) ¹	0,65	0,010	8 anos
Caneta F (2015) ¹	0,75	0,015	6 anos
Caneta J (2015) ¹	0,68	0,011	8 anos
Caneta Sr. Paulo (1996)	0,47 (valor médio)	-	-
Valor médio		-	7,3 anos

*Variação do RII_{372} por ano = $(RII_{372} \text{ caneta (2015)} - RII_{372} \text{ Paulo}) / \text{tempo (19 anos)}$

Perfis de cédulas

A técnica de PS(+)-MS pode também ser usada para classificar notas autênticas e falsas de cédulas de R\$ 100,00. A **Figura 5.8a** mostra que a cédula autêntica tem um perfil químico característico, identificando a presença do plastificante bis(2-etilexil)ftalato como marcador natural (íon $[2M + Na]^+$ de m/z 803 onde $M = C_{24}H_{38}O_4$).[124,125,127] Já os íons detectados para as cédulas de R\$ 100,00 falsificadas, **Figura 5.8d-e**, mostram perfis contendo uma ampla série oligomérica (mais evidente nas **Figura 5.8e**) os íons de m/z 300–900 com a distribuição máxima centrado em m/z 513. Outros íons correspondem a álcoois etoxilados (íons de repetição separadas por 44 m/z)[127]. Por outro lado, os perfis químicos das cédulas fabricadas pelas impressoras *Deskjet*[®] e *Laserjet*[®] foram distintas entre si. A **Figura 5.8b** mostram distribuições oligoméricas muito mais abundantes (m/z 400-1000) em relação às **Figura 5.8d-e** de íons decorrentes principalmente de álcoois propoxilados separados por 44 unidades de m/z enquanto que para impressão na *LaserJet*[®], três íons intensos são detectados (m/z 194, 391 e 584).

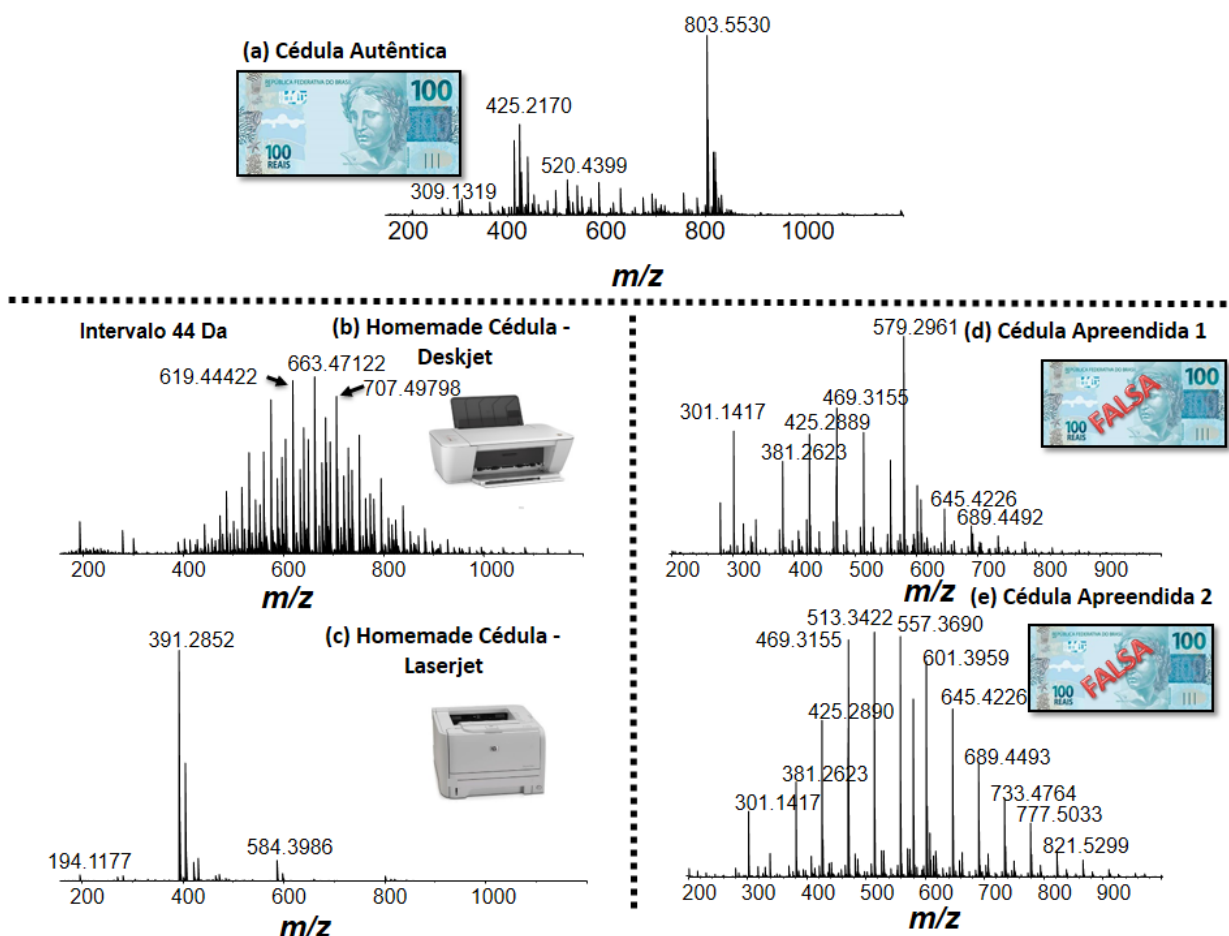


Figura 5.8. Espectro de PS(+)-MS de cédulas de (a) R\$ 100 autênticas, (d-e) falsas e (b-c) homemade a partir das impressoras Deskjet® e Laserjet®.[50]

5.5 Conclusão

A técnica PS foi capaz de gerar os perfis químicos das 6 diferentes tipos de canetas, sendo possível calcular as razões de intensidade de íons m/z 372 e 470. A partir das diferenciações constatadas o estudo de cruzamento de traços foi capaz de identificar que o traço 2 se sobrepõe ao traço 1, por possuir RII_{372} de 0,60 no cruzamento, sendo este valor muito semelhante ao traço 2 que é de 0,59.

No estudo de caso foram identificados que o perfil químico das canetas nas assinaturas I e II são idênticos, baseado em valores de RII_{372} e distinguíveis das demais. O perfil químico das assinaturas III e V são distinguíveis de todas. Já o perfil químico das assinaturas IV e VI são bastante inorgânicos, irreprodutíveis e não são questionáveis. A variação do perfil químico da caneta entre as rubricas e a

assinatura do Sr. Teobaldo é um indicativo de que o indivíduo utilizou duas canetas para a marcação do documento. Em uma análise pontual das rubricas I e II e assinaturas respectivas de Paulo e Luiz, é possível que a assinatura do Paulo (rubrica I) seja contemporânea com a assinatura do Luiz (rubrica II), em ambos casos uma variação R_{II372} próxima foi observada.

A técnica PS é viável na classificação de notas de reais autênticas e falsificadas; e na relação do uso de impressoras *LaserJet®* e *DeskJet®*; visto que a falsificação tem se modernizado, o PS se apresenta com potencial considerável na elucidação destes e outros casos.

6. PS-MS: APLICAÇÃO EM PLANTAS FITOTERÁPICAS.

6.1 Introdução

A utilização dos medicamentos fitoterápicos é uma realidade para aproximadamente 80% da população mundial segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)[134], fato mais evidenciado em países em desenvolvimento, onde ocorrem uma precarização dos atendimentos básicos à população mais carente. Este tipo de medicação se adequa às necessidades de vários municípios no atendimento primário à saúde. Os fatores essenciais nesta expansão da utilização destes medicamentos dá-se por: (1) os efeitos adversos dos fármacos sintéticos (2) preferência por tratamentos “naturais” (3) crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais (4) desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade (5) desenvolvimento de novas formas de preparações e (6) administração dos produtos e relativo baixo custo[135].

As técnicas recomendadas pela OMS abrangem a determinação de inúmeros parâmetros da planta e de tudo que possa vir apresentar o produto final para comercialização. Porém, nenhuma das técnicas recomendadas apresentam uma metodologia direta de análise para a composição química destes materiais.

O tratamento fitoterápico como um suplemento dietético, para finalidade médica, são extraídos somente das plantas.[109] As ervas destinadas à perda de peso são vendidas livremente no mercado brasileiro, mas representam sérios riscos para os consumidores quando os fabricantes adicionam adulterantes sintéticos (por exemplo, anoréxicos e benzodiazepínicos). Os casos de adulteração aumentaram ao longo dos anos devido à falta de legislação e supervisão efetivas sobre o manuseio e comercialização desses medicamentos no Brasil. Portanto, é importante desenvolver de forma eficaz um método analítico capaz de identificar drogas sintéticas na formulação de ervas.

6.2 Objetivos

Avaliar a composição de 15 diferentes ervas medicinais para a perda de peso, afim de se verificar sua composição com a fonte ambiente *Paper Spray*.

6.3 Metodologia

Para análise de PS(+) de medicamentos fitoterápicos, quinze ervas diferentes foram maceradas e extraídas com metanol (grau HPLC - Vetec Química Fina Ltda, Brasil) durante 30 min num banho de sonicator. Papéis triangulares (Whatman Grade 1, GE Healthcare, EUA) 1 cm de cada lado foram utilizados na análise de todas as amostras. Adicionou-se ao papel um volume de 15 μ l de cada extrato e deixou-se secar à temperatura ambiente. O papel foi então umedecido com 15 μ l de metanol dopado com ácido fórmico a 0,1% v/v (Sigma Aldrich). Os espectros de massa foram obtidos num espectrômetro QExactive de alta resolução (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Os parâmetros utilizados na análise foram: resolução 70.000; Tensão do spray de 3,5 kV; Média de 3 micro-scans para cada espectro; Temperatura capilar 275 °C; S-lens RF Nível de 50.

6.4 Resultados e discussão

Neste estudo, introduzimos uma nova aplicação para PS-MS como uma metodologia de impressão digital química no monitoramento da qualidade e autenticidade dos produtos fitoterápicos vendidos no mercado brasileiro, **Figura 6.1**. Os espectros de massa PS(+)-MS forneceram um perfil químico detalhado da impressão digital das amostras fitoterápicas. A sacarose e glicose foram detectadas em todas as amostras analisadas como adutos de sódio e potássio, $[M + K]^+$ de m/z 381 e $[M + Na]^+$ de m/z 203, respectivamente, **Figura 6.1c-d**.

A cafeína (m/z 195), **Figura 6.1b**, foi encontrada como adulterante em uma amostra, uma vez que nenhum dos ingredientes tinha anteriormente este composto. Polifenóis e ácidos graxos estavam presentes na maioria das amostras bem como mono, di-etri-acilgliceróis. A PS(+)-MS detectou sibutramina em uma das amostras analisadas, **Figura 6.1a**. A sibutramina é uma droga anoréxica sintética com massa

de $M=C_{17}H_{26}NCl$ e seu uso, em alguns países como o Brasil, é proibido. A sibutramina é detectada como íon $[M + H]^+$ a m/z 280,1827. A atribuição estrutural de sibutramina foi confirmada por MS/MS PS(+), mostrando perdas de $-C_9H_{19}N$ (-131 Da), $-C_8H_8NCl$ (-141 Da) e $-C_7H_6Cl$ (-155 Da). Esses achados ilustram as habilidades de PS-MS como uma ferramenta importante para examinar a qualidade e a autenticidade de amostras de ervas medicinais. Simplicidade e baixo custo torna o PS-MS uma escolha muito interessante para realização de análise de impressão digital de qualidade e autenticidade.

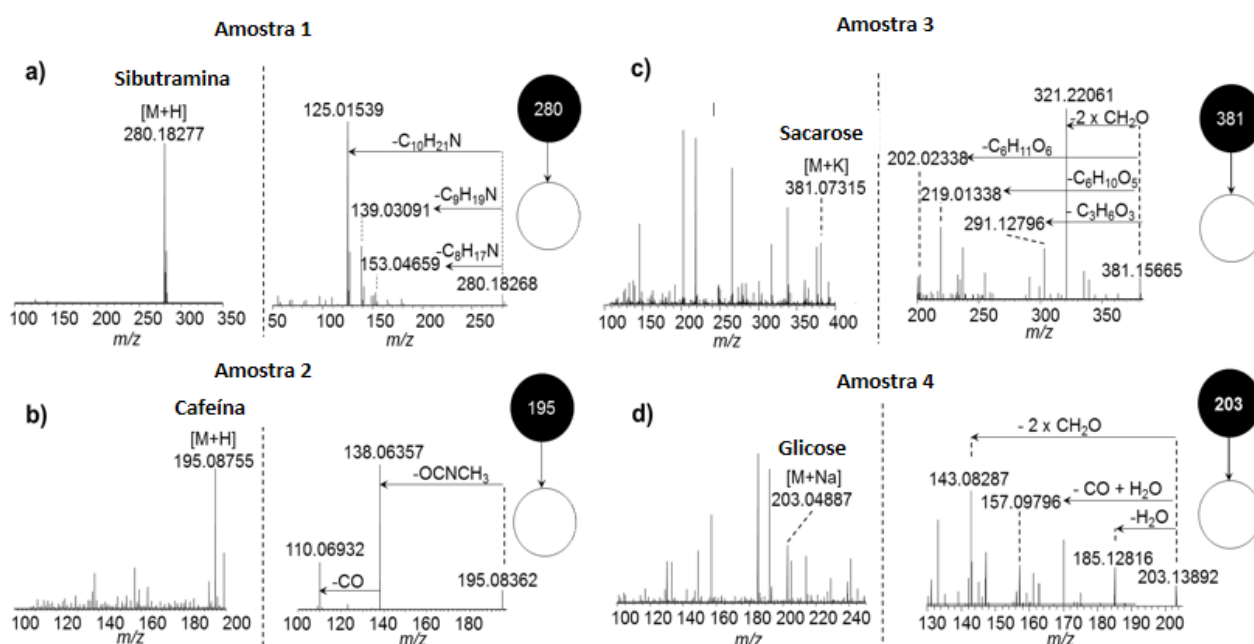


Figura 6.1. PS(+)-MS de quatro medicamentos de emagrecimento de ervas adulterados. [50]

6.5 Conclusão

PS-MS é uma técnica eficiente para monitorar a qualidade e autenticidade de produtos de ervas medicinais comumente vendidos no mercado brasileiro. Três de quinze amostras tinham alguns compostos que não estavam listados no rótulo embalado, tais como cafeína, glicose e sacarose. Uma das amostras foi adulterada com sibutramina, fortemente controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estes resultados demonstram a importância do controle de qualidade da

composição de medicamentos fitoterápicos para emagrecimento, uma vez que podem causar vários problemas para os consumidores destes medicamentos contendo compostos não especificados na embalagem, especialmente os adulterantes.

7. MICRONIR APLICADO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE COMBUSTÍVEIS

7.1 Introdução

O Brasil possui um programa de controle e monitoramento de combustíveis para garantir a qualidade em suas etapas de produção e comercialização, organizado pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Mensalmente, 15 mil amostras de combustível são coletadas aleatoriamente em todo o país e o número de análises por ano pode exceder 1,5 milhão, dependendo do tipo de combustível estudado [139]. A ANP define os procedimentos para os testes de qualidade e as normas para a comercialização destes combustíveis com base em métodos reconhecidos [139,140]. No entanto, apenas os testes preliminares são rotineiramente exigidos em postos de gasolina, sendo restritas as características físicas como aparência, cor e massa específica. Essas análises ajudam na identificação de adulteração, entretanto, elas não indicam a qualidade química do produto. Além disso, esses testes são conhecidos por serem facilmente burlados.

Diesel ou petrodiesel é o combustível mais consumido no Brasil e está sendo gradualmente substituído pelo biodiesel, que por sua vez é fonte de energia renovável [141]. O biodiesel tem propriedades físicas similares ao Diesel de petróleo [142–144], como sua aparência e densidade. No entanto, é composto de ésteres de alquila de óleos vegetais ou gorduras animais, diferenciando-o do petrodiesel. Esta característica química intrínseca permite a sua quantificação por métodos espectroscópicos [5,68,145–147].

Em contraste com os mercados europeu e norte-americano, a redução do teor de enxofre no Diesel é uma nova medida verde adotada no mercado brasileiro para reduzir as emissões de gases nocivos. A primeira medida introduzida foi a redução do teor de enxofre para um máximo de 500 mg L⁻¹ (combustível chamado S500) para ser usado em estradas do país. Ao mesmo tempo, o teor de enxofre foi então reduzido para um máximo de 10 mg L⁻¹ (Diesel denominado Diesel S10) [141], que possui o maior custo de tratamento para a remoção de enxofre, resultando em um maior valor de mercado. Esta regra é válida nas áreas metropolitanas. Portanto, o

Diesel S10 pode ser adulterado e resultando em produtos fora das especificações do mercado.

No Brasil, a gasolina comercial (gasolina do tipo C) é vendida como uma mistura binária contendo 27% v/v de etanol anidro combustível (EAC). Geralmente é adulterado pela adição de metanol, ou etanol, ou mesmo pela adição de outros produtos de hidrocarbonetos, como solventes petroquímicos e Diesel [66,67,148]. Em contraste, o combustível de etanol hidratado (EHF) é geralmente adulterado com metanol e água devido à sua afinidade química e física, como densidade e miscibilidade[149].

Várias técnicas analíticas foram usadas para detectar adulteração em amostras de combustível. A cromatografia a gás é a principal técnica analítica aplicada devido às características da amostra, como volatilidade e complexidade da matriz [67]. No entanto, outras técnicas analíticas também foram exploradas, mostrando a mesma precisão, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) [144], infravermelho próximo (NIR) [66,61,146,149], infravermelho médio (MIR) [62,74,75] e espectroscopias Raman [23, 24]. Soares *et al.*[63] revisaram outras técnicas analíticas que contribuíram para controlar a qualidade do combustível para gasolina, como a injeção de fluxo com detecção de espectrometria de emissão atômica de chama (F-AES), injeção de fluxo com detecção de espectroscopia infravermelha (FI-FT-IR) e o método de titulação Karl Fischer.

A adulteração de combustível pode ocorrer a partir da adição de um produto mais barato à mistura ou a adição de um componente não permitido. O controle da qualidade do combustível tornou-se importante em muitos países como descrito por Kalligeros e Stournas[150], causando danos ao motor dos veículos, bem como o impacto ambiental e econômico da comercialização de combustíveis de baixa qualidade ou adulterados [148,151,152].

7.2 Objetivos

Desenvolver metodologias analíticas utilizando a técnica MICRONIR portátil para a quantificação dos componentes de quatro tipos diferentes de combustíveis: (1) Biodiesel em Diesel, (2) Enxofre total em S-10 e S-500, (3) Teores de gasolina, metanol e etanol em uma mistura ternária, (4) Teores de etanol, metanol e água em uma mistura ternária de *hydrated ethyl alcohol fuel* (HEAF).

7.3 Metodologia

7.3.1 Preparação da Mistura

Para cada componente adicionado, os experimentos foram previamente projetados para cobrir uma ampla gama de concentrações. Todas as amostras foram preparadas usando uma balança analítica (Shimadzu AUW220) e armazenadas em um vidro âmbar selado a 4°C. Depois, os espectros MICRONIR foram adquiridos em triplicata com ensaios randomizados.

Um total de 133 misturas com conteúdo de biodiesel variando de 0 a 100 % m/m foram preparadas, ver **Tabela A1**. As amostras de biodiesel foram compostas por amostras de óleos de soja, azeitona, girassol, algodão, milho e óleos residuais da fritura de alimentos.

Na determinação do teor de enxofre no Diesel, foram utilizadas as misturas de Diesel S10 e S500 compradas no mercado local. Foram preparadas 16 misturas com contendo enxofre de 10 a 500 mg L⁻¹, como mostrado na **Tabela A2**.

As misturas de gasolina foram preparadas usando etanol anidro (Vetec, Brasil) e metanol de grau HPLC (Merck, Brasil). As misturas continham 0,0-75,0 % m/m de gasolina, 25,0-75,0% m/m de etanol e 0,0-50,0% m/m de metanol (**Tabela A3**).

No controle EHF, foram produzidas misturas ternárias, compostas por etanol anidro (Vetec, Brasil), metanol de grau HPLC (Merck, Brasil) e água deionizada. Estas misturas continham 0,0-100,0% m/m de etanol, 0,0-50,0% m/m de água e 0,0-50,0 %m/m de metanol (**Tabela A4**). Todos os combustíveis foram analisados em

uma ampla faixa de teores, visando uma implementação desta técnica como controle da qualidade de combustíveis em situações reais do mercado.

7.3.2 MICRONIR

A análise MICRONIR foi realizada utilizando um modelo miniatura MICRONIR TM modelo Pro 1700 fornecido pela Viavi Solutions Inc. (anteriormente JDSU Corporation, Santa Rosa, CA). Os dados foram obtidos a partir do software 2.1 da Viavi Solutions Inc. Os espectros MICRONIR foram adquiridos na faixa 908-1676 nm, com 400 varreduras, um tempo de integração de 14,1 ms, aquisição de 125 pontos por varredura, com uma distância de 6,20 nm entre as fontes de radiação, o que resultou em um tempo de medição total de aproximadamente 6s por amostra.

O instrumento é composto por uma fonte de radiação, sendo duas lâmpadas de tungstênio ($\varnothing \approx 4$ mm) associadas ao LVF usado como elemento dispersivo. O LVF é um pequeno filme de banda dielétrica que fornece ao equipamento uma relação sinal-ruído muito alta para medições NIR. Esse fato compensa parcialmente as intensidades mais baixas das bandas de absorção NIR [57,153]. Este sistema permite o desenvolvimento de instrumentos menores e uma aquisição de sinal mais rápida. O revestimento do filtro no LVF é intencionalmente posicionado em uma direção, e por causa da espessura variável do filme, o comprimento de onda transmitido através do filtro varia linearmente ao longo da direção do revestimento [56].

Após o aquecimento e a estabilização do sistema (entre 35-40°C), foram tomadas cinco leituras para cada amostra e foram feitas duas medições de referência para ajustar os espectros MICRONIR das amostras às condições do instrumento. No primeiro modo de aquisição (por transmitância), a referência foi obtida com as lâmpadas de tungstênio desligadas e sem contato com a superfície, ou seja, 0% de transmitância. No segundo modo, uma fonte de luz externa foi usada diretamente no detector de diodo (128 pixels, InGaAs não arrefecidos); Este valor é armazenado como 100% de transmitância. Os espectros MICRONIR foram obtidos com uma temperatura ambiente de 25 ± 2 °C com o acessório para líquidos (**Figura 7.1**)



Figura 7.1. Acessório para líquidos.[154]

7.3.3 Análise quimiométrica

Todos os espectros MICRONIR foram inicialmente pré-processados usando a primeira derivada pelo algoritmo *Savitzky-Golay* [155] com polinômio de segunda ordem e uma janela de 7 pontos. Posteriormente, foram construídos modelos de calibração multivariada para quantificar **a)** biodiesel em Diesel; **b)** enxofre total no Diesel; **c)** gasolina, etanol e metanol em misturas de gasolina; e **d)** etanol, metanol e água em misturas de EHF. O método de calibração multivariada utilizado foi PLS. Todos os cálculos foram realizados usando o *software Mathworks Matlab 7.0* (R2013a) com *PLSToolBox plugin* (*Eigenvector Research, Inc.*) [64,79,84,156–158].

Na construção de biodiesel no modelo de quantificação de Diesel, o conjunto de dados foi dividido em duas partes: **a)** 89 amostras para a construção do modelo de calibração e **b)** 44 amostras para validação interna do modelo. Os conjuntos de calibração e teste foram divididos usando o algoritmo *Kennard-Stone* [159]. O número de VL ideal para a construção do modelo foi otimizado pelo procedimento de validação cruzada de 5 curvas venezianas. Isso foi escolhido para reduzir a raiz quadrada média do erro de validação cruzada (RMSECV) como uma função do número de variáveis latentes, proporcionando assim um valor VL ótimo para o modelo PLS. A precisão do modelo PLS foi determinada pelo RMSEP e pelo coeficiente de determinação (R^2) [160].

Os modelos PLS construídos para determinação do teor de enxofre em Diesel, gasolina / etanol / metanol na gasolina tipo C e etanol / água / metanol em

HEAF foram elaborados usando o algoritmo rdCV [87,88]. Este procedimento é recomendado sempre que o número de amostras disponíveis para a construção do modelo é limitado, como no caso dessas três aplicações.

A presença de erros sistemáticos e de tendências foram investigados de acordo com ASTM E1655 [161] e o método relatado por Filgueiras *et al.* [162], respectivamente. Após a construção dos modelos PLS, foram determinadas algumas figuras de mérito, como R^2 (coeficiente de determinação), LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação) [162]. Os valores LD e LQ são definidos como:

$$LD = 3,3\delta_x b_k \quad \text{Equação 7.1}$$

$$LQ = 10\delta_x b_k \quad \text{Equação 7.2}$$

Onde δ_x corresponde a uma estimativa do nível de ruído no conjunto de dados; e b_k para o coeficiente de regressão para a variável k^{th} com base em um modelo de regressão [88].

7.4 Resultados e discussões

A **Figura 7.2** mostra os espectros MICRONIR dos combustíveis obtidos antes (**Figura 7.2a-d**) e após a aplicação da primeira derivada (**Figura 7.2e-h**), onde uma variação mais alta entre as amostras foi observada quando o pré-tratamento é realizado (**Figura 7.2e-h**).

A presença das bandas na região de 1100-1200 nm corresponde ao segundo sobreton do grupo funcional C-H, que foi evidenciado em todas as amostras (**Figura 7.2e-h**). Esta banda é mais abundante para amostras de misturas de Diesel (**Figura 7.2e-f**) seguido de misturas de gasolina (**Figura 7.2g**) e etanol (**Figura 7.2h**). O Diesel e a gasolina são compostos de hidrocarbonetos de cadeias longas (HC) (C_8-C_{16} e C_4-C_{12} , respectivamente) [47], portanto a maior intensidade das bandas entre 1100-1200 nm é atribuída à presença de uma maior quantidade de ligações CH em seus grupos de hidrocarbonetos. Outras bandas vibratórias semelhantes encontram-se nas regiões de 1300-1400 e 900-1000 nm, que se referem às combinações do grupo CH e ao 3º sobretons dos grupos CH, CH_2 e CH_3 , respectivamente [63].

Observe que um maior número de sinais foi verificado principalmente nas regiões 1300-1680 nm para as misturas ternárias de gasolina / etanol / metanol e etanol / água / metano (**Figura 7.2g-h**). Nesta região se distingue este grupo de misturas das amostras de Diesel e biodiesel, podendo assim ser considerada como uma região de impressão química. É atribuído à presença do 2° sobreton a presença do grupo OH [63,149], que está presente em alguns adulterantes (água e metanol) e no EHF. Os espectros MICRONIR das misturas de biodiesel/Diesel têm poucas faixas acentuadas nesta região, provavelmente por causa do maior caráter alifático dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais [163]. A banda C-O característica dos grupos éster (do biodiesel) está normalmente localizada na região 2200-2300 nm; No entanto, não foi usado na interpretação dos dados, uma vez que os espectros foram adquiridos apenas na faixa 908-1676 nm.

Para a **Figura 7.2c-d**, original (**Figura 7.2c**) e primeira derivada (**Figura 7.2d**) dos espectros MICRONIR das misturas Diesel S10 e S500, contendo diferentes conteúdos de enxofre, é difícil observar qualquer alteração visual no perfil espectral. No entanto, a presença de benzotiofenos no petrodiesel pode ser explicada por uma variação sutil no perfil espectral com máximos de absorção na região de 1100-1300 nm, **Figura 7.2c**. Essas bandas são originadas de combinações de sobretons de alongamento C-H do anel em 1550-1350 nm e vibração =C-H fora do plano a 800-690nm na faixa espectral MIR.

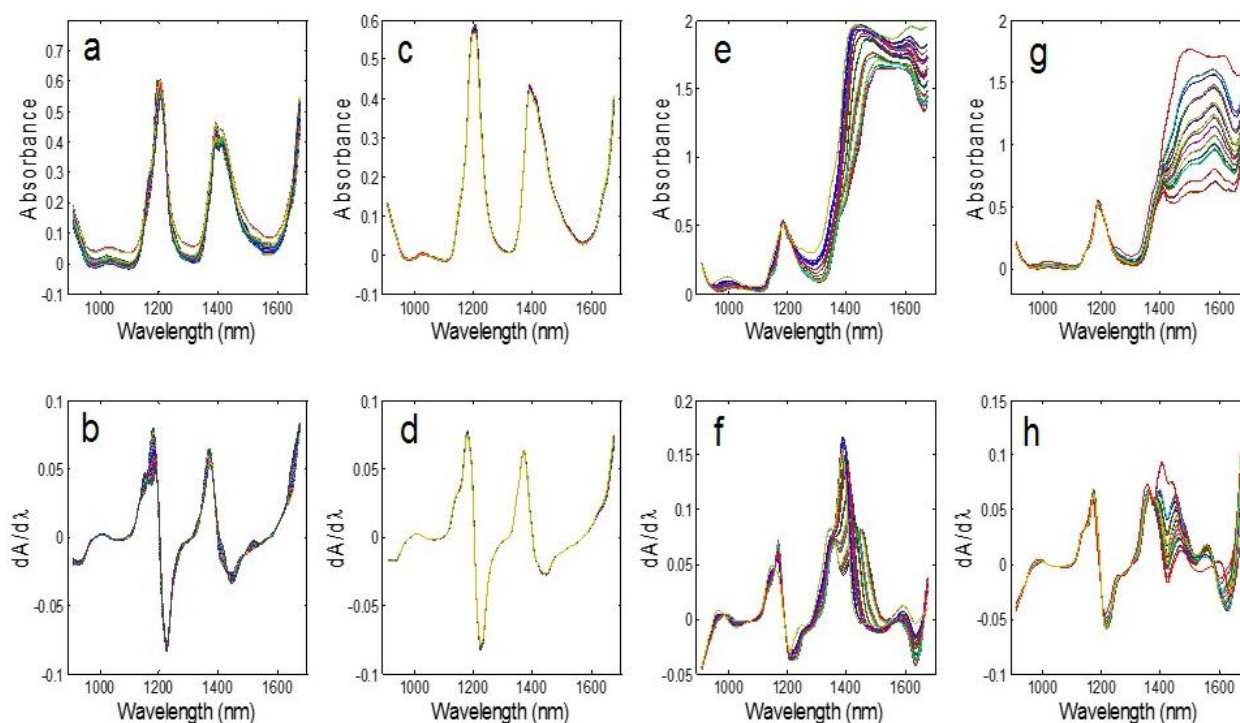


Figura 7.2. Original (a, c, e, g) e primeira derivada (b, d, f, h) de MICRONIR espectros das misturas de biodiesel/Diesel; misturas Diesel S500/S10; Combinação de gasolina/etanol/metanol ternário; e das misturas ternárias etanol/água/metanol, respectivamente.[49]

7.4.1 Quantificação de biodiesel em misturas de biodiesel/Diesel

Os gráficos previstos para os teores de biodiesel no Diesel são mostrados na **Figura 7.3a**. O modelo PLS foi construído com cinco variáveis latentes contendo 89 amostras de calibração [64]. Foi observada uma excelente relação entre a referência e os valores previstos com R^2 de 0,998, ver **Tabela 7.1**. Os intervalos de confiança indicam a precisão das medidas e são mostrados na **Figura A1**. Os valores de LD e LQ foram de 0,5% m/m e 1,8% m/m, respectivamente. Os testes de permutação [67] e não paramétricos [164] avaliados (**Figura 7.3b**) indicam não haver evidências de tendenciais. O teor mínimo de biodiesel que pode ser adicionado ao Diesel para o comércio no Brasil é atualmente de 8% m/m [141]. Os valores de detecção e quantificação encontrados neste trabalho estão abaixo deste limite, tornando o método eficiente para a detecção e quantificação de biodiesel em amostras de Diesel.

O modelo PLS utilizado neste trabalho abrange uma ampla faixa de concentração de biodiesel (de 0 a 100% m/m), respondendo satisfatoriamente mesmo em concentrações mais baixas. Paiva *et al.* [165] obtiveram valores similares de LD, com 0,31% m/m para biodiesel e 0,40% m/m para óleos vegetais em Diesel através de NIR portáteis; Entretanto, foi utilizada uma faixa de concentração estreita para a construção do modelo PLS (de 0 a 15% m/m).

Os valores de RMSECV e RMSEP foram próximos (1,8% m/m e 1,6% m/m, respectivamente). Fernandes *et al.* [166] analisaram 100 misturas com teor de biodiesel entre 5 e 50% (v/v) em Diesel, onde encontraram RMSECV e RMSEPs de 1,39% m/m e 1,01% m/m, 1,27% m/m e 0,66% m/m, respectivamente, para dois conjuntos de dados obtidos por Vis-NIR e Espectrofotômetros NIR. Corgozinho *et al.* [152] obtiveram valores de RMSEP variando de 1,6 a 2,6% m/m para as misturas de óleos vegetais em Diesel sem pré-tratamento das amostras utilizando um fluorímetro de bancada. Ao comparar as variâncias (teste F baseado na distribuição de Fisher-Snedecor) dos valores de RMSEP (1,6% m/m) com o último trabalho citado, observa-se que não há diferença significativa, com 5% de significância, entre os conjuntos de dados, onde $F_{\text{medido}} < F_{\text{tabelado}}$. Esses dados demonstram que a portabilidade não afetou significativamente a precisão da técnica MICRONIR associada às ferramentas quimiométricas. Monteiro *et al.* [144] e Portela *et al.* [164] estimaram o teor de biodiesel em Diesel usando um instrumento de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H combinado com PLS e obteve RMSEPs de 0,5 e 0,19% m/m, respectivamente. Alguns outros pesquisadores também encontraram baixos valores de RMSEP e RMSECV; no entanto, eles usaram um equipamento mais sofisticado e caro como RMN [167,168].

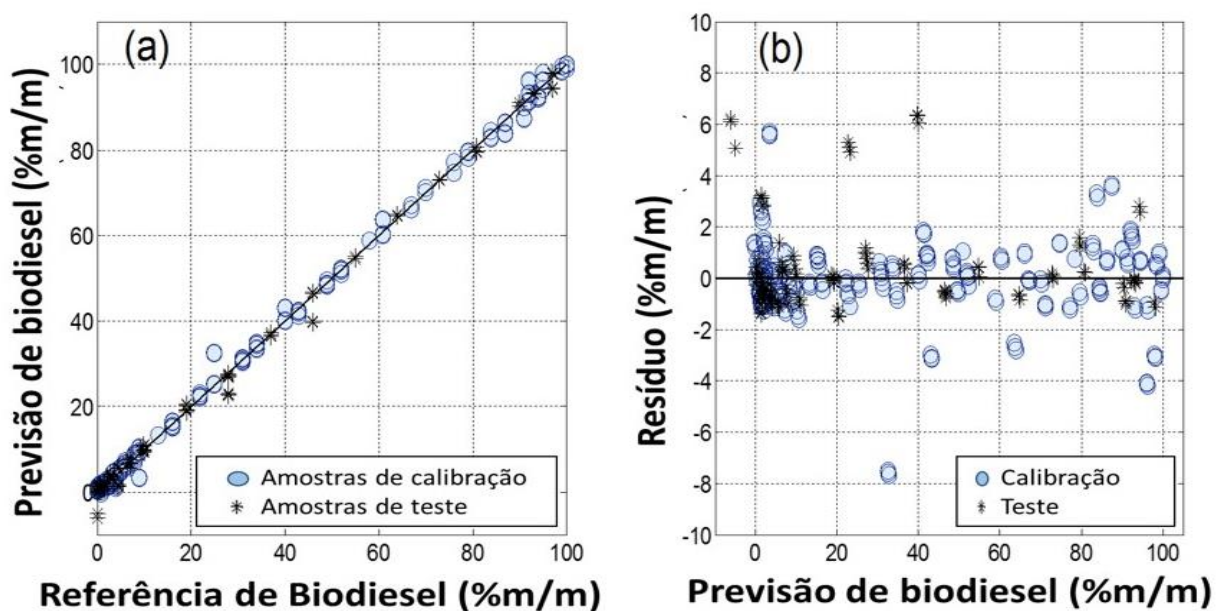


Figura 7.3. Teor de biodiesel nas misturas de biodiesel / Diesel e seu (a) valor previsto a partir do modelo PLS construído com 5 variáveis latentes, bem como seu (b) modelo de resíduos. [49]

Tabela 7.1. Resultados do modelo de calibração para quantificação de biodiesel em misturas de biodiesel / Diesel. [49]

Conteúdo Biodiesel em blendas biodiesel/Diesel (0 a 100 %m/m)	
Parâmetros	Valores
RMSECV	1,6 %m/m
RMSEP	1.8 %m/m
R^2	0,998
LD	0,5 %m/m
LQ	1,8 %m/m

O modelo PLS construído apresentou excelentes resultados para os valores de mérito e, portanto, pode ser aplicado ao controle de qualidade do combustível, conforme indicado pelos resultados apresentados na **Tabela 7.1**. Estes resultados

estão de acordo com os valores da legislação brasileira para a adição máxima de 8 % m/m de biodiesel, de diferentes origens, em amostras comerciais de Diesel [141].

7.4.2 Quantificação Diesel S500/Diesel S10

O teor de enxofre é reconhecido mundialmente como um indicador da origem e qualidade do óleo Diesel, onde valores mais baixos indicam uma boa qualidade do produto final. A ANP reduziu gradualmente o teor de enxofre no óleo Diesel comercializado no Brasil e, atualmente, são utilizados dois tipos de Diesel, Diesel S10 e S500. A **Figura 7.4a** mostra a relação entre o teor de enxofre nas amostras de Diesel e seus valores previstos pelo modelo PLS utilizando o método de validação cruzada múltipla repetida e o intervalo de confiabilidade da amostra. O teor de enxofre previsto nas amostras de Diesel mostra uma boa correlação com valores de referência, tendo R^2 de 99,2% (**Figura 7.4** e **Tabela 7.2**). Duas amostras com conteúdo de enxofre em torno de 220 mg L⁻¹ apresentaram erro de predição superior a 30 mg L⁻¹ (ou inferior a -30 mg L⁻¹). O resíduo de predição (**Figura 7.4b**) não apresenta erros sistemáticos ou de tendência, conforme provado pelos testes de permutação [162] e não paramétricos [164].

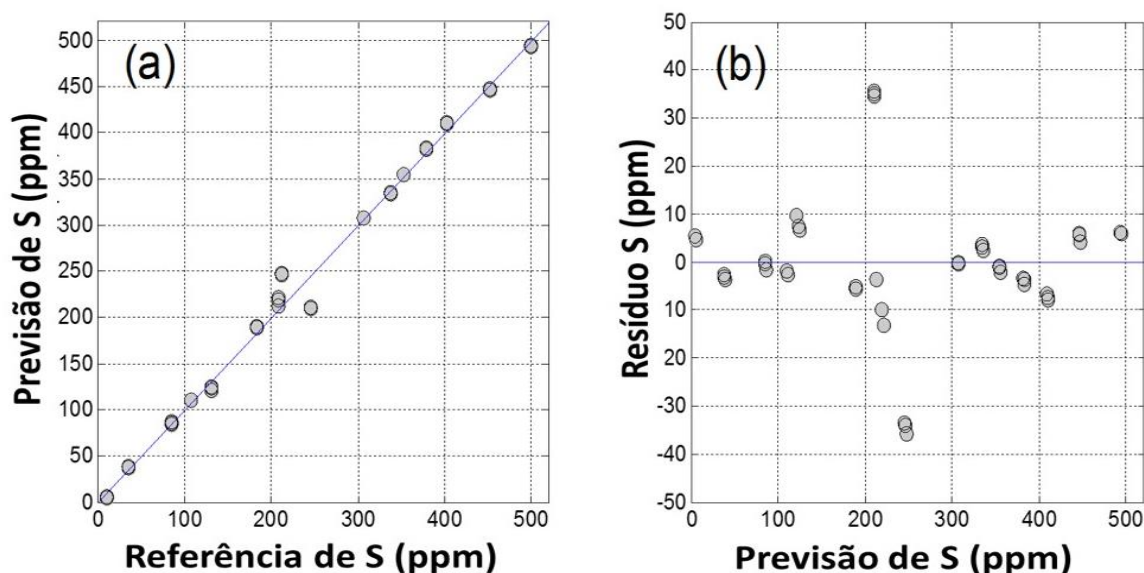


Figura 7.4. Relação entre o teor de enxofre em amostras de Diesel e seus valores previstos pelo modelo PLS usando o método de validação cruzada repetida. A linha diagonal representa a função $y = x$. [49]

Foi possível, por meio do modelo PLS (ASTM International, 2012) [56], obter valores estimados de LD e LQ igual a 2,4 e 8,0 mg L⁻¹, respectivamente (**Tabela 7.2**). O valor de RMSEP foi de 13,2 mg L⁻¹, o que não é ideal, uma vez que a amostra de Diesel S10, por exemplo, tem um teor de enxofre de 10 mg L⁻¹. Esse comportamento provavelmente é atribuído ao efeito da matriz, bem como ao amplo campo de concentração utilizado para a construção do modelo PLS. Soares *et al.* [169] encontrou maiores valores de RMSEP (0,038-0,16% m/m) usando análise FTIR; todavia, esses valores referem-se a modelos PLS construídos a partir de regiões selecionadas de espectros.

Tabela 7.2. Resultados do modelo de calibração para quantificação de biodiesel em misturas de biodiesel / Diesel e enxofre total em misturas de Diesel usando regressão PLS. [49]

Conteúdo de Enxofre em blendas de Diesel (10 a 500 ppm)	
Parametros	Valores
RMSEP	13,2 ppm
R ² predição	0,992
Bias	-0,3 ppm
LD	2,4 ppm
LQ	8,0 ppm

A **Figura 7.5a-b** exibe o teste t para os erros sistemáticos, aplicados aos resíduos do modelo PLS. O teste de homogeneidade das variâncias (**Figura 7.5a**) para os desvios de homogeneidade mostra um p-valor de 0,136, o que é adequado para a metodologia desenvolvida. Os resíduos do modelo também foram avaliados pelo teste aleatório não paramétrico (**Figura 7.5b**). O valor p do teste foi de 16,3%, o que não foi significativo em 5% do nível de significância.

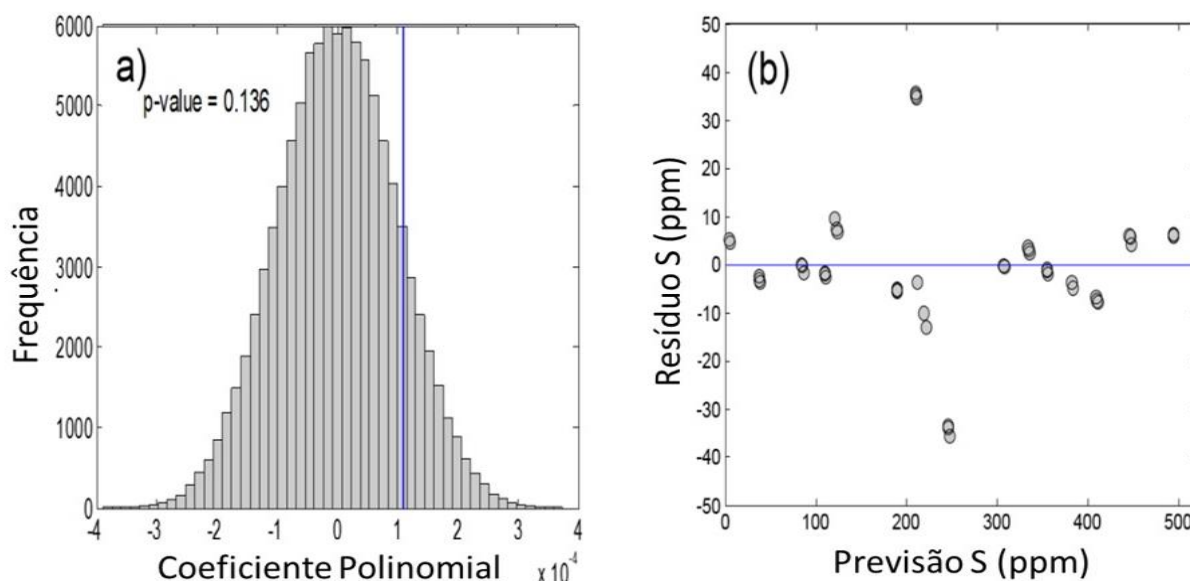


Figura 7.5. (a) Teste de permutação aplicado na avaliação de tendência do modelo PLS (b) residual do modelo PLS. [49]

7.4.3 Quantificação de gasolina/metanol/etanol

No Brasil, a gasolina comercial é vendida como uma mistura binária contendo 27% v/v de etanol; portanto, a gasolina geralmente é adulterada pela adição de metanol, aumento do teor de etanol ou adição de solventes [66,148].

A relação dos valores de referência versus preditos para os três componentes avaliados na mistura ternária de gasolina do tipo C é representada na **Figura 7.6**. É importante observar o intervalo de confiança (**Figura 7.6a-c**) e a linearidade entre o previsto e valores de referência, com valores ótimos de R^2 em todos os casos (**Tabela 7.3**). Na **Figura A1** é apresentado a mesma relação de valores com as barras de desvios com intervalo de confiança de 95%.

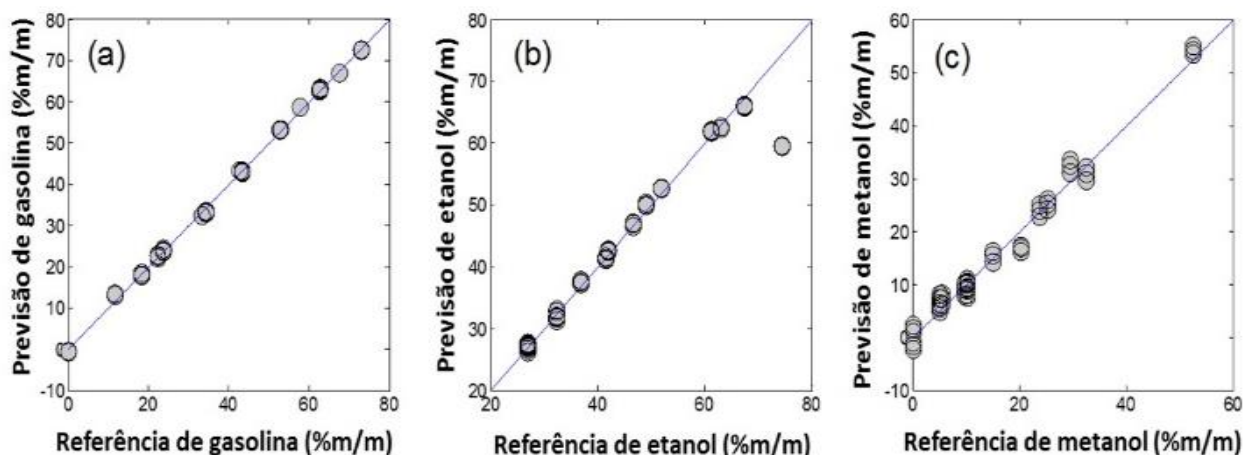


Figura 7.6. Relação entre referência e valores previstos para a gasolina (a), etanol (b) e metanol (c) conteúdo em gasolina de tipo C usando o modelo PLS. [49]

A **Tabela 7.3** mostra os valores RMSEP, R^2 , Bias, LD e LQ para gasolina, etanol e metanol obtidos a partir das amostras de mistura ternária. O modelo para a quantificação da gasolina apresentou melhor precisão do que para os álcoois (**Tabela 7.3**) com RMSEP de 0,81% m/m e R^2 de 0,998. Ao contrário da gasolina, o etanol e o metanol têm estruturas similares, o que pode explicar os valores semelhantes das figuras de mérito do modelo PLS.

Pereira *et al.* [148] determinaram a adulteração de gasolina usando solventes (nafta pesada, querosene, nafta leve e thinner) através de FTIR e quimiometria, e seu método satisfatoriamente disponível para a classificação de amostras comerciais de gasolina entre adulterados e não adulterados com 96% de precisão. Al-Ghouti *et al.* [170] encontram RMSEPs de 1,2-2,9% m/m para amostras de gasolina adulterada com chumbo usando FTIR. Além disso, Zhang *et al.* [54] detectou o metil tertbutil éter (MTBE) e benzeno, dois adulterantes comuns a gasolina através da espectroscopia Raman portátil e encontrou valores de erro de predição de 15,7% e 8,9%, respectivamente. Assim, os valores de RMSEP (0,81 a 3,81% m/m), relatados neste trabalho, estão de acordo com a literatura já apresentada.

Tabela 7.3. Resultados do modelo de calibração para quantificação de gasolina, etanol e metanol em gasolina de tipo C usando regressão PLS. Portanto, os valores de RMSEP (0,81 a 3,81% m/m), relatados no trabalho, são de acordo com literatura. [49]

Amostras	RMSEP (%m/m)	R ²	Bias (%m/m)	LD (%m/m)	LQ (%m/m)
Gasolina (0.0–75.0 m/m%)	0,81	0,998	0,04	0,55	1,84
Etanol (25.0–75.0 m/m%)	3,81	0,945	0,93	0,75	2,50
Metanol (0.0–50.0 m/m%)	1,80	0,983	0,07	0,85	2,84

Lutz *et al.*[9] apresentaram valores de LD e LQ (0,68 e 2,04% m/m) que podem ser correlacionados aos obtidos neste trabalho, mostrando um melhor valor de RMSEP (0,21% m/m) para quantificação de etanol na gasolina (variando de 0 a 10% m/m). No entanto, é importante ressaltar que o autor calibrou o conteúdo de etanol usando uma mistura binária, enquanto que no presente documento, utilizou-se uma mistura ternária com uma ampla faixa de concentração (etanol - 25 a 75% m/m e metanol - 0 a 50% m/m) na construção do modelo PLS. A ANP determina as especificações para a comercialização de gasolina automotiva, por meio da norma ANP no. 309, 27.12.2001 - DOU 28.12.2001[139], indicando que a quantidade de álcool anidro presente na gasolina deve ser 26% + 1%, até 2015. Posteriormente, esse valor se tornou 27%. O LD e LQ dos modelos construídos foram inferiores aos valores estipulados pela legislação brasileira, demonstrando a excelente performance do modelo. Além disso, a precisão do método proposto (LDs = 0.55-0.85% m/m, **Tabela 7.3**) está abaixo do limite de 1% v/v recomendado pela ANP para a adição de EHF na gasolina.

7.4.4 Quantificação de etanol/água/metanol

Os adulterantes mais comuns em EHC são metanol e água, devido à sua afinidade química e física [149]. A **Figura 7.7** mostra os teores previstos de etanol, água e metanol (%m/m) contra os valores de referência na mistura ternária e a **Figura 7.7a-c** mostra a estimativa da população da amostra através do intervalo de confiabilidade. Na **Figura A2** em anexo, é apresentado a mesma relação de valores com as barras de desvios com intervalo de confiança de 95%.

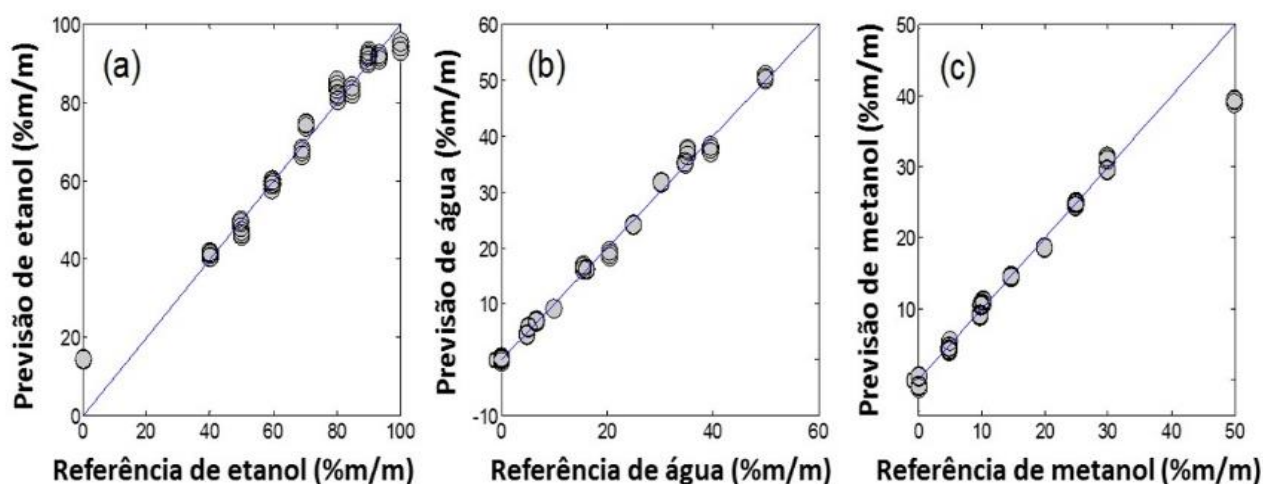


Figura 7.7. Relação entre a referência e os valores previstos para o teor de etanol (a), água (b) e metanol (c) no combustível EHC usando o modelo PLS. [49]

As semelhanças das propriedades físicas e químicas do etanol e do metanol tornam difícil a diferenciação nas misturas realizadas. No entanto, foi possível obter um método com excelentes valores de LD e LQ. Carneiro *et al.* [149] encontraram LDs de 0,50 e 0,10% m/m dos teores de metanol e água, respectivamente, em etanol usando FT-NIR combinado com PLS. Neste trabalho, foi possível obter LD de 0,04% m/m para água em EHC, indicando o excelente desempenho de MICRONIR na detecção deste adulterante na mistura ternária (**Tabela 7.4**). Além disso, os valores de RMSEP de 4,41, 1,05 e 2,78% m/m são relatados para etanol, água e metanol, respectivamente. É importante ressaltar que, após a remoção de uma amostra anômala do conjunto de dados original, ver **Tabela 7.4**, os valores de RMSEP foram reduzidos para etanol (2,68% m/m) e metanol (0,73 % m/m).

O valor R^2 , bem como o valor do Bias, foi melhor para a determinação do teor de água na mistura ternária [61]. A determinação do teor de água no etanol é um dos parâmetros mais importantes na determinação da qualidade do EHF. Uma proporção inadequada de água provoca problemas no carro [149]. A técnica mostrou uma boa sensibilidade para os três componentes, com valores de LD de 1,22, 0,04 e 0,52% m/m de etanol, água e metanol, respectivamente.

Tabela 7.4 Resultados do modelo de calibração para quantificação de etanol, água e metanol no combustível EHC usando regressão PLS. Os valores entre parênteses representam o RMSEP calculado depois de excluir uma amostra. [49]

Amostra	RMSEP (%/m/m)	R ²	Bias (%/m/m)	LD (%/m/m)	LQ (%/m/m)
Etanol (0.0–100.0 %m/m)	4,41 (2,68)	0,976	-0,81	1,22	4,07
Água (0.0–50.0 %m/m)	1,05	0,995	-0,02	0,04	1,29
Metanol (0.0–50.0 %m/m)	2,78 (0,73)	0,968	0,71	0,52	1,73

A **Figura 7.8** mostra o gráfico de importância variável para a projeção (VIP) em relação ao comprimento de onda (nm) de cada modelo PLS construído para relacionar o comprimento de onda com o conteúdo do ingrediente individual [171]. O VIP é usado para descrever como as variáveis contribuem para o conjunto de dados em função da regressão PLS [83,172]. Na **Figura 7.8**, a linha tracejada indica o valor limite de VIP, ou seja, quando $VIP = 1$. Para o valor $VIP > 1$, o modelo indica as variáveis importantes para a sua construção. Deve-se notar que as variáveis importantes (ou seja, que têm $VIP > 1$) para as amostras de misturas binárias, como as misturas de biodiesel/Diesel e Diesel (**Figura 7.8a-b**), estão localizadas na região de 1000-1200 nm (HCs de cadeia grande). Por outro lado, para as misturas ternárias (metanol/etanol/gasolina e água / metanol / etanol), **Figura 7.8c-h**, as variáveis predominantes (com $VIP > 1$) estão localizadas na região de 1300-1600 nm (grupo OH).

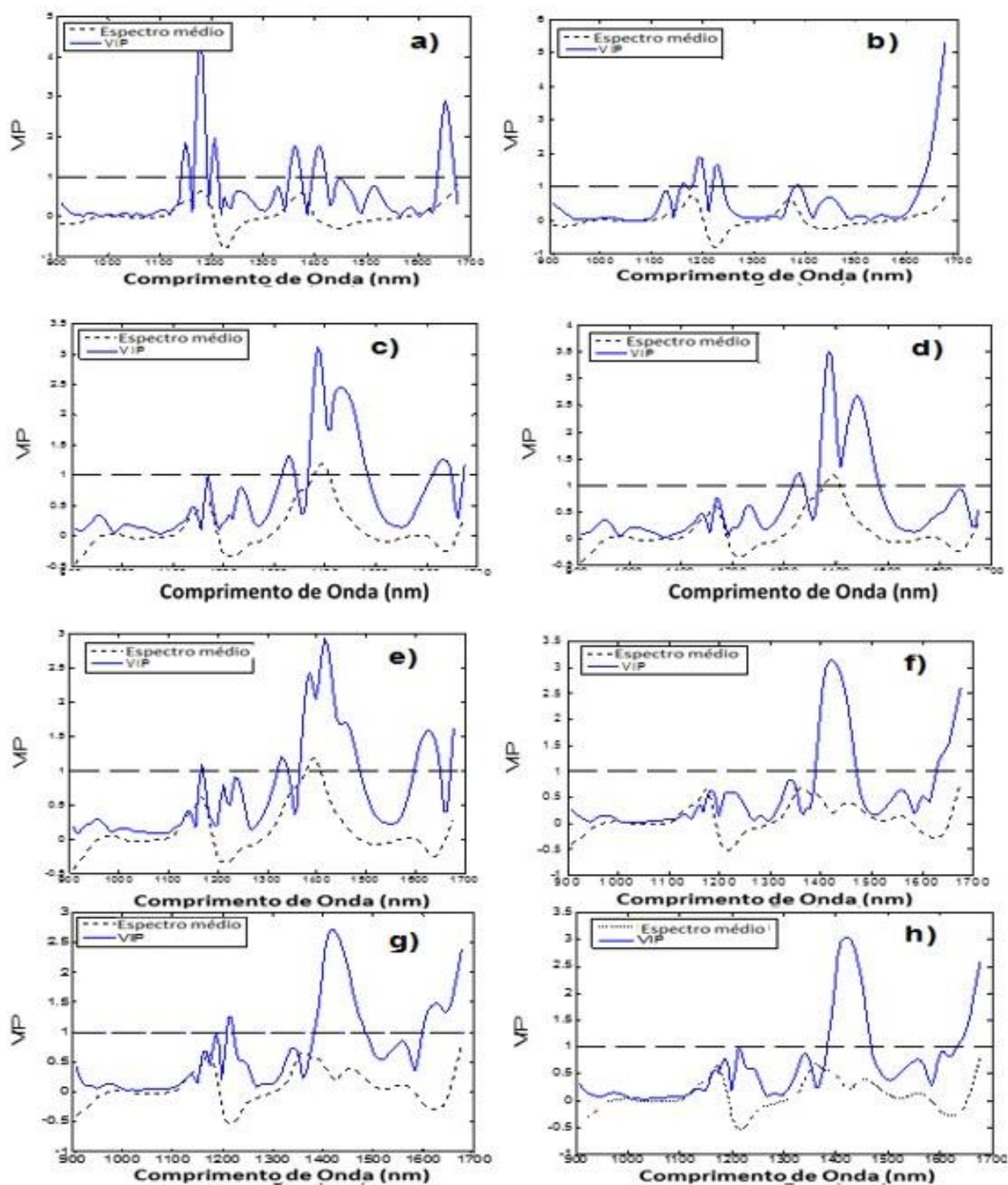


Figura 7.8. VIP versus comprimento de onda de (a) biodiesel/Diesel (b) misturas diesel S500/S10; e de misturas ternais contendo (c) etanol (d) água (e) metanol; e (f) gasolina (g) etanol (h) metanol. [49]

7.5 Conclusões

A espectroscopia no infravermelho portátil (MICRONIR), juntamente com ferramentas quimiométricas, fornece uma excelente metodologia analítica para acompanhamento da qualidade de combustíveis, podendo identificar a adulteração em Diesel, gasolina de tipo C e combustível hidratado com etanol. Aqui, sua capacidade de quantificar os conteúdos (% m/m e mg L⁻¹) de biodiesel em Diesel; enxofre em Diesel; etanol e metanol na gasolina; e o etanol, a água e o metanol no EHC foram evidenciados. Além disso, uma melhor precisão foi relatada quando comparada aos valores descritos na literatura, em que, a maioria dos métodos relatados, utilizavam espectrômetros de bancada. Portanto, a portabilidade do MICRONIR não afeta sua precisão, e esse método é uma técnica analítica confiável, rápida e não destrutiva para o controle da qualidade do combustível.

8. REFERÊNCIAS

- [1] KLAMPFL, C. W.; HIMMELSBACH, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 890, p. 44–59, 2015.
- [2] CODY, R. B.; DANE, A. J. Paper spray ionization for ambient inorganic analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 8, p. 893–898, 2014.
- [3] SUN, L. et al. Pharmaceutical Raw Material Identification Using Miniature Near-Infrared (MicroNIR) Spectroscopy and Supervised Pattern Recognition Using Support Vector Machine. **Applied Spectroscopy**, v. 70, n. 5, p. 816–825, 2016.
- [4] LUTZ, O. M. D. et al. Reproducible quantification of ethanol in gasoline via a customized mobile near-infrared spectrometer. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, n. 1, p. 61–68, 2014.
- [5] MAIA, E. et al. Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel / biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer. **Fuel**, v. 160, p. 57–63, 2015.
- [6] TSUJIKAWA, K. et al. Application of a portable near infrared spectrometer for presumptive identification of psychoactive drugs. **Forensic Science International**, v. 242, p. 162–171, 2014.
- [7] BASRI, K. N. et al. Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 335–342, 2017.
- [8] PATRÍCIA, M. et al. Classification of gasoline as with or without dispersant and detergent additives using infrared spectroscopy and multivariate classification. **Fuel**, v. 116, p. 151–157, 2014.
- [9] LUTZ, O. M. D. et al. Reproducible quantification of ethanol in gasoline via a customized mobile near-infrared spectrometer. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, p. 61–68, 2014.
- [10] HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry - Principles and Applications**. 3. ed. England: JohnWiley & Sons Ltd, 2007.
- [11] ROMÃO, W. **Novas aplicações da espectrometria de massas em química forense**. 2010. 294 f. Universidade Estadual de Campinas. 2010.
- [12] MONGE, M. E. et al. Mass spectrometry: Recent advances in direct open air surface sampling/ionization. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2269–2308,

2013.

[13] HAMID, A. M. et al. Rapid Discrimination of Bacteria by Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 7500–7507, 2015.

[14] ZHI-PING, Z.; XIAO-NING, L.; YA-JUN, Z. Ambient ionization-paper spray ionization and its application. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 145–152, 2014.

[15] TAKÁTS, Z. et al. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. **Science**, v. 306, p. 471–472, 2004.

[16] WANG, H. et al. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 5, p. 877–880, 2010.

[17] FENN, J. B. et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, n. 6, p. 64–71, 1989.

[18] CODY, R. B.; LARAME, J. A. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2297–2302, 2005.

[19] CARVALHO, T. C. DE et al. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. **Forensic Science International**, v. 262, p. 56–65, 2016.

[20] COOKS, R. G.; JARMUSCH, A. K.; WLEKLINSKI, M. Direct analysis of complex mixtures by mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 377, p. 709–718, 2015.

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

[22] GREEN, F. M. et al. Ambient mass spectrometry: advances and applications in forensics. **Surface and Interface Analysis**, v. 42, p. 347–357, 2010.

[23] FENN, J. B. Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 13, n. 3, p. 101–118, 2002.

[24] LIU, J. et al. Development , Characterization , and Application of Paper Spray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 2010.

[25] MANICKE, N. E. et al. Assessment of paper spray ionization for quantitation of pharmaceuticals in blood spots. **international journal of mass**

spectrometry, v. 300, n. 2–3, p. 123–129, 2011.

[26] MANICKE, N. E. et al. Quantitative analysis of therapeutic drugs in dried blood spot samples by paper spray mass spectrometry: An avenue to therapeutic drug monitoring. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 22, n. 9, p. 1501–1507, 2011.

[27] LI, A. et al. Paper spray ionization of polar analytes using non-polar solvents. **Chemical communications**, v. 47, n. 10, p. 2811–2813, 2011.

[28] ZHANG, Z. et al. Silica coated paper substrate for paper-spray analysis of therapeutic drugs in dried blood spots. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 931–938, 2011.

[29] MA, Q. et al. Rapid analysis of synthetic cannabinoids using a miniature mass spectrometer with ambient ionization capability. **Talanta**, v. 142, p. 190–196, 2015.

[30] ESPY, R. D. et al. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, 2012.

[31] REN, Y. et al. Analysis of biological samples using paper spray mass spectrometry: An investigation of impacts by the substrates, solvents and elution methods. **Chromatographia**, v. 76, n. 19–20, p. 1339–1346, 2013.

[32] SU, Y. et al. Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse. **The Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4443, 2013.

[33] JI, J. et al. Ambient ionization based on mesoporous graphene coated paper for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 1015–1016, p. 142–149, 2016.

[34] COLLETES, T. C. et al. A new insert sample approach to paper spray mass spectrometry: a paper substrate with paraffin barriers. **Analytical Methods**, v. 141, p. 1707–1713, 2016.

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

[36] WLEKLINSKI, M. et al. Zero Volt Paper Spray Ionization and Its Mechanism. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 13, p. 6786–6793, 2015.

[37] MOTOYAMA, A.; KIHARA, K. Zero volt paper spray ionization mass spectrometry for direct analysis of samples on filter paper substrate. **Rapid**

Communications in Mass Spectrometry, v. 29, n. 20, p. 1905–1916, 2015.

[38] LEE, H. et al. Rapid screening and determination of designer drugs in saliva by a nib-assisted paper spray-mass spectrometry and separation technique.

Journal of Separation Science, v. 35, n. 20, p. 2822–2825, 2012.

[39] SALENTIJN, G. I.; PERMENTIER, H. P.; VERPOORTE, E. 3D-printed paper spray ionization cartridge with fast wetting and continuous solvent supply features. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 23, p. 11657–11665, 2014.

[40] ESPY, R. D. et al. Paper Spray and Extraction Spray Mass Spectrometry for the Direct and Simultaneous Quantification of Eight Drugs of Abuse in Whole Blood. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 7712–7718, 2014.

[41] LIU, W. et al. Development and applications of paper-based electrospray ionization-mass spectrometry for monitoring of sequentially generated droplets. **The Analyst**, v. 138, n. 7, p. 2163, 2013.

[42] PEI, J.; KANG, Y.; HUANG, G. Reactive intermediate detection in real time via paper assisted thermal ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5354–5357, 2014.

[43] LIU, J. et al. Leaf spray: Direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 20, p. 7608–7613, 2011.

[44] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A., 1979.

[45] CONCEIÇÃO, V. N. et al. Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1538–1544, 2014.

[46] JARDIM, M. A.; ESTUDO. **Estudo e validação de um espectrofotômetro infravermelho próximo portátil para análise in situ**. 2016. 88 f. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. 2016.

[47] WORKMAN, J.; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. first ed. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

[48] CORREIA, R. M. et al. Portable near infrared spectroscopy applied to quality control of Brazilian coffee. **Talanta**, v. 176, n. April 2017, p. 59–68, 2018.

[49] CORREIA, R. M. et al. Portable near infrared spectroscopy applied to fuel quality control. **Talanta**, v. 176, n. April 2017, p. 26–33, 2018.

[50] DOMINGOS, E. et al. Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry – drugs of abuse, inks and questioned documents. **Analytical Methods**, v. 9, p. 4400–4409, 2017.

[51] GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. M.; NAMIESNIK, J. Moving your laboratories to the field - Advantages and limitations of the use of field portable instruments in environmental sample analysis. **Environmental Research**, v. 140, p. 593–603, 2015.

[52] PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

[53] CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; PALMA, A. J. Recent developments in handheld and portable optosensing — A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, p. 27–46, 2011.

[54] ZHANG, X. et al. Rapid detection of gasoline by a portable Raman spectrometer and chemometrics. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, n. November 2011, p. 1487–1491, 2012.

[55] BRONDI, A. M. et al. Differential Scanning Calorimetry and Infrared Spectroscopy Combined with Chemometric Analysis to the Determination of Coffee Adulteration by Corn. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1308–1314, 2017.

[56] O'BRIEN, N. A. et al. Miniature Near-Infrared (NIR) Spectrometer Engine For Handheld Applications. **Proceedings of SPIE**, v. 8374, p. 837404–1, 2012.

[57] ECARNOT, M. et al. Rapid phenotyping of the tomato fruit model , Micro-Tom , with a portable VIS e NIR spectrometer. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 159–163, 2013.

[58] ZAMORA-ROJAS, E. et al. Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: Database transfer from at-line instruments. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 114, p. 30–35, 2012.

[59] ZUMBA, J.; RODGERS, J. Cotton Micronaire Measurements Using Small Portable Near-Infrared (NIR) Analyzers. v. 70, n. 5, p. 794–803, 2016.

[60] CAMILO, A. et al. Detection of adulteration in hydrated ethyl alcohol fuel

using infrared spectroscopy and supervised pattern recognition methods. **Talanta**, v. 93, p. 129–134, 2012.

[61] DUPUY, N. et al. Near-Infrared Spectroscopy Analysis of Heavy Fuel Oils Using a New Diffusing Support. **Applied Spectroscopy**, v. 69, n. 10, p. 1137–1143, 2015.

[62] HUGO, V. et al. Discriminant Analysis and Cluster Analysis of Biodiesel Fuel Blends Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). **Energy & Fuels**, v. 30, p. 4905–4915, 2016.

[63] SOARES, V. R. B.; ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Contributions of Flow Analysis for Quality Control of Automotive Fuels: A Review. **Analytical Letters**, v. 46, n. 11, p. 1621–1639, 2013.

[64] BREITKREITZ, M. C. et al. Determination of total sulfur in diesel fuel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration. **The Analyst**, v. 128, n. 9, p. 1204–7, 2003.

[65] GUIMARÃES, E.; MITSUTAKE, H.; CAIXETA, L. Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration for Quantification of Soybean Oil as Adulterant in Biodiesel Fuels. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, p. 777–782, 2015.

[66] FERNANDES, H. L. et al. Simultaneous determination of methanol and ethanol in gasoline using NIR spectroscopy : Effect of gasoline composition. **Talanta**, v. 75, p. 804–810, 2008.

[67] PEDROSO, M. P. et al. Identification of gasoline adulteration using comprehensive two-dimensional gas chromatography combined to multivariate data processing. **Journal of Chromatography A**, v. 1201, p. 176–182, 2008.

[68] CESAR, J.; ALVES, L.; POPPI, R. J. Biodiesel content determination in diesel fuel blends using near infrared (NIR) spectroscopy and support vector machines (SVM). **Talanta**, v. 104, p. 155–161, 2013.

[69] KNOTHE, G. Rapid Monitoring of Transesterification and Assessing Biodiesel Fuel Quality by Near-Infrared Spectroscopy Using a Fiber-Optic Probe 1. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, 1999.

[70] BROUILLETTE, C. et al. Analysis of Twenty-Two Performance Properties of Diesel , Gasoline , and Jet Fuels Using a Field-Portable Near-Infrared (NIR) Analyzer. **Applied Spectroscopy**, v. 70, n. 5, p. 746–755, 2016.

[71] COOPER, J. B. et al. Rapid Analysis of Jet Fuel Using a Handheld Near-Infrared (NIR) Analyzer. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 2, p. 187–192, 2011.

[72] CORONA, F. et al. Supervised Distance Preserving Projections : Applications in the quantitative analysis of diesel fuels and light cycle oils from NIR spectra. **Journal of Process Control**, v. 30, p. 10–21, 2015.

[73] HUGO, V. et al. Discriminant analysis of biodiesel fuel blends based on combined data from Fourier Transform Infrared Spectroscopy and stable carbon isotope analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 161, n. December 2016, p. 70–78, 2017.

[74] DALY, S. R. et al. Predicting fuel research octane number using Fourier-transform infrared absorption spectra of neat hydrocarbons. **Fuel**, v. 183, p. 359–365, 2016.

[75] BAIRD, Z. S.; OJA, V. Predicting fuel properties using chemometrics : a review and an extension to temperature dependent physical properties by using infrared spectroscopy to predict density. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 158, p. 41–47, 2016.

[76] FILGUEIRAS, P. R. **Determinação da composição de blends de petróleo utilizando Ftir-ATR e calibração multivariada**. 2011. 113 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. 2011.

[77] PIZARRO, C. et al. Influence Lipids, of data pre-processing on the quantitative determination of the ash content and in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 509, p. 217, 2004.

[78] BORBA, F. DE S. L. **Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos aplicados à documentoscopia, bens culturais e alimentos**. 2012. 137 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. 2012.

[79] HOSKULDSSON, A. Pls Regression Methods. **Journal of Chemometrics**, v. 2, n. November 1987, p. 211–228, 1988.

[80] GAUCHI, J.; LAZRAQ, A.; CLE, R. Selecting both latent and explanatory variables in the PLS1 regression model. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 66, p. 117–126, 2003.

[81] CHONG, I.; T, C. J. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, p. 103–112, 2005.

[82] KALIVAS, J. H. Interrelationships of multivariate regression methods using eigenvector basis sets. **Journal of Chemometrics**, v. 13, n. 2, p. 111–132, 1999.

[83] WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109–130, 2001.

[84] ANDERSSON, M. A comparison of nine PLS1 algorithms. **Journal chemometrics**, v. 23, p. 518–522, 2009.

[85] WANG, Y. D.; VELTKAMP, D. J.; KOWALSKI, B. R. Multivariate instrument standardization. **Analytical Chemistry**, v. 63, 23, p. 2750–2756, 1991.

[86] KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer aided desing of experiments. **Technometrics**, v. 11, p. 137–148, 1969.

[87] FILZMOSER, P.; LIEBMANN, B.; VARMUZA, K. Repeated double cross validation. **Journal of Chemometrics**, v. 23, n. 4, p. 160–171, 2009.

[88] SNEE, R. D. Validation of regression models: methods and examples. **Technom**, v. 19, p. 415–428, 1977.

[89] ALBERICI, R. M. et al. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. **Anal. Bional. Chem.**, v. 398, p. 265–294, 2010.

[90] HARRIS, G. A.; KWASNIK, M.; FERN, F. M. Direct Analysis in Real Time Coupled to Multiplexed Drift Tube Ion Mobility Spectrometry for Detecting Toxic Chemicals. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 1908–1915, 2011.

[91] COOKS, R. G. et al. New ionization methods and miniature mass spectrometers for biomedicine: DESI imaging for cancer diagnostics and paper spray ionization for therapeutic drug monitoring. **Faraday discussions**, v. 149, p. 247–267, 2011.

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

[93] LI, L. et al. Mini 12, miniature mass spectrometer for clinical and other applications - Introduction and characterization. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 6, p. 2909–2916, 2014.

[94] NACCARATO, A. et al. Identification and assay of underivatized urinary acylcarnitines by paper spray tandem mass spectrometry. **Analytical and**

Bioanalytical Chemistry, v. 405, p. 8267–8276, 2013.

[95] HAMID, A. M. et al. Discrimination of *Candida* species by paper spray mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 378, p. 288–293, 2014.

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

[97] LIU, W. et al. Interfacing Microsampling Droplets and Mass Spectrometry by Paper Spray Ionization for Online Chemical Monitoring of Cell Culture. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 7128–7134, 2014.

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

[99] DAMON, D. E. et al. Direct Biofluid Analysis using Hydrophobic Paper Spray Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 1878–1884, 2016.

[100] PIRRO, V. et al. Direct drug analysis from oral fluid using medical swab touch spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 861, p. 47–54, 2015.

[101] LAI, P. H. et al. Comparison of gampi paper and nanofibers to chromatography paper used in paper spray-mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 375, p. 14–17, 2015.

[102] IFA, D. R. et al. Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. **The Analyst**, v. 132, n. 5, p. 461–467, 2007.

[103] SHI, R. Z. et al. Rapid Measurement of Tacrolimus in Whole Blood by Paper Spray- Tandem Mass Spectrometry (PS-MS / MS). **Clinica Chimica Acta**, v. 441, p. 2349, 2012.

[104] SNYDER, D. T. et al. Miniature and Fieldable Mass Spectrometers: Recent Advances. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 2–29, 2016.

[105] MALAJ, N.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Analysis of pesticide residues by leaf spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry Methods**, v. 4, p. 1913–1919, 2012.

[106] JIA, Z.; TIAN, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. **Desalination**, v. 247, n. 1–3, p. 423–429,

2009.

[107] OLIVEIRA, B. G. et al. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). **Food Chemistry**, v. 204, p. 37–45, 2016.

[108] SANTOS, P. F. DOS et al. 2-(4-iodo-2,5-dimetoxifenil)-n-[(2-metoxifenil)metil]etamina ou 25I-NBOMe: caracterização química de uma Designer Drug. **Quimica Nova**, v. 39, n. 2, p. 229–237, 2016.

[109] KILL, J. B. et al. Chemical characterization of synthetic cannabinoids by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 266, p. 474–487, 2016.

[110] SANTOS, H. et al. Quantification of cocaine and its adulterants (lidocaine and levamisole) using the Dragendorff reagent allied to paper spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, p. 3662–3668, 2017.

[111] BORDIN, D. C.; MESSIAS, M. Análise Forense: Pesquisa de Drogas Vegetais Interferentes de Testes Colorimétricos para Identificação dos Canabinoides da Maconha (*Cannabis Sativa* L.). **Quimica Nova**, v. 35, n. 10, p. 2040–2043, 2012.

[112] NASCIMENTO, I. R. et al. Chemical identification of cannabinoids in street marijuana samples using electrospray ionization. **Analytical Methods**, v. 7, p. 1415–1424, 2015.

[113] BRASIL, L. **Aplicativo para celular ajuda a verificar se cédula é falsa**. Disponível em: <<http://odia.ig.com.br/noticia/economia/2014-06-13/aplicativo-para-celular-ajuda-a-verificar-se-cedula-e-falsa.html>>. Acesso em: 10 out. 2017.

[114] CHOI, W. J.; MIN, G.; LEE, B. H. Counterfeit Detection Using Characterization of Safety Feature on Banknote with Full-field Optical Coherence Tomography. **Journal of Optical Society of Korea**, v. 14, n. 4, p. 316–320, 2010.

[115] AZOURY, M. et al. Fingerprint Detection on Counterfeit US\$ Banknotes: The Importance of Preliminary Paper Examination. **Journal Forensic Science**, v. 49, n. 5, p. 12–14, 2016.

[116] VILA, A. et al. Development of a fast and non-destructive procedure for characterizing and distinguishing original and fake euro notes. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 257–263, 2006.

[117] M. R. ALMEIDA et al. Detection of explosives on the surface of

banknotes by Raman hyperspectral imaging and independent component analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 860, p. 15–22, 2015.

[118] EBERLIN, L. S. et al. Instantaneous chemical profiles of banknotes by ambient mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, p. 2533–2539, 2010.

[119] ROMÃO, W. et al. Chemical profile of meta-chlorophenylpiperazine (m - CPP) in ecstasy tablets by easy ambient sonic-spray ionization , X-ray fluorescence , ion mobility mass spectrometry and NMR. p. 3053–3064, 2011.

[120] NASCIMENTO, D. et al. Anti-theft device staining on banknotes detected by mass spectrometry imaging. **Forensic Science International**, v. 260, p. 22–26, 2016.

[121] WEYERMANN, C. et al. Photofading of ballpoint dyes studied on paper by LDI and MALDI MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, n. 3, p. 297–306, 2006.

[122] SIEGEL, J. et al. The use of laser desorption/ionization mass spectrometry in the analysis of inks in questioned documents. **Talanta**, v. 67, n. 2, p. 425–429, 2005.

[123] ROMÃO, W. et al. Química Forense: Perspectivas Sobre Novos Métodos Analíticos Aplicados à Documentoscopia, Balística e Drogas de Abuso. **Quimica nova**, v. 34, n. 10, p. 1717–1728, 2011.

[124] SCHMIDT, E. M. et al. Direct and non-destructive proof of authenticity for the 2nd generation of Brazilian real banknotes via easy ambient sonic spray ionization mass spectrometry. **Science & justice : journal of the Forensic Science Society**, v. 54, n. 6, p. 459–64, 2014.

[125] CORREA, D. N. et al. Forensic Chemistry and Ambient Mass Spectrometry: A Perfect Couple Destined for a Happy Marriage? **Anal. Chem.**, v. 88, p. 2515–2526, 2016.

[126] LALLI, P. M. et al. Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **The Analyst**, v. 135, n. 4, p. 745, 2010.

[127] ROMÃO, W. et al. Analyzing Brazilian Vehicle Documents for Authenticity by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry *. **Forensic Science**, v. 57, n. 2, p. 539–543, 2012.

[128] FENG, B. et al. Ambient Mass Spectrometry Imaging: Plasma Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging and Its Applications.

Analytical Chemistry, v. 86, p. 4164–4169, 2014.

[129] KAO, Y. et al. Depth profiling of inks in authentic and counterfeit banknotes by electrospray laser desorption ionization / mass spectrometry. **Mass spectrometry**, v. 51, p. 20–27, 2016.

[130] KAO, Y. et al. Distinguishing authentic and counterfeit banknotes by surface chemical composition determined using electrospray laser desorption ionization mass spectrometry. **Mass spectrometry**, v. 48, p. 1129–1135, 2013.

[131] KAO, Y.; CHENG, S.; CHENG, C. Detection of trace ink compounds in erased handwritings using electrospray-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Mass spectrometry**, v. 49, n. January, p. 445–451, 2014.

[132] FERNANDES, S. et al. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. **Forensic Science International**, v. 247, p. 48–53, 2015.

[133] ORTIZ, R. S. et al. Profiling counterfeit Cialis , Viagra and analogs by UPLC – MS. **Forensic Science International**, v. 229, p. 13–20, 2013.

[134] EP, S.; PKF, E.; G, S. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. **J Ethnopharmacol**, v. 101, p. 75–83, 2005.

[135] FERNANDES, P. et al. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos : uma realidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. August, p. 618–626, 2008.

[136] WHO. **Quality Control Methods for Herbal Materials**. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh1791e/>>. Acesso em: 10 out. 2017.

[137] ANVISA. **Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004**. Disponível em: <<http://portal.crfsp.org.br/index.php/juridico-sp-42924454/legislacao/633-resolucao-rdc-no-48-de-16-de-marco-de-2004.html>>. Acesso em: 10 out. 2017.

[138] O'CONNOR, A. **Herbal Supplements Are Often Not What They Seem**. Disponível em: <<http://www.nytimes.com/2013/11/05/science/herbal-supplements-are-often-not-what-they-seem.html>>. Acesso em: 10 out. 2017.

[139] **Portaria ANP nº 309 de 27/12/2001**. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=182588>>. Acesso em: 5 out. 2017.

[140] **Resolução ANP Nº 50 DE 23/12/2013**. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=263587>>. Acesso em: 5 out. 2017.

[141] **Combustíveis Líquidos.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/petroleo-e-derivados2/combustiveis>>. Acesso em: 5 out. 2017.

[142] MEIRA, M. et al. Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo Componentes, residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3D e análise das Principais. **Quim. Nova**, v. 34, p. 621–624., 2011.

[143] MARTINS, G. I. et al. Physical and chemical properties of fish oil biodiesel produced in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 154–157, 2015.

[144] MONTEIRO, M. R. et al. ¹H NMR and multivariate calibration for the prediction of biodiesel concentration in diesel blends. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 6, p. 581–585, 2009.

[145] CAIRES, A. R. L.; LIMA, V. S.; OLIVEIRA, S. L. Quantification of biodiesel content in diesel/ On, biodiesel blends by fluorescence spectroscopy: evaluation of the dependence biodiesel feedstock. **Renewable Energy**, v. 46, p. 137–140., 2012.

[146] BALABIN, R. M.; LOMAKINA, E. I. Support vector machine regression (SVR/LS-SVM) – Of, an alternative to neural networks (ANN) for analytical chemistry? Comparison nonlinear methods on near infrared (NIR) spectroscopy data. **Analyst**, v. 136, p. 1703–1712., 2011.

[147] FILGUEIRAS, P. R.; ALVES, J. C. L.; POPPI, R. J. Quantification of animal fat biodiesel in And, soybean biodiesel and B20 diesel blends using near infrared spectroscopy synergy interval support vector regression. **Talanta**, v. 119, p. 582–589., 2014.

[148] PEREIRA, R. C. C. et al. Determination of gasoline adulteration by principal components Analysis-linear discriminant analysis applied to FTIR spectra. **Energy Fuels**, v. 20, p. 1097–1102., 2006.

[149] H.S.P. CARNEIRO, A.R.B. MEDEIROS, F.C.C. OLIVEIRA, G.H.M. AGUIAR, J. C. R.; P.A.Z. SUAREZ. Determination of ethanol fuel adulteration by methanol using partial least-squares models based on fourier transform techniques. **Energy Fuels**, v. 22, p. 2767–2770, 2008.

[150] S. KALLIGEROS, F. ZANNIKOS, S. STOURNAS, E. L. Fuel adulteration issues in Greece. **Energy**, v. 28, p. 15–26, 2003.

[151] PAULO, J. M. DE et al. A study of adulteration in gasoline samples using flame emission spectroscopy and chemometrics tools. **Analyst**, v. 137, p. 5919–5924, 2012.

[152] CORGOZINHO, C. N. C.; PASA, V. M. D.; BARBEIRA, P. J. S. Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometric analysis. **Talanta**, v. 76, p. 479–484, 2008.

[153] JOSÉ, E. et al. Rapid and non-destructive determination of quality parameters in the “ Tommy Atkins ” mango using a novel handheld near infrared spectrometer. v. 197, p. 1207–1214, 2016.

[154] VIAVI SOLUTIONS. **Viavi Introduces the MicroNIR™ Transmission Fixture for Precision Material Analysis.** Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/viavi-introduces-the-micronir-transmission-fixture-for-precision-material-analysis-300483123.html>>. Acesso em: 10 out. 2017.

[155] SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

[156] SOUZA, A. M. DE et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, p. 1057–1065, 2013.

[157] FERRÃO, M. F. et al. Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends Using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions. **Fuel**, v. 90, p. 701–706, 2011.

[158] TEIXEIRA, L. S. G. et al. Multivariate calibration in Fourier transform infrared spectrometry as a tool To detect adulterations in Brazilian gasoline. **Fuel**, v. 87, p. 346–352, 2008.

[159] GALVÃO, R. K. H. et al. A method for calibration and validation subset partitioning. **Talanta**, v. 67, p. 736–740, 2005.

[160] SOUZA, A. M. DE et al. Validation of the near infrared spectroscopy method for determining soil organic carbon by employing a proficiency assay for Fertility Laboratories. **J. Infrared Spectrosc.**, v. 24, p. 293–303., 2016.

[161] ASTM; INTERNATIONAL. **ASTM Standard E1655-12: Standard**

practices for infrared multivariate quantitative analysis. [s.l.] ASTM International: West Conshohocken, 2012.

[162] FILGUEIRAS, P. R. et al. Evaluation of trends in residuals of multivariate calibration models by permutation test. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 133, p. 33–41, 2014.

[163] MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **bioresource technology**, v. 70, p. 1–15, 1999.

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

[165] PAIVA, E. M. et al. Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer. **Fuel**, v. 160, p. 57–63, 2015.

[166] FERNANDES, D. D. S. et al. Determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends using NIR and visible spectroscopy with variable selection. **Talanta**, v. 87, n. 1, p. 30–34, 2011.

[167] SOARES, I. P. et al. Multivariate calibration by variable selection for blends of raw soybean oil/biodiesel from different sources using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra data,. **Energy Fuels**, v. 22, p. 2079–2083, 2008.

[168] DE VASCONCELOS, F. V. C. et al. Using near-infrared overtone regions to determine biodiesel content and adulteration of diesel/biodiesel blends with vegetable oils. **Analytica Chimica Acta**, v. 716, p. 101–107, 2012.

[169] SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; FORTES, I. C. P. Determination of sulfur in diesel using ATR/FTIR and multivariate calibration. **Eclética Química**, v. 35, p. 71–78, 2010.

[170] AL-GHOUTI, M. A.; AL-DEGS, Y. S.; AMER, M. Determination of motor gasoline adulteration using FTIR spectroscopy and multivariate calibration. **Talanta**, v. 76, p. 1105–1112, 2008.

[171] ANDERSEN, C. M.; BRO, R. Variable selection in regression – a tutorial. **Journal chemometrics**, v. 24, p. 728–737, 2010.

[172] ZIMMER, J.; ANZANELLO, M. J. A new framework for predictive variable selection based on variable importance indices. **Production**, v. 24, p. 84–93, 2013.

10. ANEXOS

Tabela A.1. Valores experimentais das composições Diesel/biodiesel.

Amostras	m_{Diesel} (g)	m_{biodiesel} (g)	(m/m)%
1	9,8053	0,0000	0,000
2	9,7595	0,0000	0,000
3	9,6692	0,0000	0,000
4	9,4855	0,0190	0,200
5	9,1360	0,0000	0,000
6	9,6975	0,0218	0,224
7	9,7122	0,0426	0,437
8	9,2281	0,0481	0,519
9	9,6179	0,0606	0,626
10	9,5067	0,0679	0,709
11	9,6391	0,0594	0,612
12	9,6366	0,0866	0,891
13	9,6080	0,0943	0,972
14	9,5613	0,0895	0,927
15	9,3519	0,0181	0,193
16	8,7885	0,0170	0,193
17	9,5724	0,0975	1,008
18	9,5575	0,1467	1,512
19	9,3890	0,1468	1,539
20	9,5500	0,1469	1,515
21	9,2284	0,1079	1,156
22	9,4704	0,1696	1,759
23	9,3974	0,1910	1,992
24	9,2993	0,1795	1,894
25	9,6202	0,2593	2,625
26	9,5409	0,1373	1,419
27	9,3066	0,6650	6,669
28	9,3934	0,3149	3,244

29	11,0418	0,2947	2,600
30	9,4317	0,1274	1,333
31	9,1967	0,1803	1,923
32	10,6962	0,3277	2,973
33	9,4983	0,1176	1,223
34	10,0679	0,3403	3,270
35	9,4137	0,1150	1,207
36	9,3310	0,1347	1,423
37	9,1235	0,4630	4,830
38	9,6147	0,1018	1,048
39	9,1990	0,5273	5,421
40	9,0760	0,5423	5,638
41	9,0981	0,6434	6,605
42	9,0484	0,6415	6,620
43	9,2030	0,6283	6,391
44	9,0934	0,7679	7,787
45	9,0970	0,7159	7,295
46	9,0937	0,7133	7,273
47	8,8824	0,7831	8,102
48	8,5632	0,8402	8,935
49	8,7181	0,7802	8,214
51	8,2478	0,8589	9,432
52	8,1989	0,9606	10,487
53	8,8053	0,9978	10,178
54	8,7792	1,0314	10,513
55	8,6957	0,9565	9,910
56	8,4830	1,3673	13,881
57	8,1817	1,5575	15,992
58	8,1785	1,5664	16,074
59	8,1010	1,6417	16,851
60	7,7760	2,0415	20,794
61	7,7840	1,8901	19,538

62	7,7154	1,8988	19,750
63	7,5948	2,2798	23,088
64	7,5014	2,2035	22,705
65	4,8529	2,5693	34,616
66	7,1915	9,7296	57,500
67	6,9628	2,7184	28,079
68	6,9323	2,7418	28,342
69	7,2409	2,3026	24,127
70	6,6173	3,1061	31,945
71	6,6045	3,1255	32,122
72	6,7476	3,1647	31,927
73	6,3213	3,4299	35,174
74	6,1060	3,4656	36,207
75	6,0788	3,7687	38,271
76	6,0583	3,7877	38,469
77	5,7035	4,0516	41,533
78	6,4161	4,5814	41,659
79	5,7063	4,3470	43,240
80	5,4337	4,2730	44,021
81	5,6706	4,3610	43,473
82	5,1699	4,6991	47,615
83	5,5063	4,4527	44,710
84	5,1282	4,6760	47,694
85	4,9150	4,9060	49,954
86	4,8379	4,8754	50,193
87	4,8368	4,9127	50,389
88	4,6879	5,1397	52,299
89	4,6109	5,3089	53,518
90	4,2296	5,3868	56,017
91	3,6037	5,8770	61,989
92	3,5677	6,3266	63,942
93	3,7317	6,1228	62,132

94	3,4949	6,5778	65,303
95	3,4920	6,4533	64,888
96	3,4822	6,6244	65,545
97	3,2595	6,7682	67,495
98	3,1954	6,6306	67,480
99	2,9307	7,2214	71,132
100	2,9337	7,1144	70,803
101	2,6218	7,1385	73,138
102	2,5680	7,2992	73,974
103	2,3295	7,6232	76,594
104	2,3348	7,8768	77,136
105	2,0043	8,1208	80,205
106	1,9382	7,9013	80,302
107	1,8333	8,2264	81,776
108	2,0179	8,1785	80,210
109	1,5109	8,5552	84,990
110	1,6509	8,1680	83,187
111	1,5428	8,5102	84,653
112	1,2675	8,7612	87,361
113	0,9315	8,9896	90,611
114	0,9363	9,1619	90,728
115	0,8503	9,1633	91,509
116	0,9301	9,1675	90,789
117	0,8051	9,4092	92,118
118	0,0737	9,2127	99,206
119	0,7510	9,3167	92,541
120	0,6546	9,4518	93,523
121	0,6736	9,3883	93,305
122	0,5837	9,5197	94,223
123	0,5724	9,5101	94,323
124	0,4327	9,5235	95,654
125	0,1684	9,6131	98,278

126	0,4695	9,6350	95,354
127	0,2514	9,8189	97,504
128	0,1463	9,9147	98,546
129	0,9847	0,0000	0,000
130	0,0000	9,8825	100,000
131	0,1012	10,0087	98,999
132	0,0000	10,1109	100,000
133	0,0000	10,1219	100,000

Tabela A.2 Valores experimentais das composições Diesel S10 e S500.

Amostras	m s-10 (g)	m s-500 (g)	% S-10/S-500
1	11,0380	0	100,00
2	10,4466	0,5690	94,83
3	9,4499	1,7018	84,74
4	8,8231	2,2100	79,97
5	8,2335	2,6983	75,32
6	7,1339	3,9250	64,51
7	6,6505	4,5392	59,43
8	6,0237	5,5696	51,96
9	5,5420	3,8909	58,75
10	4,3516	6,7069	39,35
11	3,8667	7,8023	33,14
12	3,3427	7,8169	29,95
13	2,7691	8,4135	24,76
14	2,1665	8,7235	19,89
15	1,1039	10,1313	9,83
16	0	11,1455	-

Tabela A.3. Valores experimentais das composições de gasolina, etanol e metanol.

Amostras	Gasolina	Etanol (%)	Metanol
	(%)		(%)
1	73,00	27,00	0,00
2	67,67	32,33	0,00
3	62,56	32,37	5,06
4	57,86	32,39	9,75
5	52,97	36,90	10,13
6	43,40	41,58	15,02
7	34,31	41,96	23,73
8	23,86	46,62	29,52
9	18,42	49,17	32,42
10	11,66	63,15	25,20
11	22,37	67,50	10,13
12	33,34	61,21	5,45
13	42,87	52,00	5,12
14	52,74	27,00	20,26
15	62,83	27,00	10,17
16	0,00	74,44	52,56

Tabela A.4. Valores experimentais das composições etanol, água e metanol.

Amostras	Etanol (%)	Água (%)	Metanol (%)
1	100,0	0,00	0,00
2	93,33	6,67	0,00
3	90,07	4,96	4,97
4	84,95	5,23	9,82
5	80,27	9,97	9,76
6	69,13	16,24	14,63
7	59,50	15,62	24,87
8	49,68	20,51	29,80
9	39,96	30,25	29,79
10	40,26	34,82	24,92
11	50,12	39,68	10,20
12	59,89	35,26	4,85
13	70,18	24,99	4,83
14	80,10	0,00	19,90
15	89,96	0,00	10,04
16	0,00	50,07	49,93

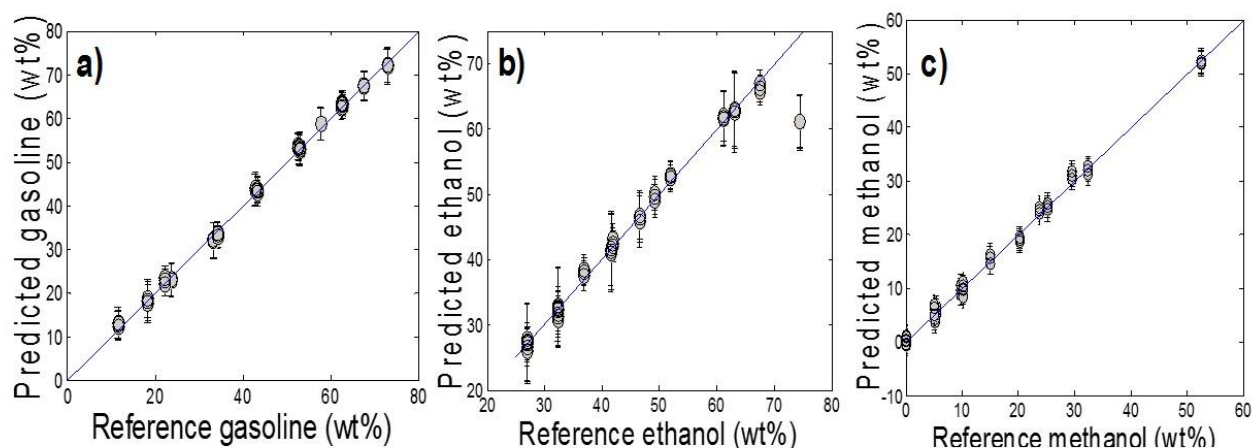
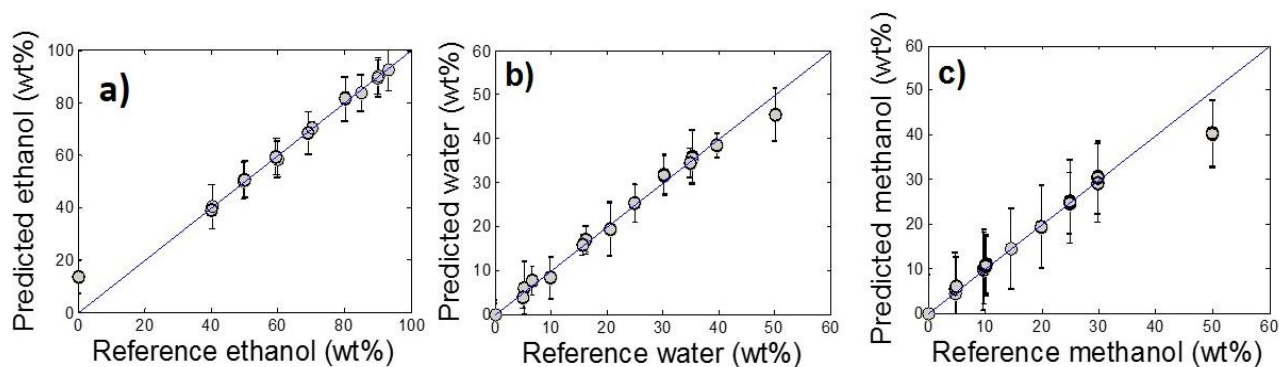


Figura A.1. Relação entre valores de referência e preditos pelo modelo PLS usando o método de validação cruzada repetida para (a) gasolina, (b) etanol e (c) conteúdo de metanol em gasolina de tipo c. As barras verticais representam o intervalo de confiança de 95% e a linha diagonal



representa a função de identidade.

Figura A.2. Relação entre a referência e os valores previstos pelo modelo PLS usando o método de validação cruzada repetida para (a) metanol, (b) água e (c) conteúdo de metanol no combustível EHC. As barras verticais representam o intervalo de confiança de 95% e a linha diagonal representa a função de identidade.