

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

MARIÁ DEL BIANCO LUPPI

Estudos de derivatização direta de anfetaminas no injetor em GC-MS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SÃO CARLOS, 2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

MARIÁ DEL BIANCO LUPPI

Estudos de derivatização direta de anfetaminas no injetor em GC-MS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química Analítica e Inorgânica

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

SÃO CARLOS, 2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Luppi, Mariá Del Bianco

Estudos de derivatização direta de anfetaminas no injetor em GC-MS /
Mariá Del Bianco Luppi. — São Carlos, 2022.

91 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de
Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

1. Cromatografia gasosa. 2. Injection port derivatization. 3. Derivatização.
4. Anfetaminas. I. Título.

Wilneide do Carmo Marchi Maiorano - CRB: 8/3978



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco e Vilma, por todo amor, dedicação e incentivo. Sem vocês nada teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pela minha saúde e pela possibilidade de desenvolver esse trabalho.

Aos meus pais, Vilma e Francisco e minhas irmãs, Marina e Marcela, por todo amor e apoio inesgotáveis durante a minha caminhada.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto, pela orientação durante esse trabalho e por ter me recebido no Laboratório de Cromatografia (CROMA). Obrigada por todo apoio, ensinamentos e oportunidades.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Dr. Junior Modesto e à JM BioAnálises S/S, por todo incentivo, suporte material e esforços durante os anos de desenvolvimento desse projeto. Sem esse apoio esse trabalho não teria sido possível.

Aos técnicos do CROMA, Guilherme e Elaine, pelas orientações, apoio e profissionalismo.

Aos amigos que fiz durante a pós-graduação: Thaís, Fábio, Chubraider, Bruna, Natália e Márcio, por sempre me apoiarem, por todas as conversas e parceria em todos os momentos.

Aos meus amigos da JM BioAnálises: Thiago Lizier, Tamyris, Marla, Adriana, Gilmara, Ana Carolina e Thiago Ferreira, pelo pela amizade, conversas, trabalho colaborativo, ensinamentos e incentivo.

Às amigas do Laboratório Protheus: Letícia, Milena, Ana Carolina e Daniele, pela amizade, conversas, incentivo e profissionalismo.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias.

A realidade
Sempre é mais ou menos
Do que nós queremos.
Só nós somos sempre
Iguais a nós-próprios (...)

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas apresenta-se como ferramenta com aplicação em diversos segmentos: farmacêutico, cosmético, forense e petroquímico, possibilitando a separação e identificação de moléculas de interesse. A crescente necessidade de monitoramento e identificação de substâncias psicoativas pode ser percebida pela implementação da portaria do Ministério do Trabalho e Previdência Social MTPS Nº 116 de 13/11/2015 que regulamenta a realização de exames toxicológicos em motoristas profissionais do transporte rodoviário coletivo de passageiros e do transporte rodoviário de cargas, que traz a demanda por métodos analíticos capazes de auxiliar na identificação e quantificação dessas substâncias. Dentre as substâncias psicoativas contempladas pelo exame toxicológico exigido pelo do Ministério do Trabalho e Previdência Social MTPS Nº 116 de 13/11/2015, foram selecionadas: anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) para o presente trabalho de estudos de derivatização direta de anfetaminas no injetor. Foi avaliada a aplicação da derivatização *on-line* (*injection port derivatization*) para determinação de anfetaminas em amostras de cabelo. Os derivatizantes anidrido acético (AA), N-metil-bis-trifluoroacetamida (MBTFA) e anidrido heptafluorobutírico (HFBA) foram avaliados para aplicação da derivatização *on-line*. As análises foram feitas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e foram avaliados os parâmetros de fluxo de purga, temperatura do injetor e volume de derivatizante utilizados. Dois protocolos de extração diferentes foram testados, e o protocolo com melhor recuperação foi aplicado a uma amostra real de cabelo. Os resultados foram satisfatórios e mostraram o potencial de utilização do N-metil-bis-trifluoroacetamida (MBTFA) como derivatizante em preparos com derivatização direta no injetor para determinação de anfetaminas em cabelo, com possibilidade futura de validação de método para aplicação em rotina de laboratório.

Palavras-chave: cromatografia gasosa, *injection port derivatization*, derivatização, anfetaminas.

ABSTRACT

Gas chromatography coupled to mass spectrometry is presented as a tool with potential applications in various segments: pharmaceutical, cosmetic, forensics, and petrochemical, allowing the separation and identification of molecules of interest. The growing need of monitoring and identification of psychoactive substances can be noted by the implementation of the ordinance no. 166 from Ministério do Trabalho e Previdência Social MTPS (Ministry of Labor and Social Security) from 11/13/2015, that regulates the execution of toxicological exams on professional drivers of collective passenger transport and road freight transport, that creates the demand for analytical methods that are able to help the identification and quantification of those substances. Among the psychoactive substances included in the toxicological exam demanded by ordinance no. 166 from Ministério do Trabalho e Previdência Social MTPS (Ministry of Labor and Social Security) from 11/13/2015, were selected: amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) for the present work of direct derivatization studies of amphetamines in the injector. The application of the online derivatization was assessed (injection port derivatization) to determine amphetamines in hair samples. The derivatives acetic anhydride (AA), N-methyl-bis-trifluoroacetamide (MBTFA) and heptafluorobutyric anhydride were assessed for the application of the online derivatization. The analyses were made by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and the parameters analyzed were: purge flow, injector temperature, and volume of derivative used. Two different protocols of injection were assessed, and the protocol with the best recovery was applied to a real hair sample. The results were good and showed the potential of the use of N-methyl-bis-trifluoroacetamide (MBTFA) as derivative in preparations of direct derivatization in the injector to determine amphetamines in hair, with the possibility of a future method validation for the application in a laboratory routine.

Keywords: gas chromatography, injection port derivatization, derivatization, amphetamines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Injeção sanduíche de 2 camadas.....	25
Figura 2 - Fluxograma do Protocolo de Extração 1.	37
Figura 3 - Fluxograma do Protocolo de Extração 2.	38
Figura 4 - Estrutura do anidrido acético.....	41
Figura 5 - Estrutura do MBTFA	42
Figura 6 - Cromatograma da solução padrão de 2 µg/mL do método 1 com derivatizante MBTFA.	43
Figura 7- Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para a anfetamina-d8 com MBTFA.	44
Figura 8 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para a anfetamina com MBTFA.	45
Figura 9 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para a metanfetamina com MBTFA (continua).	45
Figura 10 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para o MDA com MBTFA.	46
Figura 11 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para o MDMA com MBTFA.	47
Figura 12 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para a anfetamina-d8 com MBTFA	48
Figura 13 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para a anfetamina com MBTFA.	49
Figura 14 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para a metanfetamina com MBTFA (continua).....	49
Figura 15 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para o MDA com MBTFA.	50
Figura 16 - Cromatogramas de íons extraídos do modo <i>scan</i> e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para o MDMA com MBTFA.	51
Figura 17 – (a) Sugestão de mecanismo de reação, (b) derivados e espécies de transição – MBTFA ^{7,8,9}	54

Figura 18 – Cromatograma da solução 200 ng/mL de anfetamina com método 4, modo de injeção <i>splitless</i> e derivatizante MBTFA.	55
Figura 19 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de metanfetamina com método 4, modo de injeção <i>splitless</i> e derivatizante MBTFA.	55
Figura 20 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de MDA com método 4, modo de injeção <i>splitless</i> e derivatizante MBTFA.	56
Figura 21 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de MDMA com método 4, modo de injeção <i>splitless</i> e derivatizante MBTFA.	56
Figura 22 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de anfetamina-d8 com método 4, modo de injeção <i>splitless</i> e derivatizante MBTFA.	57
Figura 23 - Comparação entre injeção modo <i>splitless</i> (A) x <i>splitless</i> pulsado (B), respectivamente, para anfetamina - método 4 - derivatizante MBTFA.	58
Figura 24 - Comparação entre injeção modo <i>splitless</i> (A) x <i>splitless</i> pulsado (B), respectivamente, para metanfetamina - método 4 - derivatizante MBTFA.	58
Figura 25 - Comparação entre injeção modo <i>splitless</i> (A) x <i>splitless</i> pulsado (B), respectivamente, para MDA - método 4 - derivatizante MBTFA.	59
Figura 26 - Comparação entre injeção modo <i>splitless</i> (A) x <i>splitless</i> pulsado (B), respectivamente, para MDMA - método 4 - derivatizante MBTFA.	59
Figura 27 - Comparação entre injeção modo <i>splitless</i> (A) x <i>splitless</i> pulsado (B), respectivamente, para anfetamina-d8 - método 4 - derivatizante MBTFA.	60
Figura 28 - Curva analítica para anfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	61
Figura 29 - Curva analítica para metanfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	62
Figura 30 - Curva analítica para MDA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	62
Figura 31- Curva analítica para MDMA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	63
Figura 32 - Curva analítica para anfetamina-d8 com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	64
Figura 33 - Diferentes tempos de purga para o analito anfetamina com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto	65
Figura 34 - Diferentes tempos de purga para o analito metanfetamina com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto	65
Figura 35 - Diferentes tempos de purga para o analito MDA com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto.	66
Figura 36 - Diferentes tempos de purga para o analito MDMA com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto.	66
Figura 37 - Diferentes tempos de purga para o analito anfetamina-d8 com o derivatizante MBTFA – A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto.	67
Figura 38 - Comparação das áreas em diferentes proporções de padrão/derivatizante.	70
Figura 39 - Gráfico de área em função da temperatura do injetor.	72

Figura 40 - Cromatograma em modo SIM do analito anfetamina para o derivatizante HFBA.....	73
Figura 41 - Cromatograma modo SIM do analito metanfetamina para o derivatizante HFBA.....	73
Figura 42 - Cromatograma modo SIM do analito MDA para o derivatizante HFBA...74	
Figura 43 - Cromatograma modo SIM do analito MDMA para o derivatizante HFBA.	74
Figura 44 - Cromatograma modo SIM do padrão interno anfetamina-d8 para o derivatizante HFBA.	75
Figura 45 - (a) Sugestão de mecanismo de reação, (b) derivados e espécies de transição – HFBA ^{10,11,12} (continua).	75
Figura 46 - Cromatogramas anfetamina – modo MRM – HFBA.	77
Figura 47 - Cromatograma metanfetamina – modo MRM – HFBA.....	77
Figura 48 - Cromatograma MDA – modo MRM – HFBA.	78
Figura 49 - Cromatograma MDMA – modo MRM – HFBA.	78
Figura 50 - Cromatograma anfetamina-d8 – modo MRM – HFBA.	79
Figura 51 - Gráfico de alteração da área em função de modificações no método com derivatizante HFBA.	81
Figura 52 - Gráfico de alteração da área em função de modificações no método com o derivatizante MBTFA.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias e valores de corte, de acordo com Portaria n°116/2015 do MTPS ¹	19
Tabela 2 - Condições cromatográficas e espectrométricas dos métodos A1 e A2....	25
Tabela 3 - Identificação dos íons acetilados para cada analito utilizando o derivatizante AA.	26
Tabela 4 - Condições cromatográficas e espectrométricas dos métodos M1, M2 e M3.	28
Tabela 5 - Parâmetros para otimização dos métodos de 4 a 8.	29
Tabela 6 - Identificação dos íons acetilados para cada analito – MBTFA.	29
Tabela 7 - Identificação e concentração das soluções utilizadas na injeção com método 4 modo de injeção <i>splitless</i> pulsado com derivatizante MBTFA.	30
Tabela 8 - Parâmetros de tempo de purga, fluxo de purga do septo e fluxo de purga.	31
Tabela 9 - Condição cromatográfica e espectrométrica do método M5.	32
Tabela 10 - Variações na proporção volume de amostra/derivatizante.....	32
Tabela 11 - Variações na temperatura do injetor (<i>injection-port</i>).....	33
Tabela 12 - Identificação dos eventos de MRM para cada analito utilizando MBTFA.	33
Tabela 13 - Íons adquiridos no modo SIM - HFBA	34
Tabela 14 - Transições modo MRM – HFBA.....	35
Tabela 15 - Modificações no Protocolo de Extração 1.	39
Tabela 16 - Identificação dos íons acetilados para cada analito utilizando MBTFA.	43
Tabela 17 - Comparação entre M2 e M3 em intensidade de sinal e relação sinal ruído dos íons acetilados com o derivatizante MBTFA.....	52
Tabela 18 - Condições cromatográficas e espectrométricas- Método M4.....	53
Tabela 19 - Percentual de aumento de área da injeção por <i>splitless</i> pulsado quando comparada ao <i>splitless</i> convencional para o método 4 com o derivatizante MBTFA.....	60
Tabela 20 – Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas da anfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	61
Tabela 21 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas da metanfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	62
Tabela 22 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas do MDA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.....	63
Tabela 23 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas do MDMA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.....	63

Tabela 24 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas da anfetamina-d8 com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo <i>splitless</i> pulsado.	64
Tabela 25 - Comparação entre intensidade de sinal para os diferentes valores de tempo de purga para derivatizante MBTFA.....	67
Tabela 26 - Proporção de aumento da relação sinal/ruído no modo MRM quando comparado ao modo SIM para HFBA.....	79
Tabela 27- Recuperação – Protocolos de Extração 1 e 2 para derivatizante HFBA modo SIM.....	80
Tabela 28 - Valores de log P para os analitos avaliados.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Anidrido Acético
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
GC	Cromatografia Gasosa
IPD	<i>Injection port derivatization</i>
HFBA	Ánidrido heptafluorobutírico
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
MBTFA	N-metil-bis-trifluoroacetamida
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Espectrometria de Massas
MTPS	Ministério do Trabalho e Previdência Social
SENAD	Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

CV	coeficiente de variação
DP	desvio padrão
log P	coeficiente de partição octanol/água
mg	miligrama
mL	mililitro
ng	nanograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Derivatização com anidrido acético (AA).....	24
3.2	Derivatização com MBTFA.....	26
3.2.1	Parte I.....	26
3.2.2	Parte II.....	30
3.3	Derivatização com HFBA	34
3.4	Testes em matriz.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Derivatização com anidrido acético.....	41
4.2	Derivatização com MBTFA.....	42
4.2.1	Parte I.....	42
4.2.2	Parte II	64
4.3	Derivatização com HFBA	72
4.4	. Testes em matriz.....	80
4.4.1	Amostras reais	85
5	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica predominantemente utilizada para separar componentes voláteis e termicamente estáveis de misturas. A técnica se baseia na separação de uma mistura de componentes por meio da distribuição destes entre o gás de arraste e a fase estacionária, que se encontra dentro da coluna de separação (BLUMBERG, 2021). No caso do acoplamento com a GC, a espectrometria de massas (MS) é a técnica que pode fornecer informação estrutural sobre as moléculas e que possibilita a detecção em baixas concentrações, como por exemplo, ng/mL, dos analitos de interesse (VÉKEY, 2001). Deste modo, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) torna-se uma ferramenta que possui aplicação em diversos segmentos de pesquisa e indústria, na separação e identificação de moléculas de interesse. Devido a esta versatilidade, o surgimento de novas demandas em segmentos como: cosmético, forense, químico e farmacêutico possibilita a aplicação dessas técnicas para separação, identificação e quantificação substâncias e/ou analitos alvo de estudo.

Dentre as diferentes possibilidades de aplicação da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a análise de substâncias psicoativas em matrizes biológicas é um tema amplamente estudado e possui aplicação em diversas áreas: controle antidoping, exames admissionais, laudos forenses e renovação de carteira de habilitação. (COOPER *et al.*, 2012)

A Lei 13.013 de 2 de março de 2015 (BRASIL, 2015), que dispõe sobre o exercício da profissão de motorista, promoveu alteração no artigo 168 da Consolidação das Leis do Trabalho (CLT) e tornou obrigatório o exame toxicológico de larga janela de detecção (90 dias) para substâncias psicoativas que causem dependência ou comprometam a capacidade de direção. Aliada a essa lei, a implementação da Portaria do Ministério do Trabalho e Previdência Social MTPS Nº 116 de 13/11/2015 (BRASIL, 2015), que regulamenta a realização de exames toxicológicos em motoristas profissionais do transporte rodoviário coletivo de passageiros e transporte rodoviários de cargas, trouxe a necessidade do desenvolvimento de métodos capazes de identificar e quantificar as substâncias de interesse em uma matriz pouco explorada: o cabelo.

O cabelo se apresenta como uma matriz complementar e alternativa ante as matrizes comumente utilizadas na realização de ensaios: saliva, sangue, suor e

urina. (WOŻNIAK *et al.*, 2018) Essas matrizes apresentam a possibilidade de detecção de drogas em uma janela que vai de horas até alguns dias. Já o cabelo, além de apresentar vantagens quando comparado às matrizes convencionais: coleta não invasiva, ausência de necessidade de condições especiais de transporte e armazenamento da amostra, apresenta a possibilidade de larga janela de detecção, que pode ser do período de meses até anos. (COOPER *et al.*, 2012; KINTZ, CIRIMELE, 1997; WAGNER, 2019)

A janela de detecção se refere à possibilidade de detecção de substâncias no longo prazo, de avaliar o histórico de uso, devido ao fato das substâncias serem metabolizadas e armazenadas na fibra do cabelo por meio de difusão passiva da corrente sanguínea. (BOUMBA *et al.*, 2006) O cabelo cresce cerca de 1 cm por mês, sendo assim, cada centímetro de cabelo coletado a partir do couro cabeludo corresponde a um período de tempo de uso de substâncias psicoativas. A janela de detecção requerida para o exame toxicológico é de 90 dias, ou seja, correspondente a análise de 3 centímetros de cabelo. (BRASIL, 2015)

Dentre as substâncias psicoativas contempladas na MTPS N° 116 de 13/11/2015, as moléculas da classe das anfetaminas: anfetamina, metanfetamina (*ice, speed*), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, *ecstasy*) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) são as de interesse no presente estudo. Essas substâncias são conhecidas por serem estimulantes do sistema nervoso central, por apresentarem um alto poder de abuso e potencial de gerar dependência. (BRUCE, 2000; MUAKAD, 2013) Elas são freqüentemente utilizadas como recurso para atenuar o sono e afastar a fadiga, provenientes das exaustivas jornadas de trabalho às quais os motoristas estão submetidos.

Na Tabela 1 encontram-se descritos os valores de corte para os analitos estudados durante esse trabalho.

Tabela 1 - Substâncias e valores de corte, de acordo com Portaria n°116/2015 do MTPS¹

Analito	Valor de corte (ng/mg)	
	Triagem	Confirmação
Anfetamina	0,2	0,2
Metanfetamina	0,2	0,2
MDA	0,2	0,2
MDMA	0,2	0,2

¹ Portaria n°116/2015 do MTPS.

Os dados contidos no III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira (BASTOS, 2017), que é resultado da parceria entre a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e a Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas (SENAD), publicado por BASTOS *et al.*(2017, p.99) mostra que “as classes de medicamentos mais consumidas de forma não prescrita ou consumidas de forma diferente da prescrita, na vida, foram a de benzodiazepínicos (3,9%), a de opiáceos (2,9%) e a classe dos anfetamínicos (1,4%)”.

Além disso, segundo informações contidas no Primeiro Informe do Subsistema de Alerta Rápido sobre Drogas (SAR) (MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICA, 2022), que tem o objetivo de trazer dados e análises sobre novas substâncias psicoativas (NSP) identificadas no país, de acordo com o Núcleo de Exames de Entorpecentes (NEE) do Instituto de Criminalística da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo, que realiza a identificação e comprovação de substâncias tóxicas, a requisição para análise de materiais apreendidos teve aumento do ano de 2020 para 2021, dos quais os anfetamínicos correspondem a 38%. (MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICA, 2022)

Dentre os estimulantes utilizados pelos motoristas, até o ano de 2011 a anfetamina era o mais utilizado, entretanto, a partir do ano de 2011 foi possível notar uma mudança, na qual a cocaína passou a ser o estimulante mais utilizado entre os motoristas. (LEYTON *et al.*, 2019) Junto a este cenário, também foi constatada a

relação entre uso de anfetaminas conforme o aumento da distância da viagem dos motoristas. (SINAWAGA *et al.*, 2015)

De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas 2021, divulgado em junho de 2021, durante o último ano, aproximadamente de 275 milhões de pessoas usaram drogas no mundo. Além disso, é estimado que no ano de 2019 27 milhões de pessoas da faixa etária entre 15 e 64 anos tenham usado anfetaminas. (UNODC, 2021) Os dados sugerem que o tráfico de drogas estimulantes continua a ser dominado pela metanfetamina quando a avaliação é a nível mundial, e no ano de 2020 o número de usuários de anfetaminas (anfetamina e metanfetamina) atingiu a marca de 34 milhões, enquanto o número de usuários de *ecstasy* chegou a 20 milhões. (UNODC, 2022)

Levando esse cenário em consideração, as substâncias: anfetamina, metanfetamina, MDA e MDMA foram escolhidas para o presente trabalho pelo fato de serem substâncias estimulantes capazes de aumentar o desempenho cognitivo, o estado de alerta e concentração, e de serem utilizadas de maneira indiscriminada pelos motoristas de caminhões, de modo a possibilitar o aumento da jornada de trabalho. (LEYTON *et al.*, 2019; SINAWAGA *et al.*, 2015)

Para realizar análise por cromatografia gasosa é necessário que os analitos de interesse possuam estabilidade térmica e volatilidade, aumentando a detectabilidade. (CHIARADIA *et al.*, 2008) Moléculas que apresentam grupos funcionais como $-NH$, $-OH$, $-COOH$ e $-SH$, pelo fato de poderem fazer ligações de hidrogênio, costumam tornar necessária a etapa de derivatização ou, ao menos, se favorecerem da derivatização, assim como moléculas termolábeis também necessitam dessa etapa.

A derivatização é um processo que visa o aumento da detectabilidade por meio do aumento da volatilidade e estabilidade térmica, garantindo com que o analito de interesse tenha melhores características para ser determinado por cromatografia gasosa. (ORATA, 2012; SCHUMMER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013). Apesar de necessária, a etapa de derivatização convencional (*off-line*) demanda tempo de reação da amostra, além de proporcionar o contato do analista com o reagente derivatizante, que é frequentemente tóxico. (WANG *et al.*, 2013)

Deste modo, a derivatização *on-line*, chamada de *injection port derivatization*, que ocorre no injetor do cromatógrafo a gás, sob alta temperatura, apresenta-se como uma alternativa para diminuição do tempo de análise, menor número de

etapas de preparo de amostras, aumento de produtividade e de reprodutibilidade, e de menor uso de reagentes derivatizantes, frequentemente tóxicos. (WANG *et al.*, 2013)

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método analítico para determinação dos analitos: anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) utilizando derivatização direta no injetor (*injection port derivatization* - IPD), de modo a automatizar o processo de derivatização e possibilitar futuramente a validação de metodologia analítica para aplicação na rotina de laboratório

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados os padrões analíticos em solução de anfetamina (*LGC Standards®*), metanfetamina (*Absolute Standards®*), MDMA (*LGC Standards®*), MDA (*Absolute Standards®*) e anfetamina-d8 (*LGC Standards®*). Todos os padrões analíticos se encontravam na concentração de 1 mg/mL, dissolvidos em metanol e que foram gentilmente cedidos pela empresa JM BioAnalises S/S.

Os solventes e reagentes utilizados foram metanol (J.T. Baker®), tolueno (Scharlau®), água ultrapurificada (Millipore®), acetato de etila (Biograde®), ácido clorídrico (J.T.Baker) e hidróxido de sódio (Mallinckrodt)

Foram utilizados os derivatizantes anidrido acético (AA) do fabricante Mallinckrodt®, N-Metil-bis(trifluoroacetamida) (MBTFA) e anidrido heptafluorobutírico (HFBA), ambos do fabricante *Sigma Aldrich®*

A primeira parte (Parte I) desse trabalho foi realizada nas instalações da empresa JM BioAnalises S/S, localizada em Botucatu/SP, e segunda parte (Parte II) no Laboratório de Cromatografia (CROMA) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

Na primeira parte dos experimentos, realizada nas instalações da empresa JM BioAnalises, o instrumento utilizado foi um cromatógrafo Agilent 7890B (Santa Clara, CA, EUA), com amostrador modelo 7693, acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 5977B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com fonte de ionização por elétrons (EI). O software utilizado para aquisição de dados foi o *MassHunter GC/MS Acquisition*, para análise qualitativa foi utilizado o software *MassHunter Workstation Software – Qualitative Analysis* e para análise quantitativa foi utilizado o software *MassHunter Workstation Software – Quantitative Analysis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

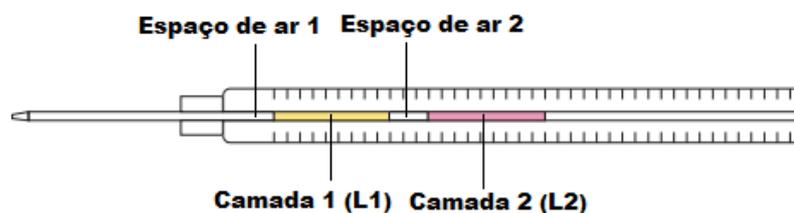
Na segunda parte dos experimentos, realizada no CROMA, o instrumento utilizado foi um cromatógrafo Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), com injetor/amostrador automático CTC Pal (CTC Analytics AG®, Zwingen, Suíça), acoplado a um espectrômetro de massas Waters Micromass Quattro Micro™ (Waters® Micromass®, Milford, MA, EUA) equipado com fonte de ionização por

elétrons (EI). O software utilizado para aquisição, análise qualitativa e análise quantitativa foi o *MassLynx* 4.4 (Waters Corporation®)

3.1 Derivatização com anidrido acético (AA)

Para o início do trabalho, realizado nas instalações da empresa JM BioAnalises S/S, foi utilizado o derivatizante anidrido acético (AA). Foram preparadas separadamente soluções intermediárias de cada um dos analitos com concentração de 20 µg/mL em metanol, a partir das soluções dos padrões analíticos. As soluções intermediárias foram injetadas no cromatógrafo Agilent 7890B (Santa Clara, CA, EUA) equipado com coluna capilar HP 5 MS (5%-fenil-metilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de filme (fabricante: Agilent). Como gás de arraste foi utilizado hélio com fluxo de 1,0 mL/min. O injetor foi mantido a 90°C. A programação de temperatura do forno da coluna foi iniciada em 60°C e mantida por 2,5 minutos, em seguida foi feita uma rampa de aquecimento à taxa de 30°C/min até 200°C e mantida durante 2 minutos, seguida de outra rampa de aquecimento até 280°C à taxa de 40°C/min (DJATMIKA *et al.*, 2018). O *insert liner* utilizado foi o ultra inerte com lã de vidro *single taper* Agilent (PN: 5190-3163), de comprimento de 78,5 mm, com 6,47 mm de diâmetro externo, diâmetro interno de 4 mm e 900 µL de volume. O espectrômetro de massas Agilent 5977B (Santa Clara, CA, EUA) foi operado com a fonte à temperatura de 300°C, a temperatura do quadrupolo foi de 150°C e a linha de transferência foi mantida a 280°C. A varredura foi realizada no modo *scan*, de 30 a 500 m/z (método A1). O injetor foi utilizado no modo de injeção '*sandwich*'. Foi selecionada a opção '*2 layer sandwich*', de forma que a seringa de injeção foi preenchida com 1 µL do derivatizante (L2), 0,1 µL de ar entre as camadas, 1 µL da solução contendo os padrões analíticos (L1) e 0,1 µL de ar, conforme mostra a Figura 1. (método A1).

Figura 1 - Injeção sanduíche de 2 camadas



Fonte: Adaptação de Agilent, 2010, p.184.

A velocidade do êmbolo (*plunger speed*) durante a injeção foi lenta e o fluxo de purga do septo foi de 3 mL/min.

Em uma segunda condição de análise com o anidrido acético, a temperatura do injetor foi mantida a 270°C, o volume de amostra injetado foi de 2 µL e o volume de derivatizante injetado foi de 1 µL (método A2). Segue abaixo a Tabela 2, com as condições utilizadas com o derivatizante anidrido acético.

Tabela 2 - Condições cromatográficas e espectrométricas dos métodos A1 e A2.

Parâmetro	Método A1	Método A2
Programação do Forno	Início: 60°C (2,5 min) Rampa 1: 30°C/min até 200°C (2 min) Rampa 2: 40°C/min até 280°C ²	Início: 140°C (2,5 min) Rampa 1: 30°C/min até 200°C (2 min) Rampa 2: 40°C/min até 280°C
Fluxo gás de arraste	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Temperatura do Injetor	90°C	270°C
Volume de amostra/Volume de derivatizante	1 µL/1µL	2 µL/1µL
Modo de injeção	<i>splitless</i>	<i>splitless</i>
Fluxo de purga do split	50 mL/min	50 mL/min
Tempo de purga do split	0,75 min	0,75 min
Velocidade da injeção	lenta	rápida
Temperatura da fonte de ionização	300°C	300°C

Temperatura do Quadrupolo	150°C	150°C
Temperatura da linha de transferência	280°C	280°C
Modo de varredura	<i>scan</i> (30-500 m/z)	<i>scan</i> (30-500 m/z)

² DJATMIKA *et al.*, 2018.

No início dos experimentos o padrão interno anfetamina-d8 ainda não estava disponível para uso, deste modo, as injeções realizadas com o derivatizante anidrido acético foram realizadas sem a presença da anfetamina-d8.

Na Tabela 3 encontram-se descritos os íons que foram monitorados nas injeções realizadas no modo de aquisição *scan* (m/z 40-500) dos analitos derivatizados com o anidrido acético

Tabela 3 - Identificação dos íons acetilados para cada analito utilizando o derivatizante AA.

Analito	Íons derivados acetilados³
Anfetamina	44
	86
Metanfetamina	58
	91
MDA	135
	162
MDMA	58
	162

Fonte: Autoria própria

³ DOBOS *et al.*, 2012.

Além do derivatizante anidrido acético (AA), foi avaliada a aplicação dos derivatizantes N-Metil-bis(trifluoroacetamida) (MBTFA) e anidrido heptafluorobutírico (HFBA) em condições diferentes do anidrido acético, também utilizando-se o modo de injeção *sandwich*.

3.2 Derivatização com MBTFA

3.2.1 Parte I

A primeira parte da etapa experimental realizada com o derivatizante MBTFA foi realizada nas instalações da empresa JM BioAnalises.

A partir dos padrões analíticos em solução, foram preparadas soluções estoque de 20 µg/mL em metanol de cada um dos analitos, e a partir destas, foi preparada uma solução intermediária contendo todos os analitos em tolueno, com concentração de 2 µg/mL. Essa solução foi injetada no cromatógrafo Agilent 7890B acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 5977B, equipado com coluna capilar HP 5 MS (5%-fenil-metilpolisiloxano) com as dimensões 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de filme e *insert liner* ultra inerte com lã de vidro single taper Agilent (PN:5190-3163), de comprimento de 78,5 mm, 6,47 mm diâmetro externo, diâmetro interno de 4 mm e 900 µL de volume. O injetor do cromatógrafo foi utilizado no modo *sandwich* (Figura 1) e o volume de amostra variou para cada método e o volume de derivatizante utilizado foi 1 µL. Hélio foi utilizado como gás de arraste e os analitos foram avaliados em 3 diferentes métodos (M1, M2 e M3), descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições cromatográficas e espectrométricas dos métodos M1, M2 e M3.

Parâmetro	Método M1	Método M2	Método M3
Programação do Forno	Início: 140°C (2,5 min) Rampa 1: 30°C/min até 200°C (2 min) Rampa 2: 40°C/min até 280°C (2 min)	Início: 90°C (1 min) Rampa 1: 20°C/min até 200°C (2 min) Rampa 2: 30°C/min até 290°C (2 min) ⁴	Início: 90°C (1 min) Rampa 1: 10°C/min até 200°C (1 min) Rampa 2: 30°C/min até 290°C (0 min)
Fluxo gás de arraste	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Temperatura do injetor	280°C	270°C	270°C
Volume de amostra/Volume de derivatizante	2 µL/1µL	1 µL/1µL	1 µL/1µL
Modo de injeção	splitless	splitless	splitless
Fluxo de purga do <i>split</i>	40 mL/min	50 mL/min	50 mL/min
Tempo de purga do <i>split</i>	0,50 min	0,75 min	0,75 min
Fluxo de purga do septo	3 mL/min	3 mL/min	3 mL/min
Velocidade da injeção	rápida	lenta	lenta
Temperatura da fonte de ionização	300°C	300°C	300°C
Temperatura do quadrupolo	150°C	150°C	150°C
Temperatura da linha de transferência	280°C	280°C	280°C
Modo de varredura	<i>scan</i> (30-500 m/z)	<i>scan</i> (30-500 m/z)	<i>scan</i> (30-500 m/z)

Fonte: Autoria própria

⁴ DOBOS *et al.*, 2012.

Após a realização dos testes nos 3 métodos descritos na Tabela 4 e avaliação dos resultados, foi selecionado o método M3 para dar continuidade ao processo de otimização. A partir do método M3, utilizando a mesma programação do forno da coluna, foram feitas combinações dos parâmetros velocidade de injeção e temperatura do injetor em diferentes condições, e então foram criados novos métodos com as seguintes nomenclaturas: M4, M5, M6, M7 e M8, descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros para otimização dos métodos de 4 a 8.

Identificação	Velocidade do êmbolo (<i>plunger speed</i>)	Temperatura do injetor
Método M4	Rápida	270 °C
Método M5	Lenta	290 °C
Método M6	Rápida	290 °C
Método M7	Rápida	300 °C
Método M8	Rápida	310 °C

Fonte: Autoria própria

A partir dos dados obtidos com a varredura no modo *scan*, o método M4 foi selecionado para dar continuidade na otimização, e as condições cromatográficas foram aplicadas juntamente com o método espectrométrico no modo *SIM* (*selected ion monitoring*). Para avaliação, foi injetada uma solução de concentração 200 ng/mL em tolueno, o monitoramento dos íons foi realizado no modo seletivo *SIM*, e os íons encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Identificação dos íons acetilados para cada analito – MBTFA.

Analito	Íons derivados acetilados⁵
Anfetamina-d8	96
	126
	143
Anfetamina	90
	118
	140

Metanfetamina	110
	118
	154
MDA	135
	162
MDMA	135
	154
	162

⁵ HIDVÉGI *et al.*, 2006.

Para otimizar a reação de acilação e possibilitar o aumento de sinal dos analitos, usando-se o método no modo de varredura *SIM*, foi avaliada a injeção *sandwich* no modo *splitless* pulsado.

O método otimizado com a injeção no modo *splitless* pulsado foi aplicado, realizando injeção em triplicata das soluções padrão dos analitos, descritas na Tabela 7, em diferentes concentrações em solvente tolueno, de modo a avaliar a resposta dos analitos de acordo com a concentração, além da linearidade e repetibilidade, a partir das soluções injetadas.

Tabela 7 - Identificação e concentração das soluções utilizadas na injeção com método 4 modo de injeção *splitless* pulsado com derivatizante MBTFA.

Identificação da Solução	Concentração (ng/mL)
Solução 1	3,1
Solução 2	6,3
Solução 3	12,5
Solução 4	25,0
Solução 5	50,0
Solução 6	100,0
Solução 7	200,0

Fonte: Autoria própria

Os dados obtidos para cada um dos diferentes analitos foram avaliados estatisticamente, com avaliação da linearidade, coeficiente de variação, desvio padrão e presença de *outliers*.

3.2.2 Parte II

A segunda parte da etapa experimental com o derivatizante MBTFA foi realizada no Laboratório de Cromatografia (Croma - IQSC/USP).

Nesta etapa do experimento, os parâmetros obtidos na primeira parte com o método M4 foram transferidos para o novo sistema GC-MS/MS. Foram testadas soluções das mesmas concentrações utilizadas no sistema GC-MS da instalação da empresa JM BioAnálises, para que pudesse ser feita uma comparação entre os sistemas e prosseguir com testes de novas condições de análise.

Devido à diferença entre os instrumentos das duas instalações, alguns parâmetros e concentrações de soluções tiveram que ser reavaliados e/ou modificados, de modo a se obter a melhor condição de análise possível.

Foram testados diferentes valores de tempo de purga (*purge-off time*) e de fluxo de purga do septo (*septum purge flow*). Para estes testes foi utilizada uma solução padrão de 400 ng/mL contendo todos os analitos em tolueno. Os diferentes valores testados se encontram descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros de tempo de purga, fluxo de purga do septo e fluxo de purga.

Parâmetro	Valores	Unidade de medida
Tempo de purga (<i>purge-off time</i>)	1,0; 1,2; 1,5	minutos
Fluxo de purga do septo	2, 4, 5	mL/min

Fonte: Autoria própria

Antes de serem avaliadas novas condições de análise, foi realizada uma alteração na cromatografia utilizada no método M4, com a intenção de promover uma melhor separação dos analitos estudados. A nova condição cromatográfica definida como método M5 encontra-se descrita na Tabela 9.

Ao transferir os experimentos da instalação da empresa JM BioAnálises S/S para o Laboratório de Cromatografia (CROMA), o parâmetro velocidade de injeção (*plunger speed*) foi alterado, uma vez que o novo injetor disponível opera apenas em uma única velocidade de injeção.

Tabela 9 - Condição cromatográfica e espectrométrica do método M5.

Parâmetro	Método M5
Programação do Forno	Início: 105°C (1 min)
	Rampa 1: 10°C/min até 200°C (1 min)
	Rampa 2: 30°C/min até 290°C 0 min)
Fluxo gás de arraste	1 mL/min
Temperatura do Injetor	270°C
Volume de Injeção	1 µL
Modo de injeção	<i>splitless</i>
Fluxo de purga do split	<i>50 mL/min</i>
Tempo de purga do <i>split</i>	<i>0,75 min</i>
Fluxo de purga do septo	4 mL/min
Velocidade da injeção	não se aplica
Temperatura da fonte de ionização	300°C
Temperatura do Quadrupolo	150°C
Temperatura da linha de transferência	280°C
Modo de aquisição	SIM

Fonte: Autoria própria

Nas condições descritas na Tabela 9, também foram realizadas variações na proporção volume de amostra/derivatizante, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 - Variações na proporção volume de amostra/derivatizante.

Identificação	Volume de amostra (µL)	Volume de derivatizante (µL)	Proporção (razão v/v)
Condição 1	1	1	1/1
Condição 2	1,3	0,7	13/7
Condição 3	1,5	0,5	3/1
Condição 4	1	1*	1/1 ⁶

Fonte: Autoria própria

⁶ derivatizante diluído na proporção 1:1 (v/v) com o solvente acetonitrila.

Na escolha dos valores selecionados para testes das proporções não contemplaram experimentos em que o derivatizante se encontrasse em maior

volume do que a solução padrão, e, em todos os testes realizados, foi mantido o volume total de injeção de 2 µL (soma do volume de amostra e derivatizante).

Após o método M5 ter sido avaliado para os parâmetros descritos na Tabela 10, também foram testados mais três novos valores de temperatura do injetor, que se encontram descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Variações na temperatura do injetor (*injection-port*).

Identificação	Temperatura (°C)
Temperatura 1	240
Temperatura 2	250
Temperatura 3	280

Fonte: Autoria própria

O sistema GC-MS/MS disponível no Laboratório de Cromatografia possibilitou a aquisição de dados no modo MRM. Foram realizados experimentos no modo *product ion scan* de modo a verificar quais íons seriam obtidos a partir da seleção e fragmentação de íons precursores. A partir desses íons produtos, foram realizados experimentos no modo de aquisição MRM para todos os analitos (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA) e para o padrão interno anfetamina-d8, utilizando o derivatizante MBTFA.

Na Tabela 12 encontram-se descritos os eventos MRM para os analitos avaliados.

Tabela 12 - Identificação dos eventos de MRM para cada analito utilizando MBTFA.

Analito	Transições
Anfetamina-d8	126>69
	126>96
Anfetamina	118>91
	140>69
Metanfetamina	154>69
	154>110
MDA	135>51
	135>77
MDMA	154>69
	154>110

Fonte: Autoria própria

3.3 Derivatização com HFBA

Os experimentos utilizando o derivatizante anidrido heptafluorobutírico (HFBA) foram realizados na Parte II do desenvolvimento do projeto.

Os experimentos realizados com HFBA foram realizados de modo a estudar seu comportamento em *injection-port derivatization* e a viabilidade de sua aplicação para esse tipo de uso.

Foram utilizadas as condições cromatográficas e espectrométricas do método M3, com alteração na aquisição para, primeiramente, modo *scan*, e posteriormente no modo SIM.

Para os testes com o derivatizante HFBA com os padrões foi selecionado o solvente acetato de etila. (KARAČONJI *et al.*, 2014; KINTZ *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2000). Deste modo, primeiramente foram injetadas as soluções de cada um dos padrões analíticos em acetato de etila, na concentração de 2 µg/mL, no modo *scan*.

Após a obtenção dos dados no modo *scan*, padrões de 400 ng/mL foram injetados no modo de aquisição SIM.

Na Tabela 13 se encontram descritos os íons adquiridos no modo de aquisição SIM para os analitos derivatizados com HFBA.

Tabela 13 - Íons adquiridos no modo SIM - HFBA

Anfetamina-d8	96
	126
Anfetamina	91
	118
	240
Metanfetamina	118
	210
	254
MDA	135
	162
MDMA	162
	210
	254

Fonte: Autoria própria

A instrumentação disponível no Laboratório CROMA possibilitou a realização dos experimentos no modo MRM com o derivatizante HFBA. Foram realizados

experimentos no modo *product ion scan*, de modo a verificar quais íons seriam obtidos a partir da seleção e fragmentação de íons precursores. A partir desses íons produtos, foram realizados experimentos no modo de aquisição MRM para todos os analitos (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA) e para o padrão interno anfetamina-d8, utilizando o derivatizante HFBA. Para os experimentos no modo MRM foram utilizados padrões de 400 ng/mL em acetato de etila.

Na Tabela 14 encontram-se descritos os eventos MRM adquiridos com o derivatizante HFBA.

Tabela 14 - Transições modo MRM – HFBA.

Anfetamina-d8	243>169
Anfetamina	240>169 240>192
Metanfetamina	254>169 254>210
MDA	135>77 162>131
MDMA	254>169 254>210

Fonte: Autoria própria

3.4 Testes em matriz

Após serem selecionadas as melhores condições cromatográficas e espectrométricas para os analitos estudados, foram realizados testes de extração em matriz para avaliação de recuperação dos analitos.

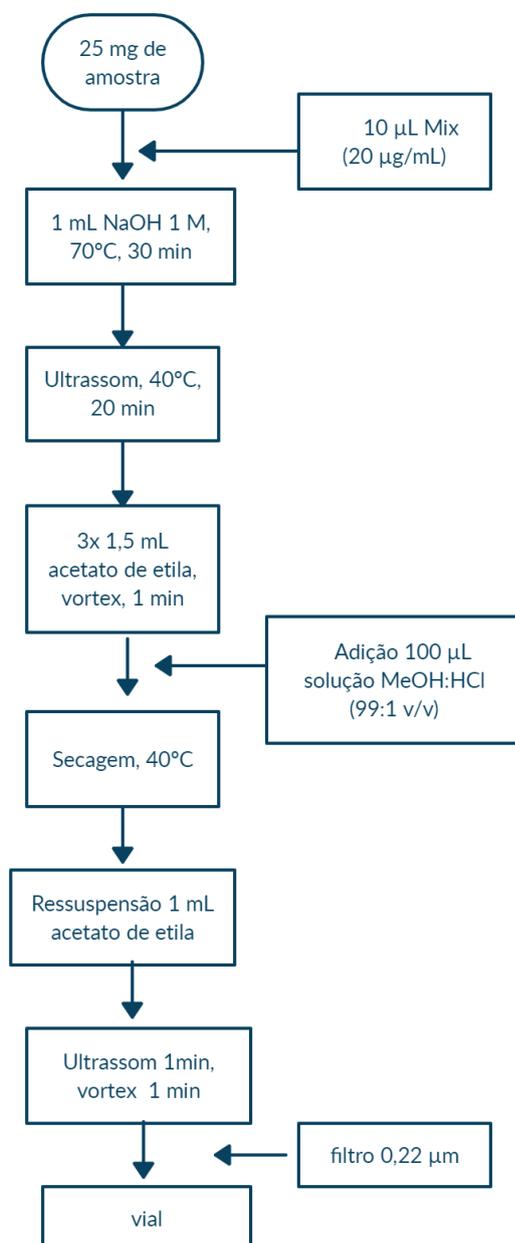
Para realização dos testes em matriz, foi utilizada uma amostra de cabelo isenta dos analitos alvo do estudo (amostra branca), previamente lavada. Essa amostra foi picotada com auxílio de tesoura em pequenos pedaços, com aproximadamente 2-3mm de comprimento, e foram pesados 25 mg em balança analítica.

Com o intuito de fazer avaliação da recuperação e do efeito de matriz, os testes foram realizados com a concentração mais alta que o valor de corte, de 8 ng/mg, para todos os analitos.

Foram testados dois diferentes protocolos de extração. O primeiro protocolo de extração foi realizado de acordo com o descrito por Karačonji e Brajenović, realizando algumas modificações. (KARAČONJI *et al.*, 2014) Nesse protocolo foram pesados em um frasco 25 mg de amostra branca de cabelo e foram adicionados 10 µL da solução (20 µg/mL) contendo os 4 analitos alvo e o padrão deuterado de anfetamina. Em seguida, foi adicionado 1 mL de hidróxido de sódio 1 M, o frasco foi fechado e a amostra foi colocada em banho de água a 70°C durante 30 minutos. Após a completa dissolução do cabelo, a amostra foi colocada em banho de ultrassom à 40°C durante 20 minutos. Na seqüência, a amostra foi retirada do banho de ultrassom e deixada na bancada até que chegasse à temperatura ambiente. Foram realizadas três extrações de 1,5 mL de acetato de etila com agitação em vortex durante 1 minuto. O extrato foi colocado em tubo de ensaio, foram adicionados 100 µL da solução metanol: ácido clorídrico (99:1 v/v) e o extrato foi seco a 40°C em concentrador de amostras com fluxo de nitrogênio. A ressuspensão foi feita com 1 mL de acetato de etila, o tubo de ensaio foi colocado em banho de ultrassom durante 1 minuto e agitado em vortex durante 1 minuto. A amostra foi filtrada utilizando filtro Acrodisc de 0,22 µm PVDF (Pall Life Sciences). (KARAČONJI *et al.*, 2014)

As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata. Utilizando esse protocolo de extração, também foram extraídas três amostras brancas, isentas de adição de padrão. Parte do extrato da amostra branca extraída foi utilizado para preparar um padrão de concentração 200 ng/mL no extrato branco (“*matrix matched standard*”), de modo a possibilitar a avaliação do efeito matriz e da avaliação da recuperação do protocolo de extração.

A Figura 2 se refere ao fluxograma do Protocolo de Extração 1.

Figura 2 - Fluxograma do Protocolo de Extração 1.

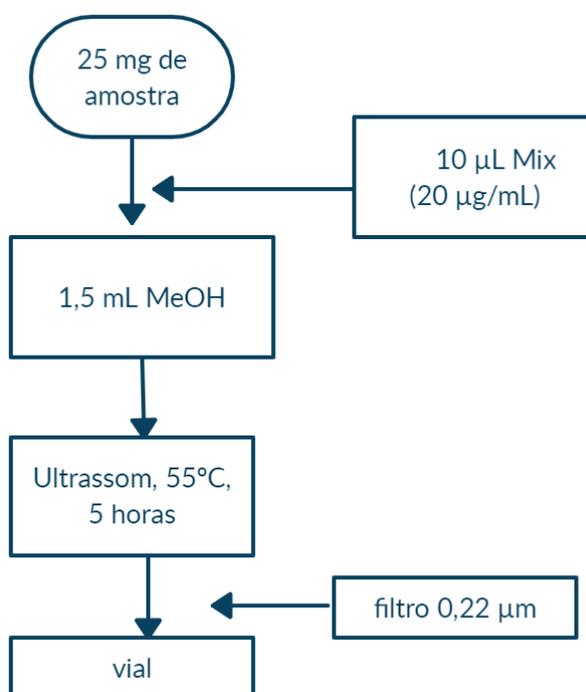
Fonte: Autoria própria

O segundo protocolo de extração foi realizado de acordo com o descrito por Kintz e Cirimele, realizando algumas modificações. (KINTZ *et al.*, 1997) Foram pesadas em frasco 25 mg de amostra branca de cabelo, foram adicionados 10 µL da solução (20 µg/mL) contendo os 4 analitos alvo e o padrão deuterado de anfetamina. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de metanol. O frasco foi fechado e foi colocado em banho de ultrassom à temperatura de 55°C durante 5 horas. Após o

resfriamento, a amostra foi filtrada utilizando filtro Acrodisc de 0,22 μm PVDF (Pall Life Sciences).

As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata. Utilizando esse protocolo de extração, também foram extraídas três amostras brancas, isentas de adição de padrão. Parte do extrato da amostra branca extraída foi utilizado para preparar um padrão de concentração 133 ng/mL no extrato branco (*“matrix matched standard”*), de modo a possibilitar a avaliação do efeito matriz e da avaliação da recuperação do protocolo de extração.

Figura 3 - Fluxograma do Protocolo de Extração 2.



Fonte: Autoria própria

As amostras submetidas aos dois protocolos de extração foram injetadas para derivatização *on-line* com o derivatizante HFBA e com o derivatizante MBTFA, no modo de aquisição SIM. Entretanto, foi calculada recuperação dos métodos utilizados nos protocolos de extração 1 e 2 utilizando apenas o HFBA como derivatizante. Para avaliação da recuperação, a amostra fortificada e extraída foi comparada com uma amostra do padrão preparado no extrato da matriz branca (*matrix matched standard*) de cada um dos protocolos de extração.

Os protocolos 1 e 2 de extração foram avaliados quanto ao critério de recuperação apenas na combinação com o derivatizante HFBA.

Utilizando o protocolo de extração 1, além do preparo de amostras como descrito, também foram feitas modificações no volume final de ressuspensão e no tipo de solvente utilizado nas amostras, de modo a buscar uma condição que fosse a mais adequada para a ocorrência da reação de derivatização. As modificações realizadas na etapa final do método estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15 - Modificações no Protocolo de Extração 1.

Identificação da modificação	Volume ressuspensão	Solvente utilizado
A	500 µL	acetato de etila
B	250 µL	tolueno

Fonte: Autoria própria

As amostras que sofreram as alterações descritas na Tabela 15 foram injetadas com os derivatizantes MBTFA e HFBA, no modo de aquisição SIM.

Após a realização das injeções no modo SIM, também foram realizadas as injeções no modo de aquisição MRM para os derivatizantes MBTFA e HFBA para a melhor condição obtida a partir das modificações descritas na Tabela 15.

3.4.1 Amostras reais

Depois de realizados os testes com os diferentes protocolos de extração, com as modificações do solvente conforme descrito na Tabela 15 e com o melhor modo de aquisição, com a intenção de avaliar a aplicação dos protocolos de extração com amostras reais, foi submetida à extração, em triplicata, uma amostra real de cabelo (usuário) sabidamente contendo substâncias psicoativas. Esta amostra foi gentilmente cedida pela empresa JM BioAnalises, e se refere a uma amostra de uma rodada de ensaio de proficiência realizada pela empresa JM BioAnalises, e que sabidamente continham, além de metanfetamina e MDMA, outras substâncias psicoativas. A esta amostra foram adicionados 10 µL de da solução de 20 µg/mL de anfetamina-d8 e esta foi extraída de acordo com o protocolo de extração 1 e

ressuspendida de acordo com a modificação A descrita na Tabela 15. Esta amostra foi injetada com o derivatizante MBTFA, nos modos de aquisição SIM e MRM. Ao realizar estes testes, a intenção foi verificar se, com os protocolos de extração avaliados e suas modificações, juntamente com a melhor condição de derivatizante selecionada, seria possível detectar as substâncias psicoativas em uma amostra real de cabelo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A derivatização em GC é um processo que tem a finalidade de melhorar a volatilidade, estabilidade térmica, a seletividade e detectabilidade das moléculas de interesse, de modo que haja maior compatibilidade das moléculas para serem determinadas pela técnica de cromatografia gasosa. (WANG *et al.*, 2013. Dentre as opções de processos de derivatização, a acilação é bastante utilizada com aminas primárias e secundárias. A acilação promove a substituição dos átomos de hidrogênio pelos grupos acila. (ORATA, 2012; ZAIKIN *et al.*, 2003) Na acilação, os grupos como –OH, –SH e –NH são convertidos em ésteres, tioésteres e amidas.

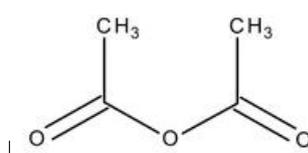
A reação de acilação pode ser descrita de maneira genérica conforme se encontra abaixo (ZAIKIN *et al.*, 2003):



4.1 Derivatização com anidrido acético

O anidrido acético é um derivatizante comumente utilizado para reações de acilação, devido a sua capacidade de reagir em condições brandas.

Figura 4 - Estrutura do anidrido acético



Fonte: Autoria própria

As injeções dos padrões com o uso do derivatizante anidrido acético (AA) e a varredura realizada no modo *scan* apresentaram a formação das espécies dos analitos anfetamina, metanfetamina, MDMA e MDA em suas formas acetiladas. Os espectros de massas obtidos das injeções de cada um dos analitos separadamente foram comparados com a base de dados da biblioteca da NIST.

Após a realização dos testes no modo *scan*, foram realizados os testes no modo de aquisição *SIM* para os analitos, entretanto, nesse modo de aquisição não foram observados os picos dos íons acetilados com o derivatizante anidrido acético.

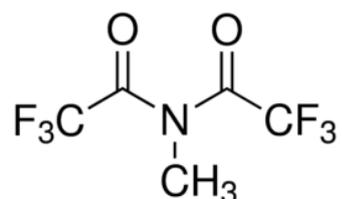
Um fator que pode explicar esse comportamento é a ausência de um reagente aceptor de próton, como a piridina, que embora não seja sempre necessário, poderia justificar a não ocorrência da reação de acilação. (BERGO *et al.*, 2009; STAERK *et al.*, 2000) Além disso, uma proporção não adequada entre reagente/derivativante ou condição de injeção também podem ter contribuído para esse efeito e não ter possibilitado a formação dos íons acetilados. Dobos e colaboradores obtiveram resultados satisfatórios ao derivatizar anfetaminas com anidrido acético na ausência de piridina, entretanto, Bergo e colaboradores obtiveram bons resultados com a combinação de anidrido acético com piridina. (DOBOS *et al.*, 2012; BERGO *et al.*, 2009)

4.2 Derivatização com MBTFA

4.2.1 Parte I

O derivativante MBTFA – N-metil-bis-trifluoroacetamida foi utilizado para derivatização nos métodos M1, M2 e M3.

Figura 5 - Estrutura do MBTFA

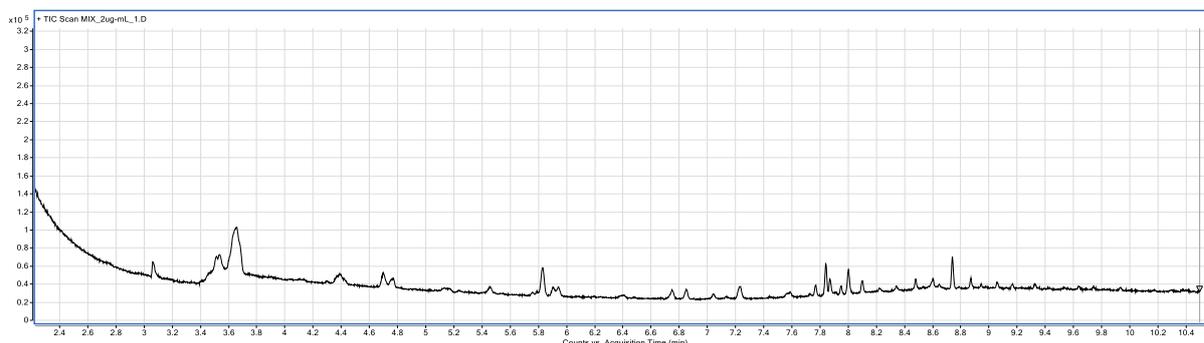


Fonte: Autoria própria

O MBTFA é um agente derivativante que faz parte do grupo dos anidridos perfluoroácidos e é bastante reativo com aminas primárias e aminas secundárias em condições brandas. (SEGURA *et al.*, 1998) O processo de derivatização de aminas por acilação é preferível quando comparado ao processo de sililação, pois os produtos da reação do primeiro processo são mais estáveis. (ZAIKIN *et al.*, 2003)

O método M1 não apresentou resultados satisfatórios, tendo em vista que não houve formação das espécies dos derivados acetilados dos analitos em questão. Na Figura 6 se encontra o cromatograma obtido com varredura no modo *scan*, sem sinal para os derivados acetilados dos analitos alvo do estudo.

Figura 6 - Cromatograma da solução padrão de 2 µg/mL do método 1 com derivatizante MBTFA.



Fonte: Autoria própria

A injeção utilizando o método 2 apresentou a formação dos íons derivados acetilados, os quais foram comparados com a biblioteca espectral NIST (*National Institute Standards and Technology*) e que, com exceção da anfetamina-d8, foram os mesmos obtidos por Dobos e co-autores (DOBOS *et al.*, 2012). Os íons dos derivados acetilados para cada um dos analitos se encontram descritos na Tabela 16.

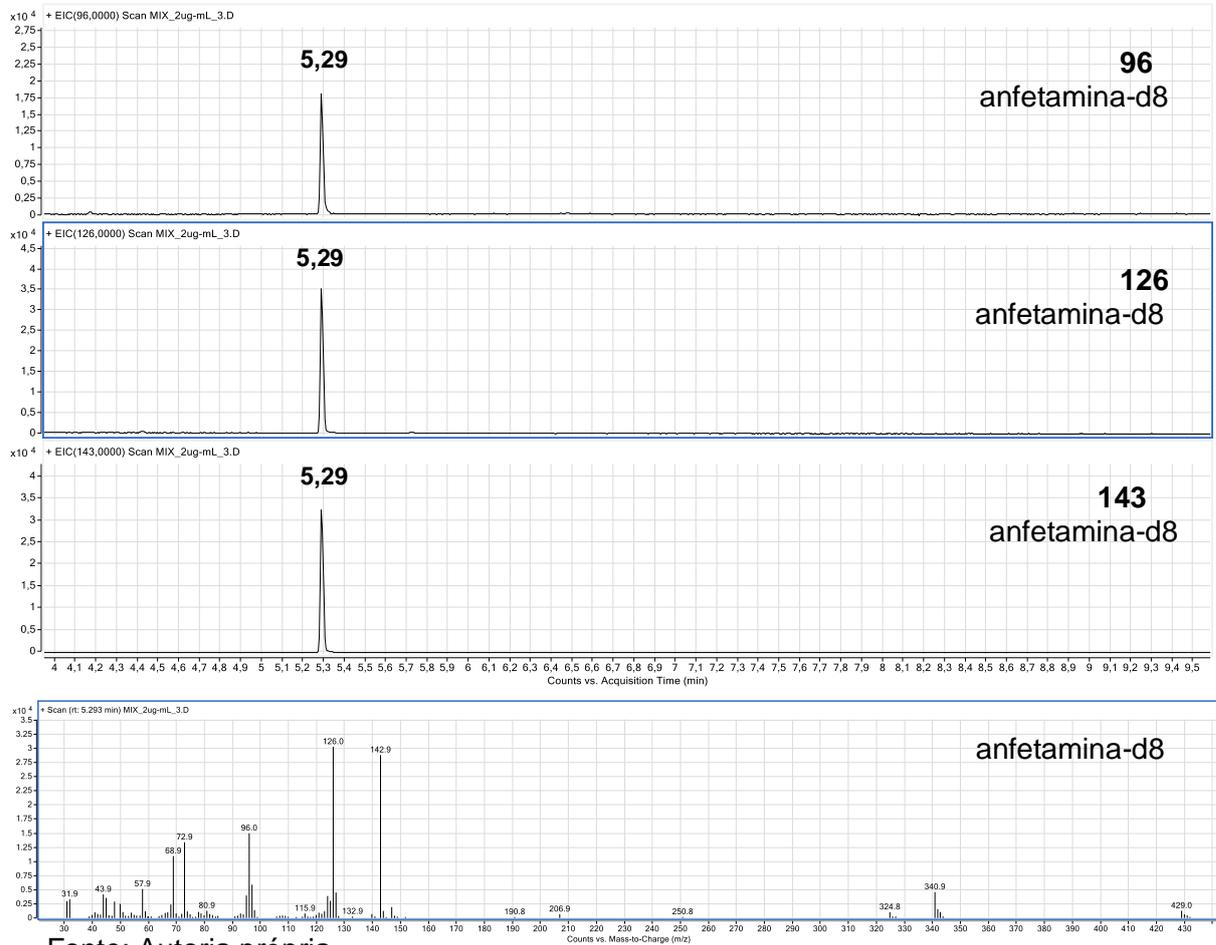
Tabela 16 - Identificação dos íons acetilados para cada analito utilizando MBTFA.

Analito	Íons derivados acetilados
Anfetamina-d8	96
	126
	143
Anfetamina	91
	118
	140
Metanfetamina	110
	118
	154
MDA	135
	162
MDMA	135
	154
	162

Abaixo se encontram as Figuras 7 a 11 referentes aos cromatogramas extraídos de íons totais (EIC – *extracted ion chromatogram*) obtido no modo de

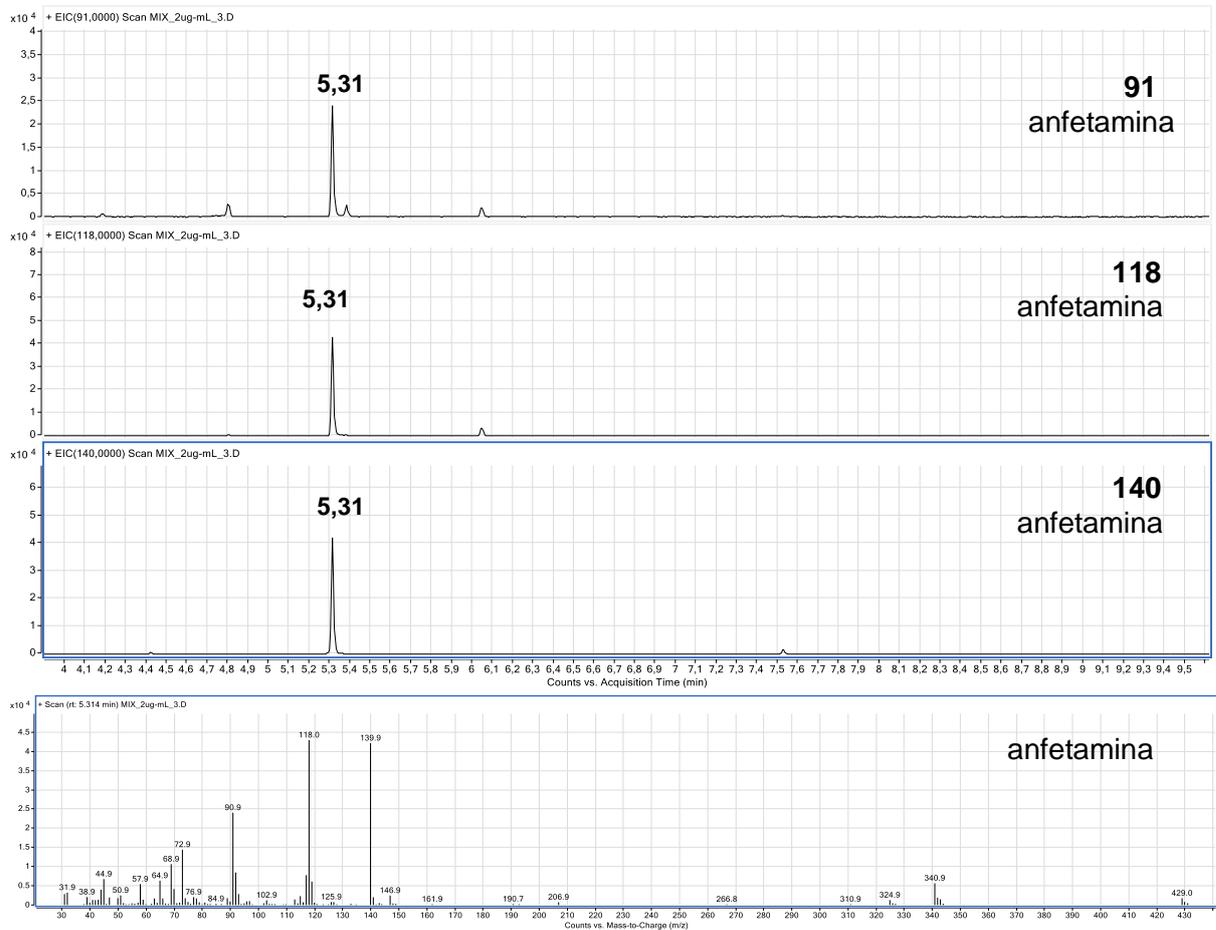
varredura *scan* e os íons acetilados dos analitos anfetamina-d8, anfetamina, metanfetamina, MDA e MDMA.

Figura 7- Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para a anfetamina-d8 com MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Figura 8 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para a anfetamina com MBTFA.



Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para a metanfetamina com MBTFA (continua).

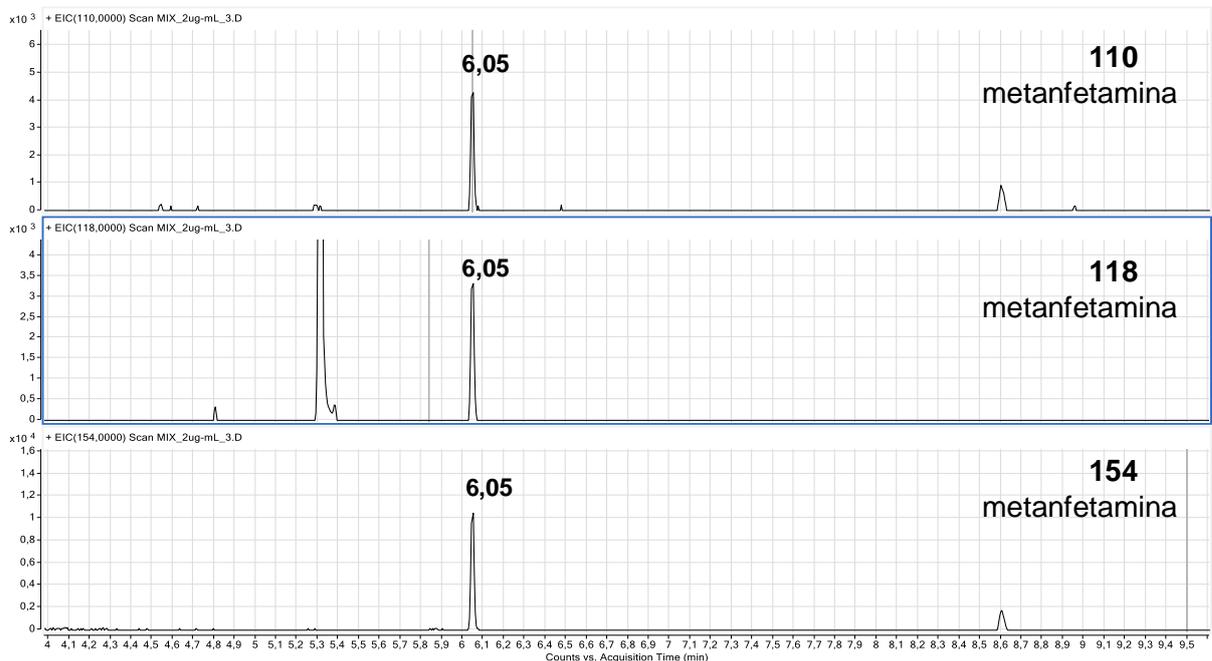
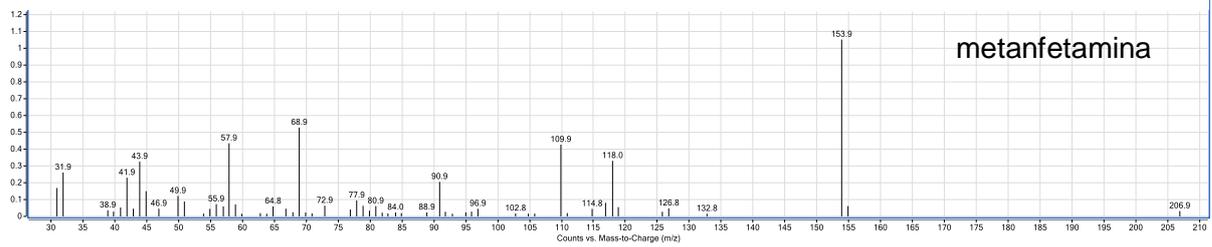
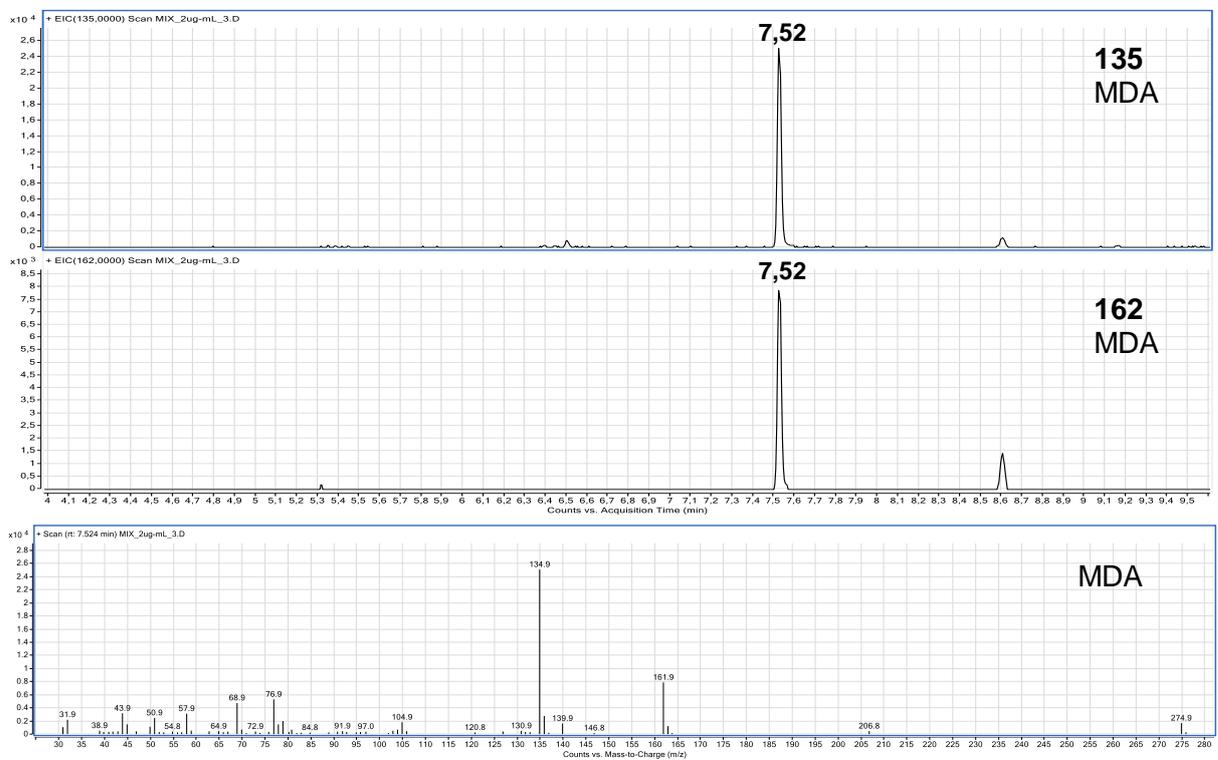


Figura 9 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para a metanfetamina com MBTFA (continuação).



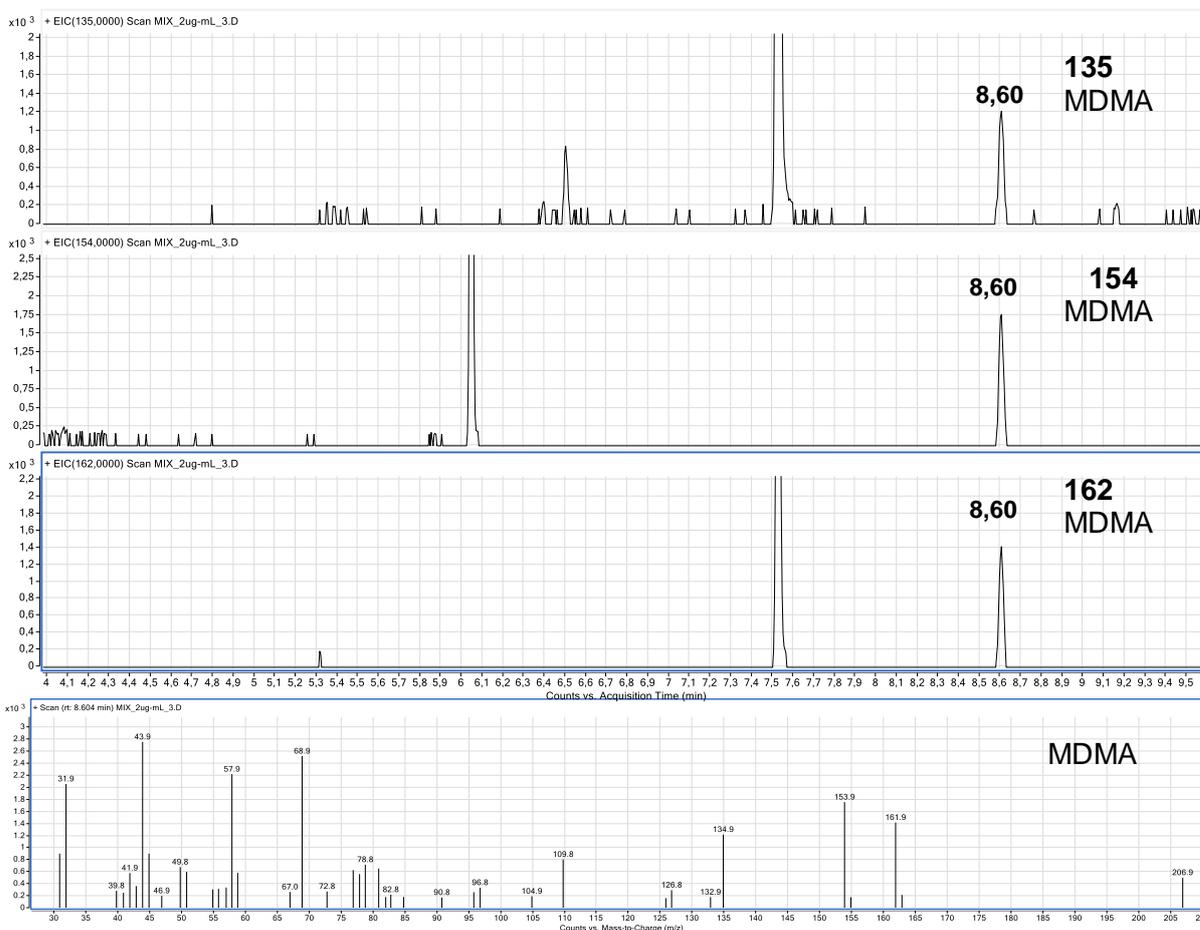
Fonte: Autoria própria

Figura 10 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para o MDA com MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Figura 11 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 2 de aquisição para o MDMA com MBTFA.



Fonte: Autoria própria

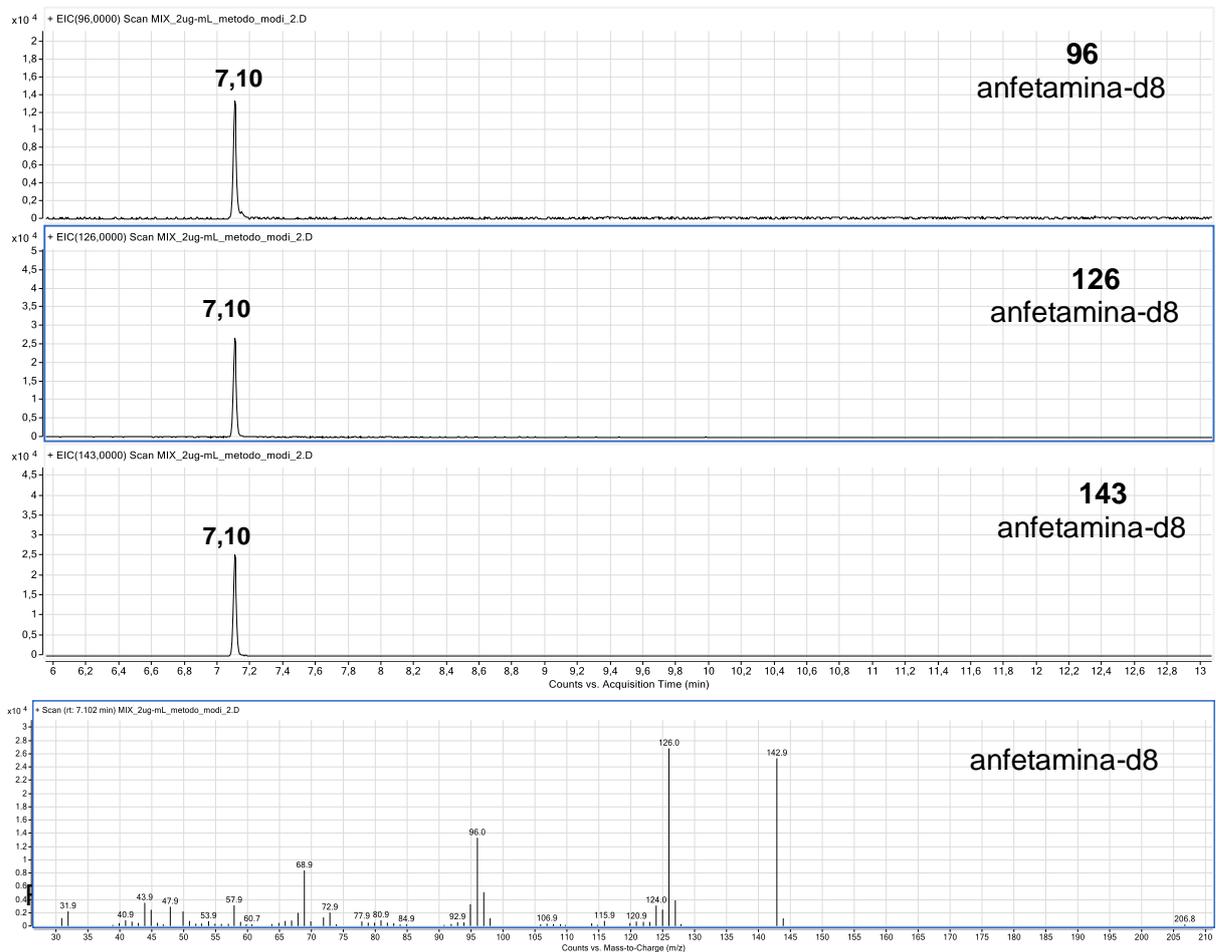
Nas Figuras de 7 a 11 é possível observar nos cromatogramas de íons extraídos que, para todos os analitos e íons avaliados, o método apresentou boa seletividade. Quanto à intensidade de sinal, é possível observar nas Figuras 9 e 11 que íons do analitos metanfetamina e MDMA apresentaram menor intensidade de sinal dentre todos os analitos, entretanto, a relação sinal/ruído foi superior a razão 10:1 para todos os íons de todos os analitos.

As variáveis como tempo de purga e tempo de *splitless* podem influenciar esses resultados, porém, esse comportamento também pode ser explicado pela maior reatividade das aminas primárias (anfetamina e MDA) ante o derivatizante MBTFA, pelo fato destas não possuírem grupos substituídos na cadeia alfa-metil-etilamina. Em relação às aminas secundárias (metanfetamina e MDMA), a cadeia alfa-metil-etilamina se encontra com grupos substituídos, resultando em

provavelmente uma menor reatividade com o derivatizante MBTFA. (HIDVÉGI *et al.*, 2008)

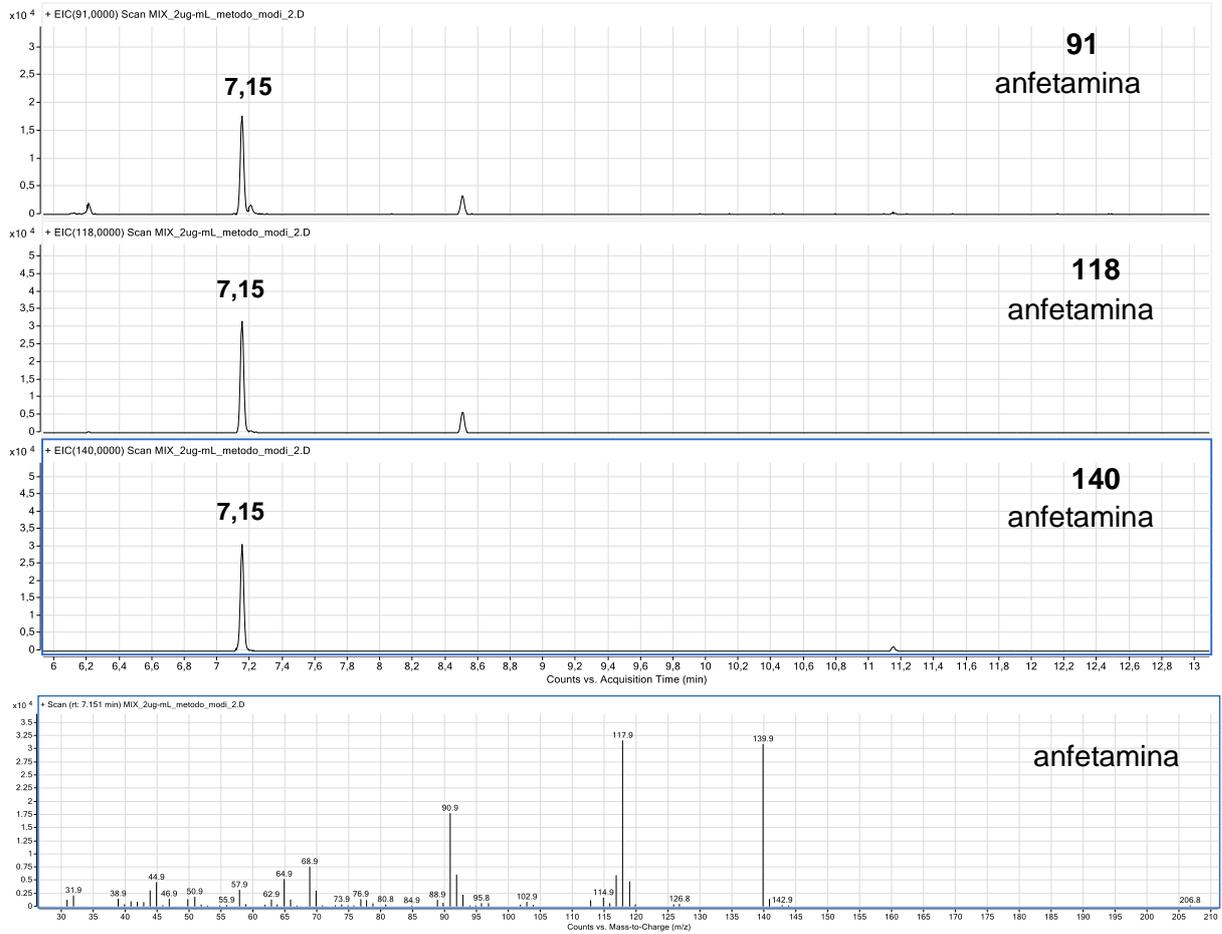
A injeção utilizando o método 3 apresentou a formação dos íons derivados acetilados, os quais foram comparados com a biblioteca espectral NIST (*National Institute Standards and Technology*) e foram os mesmos obtidos por Dobos e coautores (DOBOS *et al.*, 2012). Abaixo se encontram as Figuras 12 a 16 referentes ao cromatograma de íons totais (TIC) obtido no modo de varredura *scan* e os íons acetilados dos analitos anfetamina-d8, anfetamina, metanfetamina, MDA e MDMA.

Figura 12 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para a anfetamina-d8 com MBTFA



Fonte: Autoria própria

Figura 13 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para a anfetamina com MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Figura 14 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para a metanfetamina com MBTFA (continua).

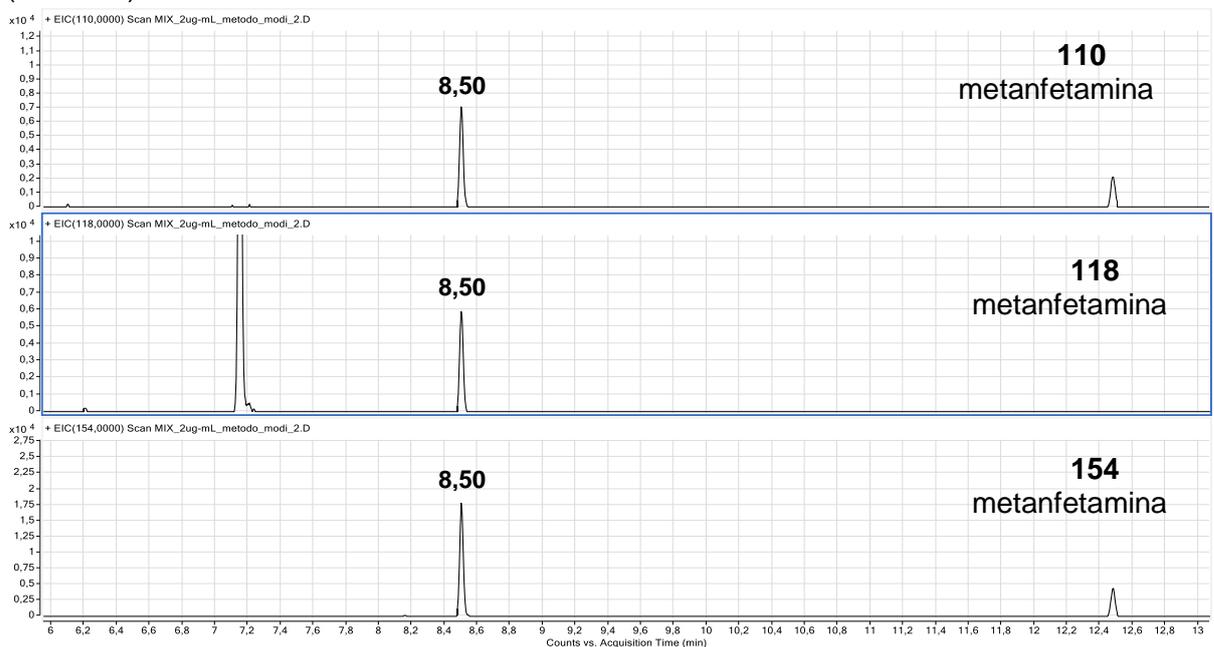
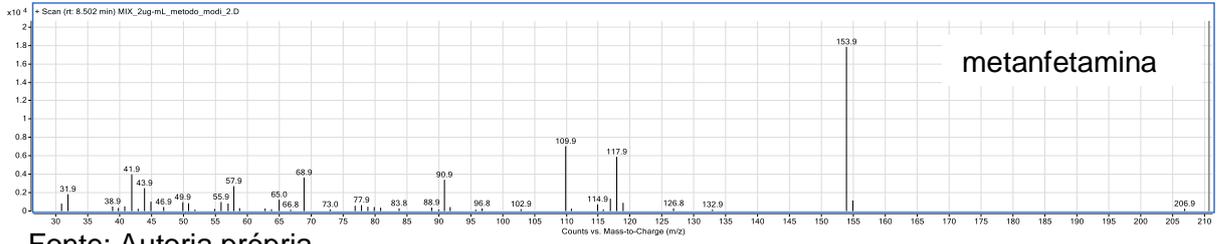
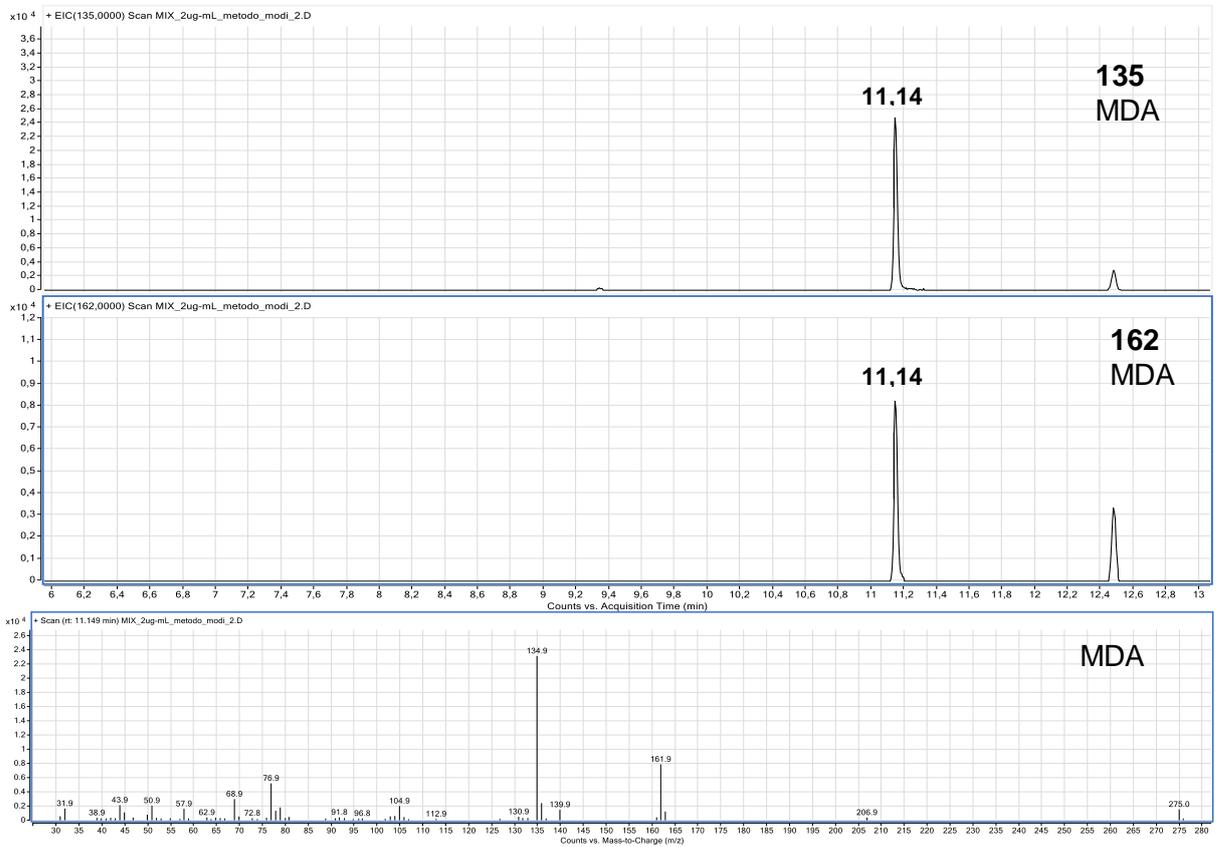


Figura 14 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para a metanfetamina com MBTFA (continuação).



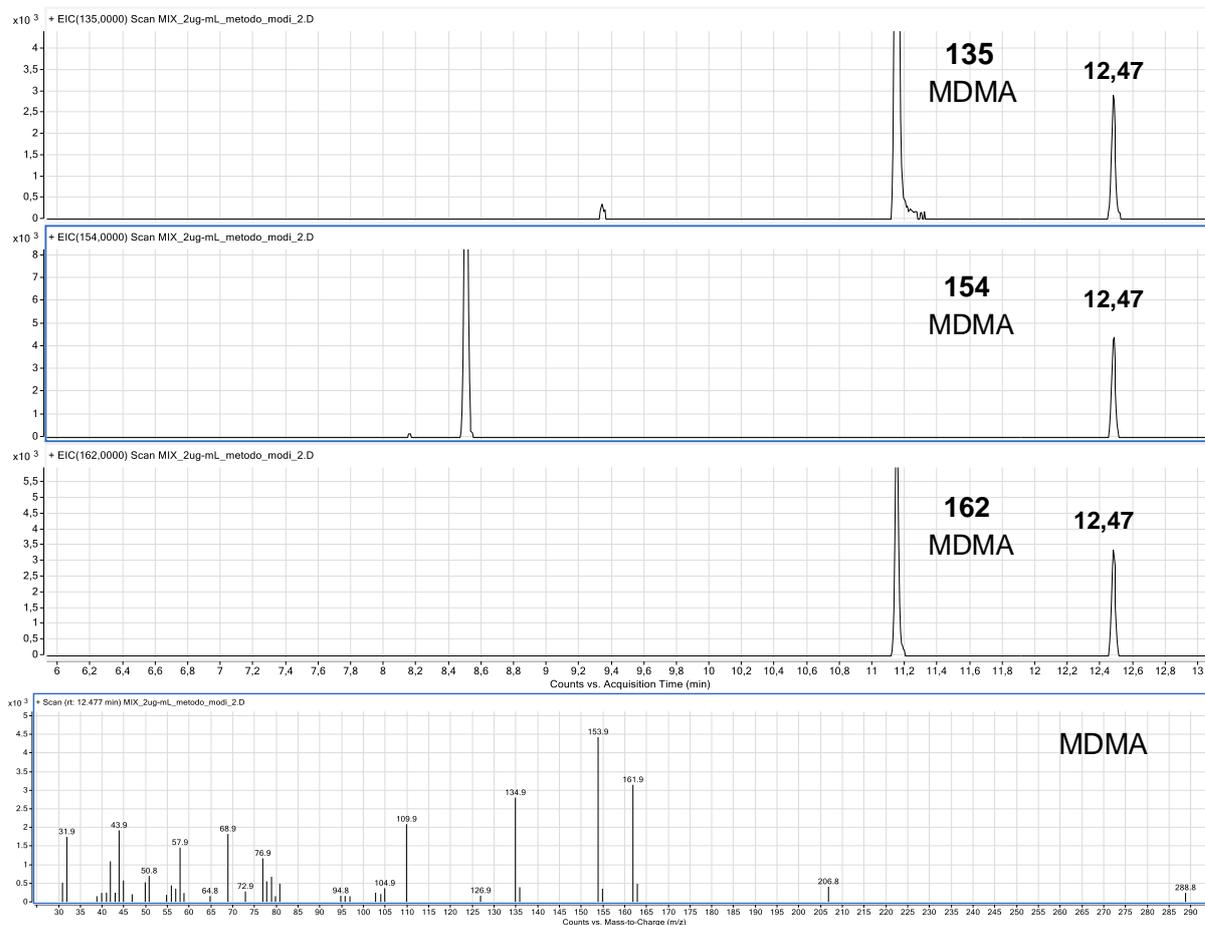
Fonte: Autoria própria

Figura 15 - Cromatogramas de íons extraídos do modo *scan* e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para o MDA com MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Figura 16 - Cromatogramas de íons extraídos do modo scan e espectro de massas da injeção padrão de 2 µg/mL com método 3 de aquisição para o MDMA com MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Comparando os cromatogramas de íons extraídos referentes ao método 2 com os cromatogramas referentes ao método 3, é possível observar que em ambos os picos apresentaram boa seletividade, com baixa intensidade de ruído. Também é possível observar que para anfetamina-d8 e anfetamina, o método 3 apresentou uma diminuição na intensidade dos sinais dos íons desses analitos e para o restante o comportamento foi o oposto, o método 3 proporcionou aumento na intensidade do sinal. Para os dois métodos também foi avaliada a relação sinal/ruído (S/N) para os analitos e seus íons, e os resultados mostram que o método 2 apresenta uma maior relação sinal ruído para os analitos anfetamina-d8 e anfetamina, em contrapartida, o método 3 apresentou um aumento dessa relação para os analitos metanfetamina, MDA e MDMA, últimos analitos a eluírem na corrida cromatográfica. Esses resultados mostram que método 3 com uma corrida mais lenta promoveu um aumento na intensidade do sinal dos analitos metanfetamina, MDA e MDMA,

aumento esse que se mostrou mais significativo à possibilidade de melhora na detecção, quando comparado ao dano ocasionado pela diminuição da relação sinal/ruído para anfetamina-d8 e anfetamina que, mesmo com a queda, ainda apresentaram boa detecção. As variações resultantes nas intensidades de sinal e na relação sinal ruído para os analito entre os métodos 2 e 3 para o derivatizante MBTFA estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17 - Comparação entre M2 e M3 em intensidade de sinal e relação sinal ruído dos íons acetilados com o derivatizante MBTFA.

Analito	Íon	Intensidade do sinal em	Relação sinal/ruído (S/R)
		M3 comparado a M2	em M3 comparado a M2
anfetamina-d8	96	queda 31%	queda 18%
	126	queda 28%	queda 14%
	143	queda 23%	queda 12%
anfetamina	91	queda 36%	queda 25%
	118	queda 25%	queda 23%
	140	queda 25%	queda 25%
metanfetamina	110	aumento 75%	aumento 50%
	118	aumento 100%	aumento 78%
	154	aumento 75%	aumento 50%
MDA	135	igual	aumento 20%
	162	aumento 6%	aumento 15%
MDMA	135	aumento 133%	aumento 125%
	162	aumento 128%	aumento 136%
	154	aumento 150%	aumento 120%

Fonte: Autoria própria

De acordo com os resultados obtidos do método 3, este foi selecionado para ser otimizado em relação aos parâmetros: temperatura do injetor e velocidade da injeção. Esse método foi selecionado, pois demonstrou melhora tanto na intensidade de sinal, quanto na relação sinal/ruído principalmente para os analito MDMA, que, possivelmente pelo fato de ser uma amina secundária, desde os primeiros testes, apresenta menor intensidade de sinal quando comparado aos outros analitos avaliados. Devido ao fato do presente trabalho avaliar mais de um analito, e dentre

esses analitos existirem características distintas entre eles (aminas primárias e secundárias), optou-se por selecionar um método que promova ganhos nos analitos que apresentam maiores dificuldades de reação e conseqüente detecção.

Após a avaliação da combinação da velocidade de injeção e temperatura do injetor, o método M4 apresentou melhor resultado, e então foi realizada injeção no modo SIM (*selected ion monitoring*). As condições obtidas para o método M4 estão descritas na Tabela 18.

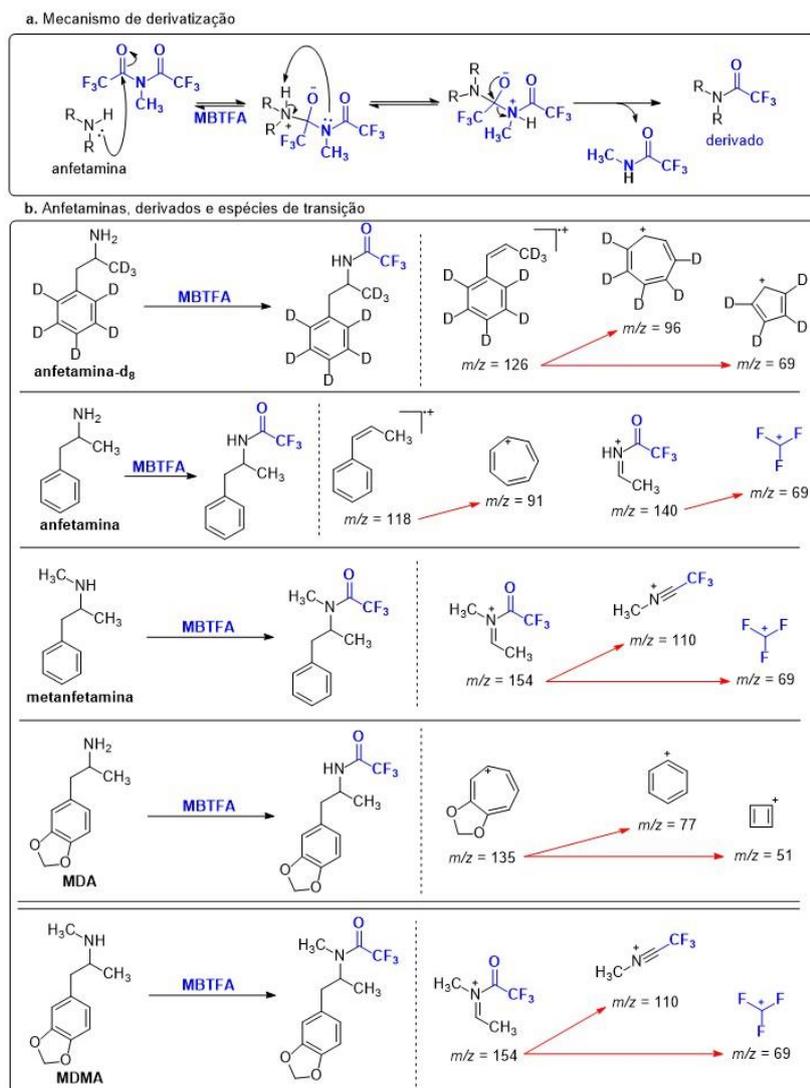
Tabela 18 - Condições cromatográficas e espectrométricas- Método M4.

Parâmetro	Método M4
Programação do Forno	Início: 90°C (1 min) Rampa 1: 10°C/min até 200°C (0 min) Rampa 2: 20°C/min até 290°C (0 min)
Fluxo gás de arraste	1 mL/min
Temperatura do Injetor	270 °C
Volume de Injeção	1 µL
Modo de injeção	<i>splitless</i>
Velocidade da injeção	rápida
Temperatura da fonte de ionização	300°C
Temperatura do Quadrupolo	150°C
Temperatura da linha de transferência	280°C
	91
Anfetamina	118
	140
	91
Metanfetamina	110
	118
	154
Modo de varredura (SIM)	135
MDA	162
	135
MDMA	154
	162
	96
Anfetamina-d8	126
	143

Fonte: Autoria própria

As possíveis estruturas para os íons observados a partir da reação do MBTFA com as anfetaminas estão ilustradas na Figura 17.

Figura 17 – (a) Sugestão de mecanismo de reação, (b) derivados e espécies de transição – MBTFA ^{7,8,9}



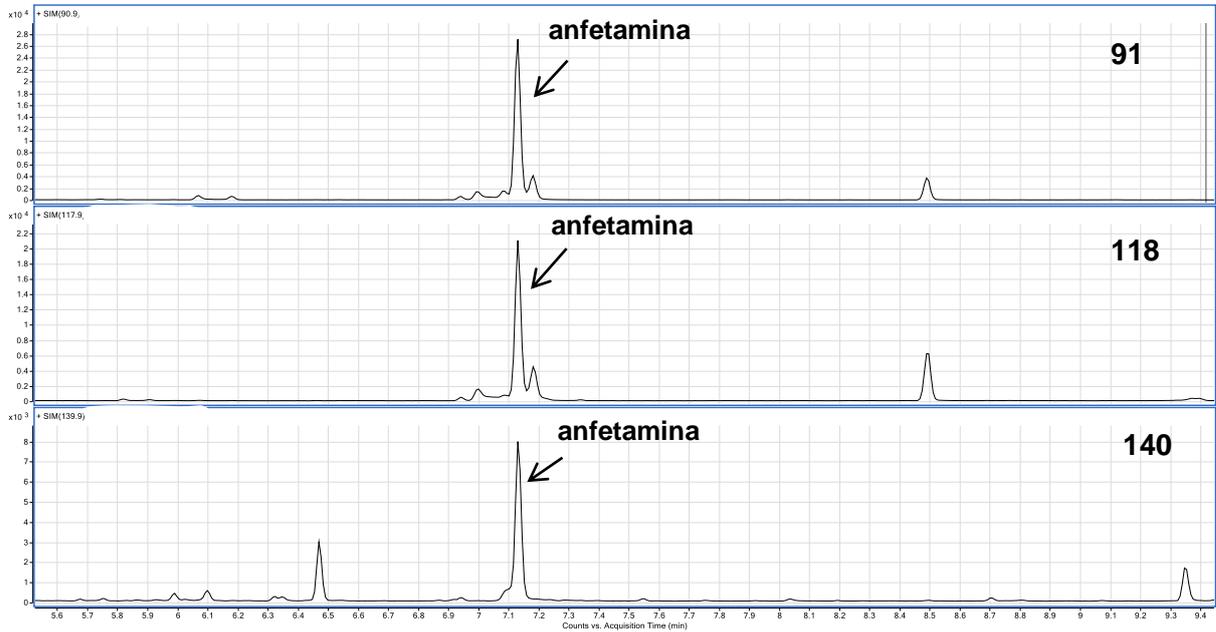
⁷ GROSS, J.H, 2017.

⁸ MOHAMED, *et al.*, 2017.

⁹ KUMAZAWA *et al.*, 2011.

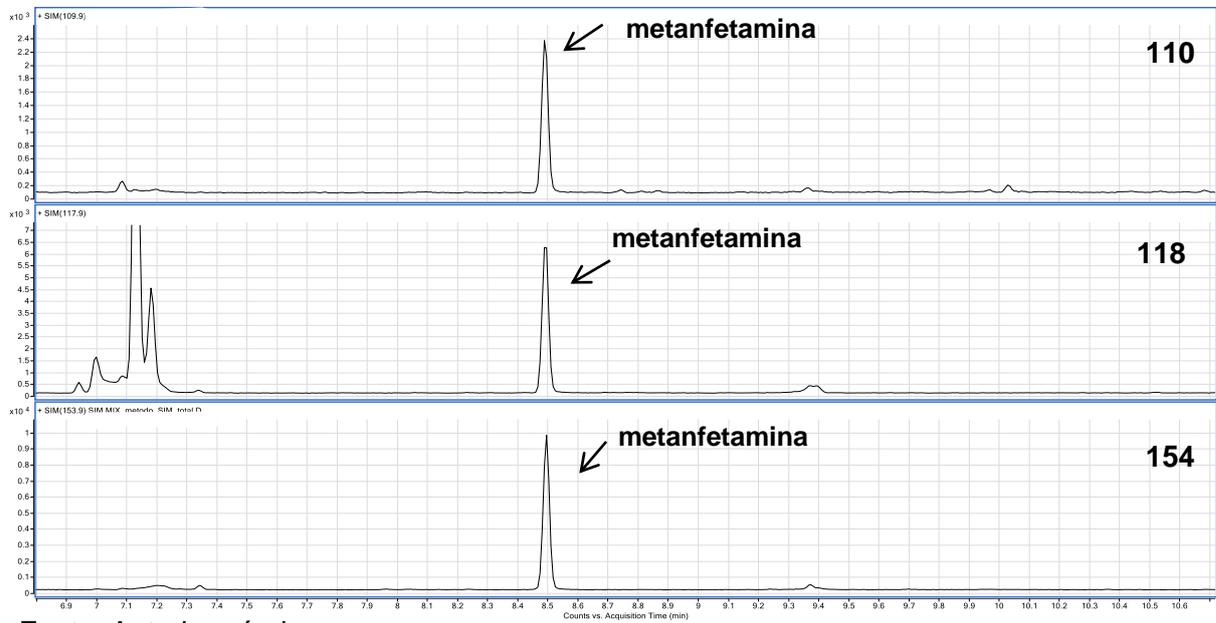
Abaixo se encontram as Figuras 18 a 27 referentes aos cromatogramas adquiridos no modo *SIM*, com concentração de 200 ng/mL, no método 4 com *splitless* para cada um dos analitos avaliados.

Figura 18 – Cromatograma da solução 200 ng/mL de anfetamina com método 4, modo de injeção *splitless* e derivatizante MBTFA.



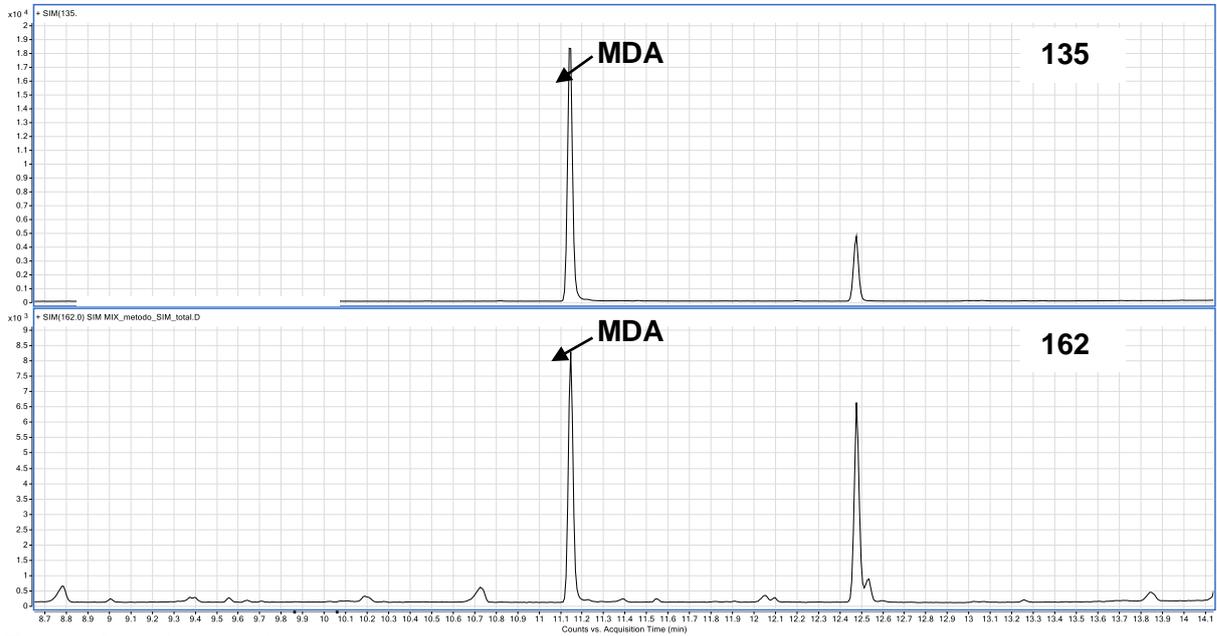
Fonte: Autoria própria

Figura 19 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de metanfetamina com método 4, modo de injeção *splitless* e derivatizante MBTFA.



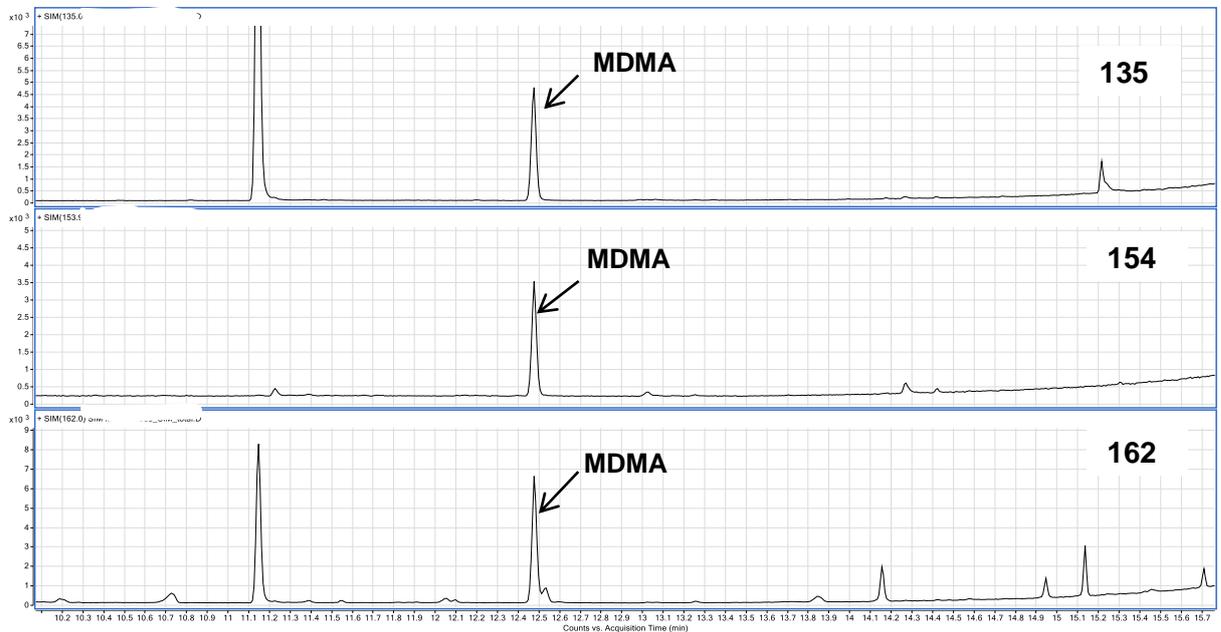
Fonte: Autoria própria

Figura 20 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de MDA com método 4, modo de injeção *splitless* e derivatizante MBTFA.



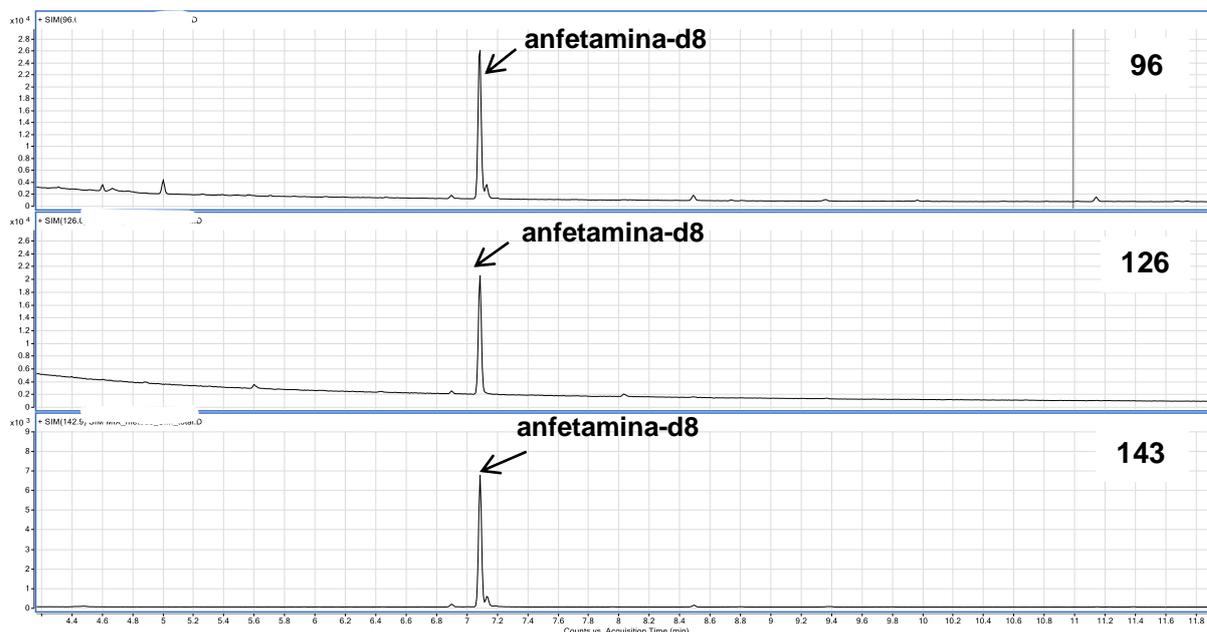
Fonte: Autoria própria

Figura 21 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de MDMA com método 4, modo de injeção *splitless* e derivatizante MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Figura 22 - Cromatograma da solução 200 ng/mL de anfetamina-d8 com método 4, modo de injeção *splitless* e derivatizante MBTFA.



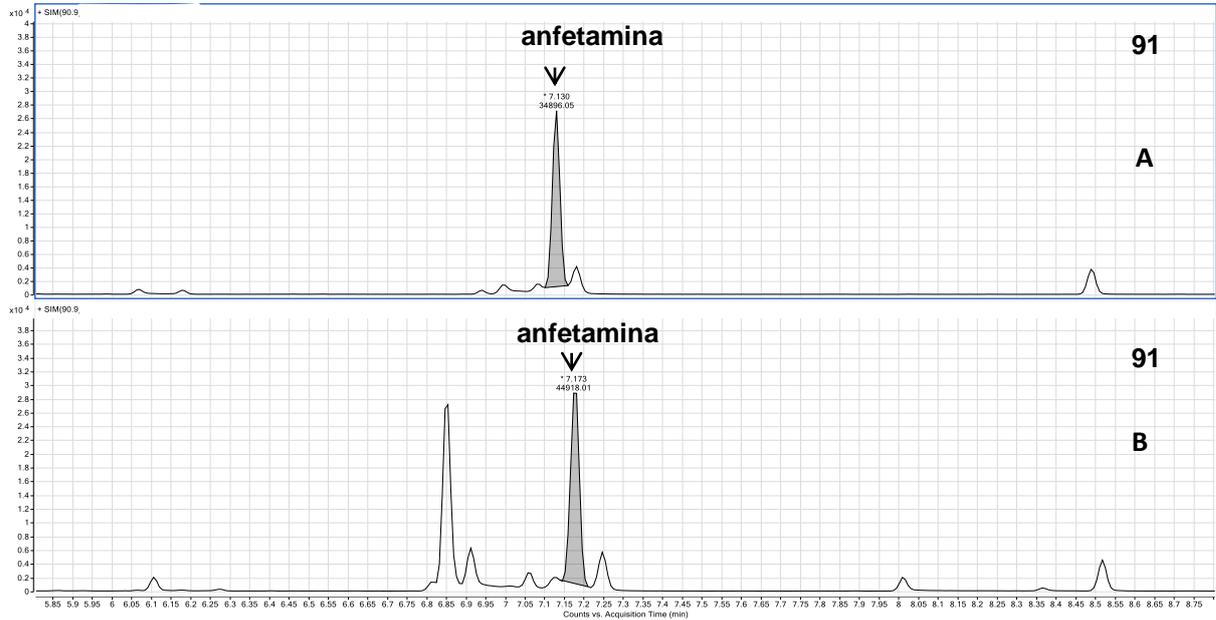
Fonte: Autoria própria

De acordo com os cromatogramas mostrados nas Figuras 18 a 22 pode ser observada a formação dos íons acetilados de cada um dos analitos avaliados, os mesmos obtidos por Dobos e coautores. (DOBOS *et al.*, 2012)

Com o intuito de proporcionar um aumento do sinal dos analitos, o método 4 foi modificado para avaliar a injeção no modo *splitless pulsado*. O modo de injeção *splitless* pulsado pode auxiliar na minimização da degradação térmica dos analitos e promover uma transferência mais eficiente para a coluna. (SASAKI *et al.*, 2006).

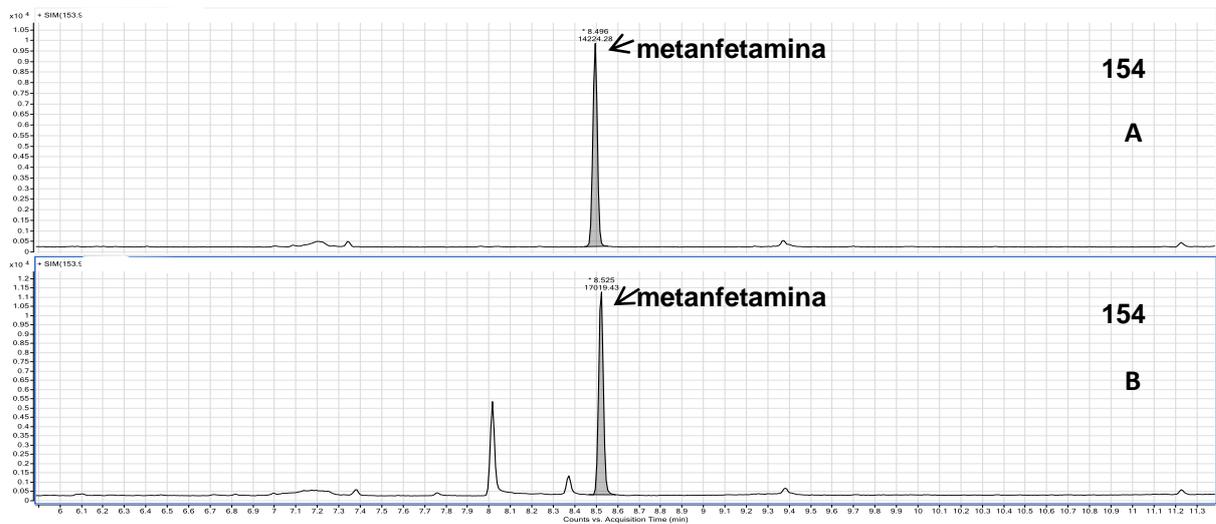
Nas Figuras 23 a 27 se encontram os cromatogramas comparativos adquiridos no modo *SIM* (*selected ion monitoring*) para os analitos: anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA e anfetamina-d8, injetados nos modos de injeção *splitless* e *splitless* pulsado, respectivamente.

Figura 23 - Comparação entre injeção modo *splitless* (A) x *splitless* pulsado (B), respectivamente, para anfetamina - método 4 - derivatizante MBTFA.



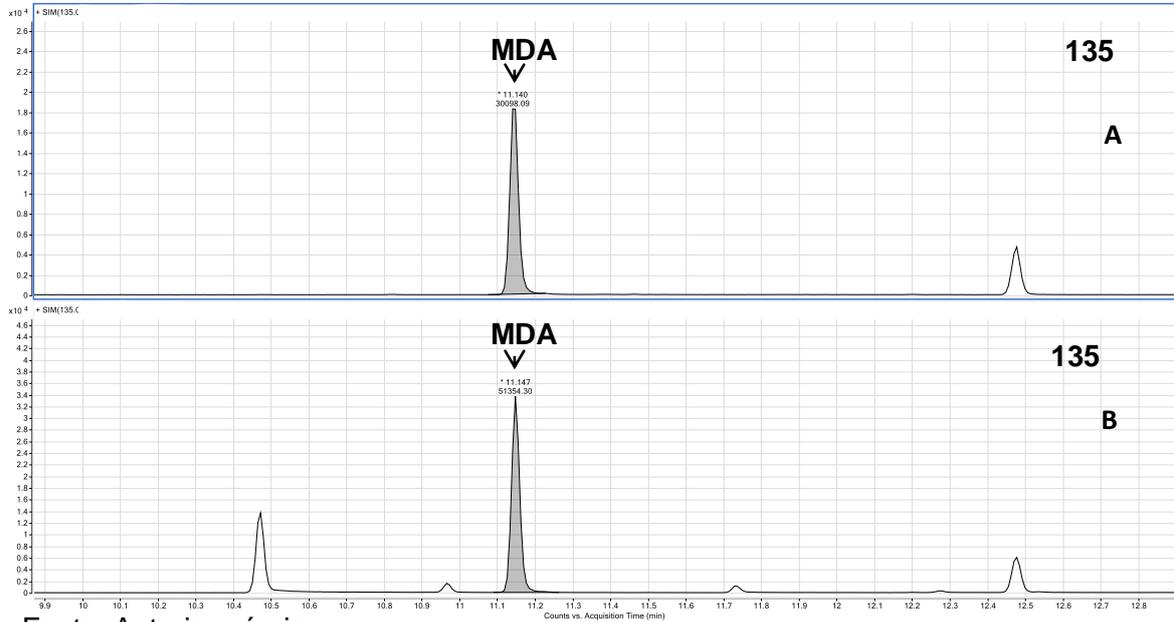
Fonte: Autoria própria

Figura 24 - Comparação entre injeção modo *splitless* (A) x *splitless* pulsado (B), respectivamente, para metanfetamina - método 4 - derivatizante MBTFA.



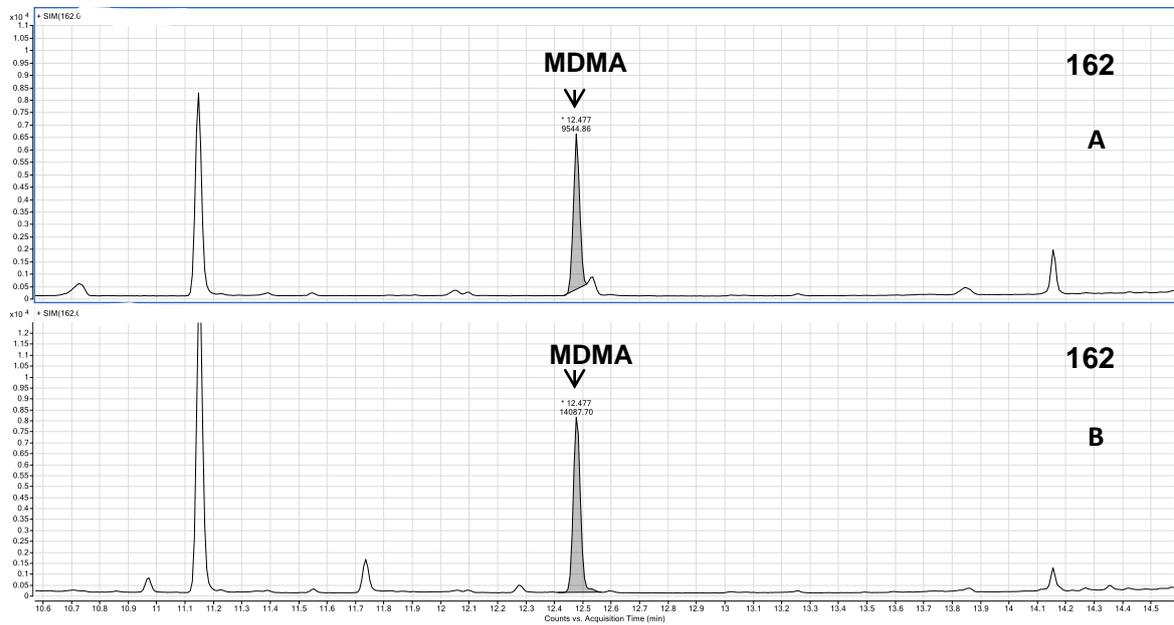
Fonte: Autoria própria

Figura 25 - Comparação entre injeção modo *splitless* (A) x *splitless* pulsado (B), respectivamente, para MDA - método 4 - derivatizante MBTFA.



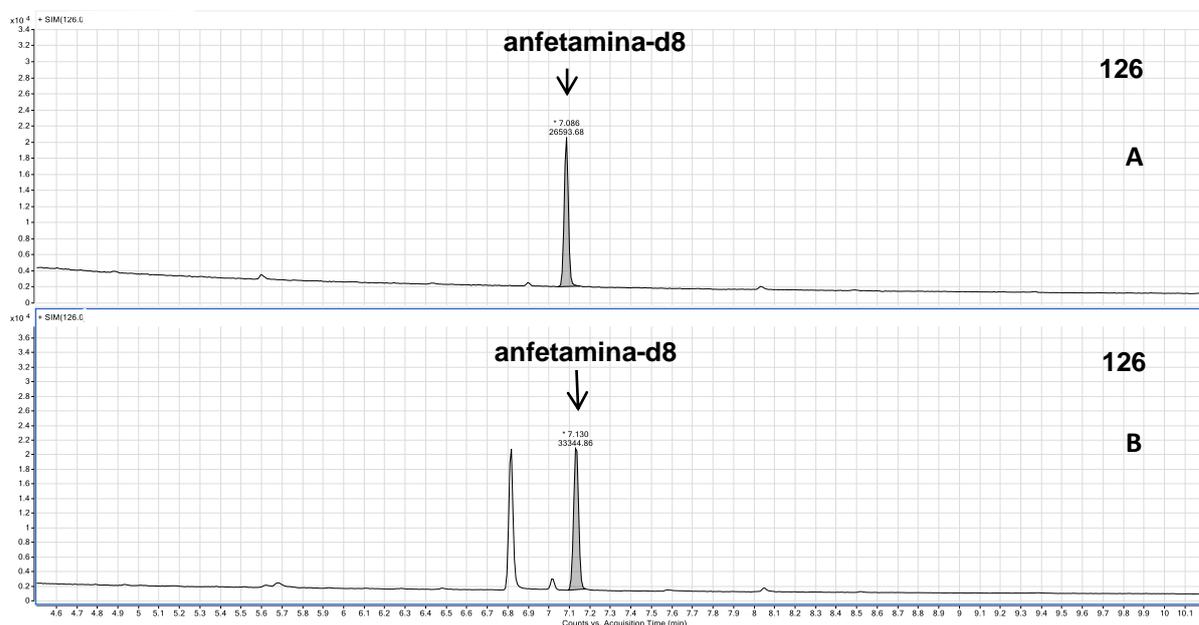
Fonte: Autoria própria

Figura 26 - Comparação entre injeção modo *splitless* (A) x *splitless* pulsado (B), respectivamente, para MDMA - método 4 - derivatizante MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Figura 27 - Comparação entre injeção modo *splitless* (A) x *splitless* pulsado (B), respectivamente, para anfetamina-d8 - método 4 - derivatizante MBTFA.



Fonte: Autoria própria

Comparando as Figuras 23 a 27, é possível observar que a injeção realizada no modo *splitless* pulsado promoveu incremento de área quando comparada com a injeção feita no modo *splitless* convencional. Isso pode estar relacionado ao fato da injeção no modo *splitless* pulsado promover uma introdução mais eficiente dos analitos para a coluna. (SASAKI *et al.*, 2006). Na Tabela 19 encontra-se descrito o percentual de aumento para cada analito.

Tabela 19 - Percentual de aumento de área da injeção por *splitless* pulsado quando comparada ao *splitless* convencional para o método 4 com o derivatizante MBTFA.

Analito	Aumento de área (%)
anfetamina	28,72
metanfetamina	19,65
MDA	70,62
MDMA	47,59
Anfetamina-d8	25,39

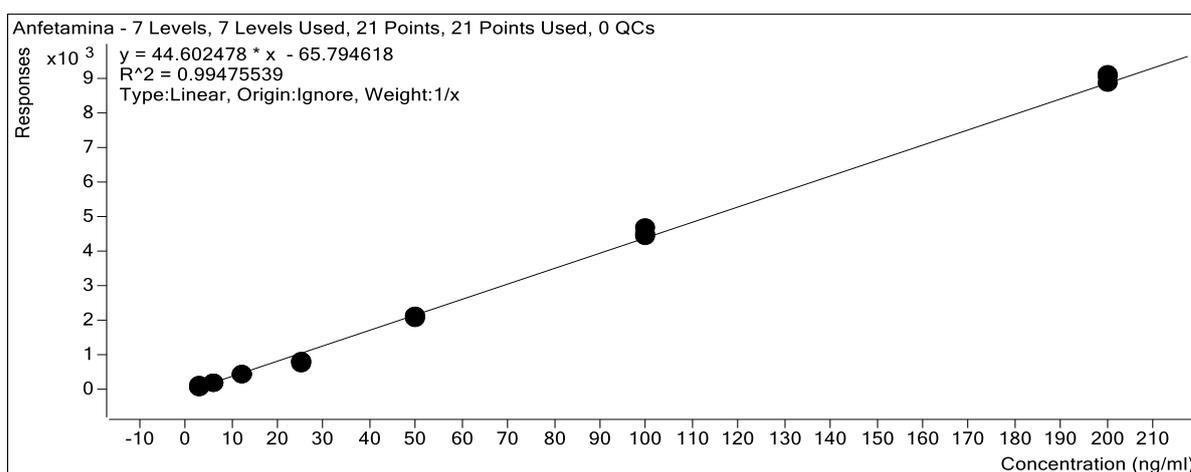
De acordo com esses resultados apresentados, o modo de injeção *splitless* pulsado se apresentou como mais adequado na aplicação do método.

Para avaliar a sensibilidade do método, linearidade e repetibilidade, foram preparadas soluções a partir de diluições sucessivas dos padrões analíticos, na faixa descrita na Tabela 7.

A anfetamina-d8 foi utilizada como padrão interno no método, a linearidade do método foi avaliada para estudo do processo de derivatização, determinação dos íons a serem selecionados e qual concentração possuiria detectabilidade adequada.

A injeção de cada solução foi realizada em triplicata, e foi avaliado o desvio padrão e o coeficiente de variação das replicatas de cada uma das concentrações dos analitos. As curvas de calibração obtidas para cada um dos analitos se encontram nas Figuras 28 a 32.

Figura 28 - Curva analítica para anfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.



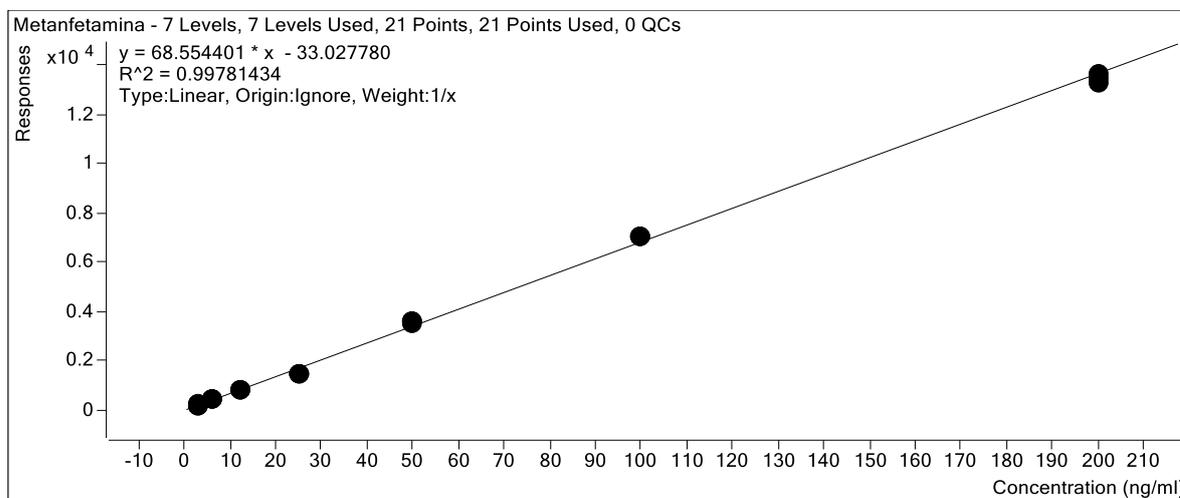
Fonte: Autoria própria

Tabela 20 – Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas da anfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.

Analito	Concentração Nominal (ng/mL)	Média da concentração da triplicata (ng/mL)	Coefficiente de variação (%)
Anfetamina	3,1	3,6	12,31
	6,3	6,0	14,46
	12,5	10,2	5,56
	25,0	23,9	13,36
	50,0	51,1	5,85
	100,0	105,8	3,26
	200,0	195,9	3,58

Fonte: Autoria própria

Figura 29 - Curva analítica para metanfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.



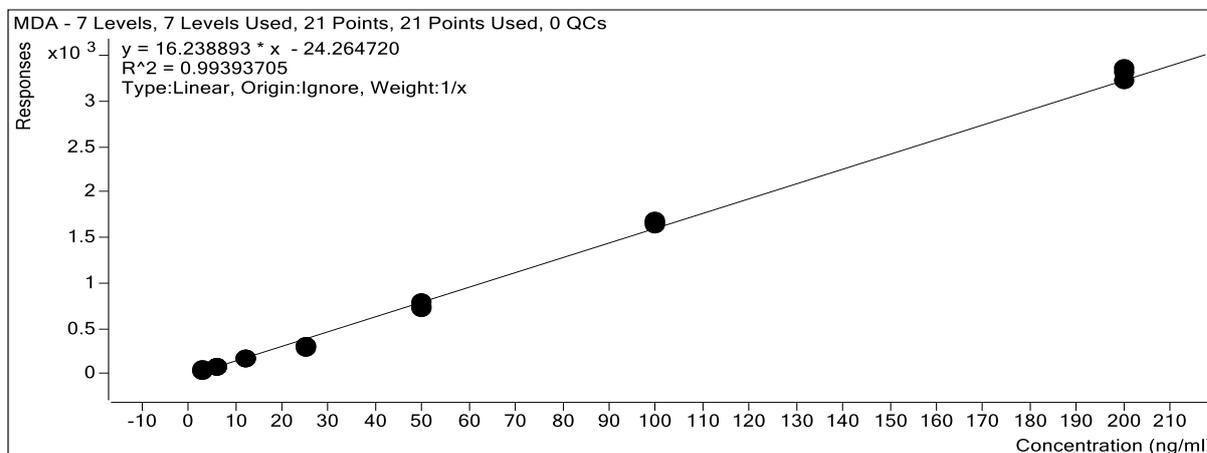
Fonte: Autoria própria

Tabela 21 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas da metanfetamina com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Média da concentração da triplicata (ng/mL)	Coefficiente de variação (%)
Metanfetamina	3,1	2,5	5,05
	6,3	7,8	2,78
	12,5	12,5	16,90
	25,0	25,1	14,85
	50,0	51,9	0,74
	100,0	104,2	0,83
	200,0	193,1	2,88

Fonte: Autoria própria

Figura 30 - Curva analítica para MDA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.



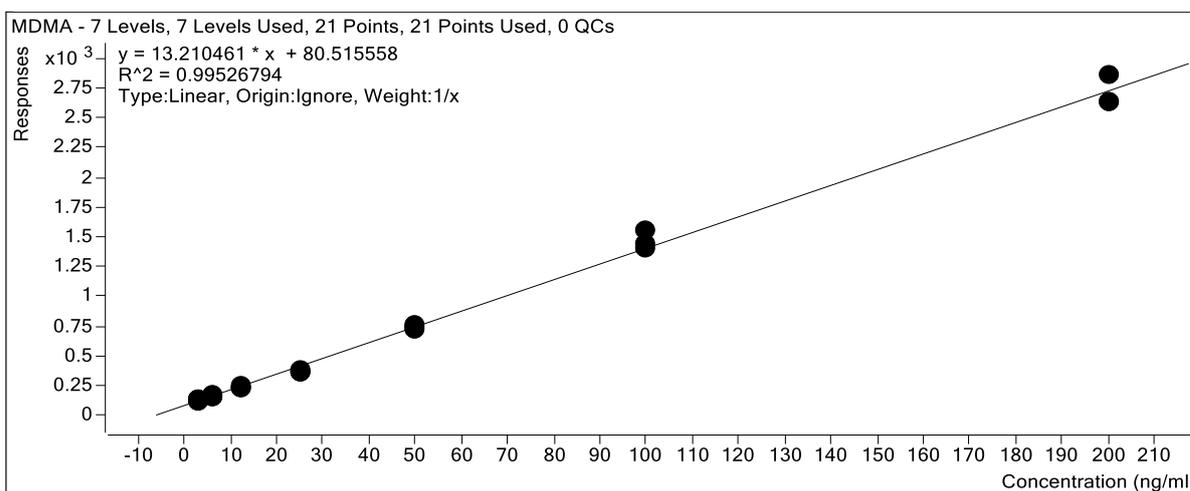
Fonte: Autoria própria

Tabela 22 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas do MDA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.

Analito	Concentração Nominal (ng/mL)	Média da concentração da triplicata (ng/mL)	Coefficiente de variação (%)
MDA	3,1	3,8	15,41
	6,3	5,6	8,23
	12,5	11,3	1,20
	25,0	22,5	5,13
	50,0	52,1	2,31
	100,0	106,9	0,88
	200,0	194,7	1,25

Fonte: Autoria própria

Figura 31- Curva analítica para MDMA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.



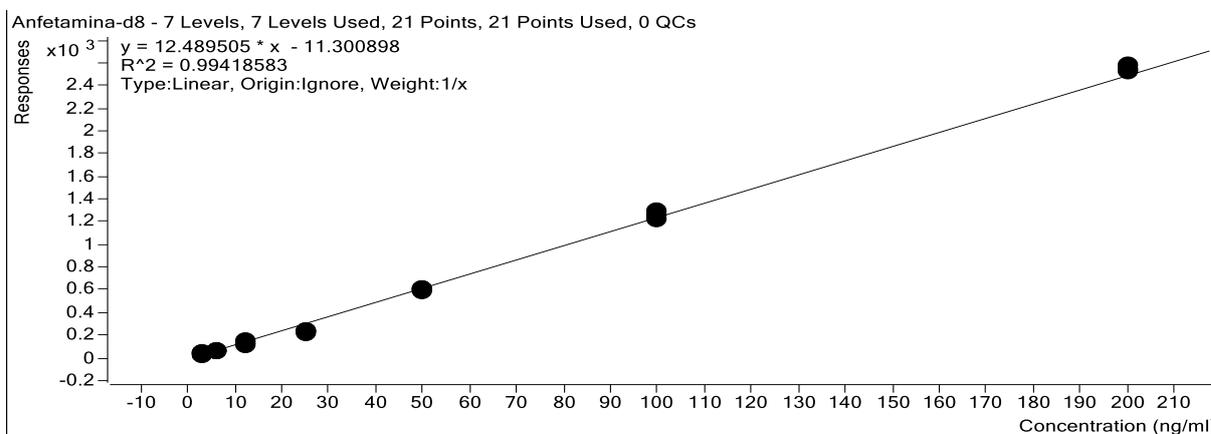
Fonte: Autoria própria

Tabela 23 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas do MDMA com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.

Analito	Concentração Nominal (ng/mL)	Média da concentração da triplicata (ng/mL)	Coefficiente de variação (%)
MDMA	3,1	3,2	2,74
	6,3	5,3	12,76
	12,5	12,6	4,77
	25,0	26,8	10,32
	50,0	56,2	0,58
	100,0	112,2	3,14
	200,0	181,0	1,94

Fonte: Autoria própria

Figura 32 - Curva analítica para anfetamina-d8 com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.



Fonte: Autoria própria

Tabela 24 - Cálculo da média da concentração e coeficiente de variação das replicatas da anfetamina-d8 com o derivatizante MBTFA, método 4 e injeção modo *splitless* pulsado.

Analito	Concentração Nominal (ng/mL)	Média da concentração da triplicata (ng/mL)	Coefficiente de variação (%)
Anfetamina-d8	3,1	3,4	13,99
	6,3	6,3	10,60
	12,5	10,3	2,23
	25,0	24,3	13,32
	50,0	52,0	6,53
	100,0	104,7	1,72
	200,0	195,6	2,62

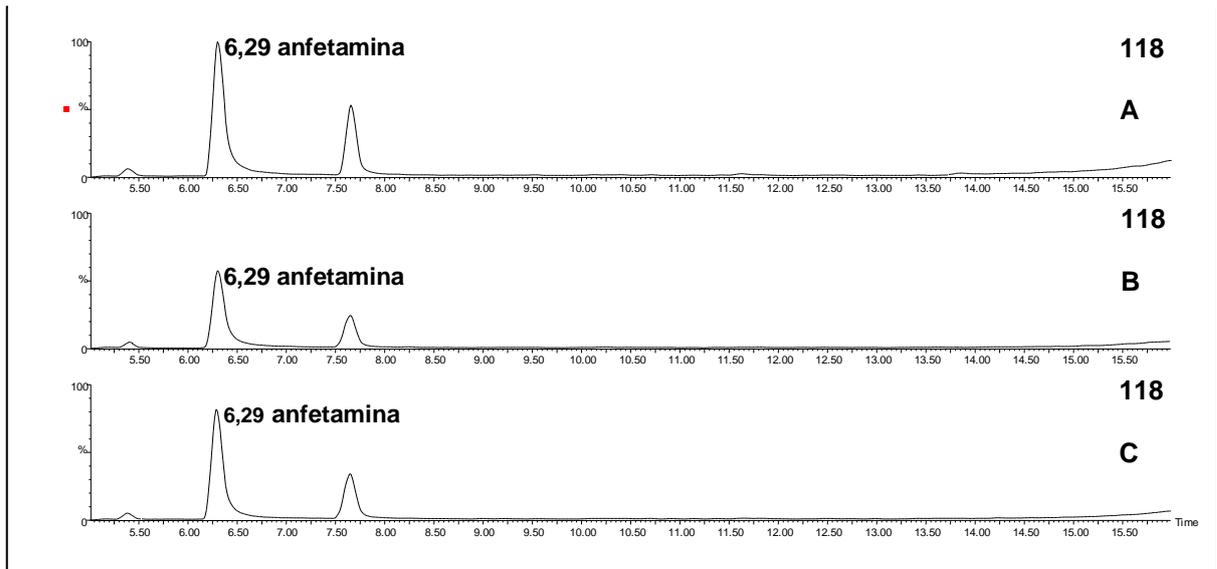
Fonte: Autoria própria

De acordo com os dados apresentados nas Figuras 28 a 32 e Tabelas 20 a 24, todos os analitos apresentaram ajuste linear para o intervalo avaliado, com valor de coeficiente de correlação linear (r) superior a 0,99, demonstrando a relação linear entre concentração e resposta. As triplicatas de cada um dos níveis de calibração dos analitos não apresentaram *outliers*, segundo o teste de Grubbs. Para todos os analitos avaliados, o coeficiente de variação se manteve menor que 20%.

4.2.2 Parte II

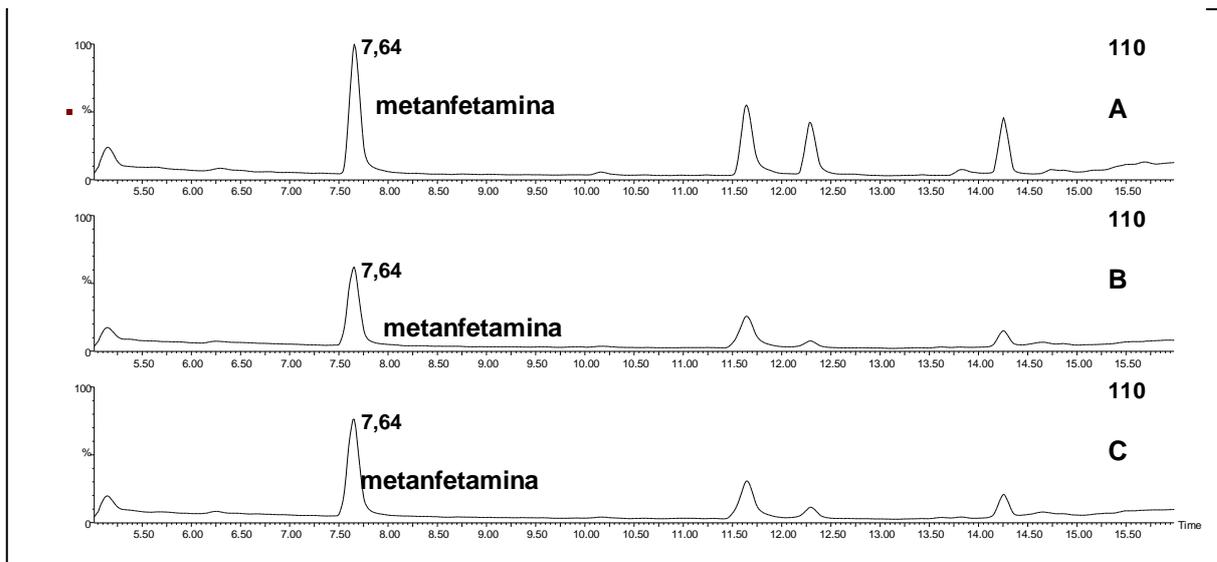
Na parte II dos experimentos, foram realizados testes com diferentes valores de tempo de purga, descritos na Tabela 8. Os cromatogramas obtidos nessa avaliação encontram-se nas Figuras 33 a 37.

Figura 33 - Diferentes tempos de purga para o analito anfetamina com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto



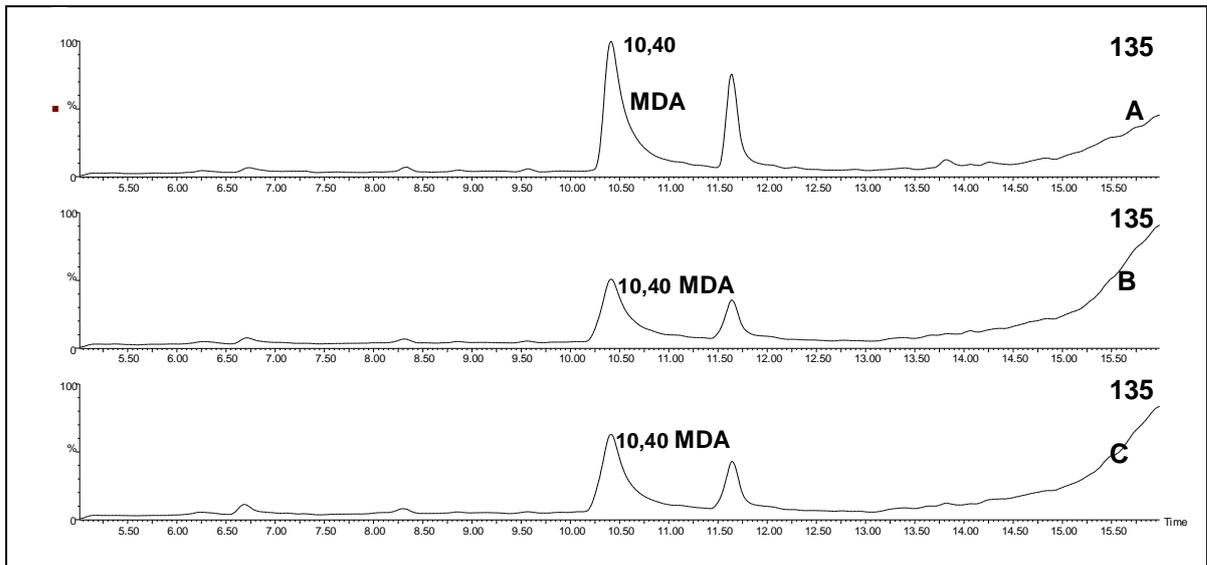
Fonte: Autoria própria

Figura 34 - Diferentes tempos de purga para o analito metanfetamina com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto



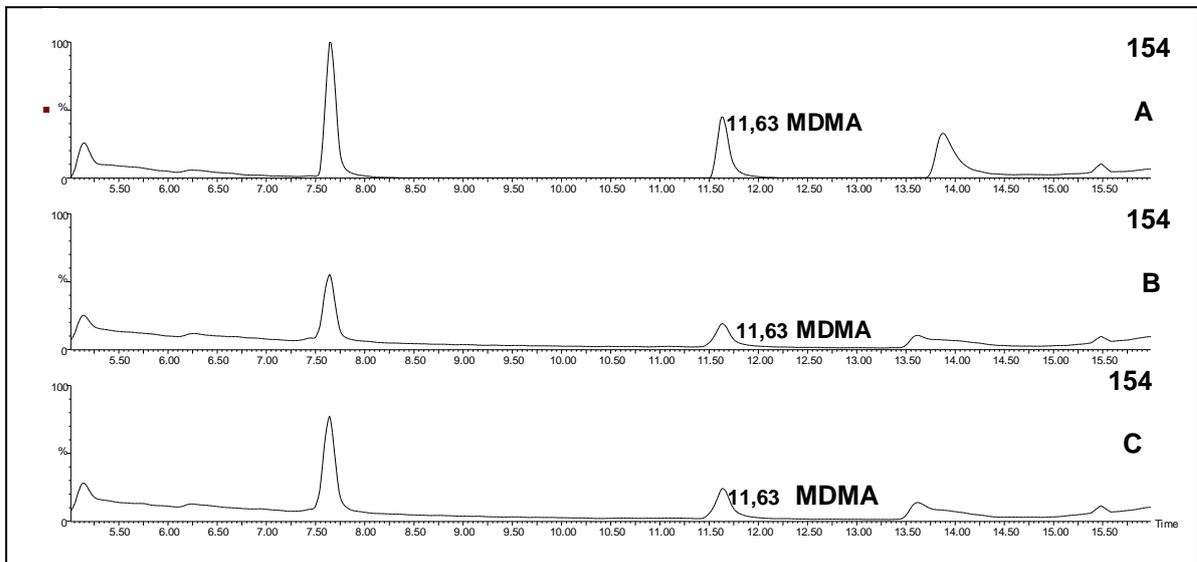
Fonte: Autoria própria

Figura 35 - Diferentes tempos de purga para o analito MDA com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto



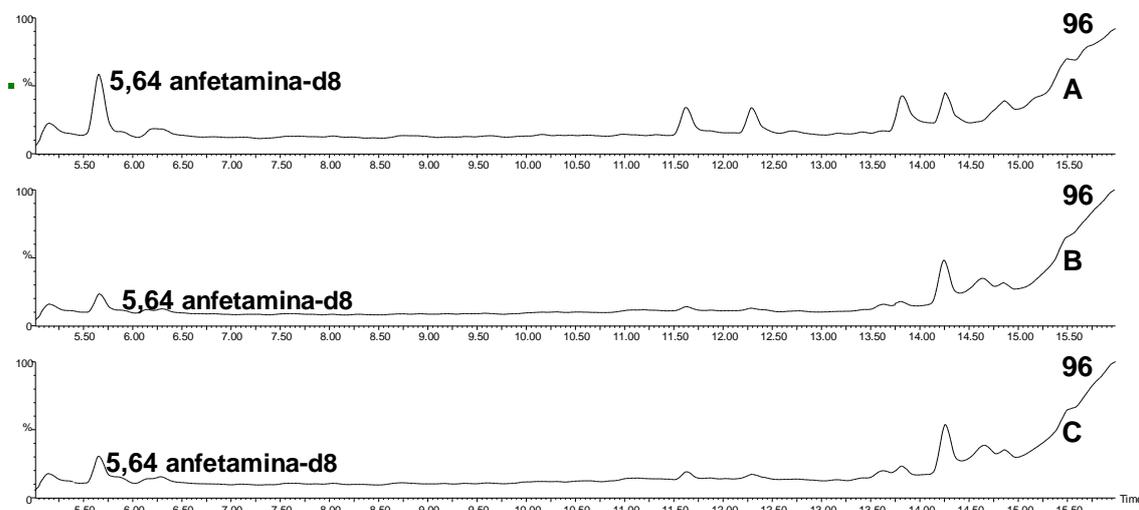
Fonte: Autoria própria

Figura 36 - Diferentes tempos de purga para o analito MDMA com o derivatizante MBTFA - A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto



Fonte: Autoria própria

Figura 37 - Diferentes tempos de purga para o analito anfetamina-d8 com o derivatizante MBTFA – A: 1 minuto, B: 1,2 minuto, C: 1,5 minuto



Fonte: Autoria própria

Na Tabela 25 se encontram os valores de intensidade de sinal dos analitos nos diferentes tempos de fluxo de purga.

Tabela 25 - Comparação entre intensidade de sinal para os diferentes valores de tempo de purga para derivatizante MBTFA

Analito	Área		
	Tempo de purga (minutos)		
	1,0	1,2	1,5
anfetamina	$1,20 \cdot 10^5$	$6,02 \cdot 10^4$	$7,96 \cdot 10^4$
metanfetamina	$9,16 \cdot 10^4$	$4,46 \cdot 10^4$	$5,84 \cdot 10^4$
MDA	$6,53 \cdot 10^4$	$3,35 \cdot 10^4$	$3,90 \cdot 10^4$
MDMA	$5,58 \cdot 10^4$	$2,94 \cdot 10^4$	$3,42 \cdot 10^4$
anfetamina-d8	$9,99 \cdot 10^4$	$5,02 \cdot 10^4$	$6,12 \cdot 10^4$

Fonte: Autoria própria

De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que dentre os valores de tempo de purga avaliados, o valor de 1 minuto foi o que promoveu maior intensidade de sinal dos analitos avaliados, conforme mostra a Tabela 25. É possível observar que o aumento do tempo de purga provoca o alargamento dos picos para todos os analitos e padrão interno avaliados, diminuindo a eficiência cromatográfica.

O tempo de purga tem relação com sensibilidade e deve ser longo o suficiente para que haja vaporização da amostra e que a reação ocorra dentro do *liner*. Entretanto, esse tempo não deve ser longo demais a ponto de proporcionar

degradação ou adsorção dos analitos. É possível observar que com o aumento do tempo de purga há alargamento mais pronunciado dos picos dos analitos que eluem tardiamente (MDA e MDMA). Longos períodos de tempo de purga mostraram o efeito de alargar os picos e reduzir a sensibilidade e a eficiência cromatográfica. (DJATMIKA *et al.*, 2018).

O fluxo de purga do septo tem a finalidade de remover possíveis resíduos de amostras que possam estar na região do septo. (RADLER, 2010) A utilização de fluxo de purga na região do septo minimiza a ocorrência de picos fantasmas no cromatograma. (RADLER, 2010)

Na avaliação dos diferentes fluxos de purga do septo, foi observado que os valores testados e descritos na Tabela 8 apresentaram pouca variação no incremento de área, com resultados similares para os analitos avaliados, e deste modo, o valor de 4 mL/ min foi selecionado.

A proporção entre a amostra e o derivatizante é uma variável de grande influência sobre a reação que deve acontecer na derivatização *on-line*. (WANG *et al.*, 2013) Isso ocorre, pois essa proporção deve ser eficaz para que, mesmo com o aumento da concentração do padrão analítico injetado, como por exemplo, durante injeções de uma curva de calibração, a reação ainda aconteça, sem que o derivatizante seja um reagente limitante. Além disso, a quantidade de derivatizante não deve estar em excesso, pois, caso isso aconteça, há possibilidade de ocorrer reações secundárias e de haver comprometimento da coluna cromatográfica. O padrão analítico também não deve estar em excesso em relação ao derivatizante, pois nesse caso a reação também irá se processar de maneira incompleta, diminuindo o rendimento da reação e possibilitando que durante a separação ocorra o aparecimento da espécie não derivatizada. (WANG *et al.*, 2013)

Para que o processo de derivatização *on-line* seja eficaz, deve haver compromisso na relação entre o volume de solução padrão e volume de derivatizante, de modo que se obtenha uma boa intensidade de sinal e reprodutibilidade de reação.

Para poder combinar essas características e obter uma condição de reação efetiva e reprodutível, foram avaliadas diferentes razões entre a proporção de amostra e derivatizante, descritas na Tabela 10. Essas proporções foram selecionadas levando-se em conta informações obtidas na literatura sobre diluição do derivatizante (HIDVÉGI *et al.*, 2008) e também levando em conta a precaução

referente ao dano do excesso de derivatizante ao sistema cromatográfico. (JURADO *et al.*, 2000). Deste modo, os valores selecionados para testes das proporções não contemplaram experimentos em que o derivatizante se encontrasse em maior volume do que a solução padrão, e, em todos os testes realizados, foi mantido o volume total de injeção de 2 μ L (soma do volume de amostra e derivatizante).

As comparações feitas entre as variações da proporção de padrão e de derivatizante foram avaliadas levando-se em conta a como referência a proporção 1/1 (v/v), que foi a utilizada no começo dos testes e proporcionou resultados satisfatórios, com formação dos íons acetilados. De acordo com os resultados obtidos nos experimentos descritos na Tabela 10, no teste realizado na condição 2, na proporção 13:7 (v/v), foi possível observar uma queda de intensidade do sinal para todos os analitos, com exceção do analito MDA, que apresentou incremento de área, quando comparado à condição de proporção 1:1 (v/v). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato do analito MDA ser uma amina primária, e não possuir grupos substituídos na cadeia alfa-metil-etilamina, sugerindo que a diminuição do volume de derivatizante em relação ao volume de analito tenha menos impacto na reatividade para esse analito.

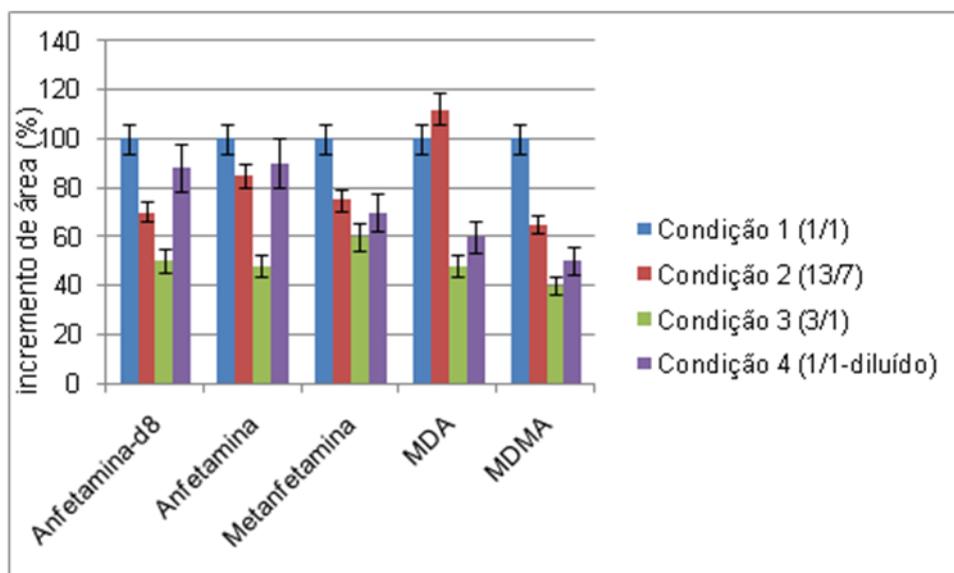
Para os experimentos realizados na condição 3, na proporção 3:1 (v/v), foi observada queda de sinal para todos os analitos, quando comparado com o teste realizado na proporção 1:1 (v/v). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de o volume de derivatizante encontrar-se limitado em relação ao volume de solução padrão, e da reação não ter ocorrido de maneira completa, e sugere-se que esse volume limitado não foi suficiente para promover a reação com um bom rendimento, como ocorreu na referência utilizada na proporção 1/1 (v/v). (HIDVÉGI *et al.*, 2008)

O experimento realizado na condição 4, com o derivatizante diluído com acetonitrila na proporção 1/1 (v/v) com acetonitrila, demonstrou aumento de sinal, quando comparado ao experimento na condição 1, para a anfetamina e para anfetamina deuterada. Os demais analitos: metanfetamina, MDA e MDMA apresentaram queda na intensidade do sinal, quando comparados ao experimento realizado na condição 1. Para explicar esse comportamento, sugere-se que a diminuição da concentração do derivatizante cause menor impacto para os analitos que possuem estrutura de amina primária, como a anfetamina

Para facilitar a avaliação desses dados, a condição 1 (1/1 v/v) foi tomada como referência (100%) para a área obtida nos cromatogramas de cada analito, e as

áreas obtidas com as injeções realizadas nas condições 2,3 e 4 foram calculadas em relação a esta normalização. Os resultados obtidos encontram-se no gráfico da Figura 38.

Figura 38 - Comparação das áreas em diferentes proporções de padrão/derivativante



Fonte: Autoria própria

A dificuldade em estabelecer a melhor relação entre a proporção de solução padrão e derivativante também reside no fato dos analitos possuírem estruturas diferentes entre si, aminas primárias e secundárias, características que garantem diferentes reatividades. Além disso, é possível observar que com a variação da razão entre analito e derivativante, o aumento ou queda nas áreas dos analitos não seguem o mesmo padrão para todos eles, evento também notado por Hidvégi e co-autores. (HIDVÉGI *et al.*, 2008) É de grande importância garantir que haja derivativante suficiente para que a reação possa ocorrer e que se possua uma boa separação cromatográfica e aumento da detectabilidade. (WANG *et al.*, 2013) Um volume insuficiente de derivativante pode ocasionar uma reação com baixa formação dos íons acetilados, ao passo que o excesso dele, além do desperdício do reagente em si, pode contribuir para o dano do sistema cromatográfico e a inviabilização da reação de modo *online*. (JURADO *et al.*, 2000)

Com os resultados obtidos com as variações de proporção entre volume de amostra e volume de derivativante, pôde-se verificar que o aumento ou queda de sinal não segue a mesma relação para todos os analitos.

Hidvégi e colaboradores obtiveram resultados satisfatórios ao empregar o uso do derivatizante MBTFA diluído com o solvente acetonitrila, observaram os íons acetilados das anfetaminas mesmo em quantidades bem diluídas do derivatizante, e supuseram que a quantidade de MBTFA utilizada no processo de derivatização pode influenciar a transferência de massa do liner para a coluna, e possui efeitos diferentes sobre a reatividade de cada analito, dependendo da sua estrutura química. (HIDVÉGI *et al.*, 2008)

Nos experimentos buscou-se avaliar uma condição de análise que pudesse obter resultados satisfatórios no que se refere à intensidade de sinal e reprodutibilidade de reação para todos os analitos e para o padrão interno.

Com os resultados obtidos, foi observado que a proporção 1:1 (v/v) entre padrão e derivatizante foi a relação que apresentou uma melhor condição de análise para os analitos em questão, de modo que a reação ocorreu promovendo um incremento de sinal que foi satisfatório para todos os analitos, dentre todas as condições testadas.

A temperatura do injetor, que foi avaliada na Parte I do desenvolvimento do trabalho, foi testada novamente na Parte II, com o intuito de proporcionar uma melhor condição de reação e aumento do sinal instrumental no novo sistema GC-MS/MS utilizado.

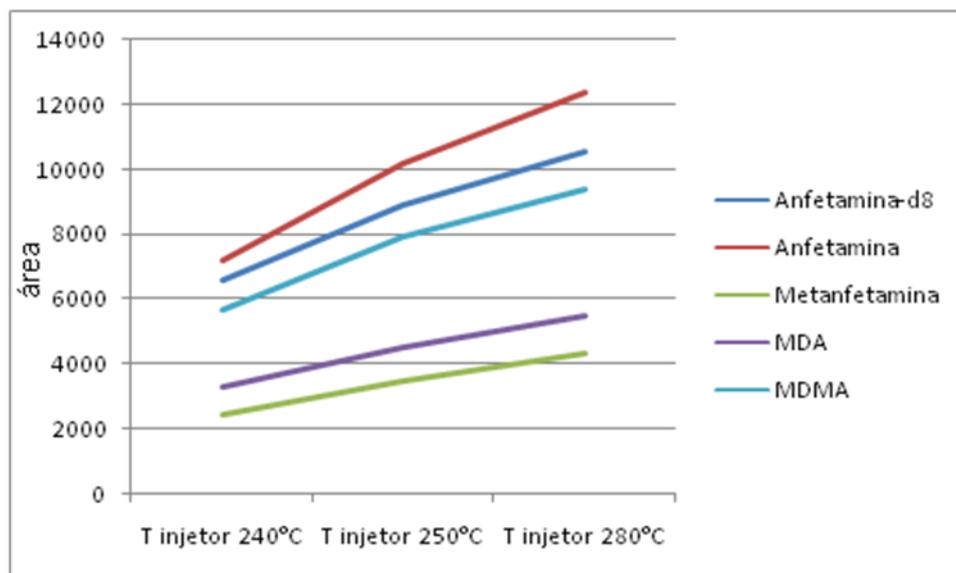
A temperatura do injetor é um parâmetro que possui bastante influência sobre a reação de derivatização *on-line*. Isso ocorre pelo fato da temperatura poder tanto aumentar a eficiência do processo de derivatização, quando selecionada de maneira adequada, quanto de promover a degradação do derivatizante e do analito, além de favorecer a ocorrência reações secundárias, quando selecionada de maneira pouco cuidadosa. No modo de derivatização por *injection port*, os analitos derivados são formados e volatilizados na mesma temperatura. (WANG *et al.*, 2013)

Os valores testados na Parte II para a temperatura do injetor, descritos na Tabela 11, mostraram que comparando os três valores de temperaturas avaliados, foi observado que a temperatura de 250°C apresentou incremento de sinal superior quando comparada à temperatura de 240°C, e a temperatura de 280°C, dentre todas as temperaturas avaliadas, foi a que proporcionou maior incremento de área para todos os analitos. Desse modo, sugere-se que uma temperatura mais elevada do injetor contribuiria para uma reação mais eficiente entre os analitos e o derivatizante,

porém, a temperatura não é alta o suficiente para que possa promover degradação dos produtos formados ou reações secundárias.

Na Figura 39 está representado o incremento de área versus a temperatura do injetor.

Figura 39 - Gráfico de área em função da temperatura do injetor.



Fonte: Autoria própria

O liner utilizado nos experimentos também tem relação direta com a eficiência da reação. Neste caso, o liner utilizado continha lã de vidro. A lã de vidro promove maior área de superfície, o que aumenta a capacidade de aquecimento e permite melhor vaporização dos analitos que possuem alto ponto de ebulição. No presente trabalho foi utilizado apenas um tipo de liner. Diferentes tipos de liner e a maneira como eles podem afetar as reações por *injection port* não foram avaliados devido às limitações nos modelos de liners disponíveis para realização do trabalho.

4.3 Derivatização com HFBA

Os primeiros testes realizados com o derivatizante HFBA foram realizados com as condições do método M3, com a proporção 1/1 (v/v) entre padrão analítico e derivatizante e apresentaram resultados satisfatórios, pois foi possível verificar a formação dos íons acetilados, demonstrando a ocorrência da reação no modo *on-line* com o referido derivatizante.

Abaixo se encontram os cromatogramas referentes aos íons obtidos no modo SIM com o uso do derivatizante HFBA.

Figura 40 - Cromatograma em modo SIM do analito anfetamina para o derivatizante HFBA.

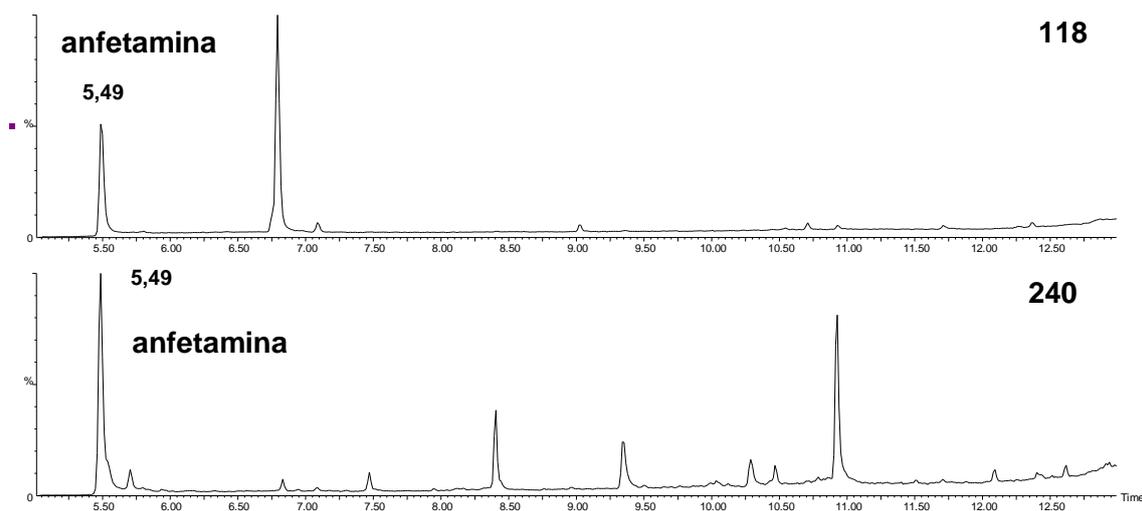
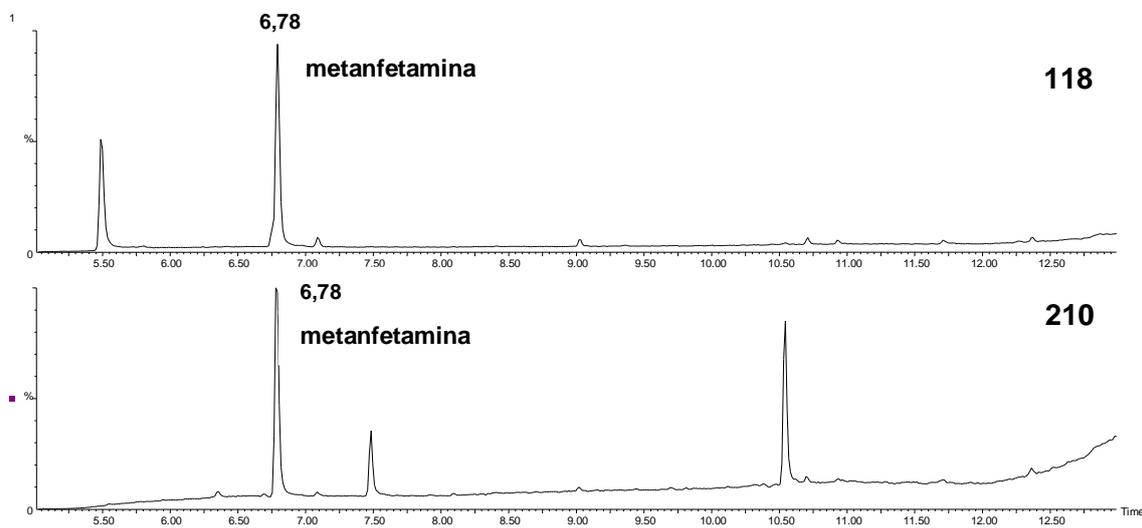
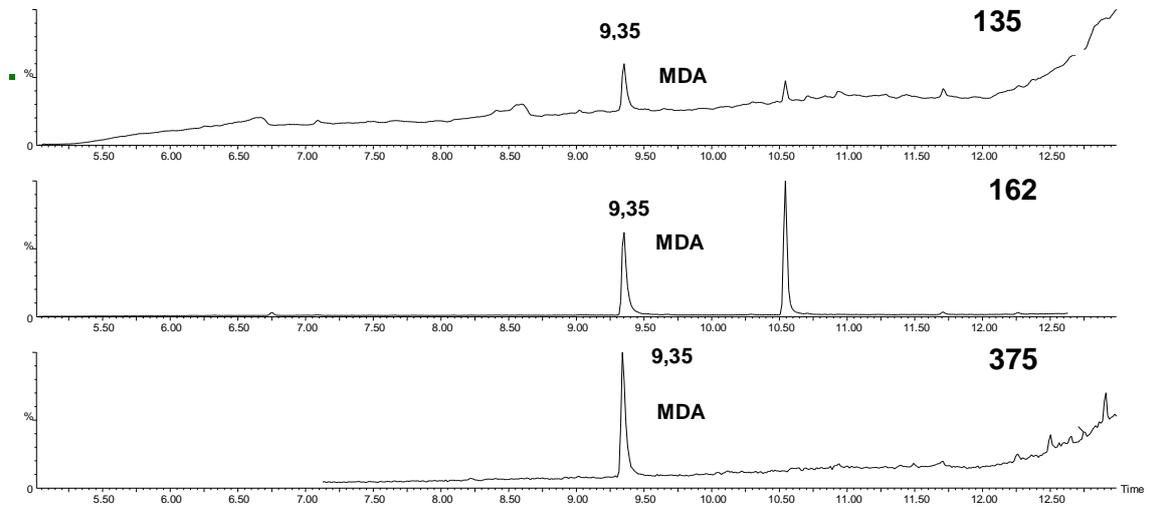


Figura 41 - Cromatograma modo SIM do analito metanfetamina para o derivatizante HFBA.



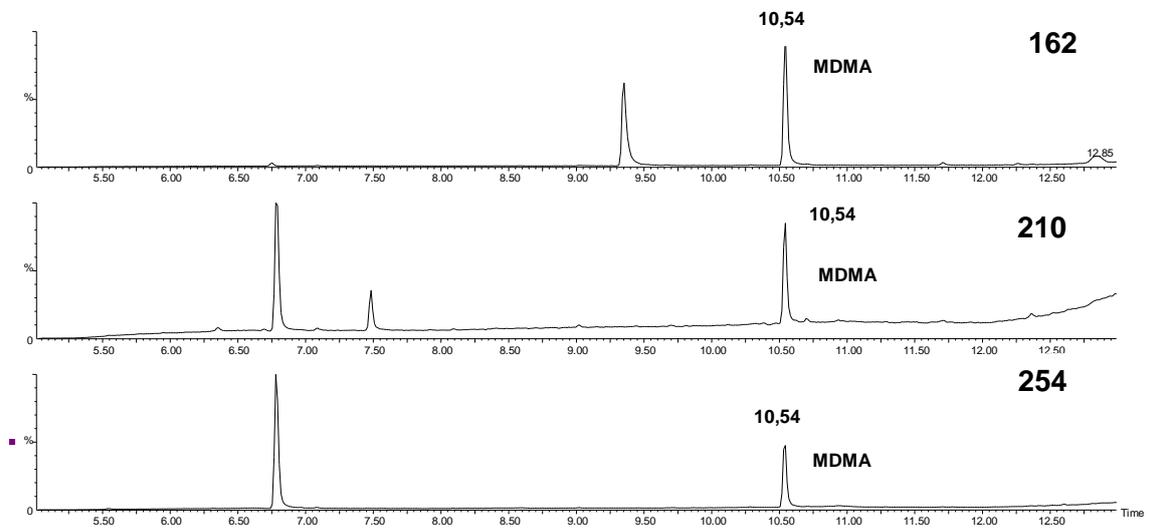
Fonte: Autoria própria

Figura 42 - Cromatograma modo SIM do analito MDA para o derivatizante HFBA.



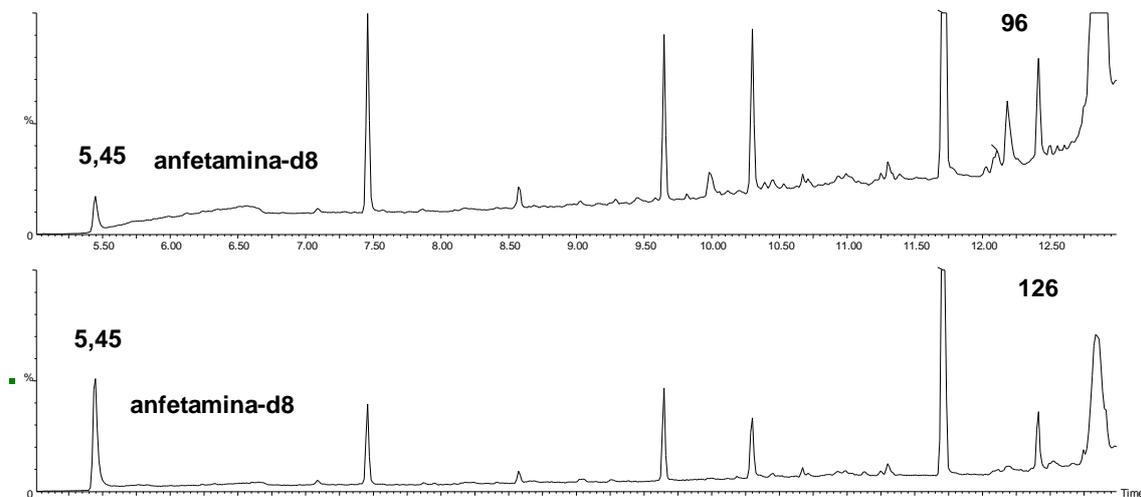
Fonte: Autoria própria

Figura 43 - Cromatograma modo SIM do analito MDMA para o derivatizante HFBA.



Fonte: Autoria própria

Figura 44 - Cromatograma modo SIM do padrão interno anfetamina-d8 para o derivatizante HFBA.



Fonte: Autoria própria

As possíveis estruturas para os íons observados a partir da reação do HFBA com as anfetaminas estão ilustradas na Figura 45.

Figura 45 - (a) Sugestão de mecanismo de reação, (b) derivados e espécies de transição – HFBA^{10,11,12} (continua).

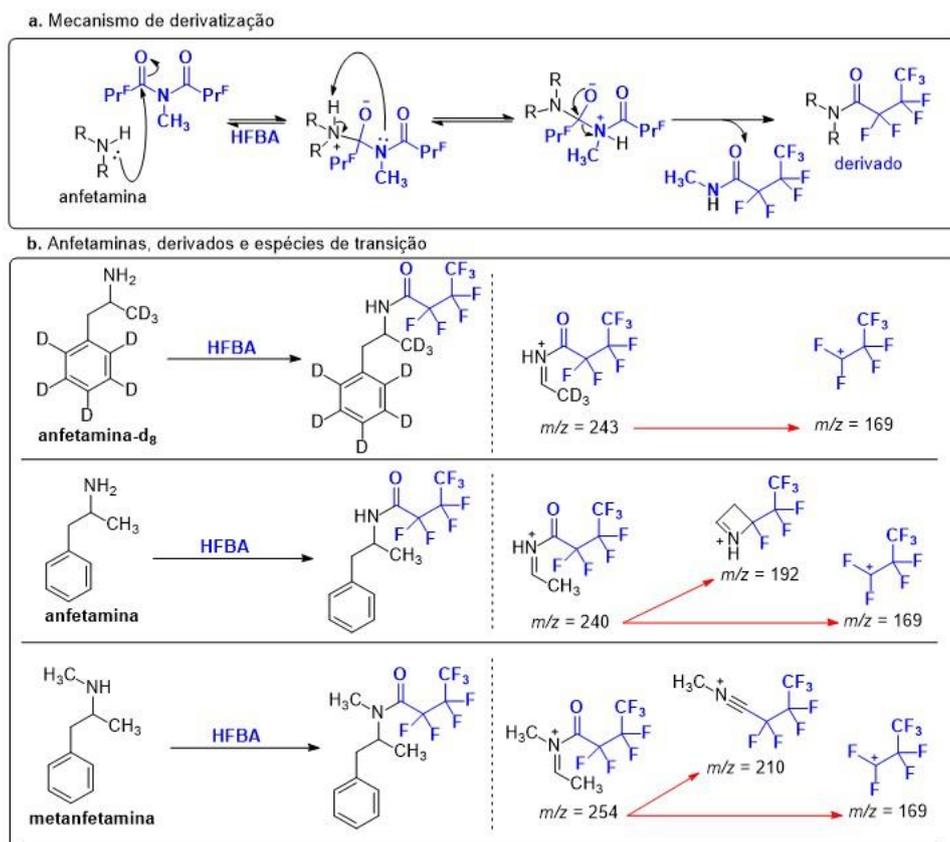
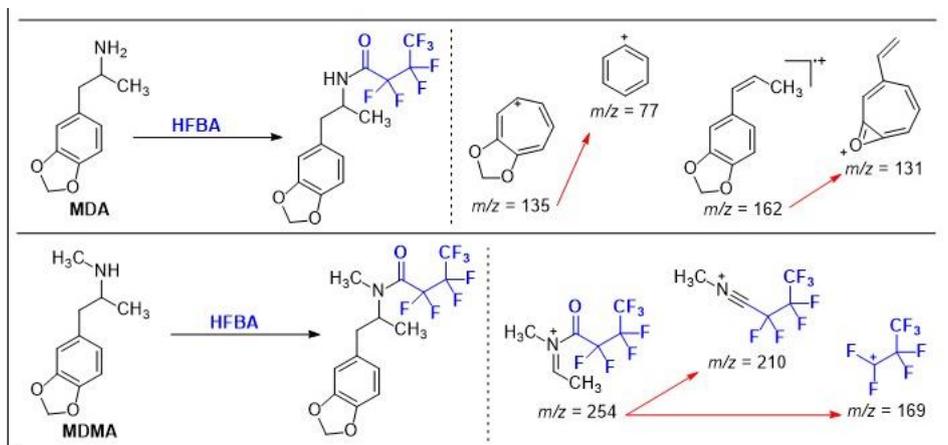


Figura 45 - (a) Sugestão de mecanismo de reação, (b) derivados e espécies de transição – HFBA^{10,11,12} (continuação).



Fonte: Autoria própria

¹⁰ GROSS, J.H, 2017.

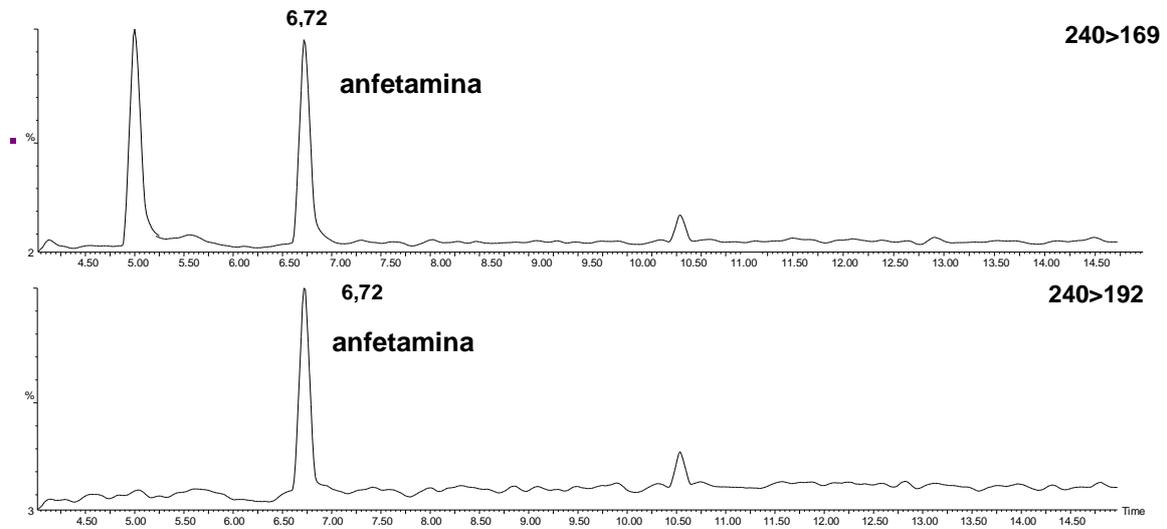
¹¹ MOHAMED, *et al.*, 2017.

¹² KUMAZAWA *et al.*, 2011.

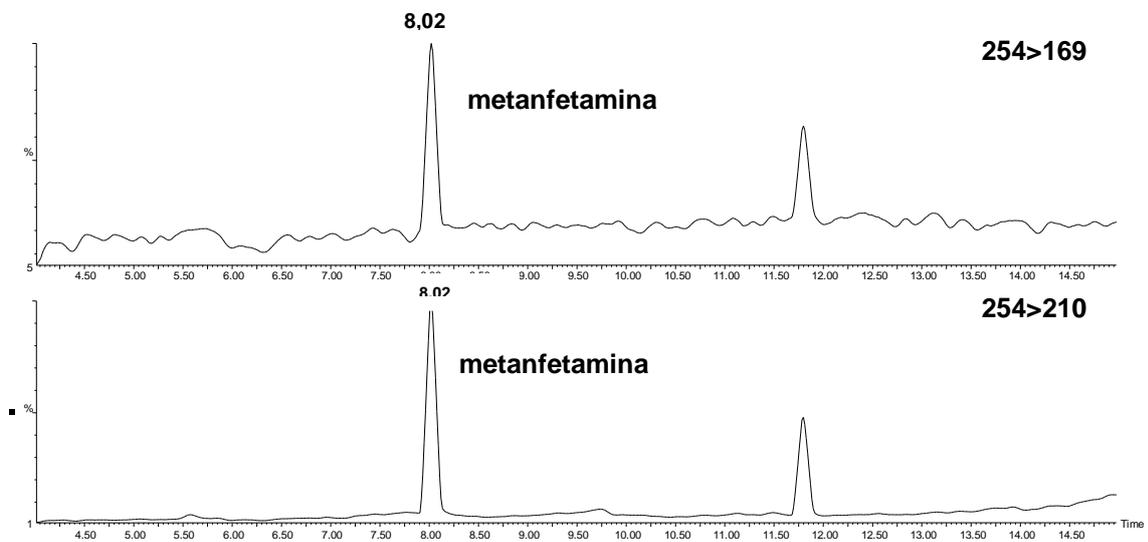
Todos os experimentos com o derivatizante HFBA foram realizados no Laboratório de Cromatografia (CROMA), e a instrumentação disponível também possibilitou que experimentos no modo de aquisição MRM (*multiple reaction monitoring*) fossem realizados.

O modo de aquisição MRM apresenta vantagens em relação aos modos *scan* e SIM. O aumento da especificidade é um deles, que ocorre pela capacidade desse modo de aquisição em identificar e possibilitar a quantificação de íons que são fragmentos de um íon precursor pré-estabelecido e selecionado. (GERGOV *et al.*, 2003) Apenas os íons que cumprem as relações estabelecidas de razão massa/carga atravessarão os quadrupolos e serão fragmentados e detectados. Além disso, após a seleção do íon precursor e sua fragmentação na cela de colisão, a presença do segundo filtro de massas é capaz de selecionar os íons fragmentos. Nesse processo, o número de interferência ou sinais não relacionados aos analitos de interesse são diminuídos, o que reflete na diminuição do ruído da análise. (STAHL-ZENG *et al.*, 2007)

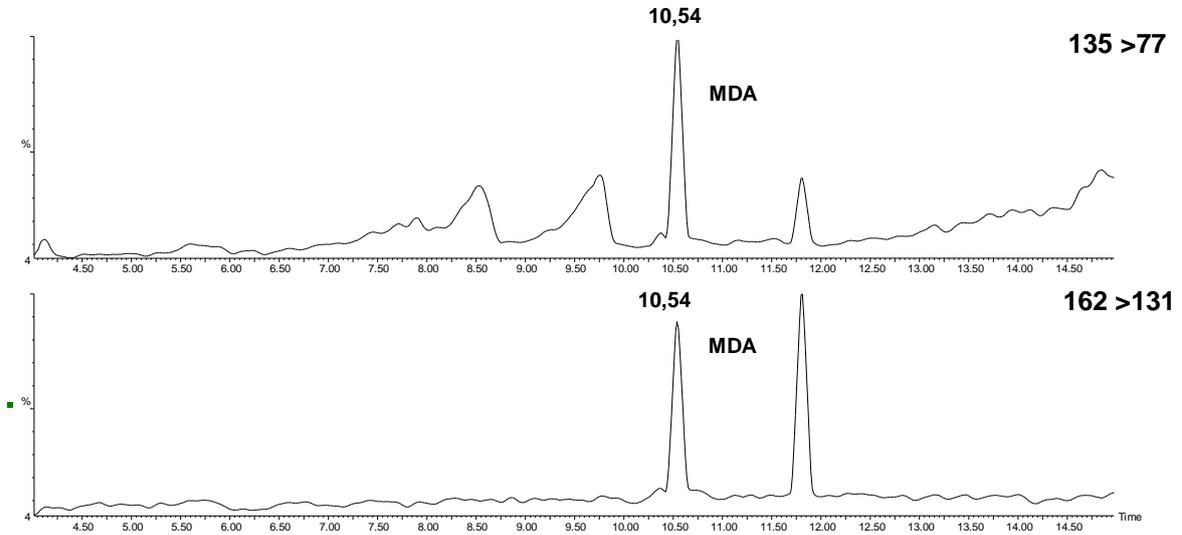
Nas Figuras 46, 47, 48, 49 e 50 abaixo seguem os cromatogramas dos analitos no modo de aquisição MRM.

Figura 46 - Cromatogramas anfetamina – modo MRM – HFBA.

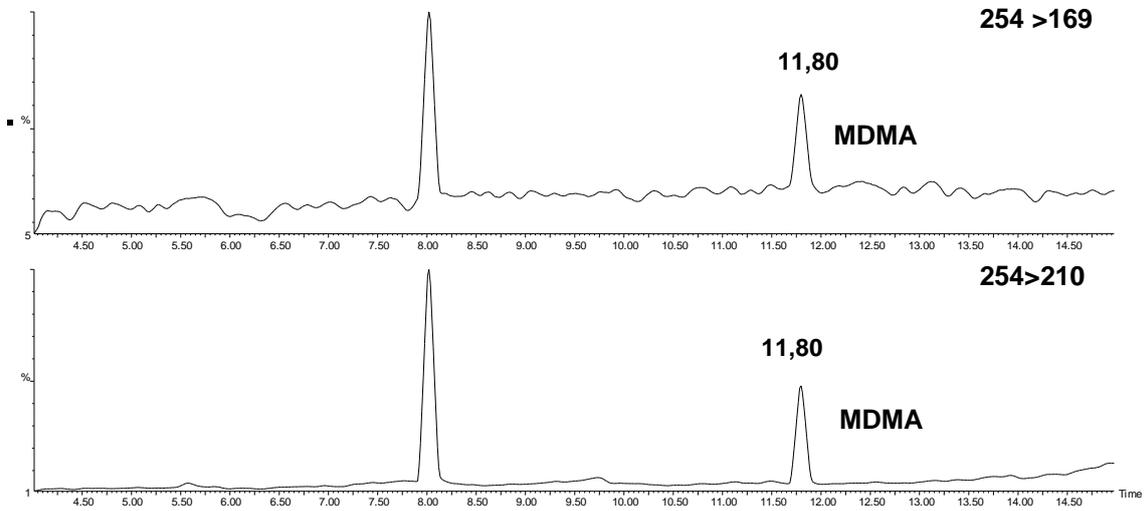
Fonte: Autoria própria

Figura 47 - Cromatograma metanfetamina – modo MRM – HFBA.

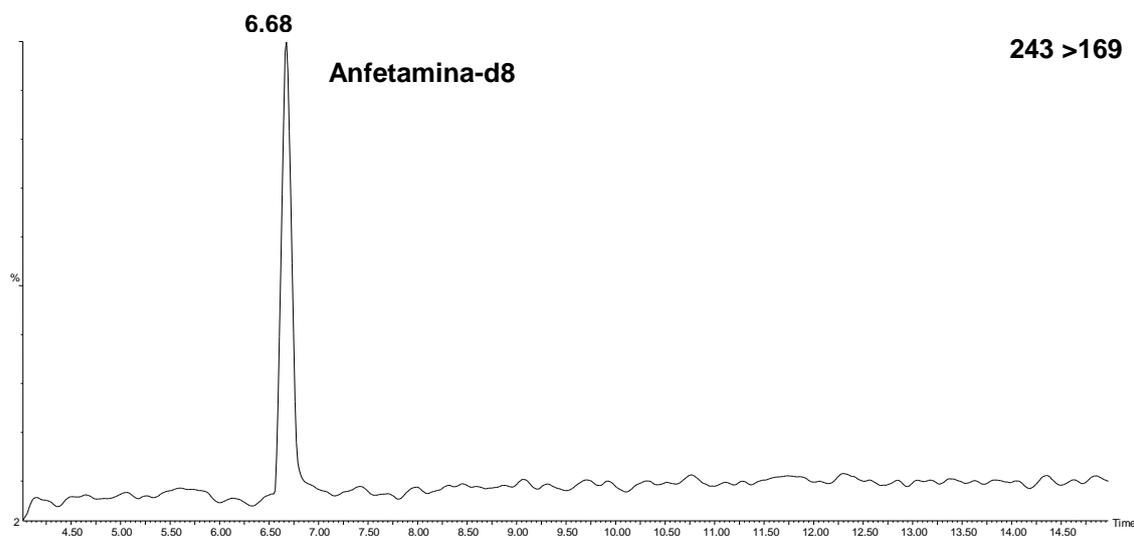
Fonte: Autoria própria

Figura 48 - Cromatograma MDA – modo MRM – HFBA.

Fonte: Autoria própria

Figura 49 - Cromatograma MDMA – modo MRM – HFBA.

Fonte: Autoria própria

Figura 50 - Cromatograma anfetamina-d8 – modo MRM – HFBA.

Fonte: Autoria própria

Os experimentos realizados no modo de aquisição MRM tiveram o intuito de avaliar a possibilidade de melhorar a detecção dos analitos de interesse, o que é de grande importância quando se refere a uma análise com baixa concentração dos analitos de interesse.

Na Tabela 26 se encontram descritos os aumentos na porcentagem da relação sinal/ruído quando comparado o modo de aquisição SIM com o modo MRM.

Tabela 26 - Proporção de aumento da relação sinal/ruído no modo MRM quando comparado ao modo SIM para HFBA.

Analito	Transição	Aumento na relação sinal/ruído (S/R) MRM (%)
anfetamina	240>169	94
metanfetamina	254>169	69
MDA	162>131	46
MDMA	254>210	87
anfetamina-d8	243>169	79

Com os resultados descritos na Tabela 26 é possível observar que o modo de aquisição MRM proporcionou um aumento na relação sinal/ruído quando comparado do modo de aquisição SIM. Esse aumento na relação sinal ruído se deve ao fato de, no modo de aquisição MRM, o número de interferentes no cromatograma ser menor, uma vez que o segundo analisador quadrupolo filtra íons específicos que vieram do

íon precursor, diminuindo interferentes ou componentes que não sejam o do analito de interesse. (STAHL-ZENG *et al.*, 2007)

4.4. Testes em matriz

Os testes em matriz foram realizados utilizando os protocolos de extração 1 e 2, com os derivatizantes MBTFA e HFBA, com o modo de aquisição SIM. Entretanto, para estes 2 protocolos, apenas para o derivatizante HFBA foi calculada a recuperação dos métodos. O cálculo foi realizado comparando uma injeção da amostra fortificada e posteriormente extraída com uma solução de padrões preparada em extrato de uma amostra branca extraída (*matrix matched standard*), na mesma concentração da amostra fortificada, para cada um dos métodos de extração avaliados.

Os resultados estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27- Recuperação – Protocolos de Extração 1 e 2 para derivatizante HFBA modo SIM

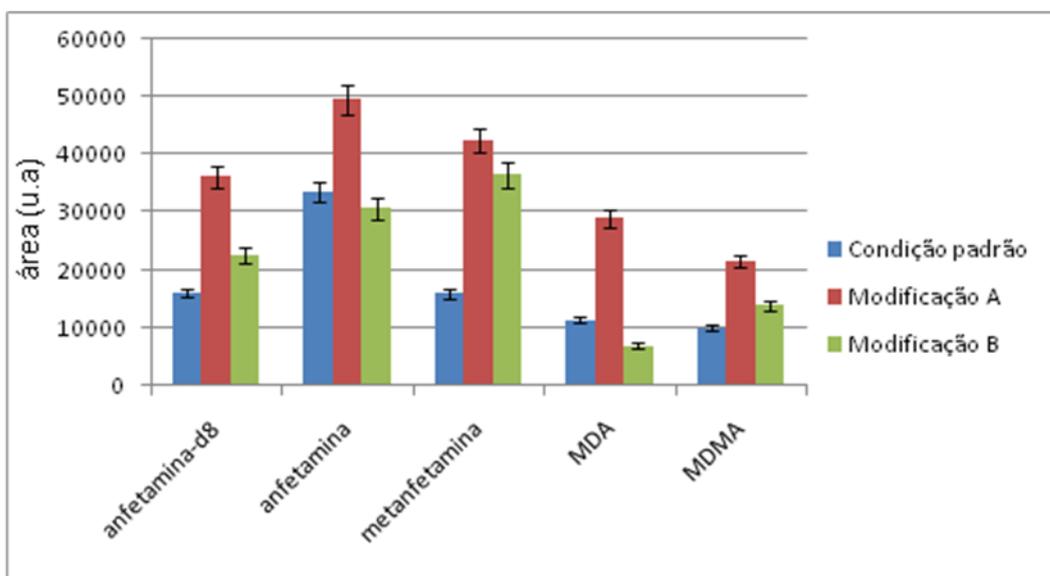
Analito	Íon	Recuperação (%)	
		Protocolo 1	Protocolo 2
anfetamina-d8	126	105	68
anfetamina	118	103	45
metanfetamina	254	102	96
MDA	162	108	92
MDMA	162	118	113

Fonte: Autoria própria

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 27, é possível observar que para o protocolo 1 os valores de recuperação foram maiores do que os valores obtidos para o protocolo 2. Os valores da recuperação foram avaliados levando-se em conta a referência do documento intitulado “Orientações sobre validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020), no qual, para a concentração do valor do corte desses analitos (0,2 ng/mg) e para o valor referente ao teste de recuperação (8 ng/mg) a média da recuperação deve estar entre 80-

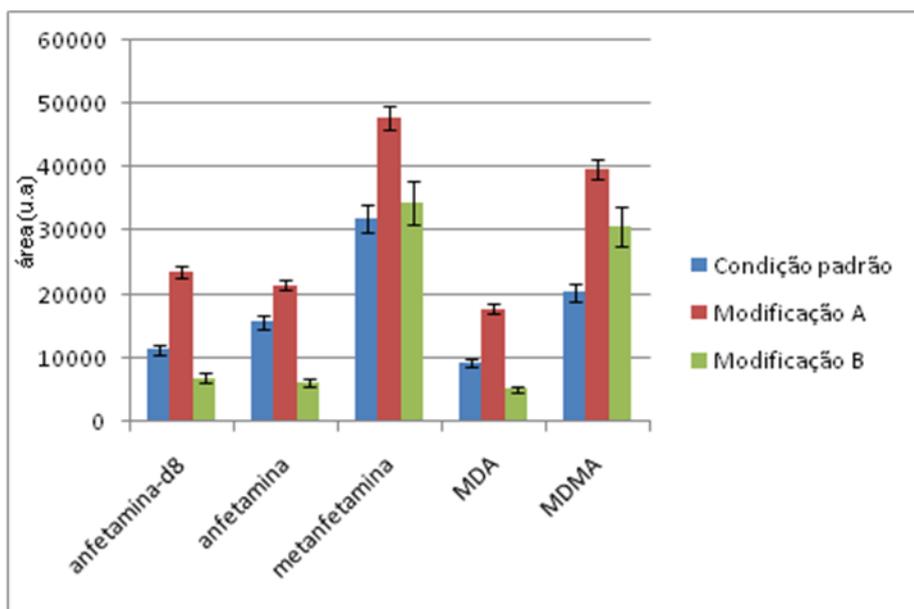
110%. (INMETRO, 2020) Deste modo, é possível avaliar que o protocolo de extração 1 se torna mais promissor no que se refere ao atendimento dos critérios para posterior validação de método. O melhor desempenho do protocolo de extração 1 pode ser justificado pelo fato de, após a digestão da matriz, serem realizadas extrações líquido-líquido de maneira sucessivas, com três partes de solvente, o que pode ter promovido uma maior eficiência do processo de extração, além de ter diminuído o efeito matriz, pelo fato do extrato final ter sido separado da parte onde a matriz se encontrava digerida. Além disso, a natureza menos polar do solvente pode ter contribuído para melhor extração dos analitos. No caso do método 2, há apenas extração direta com o solvente, uma única vez. A natureza do solvente é mais polar nesse caso, e o extrato final para injeção é o mesmo onde se encontrava a matriz após incubação. Pelo fato do protocolo 1 apresentar resultados mais promissores para as próximas etapas do desenvolvimento, este protocolo foi avaliado quando foi submetido a alterações na etapa final do método, variando as condições descritas na Tabela 15.

Figura 51 - Gráfico de alteração da área em função de modificações no método com derivatizante HFBA.



Fonte: Autoria própria

Figura 52 - Gráfico de alteração da área em função de modificações no método com o derivatizante MBTFA.



Fonte: Autoria própria

As Figuras 51 e 52 demonstram as respostas em relação à área das amostras fortificadas e extraídas (8 ng/mg) na condição padrão do protocolo de extração 1, e com as variações A e B (descritas na Tabela 15), no volume e na natureza do solvente. A concentração escolhida para o teste foi alta o suficiente de modo a possibilitar o estudo sobre a recuperação dos protocolos e garantir que haja detectabilidade para os testes realizados.

O solvente selecionado para ser o meio de reação do processo de derivatização deve possuir a capacidade de dissolução dos analitos, e, além disso, não deve possuir hidrogênios ativos. (WU *et al.*, 2009) Essas características podem ser consideradas para justificar um melhor desempenho da reação com o derivatizante MBTFA em tolueno, quando comparado ao desempenho com metanol, durante a fase inicial de experimentos.

Com os resultados obtidos é possível observar que, para o derivatizante HFBA, a modificação A apresentou valores de área superiores à condição padrão para todos os analitos. Sugere-se que esse comportamento pode ser explicado com a avaliação de que o acetato de etila, em menor volume do que a condição padrão, apresentou uma concentração eficiente dos analitos, com poucos prejuízos relativos à interferentes provenientes da matriz. Observa-se também que a condição B apresentou incremento de área para os analitos metanfetamina, MDMA e o padrão

interno anfetamina-d8, quando comparado à condição padrão. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato das 2 moléculas (metafetamina e MDMA) citadas possuírem maiores valores de log P, indicando maior hidrofobicidade e, portanto, maior afinidade com o tolueno, solvente menos polar que o acetato de etila.

No que se refere aos resultados com o derivatizante MBTFA, também é possível observar que a modificação A apresentou valores de área superior à condição padrão para todos os analitos. Observa-se também que a condição B apresentou incremento de área para os analitos metanfetamina e MDMA, quando comparado à condição padrão.

Comparando os dois derivatizantes, é possível observar que para todos os analitos, com exceção da metanfetamina e MDMA, os resultados na condição padrão com o derivatizante HFBA apresentaram maiores valores de área do que a mesma condição avaliada com o MBTFA. Além disso, os resultados com o derivatizante MBTFA apresentaram maior relação sinal ruído e melhor linha de base, quando comparado ao derivatizante HFBA.

Nota-se também que a modificação B, quando comparada à condição original, apresentou incremento de área para anfetaminha-d8, metanfetamina e MDMA, com o uso do derivatizante HFBA, sendo que o incremento de área para metanfetamina foi o mais pronunciado.

Também é possível observar que no uso com os 2 derivatizantes a condição A apresentou os melhores resultados quanto ao incremento de área e relação sinal/ruído, quando comparada à condição padrão e à condição B.

Apesar da condição A ter metade do volume de ressuspensão da condição padrão, o resultado obtido para as amostras da condição A não apresentaram áreas com o dobro da condição padrão, o que poderia ser esperado.

Com o uso do derivatizante HFBA, a condição A para os analitos anfetamina-d8, metanfetamina, MDA e MDMA apresentaram aumento de área superior ao dobro da condição padrão, entretanto esse comportamento não ocorreu para o analito anfetamina. Sugere-se que nesse caso da anfetamina que o solvente selecionado possibilitou que o efeito matriz tenha se sobreposto ao efeito de concentração do analito.

Na Tabela 28 se encontram os valores de log P para os analitos avaliados.

Tabela 28 - Valores de log P para os analitos avaliados.

Analito	Log P¹
Anfetamina-d8	n.d ²
Anfetamina	1,81
Metanfetamina	2,07
MDA	1,59
MDMA	1,81

Fonte: Autorial própria

¹SODRÉ *et al*, 2013

²n.d = informação não disponível

As amostras com a modificação A foram injetadas no modo de aquisição MRM, utilizando os derivatizantes MBTFA e HFBA. Os resultados mostraram que tanto a aquisição no modo MRM com o derivatizante MBTFA quanto com o derivatizante HFBA apresentaram-se satisfatórias, e todas as transições descritas nas Tabelas 12 e 14 foram detectadas.

Para os dois derivatizantes, a área dos picos obtida no modo de aquisição MRM foi menor do que a área do mesmo pico adquirido no modo SIM, entretanto o modo MRM, por ser mais seletivo, apresentou uma maior relação entre sinal/ruído (S/N), quando comparado ao modo de aquisição SIM, o que reflete sua importância e vantagem na aplicação de análise com baixa concentração dos analitos de interesse.(GERGOV, *et al.*,2003; STAHL-ZENG *et al.*, 2007)

Foi observado que para os experimentos realizados com MBTFA, as linhas de base, assim como a relação sinal/ruído dos analitos e a resolução cromatográfica foram superiores, quando comparados aos resultados obtidos com o HFBA. Uma verificação importante se refere ao fato dos resultados com o derivatizante MBTFA serem mais satisfatórios para o analito MDMA quando comparado aos resultados obtidos com o derivatizante HFBA. O MDMA, dentre todos os analitos avaliados, foi o que apresentou menor variação de incremento do sinal quando avaliados os parâmetros da derivatização (tempo de purga, temperatura do injetor e volume derivatizante). Ele é o último dos analitos a eluir, apresenta, dentre todos os analitos avaliados, a menor intensidade de área. Esse comportamento de aparente baixa

reatividade frente às variações dos parâmetros para derivatização, pode ser justificado pelo fato desta molécula ser uma amina secundária, e possuir a cadeia alfa-metil-etilamina com grupos substituídos, o que dificultaria a reação. (HIDVÉGI *et al.*, 2008) Deste modo, como as condições com o MBTFA com a modificação A, no modo de aquisição MRM, proporcionaram melhores resultados, esta foi selecionada para ser aplicada à amostra real de cabelo.

4.4.1 Amostras reais

Baseado nos resultados obtidos com a combinação dos derivatizantes e solventes, foi testada uma amostra real (usuário) extraída com o Protocolo 1 e ressuspensa com 500 µL de acetato de etila (condição A). Essa amostra foi injetada utilizando o derivatizante MBTFA, devido aos resultados mais satisfatórios, quando comparado com o HFBA, nos modos SIM e MRM.

Na injeção da amostra real foi possível verificar a presença dos analitos metanfetamina e MDMA, em ambos os modos de aquisição, corroborando com as informações obtidas pela amostra do ensaio de proficiência, e possibilitando a verificação da aplicação da derivatização *on-line* para determinação de anfetaminas na matriz cabelo.

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados com derivatização direta no injetor (*injection port derivatization*) mostraram que essa técnica se apresenta como uma possibilidade mais simples do que a abordagem convencional para aplicação em determinação de anfetaminas em amostras de cabelo. Esse tipo de derivatização, devido à simplificação no preparo, menor consumo de reagentes, maior reprodutibilidade (devido à automatização) mostra-se viável para aplicação em rotinas de laboratório. Os principais parâmetros avaliados: tempo de purga, temperatura do injetor e volume de derivatizante mostram que a combinação dessas 3 variáveis é responsável pela obtenção de resultados satisfatórios durante o desenvolvimento. Também como resultado desse trabalho é possível verificar que a derivatização por acilação apresenta-se como uma alternativa viável para derivatização de anfetaminas, levando-se em conta o fato desse tipo de reação produzir produtos de acilação mais estáveis, com diferentes derivatizantes.

Deste modo, para projetos futuros e continuidade do trabalho, sugere-se prosseguir com a aplicação das condições cromatográficas e espectrométricas estabelecidas para derivatização no injetor para prosseguir com a validação do método analítico para determinação de anfetaminas em cabelo e possibilitar a aplicação em uma rotina de laboratório.

REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES INC. Agilent 7693A automatic liquid sampler installation, operation and maintenance. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4513-90010.pdf>. Acesso em: 9 maio 2022.

AQUINO NETO, F.R. Uma abordagem simples e abrangente para dominar as variáveis que afetam a injeção em cromatografia gasosa de alta resolução. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 2, p.51–67, 2010.

BASTOS, F.I.P.M.; VASCONCELLOS, M.T.L.; DE BONI, R.B.; DOS REIS, N.B.; COUTINHO., C.F.S. III levantamento nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. **Instituto de Informação Científica e Tecnológica em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 528 p.,2017.

BERGO, P.L. S.; CORREA, J.M.C.; NAGEM, T.J.; AUGUSTI, R.; NASCENTES, C.C. Simultaneous quantification of amphetamines and ephedrines in urine by gc/ms using analytical-grade acetic anhydride/pyridine as derivatizing reagents: a suitable approach to reduce costs of routine analyses. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 348-358, mar.2009.

BLUMBERG, L. M. Theory of gas chromatography. *In: Gas chromatography.*, handbooks inf separation science. Amsterdam: Elsevier, 2021, cap. 2, p. 19-97.

BOUMBA , V. A.; ZIAVROU, K. S.; VOUGIOUKLAKIS, T. Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. **International Journal of Toxicology**. Reston, v.25, n.3, p.143-163. Maio 2006.

BRASIL. Lei n. 13.103/2015, de 02 de Março de 2015. Dispõe sobre o exercício da profissão de motorista; altera a Consolidação das Leis do Trabalho - CLT, aprovada pelo Decreto-Lei nº 5.452, de 1º de maio de 1943, e as Leis nº 9.503, de 23 de setembro de 1997 - Código de Trânsito Brasileiro, e 11.442, de 5 de janeiro de 2007 (empresas e transportadores autônomos de carga), para disciplinar a jornada de trabalho e o tempo de direção do motorista profissional; altera a Lei nº 7.408, de 25 de novembro de 1985; revoga dispositivos da Lei nº 12.619, de 30 de abril de 2012; e dá outras providências. **Diário Oficial da União** : seção 1, Brasília, ano 152, n.41, p.1-4, Mar.2015. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2015/lei/l13103.htm. Acesso em: 28 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Justiça e Segurança Pública. Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas. **Centro de Excelência para a Redução da Oferta de Drogas Ilícitas**. Primeiro Informe do Subsistema de Alerta Rápido Sobre Drogas (SAR).2022. Disponível em:<https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/sua-protecao/politicas-sobre-drogas/subsistema-de-alerta-rapido-sobre-drogas-sar/primeiro-informe-sar-19-1-2022.pdf>. Acesso em: 9 maio 2022.

BRASIL. Ministério de Previdência Social. Portaria MTPS Nº 116 de 13 de Novembro de 2015. Diretrizes para realização de exames toxicológicos em motoristas profissionais do transporte rodoviário de cargas e coletivos de passageiros. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, p.117-118, Nov.2015. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=306368>. Acesso em: 28 maio 2022.

BRUCE, M. Managing amphetamine dependence. **Advances in Psychiatric Treatment**, Cambridge, v. 6, p. 33–40, 2000.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

COOPER, G. A. A.; KRONSTRAND, R.; KINTZ, P. Society of hair testing guidelines for drug testing in hair. **Forensic Science International**, Shannon, v. 218, n. 1-3, p. 20–24, 2012.

DJATMIKA, R.; DING, W. H.; SULISTYARTI, H. Determination of parabens by injection-port derivatization coupled with gas-chromatography-mass spectrometry and matrix solid phase dispersion. *In*: **TOP CONFERENCE SERIES: MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING**, Malang, v. 299, 2018.

DOBOS, A.; HIDVÉGI, E.; SOMOGYI, G. P. Comparison of five derivatizing agents for the determination of amphetamine-type stimulants in human urine by extractive acylation and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, Oxford, v. 36, n.5, p. 340–344, Jun.2012.

FEITOSA, R. S.; SODRÉ, F. F.; MALDANER, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: ocorrência, determinação e aplicações forenses. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 291–305, 2013.

GERGOV, M.; OJANPERA, I.; VUORI, E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography–ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 795, n. 1, p.41–53. Set. 2003.

GROSS, J.H. **Mass Spectrometry** a textbook. 3.ed. Cham: Springer, 2017.

HIDVÉGI, E.; FÁBIÁN, P.; HIDEG, Z.; SOMOGYI, G. GC–MS determination of amphetamines in serum using on-line trifluoroacetylation. **Forensic Science International**, Shannon, v. 161, n. 2-3, p. 119-126, 12 Set. 2006.

HIDVÉGI, E.; HIDEG, Z.; SOMOGYI, G. P. Different reactivities of amphetamines with N-methyl- bis(trifluoroacetamide) in heated gas chromatographic injectors. **Pharmazie**, Eschborn, v. 63, n. 3, p. 233–234, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CCGRE-008.Revisão 09 jun. 2020. Brasília: INMETRO, 2020.

JURADO, C.; GIMÉNEZ, MP.; SORIANO, T.; MENÉNDEZ, M.; REPETTO, M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, mda, and mdma in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by gc-ms, **Journal of Analytical Toxicology**, Oxford, v.24, n.1, p.11–16, 2000.

KARAČONJI, I. B.; BRAJENOVIĆ, N. Evaluation of amphetamine-type stimulant abuse through hair analysis: results from 12 years of work. **Arh Hig Rada Toksikol**, Zagreb, v. 65, p., 225–230, 2014.

KINTZ, P.; CIRIMELE, V. Interlaboratory comparison of quantitative determination of amphetamine and related compounds in hair samples. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 84, n.1-3, p.151–156, 1997.

KUMAZAWA, T.; HARA, K.; HASEGAWA, C.; UCHIGASAKI, S.; LEE, X.P.; SENO, H.; SUZUKI, O.; SATO, K. Fragmentation pathways of trifluoroacetyl derivatives of methamphetamine, amphetamine, and methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs by gas chromatography/mass spectrometry. **International Journal of Spectroscopy**, Cairo, v. 2011, p. 1-12, 2011.

LANGE, S.T; PAZZIM, R. S; GABRIEL, M.M; WAGNER, R. O cabelo como matriz analítica para o exame toxicológico de motoristas profissionais na Lei nº 13.103/15. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.20, n.2, p. 77–88, 2019.

LEE, M. R.; SONG, Y. S.; HWANG, B. H.; CHOU, C. C. Determination of amphetamine and methamphetamine in serum via headspace derivatization solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 896, n. 1-2, p. 265–273, 2000.

LEYTON, V.; BOMBANA, H. S.; MAGALHÃES, J. G.; PANIZZA, H. N.; SINAGAWA, D. M.; TAKITANE, J.; DE CARVALHO, H. B.; ANDRECEUTTI, G.; YONAMINE, M.; GJERDE, H.; MUÑOZ, D. R. Trends in the use of psychoactive substances by truck drivers in São Paulo State, Brazil: a time-series cross sectional roadside survey (2009–2016). **Traffic Injury Prevention**, Oxfordshire, p. 122-127, 2019.

MOHAMED, K. M.; BAKDASH, A. Comparison of 3 derivatization methods for the analysis of amphetamine-related drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry Insights**. Thousand Oaks, v. 12, p. 1-16, 2017.

MUAKAD, I. B. Anfetaminas e drogas derivadas. **Revista da Faculdade de Direito**, Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 108, p. 545.2013.

ORATA, F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *In*: MOHD, M. A. (ed.). **Advanced Gas Chromatography** - progress in agricultural, biomedical and industrial applications. London: IntechOpen, 2012, cap. 5, p.83 -108.

SASAKI, T.; Makino, Y. Effective injection in pulsed splitless mode for impurity profiling of methamphetamine crystal by GC or GC/MS. **Forensic Science International**, Dublin, v. 160, n.1, p.1-10, 2006.

SINAGAWA, D.M.; DE CARVALHO, H.B.; ANDRECEUTTI, G.; DO PRADO, N.V.; DE OLIVEIRA, K. C. B. G.; YONAMINE, M.; MUÑOZ, D.R.; GJERDE, H.; LEYTON, V. Association between travel length and drug use among brazilian truck drivers. **Traffic Injury Prevention**, Oxfordshire, v.16, n.1, p. 5-9, 2015.

SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M. R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 77, n.4, p. 1473–1482, 2009.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B: biomedical applications**, Amsterdam, v. 713, n. 1, p. 61–90, 1998.

STAERK, K.; KULPMANN, W.R. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: biomedical applications**, Amsterdam, v.745, n.2, 399-411, 2000.

STAHL-ZENG, J.; LANGE, V.; OSSOLA, R.; ECKHARDT, K.; KREK, W.; AEBERSOLD, R.; DOMON, B. High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. **Molecular and Cellular Proteomics**, Rockville, v. 6, n. 10, p. 1809–1817. 2007.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). *In: World Drug Report*. World Drug Report 2021. Drug market trends: cocaine amphetamine-type stimulants. *Booklet 4*. Disponível em: https://www.unodc.org/res/wdr2021/field/WDR21_Booklet_4.pdf. Acesso em: 3 jul. 2022.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). *In: World Drug Report*. World Drug Report 2022. Drug market trends cocaine amphetamine-type stimulants new psychoactive substances. *Booklet 4*. Disponível em: https://www.unodc.org/res/wdr2022/MS/WDR22_Booklet_4.pdf. Acesso em: 3 jul. 2022.

VÉKEY, K.. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.921, n.2, p. 227–236, 2001.

WANG, Q.; MA, L.; YIN, C. RU; XU, L. Developments in injection port derivatization. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1296, p.25–35, 2013.

WOŹNIAK, M. K.; WIERGOWSKI, M.; ASZYK, J.; KUBICA, P.; NAMIEŚNIK, J.; BIZIUK, M. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 148, p. 58–64, 2018.

WU, J.; HU, R.; YUE, J., YANG, Z.; ZHANG, L. Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1216, n.7,p.1053-1058,2009.

ZAIKIN, V. G.; HALKET, J. M. Derivatization in mass spectrometry - 2. acylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 9, n.5, p. 421–434, 2003.