

Instituto de Química

Departamento de Química Analítica

Tese de Doutorado

# NOVAS APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM QUÍMICA FORENSE

Wanderson Romão

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Campinas, 11 de novembro de 2010

# FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

 R662n
Romão, Wanderson. Novas aplicações da espectrometria de massas em química forense / Wanderson Romão. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.
Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
1. Espectrometria de massas. 2. EASI-MS.
3. Química forense. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: New applications of mass spectrometry in forensic chemistry

Palavras-chaves em inglês: Mass spectrometry, EASI-MS, Forensic chemistry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (Orientador), Dr. Adriano Otávio Maldaner (Policía Federal-Brasília), Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre (IB-UNESP-Rio Claro), Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-UNICAMP), Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 11/11/2010



Ao meu filho Henrique Araújo Romão (9 meses e 15 dias), minha inspiração. Um amor incondicional. Sempre feliz e alegre. Meu garoto, que me transmite em apenas um olhar, toda força, paz e determinação necessária para transformar o impossível em possível, o inalcancável em alcançável, enfim, quebrar paradigmas. Filho, obrigado por existir e ser bonito igual ao papai (olhos azuis, forte, loiro e cabelo liso).

### **Agradecimentos**

A minha Família, que sempre esteve do meu lado em todos os momentos da minha vida. Muito obrigado a minha mãe (Sra. Ângela Marina Zamprogno Romão), aos meus irmãos (Werlen Romão e Welber Romão) e a minha amada avó Dona Roza Zamprogno, por acreditarem em mim;

A mãe do meu filho Joyce Rodrigues Araújo por cuidar dele.

Ao Prof. Marcos Nogueira Eberlin, por todos os ensinamentos transmitidos, pela orientação, confiança, amizade e excelente convivência;

Aos meus amigos da moradia, casa G5: Marcos, Bruno, André, Heitor, Gabriel e por último e menos importante, o gato, Miau;

A Profa. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno pela ajuda, amizade, orientação, dedicação e, principalmente, por acreditar sempre que para todos os problemas da vida existem soluções simples, rápidas, não-destrutivas e multi-elementares;

A todos meus amigos do Laboratório Thomson, pela contribuição e convivência durante esses dois anos de trabalho. Em especial: Boniek G. Vaz, Gustavo B. Sanvido, Clécio, Raquel, Núbia, Cris e Rosineide Simas, por me mostrarem que os obstáculos da vida são mais fáceis com todos vocês do meu lado;

Aos funcionários do IQ (BIQ, CPG, Xerox, Desenho, Vidraria, Segurança e Limpeza), pela prestação de serviços com eficiência;

A FAPESP (processo: nº 2009/07168-9) pela bolsa de estudo concedida, mesmo que seja por **retroativo**, e como diziam os políticos "pior do que tá, fica sim";

À Polícia Civil do Rio de Janeiro (Bruno D. Sabino), de São Paulo (Deleon N. Correa) e à Polícia Federal (Adriano O. Maldaner), pelo compartilhamento de informações e aprendizado durante a realização dessa tese de doutorado.

vii

# Currículum Vitae

## 1. Dados pessoais

Nome:	Wanderson Romão
Filiação:	Waulidar Romão e Ângela Marina Zamprogno
Nascimento:	03/12/1983 – Colatina/ES - Brasil
Endereço	e-mail para contato : wromao@iqm.unicamp.br
eletrônico:	e-mail alternativo : wandersonromao@gmail.com

Currículum lates:

http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4583681A3

## 2. Formação Acadêmica / Titulação

2009-2010. Doutorado em Química.

## Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.

Título: Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(2009/07168-9)

2007-2009. Mestrado em Química.

## Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.

**Título:** Metodologia para detectar a presença do PET reciclado em embalagens PET para alimentos.

Orientador: Marco-Aurélio De Paoli

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(2007/54023-0)

2004-2006. Graduação em Bacharel em Química.

# Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Vitória, Brasil

Título: Estudo do envelhecimento da Poliamida 11 utilizado na produção de dutos

flexíveis aplicados a indústria de petróleo

Orientador: Geovane Lopes de Sena

Bolsista do(a): Fundação Espírito Santense de Tecnologia / CENPES - PETROBRÁS

2004-2006. Graduação em Licenciatura Plena em Química.

Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Vitória, Brasil.

#### 3. Produção científica

#### 3.1 Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos (2009/2010)

- I) Wanderson Romão, Marcos F. Franco, Gustavo B. Sanvido, Amadeu H. Iglesias, Maria Izabel M. S. Bueno, Marcos N. Eberlin, Ronei J. Poppi, Marco-Aurelio De Paoli. "Metologia para detectar & quantificar a presença de PET reciclado em misturas de PET grau-garrafa: espectrometria de Massas (MALDI-MS) e fluorescência de Raios-X (XRF)". In: Décimo Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009, Foz do Iguaçú.
- II) Thaís C. Oliveira; Eder T. Durello, Márcio C. Pinto, Phellipe Amaral, Wanderson Romão, Deleon N. Correa, Bruno D. Sabino, Maria F. Riccio, Alexandra CHF Sawaya, Marcos N Eberlin. "Análise Comparativa em formulações farmacêuticas de Sildenafil por espectrometria de massas". In: Terceiro Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2009, Campinas.
- III) Wanderson Romão, Deleon N Correa, Gustavo B Sanvido, Maria F Riccio, Emanuele A alves, Morena L Sodré, Bruno D Sabino, Marcos N Eberlin. "mchlorophenylpiperazine (m-CPP) and ecstasy evaluated by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass spectrometry (EASI-MS) – Forensic Applications". In: Terceiro Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2009, Campinas.
- IV) Deleon N Correa, Wanderson Romão, Priscila M Lalli, Boniek G Vaz, Virgínia L C N Telles, Marcos N Eberlin. *"The Use of Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (EASI-MS) for Analysis of Questioned Documents – Forensic Applications".* In: Terceiro Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2009, Campinas.
- V) Deleon N. Correa, Wanderson Romão, Nicolas V Schawb, A A Hamada, C C J Campos, M R Menezes, D Razzo, Bruno D Sabino, A Martyni, A Campos, Maria Izabel MS Bueno, Marcos N Eberlin. "Aplicação da fluorescência de raios-X portátil (XRF) na identificação e caracterização de resíduos de disparos de arma de fogo". In: 33º Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.
- VI) Wanderson Romão, Bruno D Sabino, Amadeu C Júnior, Boniek G Vaz, Deleon N Correa, Marcos N Eberlin. "LSD and 9,10-Dihydro-LSD Analysis in Street Drug

Blotter Samples (Rio de Janeiro, Brazil) via EASI-MS". In: 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2010, Salt Lake City.

VII) Bruno D. Sabino, Amadeu C JUNIOR, Fábio O. M. Alonso, Wanderson Romão, Marcos N. Eberlin. "Identificação rápida e simples de LSD e 9,10dihidro-LSD em selos apreendidos no Rio de Janeiro utilizando as técnicas de CCD e EASI-MS". In: III Seminário Nacional de DNA e Laboratórios Forenses, 2010, Brasília.

#### 3.2 Artigos Publicados (2009/2010)

- Lívia S. Eberlin, Renato Haddad, Ramon C. S. Neto, Ricardo G. Cosso, Denison R. J. Maia, Adriano O. Maldener, José Jorge Zacca, Gustavo B. Sanvido, Wanderson Romão, Boniek G. Vaz, Demian R. Ifa, Allison Dill, Graham Cooks, Marcos N Eberlin. *Instantaneous Chemical Profiles of Banknotes by Ambient Mass Spectrometry*. *Analyst*, 2010; 135:2533-39.
- II) Rosana M. Alberici, Rosineide C. Simas, Gustavo B. Sanvido, Wanderson Romão, Priscilla M. Lalli, Mário Benassi, Ildenize B. S. Cunha, Marcos N. Eberlin. *Ambient Mass Spectrometry: Bringing MS into The Real World.* Anal Bioanal Chem, 2010; 398:265-94.
- III) Bruno D. Sabino, M. L. Sodré, E. A. Alves, H. F. Rozembaum, F.O.M. Alonso, D. N. Correa, Marcos N Eberlin, Wanderson Romão. *Analysis of Street Ecstasy Tablets by Thin Layer Chromatography Coupled To Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry.* Braz J Anal Chem, 2010; 1:6-11.
- IV) Wanderson Romão, Marcos F. Franco, Amadeu H. Iglesias, Gustavo B. Sanvido, Danilo A. Maretto, Fabio C. Gozzo, Ronei J. Poppi, Marcos N. Eberlin, Marco-Aurelio De Paoli. *Fingerprinting of bottle-grade poly(ethylene terephthalate) via matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.* Polym Degrad Stab, 2010;95:666-71.
- V) Wanderson Romão, Marcos F. Franco, Maria Izabel M. S. Bueno, Marcos N. Eberlin, Marco-Aurelio De Paoli. *Analysing metals in bottle-grade poly(ethylene terephthalate) by x-ray fluorescence spectrometry.* J App Polym Sci, 2010; 117:2993-3000.

- VI) Wanderson Romão, Marcos F Franco, Maria Izabel MS Bueno, Marco-Aurelio De Paoli. Distinguishing between virgin and post-consumption bottle-grade poly (ethylene terephthalate) using thermal properties. Polym Test, 2010; 29:879-85.
- VII) Wanderson Romão, Eustáquio V. R. Castro, Elói A. S. Filho, Regina C. L. Guimarães, Ana L. N. Silva, Sylvia C. S. Teixeira, Marco-A. De Paoli, Geovane L. de Sena, Ageing of polyamide 11 used in the manufacture of flexible piping. J Appl Polym Sci, 2009;114:1777-83.
- VIII) Wanderson Romão, Marcos F. Franco, Yuri E. Corilo, Marcos N. Eberlin, Márcia A. S. Spinacé, Marco-A. De Paoli, *Poly (ethylene terephthalate) thermo-mechanical and thermo-oxidative degradation mechanisms. Polym Degrad Stab,* 2009; 94:1849-59.
- IX) Júlia C. Fatuch, Mauro A. Soto-Oviedo, César O. Avellaneda, Marcos F. Franco, Wanderson Romão, Marco-A. De Paoli, Ana F. Nogueira. Synthesis and characterization of aniline copolymers containing carboxylic groups and their application as sensitizer and hole conductor in solar cells. Synthetic Metals, 2009;159:2348-2354.
- X) Wanderson Romão, Márcia A. S. Spinacé, Marco-A. De Paoli. Poli(tereftalato de etileno), PET: uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. Polímeros 2009; 19: 121-32.

#### 3.3 Artigos Submetidos para Publicação (2010)

- I) Wanderson Romão, Gustavo B. Sanvido, Maria F. Riccio, Nicolas V. Schwab, Emanuele A. Alves, Bruno D. Sabino, Adriano O. Maldaner, Maria Izabel M. S. Bueno, Marcos N. Eberlin. *Ecstasy and m-CPP Tablets Analyzed by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry and X-Ray Fluorescence*. J Forensic Science, 2010, submitted.
- II) Ryan C. White, João E. Benedetti, Agnaldo S. Gonçalves, Wanderson Romão, Boniek G. Vaz, Marcos N. Eberlin, Carlos R. D. Correia, Marco A. De Paoli, Ana F. Nogueira. Synthesis, characterization and introduction of a new ion-coordinating ruthenium sensitizer dye in quasi-solid state TiO<sub>2</sub> solar cells. Inorg Chem, 2010, submitted.

- III) Wanderson Romão, Thaís Regiani, Clécio F. Klitzke, Boniek G.Vaz, Yuri E. Corilo, Renato Haddad, Daniella V. Augusti, Vânya M. D. Pasa, Rita C. C. Pereira, Rodinei Augusti, Marcos N. Eberlin. Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (V-EASI-MS) and Direct Infusion Electrospray Ionization Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (ESI-FT-ICR-MS) Applied for a Rapid and Reliable Recognition of Gasoline Samples Adulterated with Kerosene and Diesel. Energy and Fuels, 2010, submitted.
- IV) Vanessa G. Santos, Thaís Regiani, Fernanda F. G. Dias, Wanderson Romão, Clécio F. Klitzke, Fernando Coelho, Marcos N. Eberlin. Development and Applications of Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (V-EASI) for Easier than Ever Ambient Mass Spectrometry. Anal Chem, 2010, submitted.
- V) Wanderson Romão, Andrea Martiny, Bruno D. Sabino, Nicolas V. Schwab, Maria Izabel M. S. Bueno, Adriano O. Maldaner, Regina Sparrapan, Marcos N. Eberlin. "Química Forense: Perspectivas sobre Novas Metodologias Analíticas Aplicadas à Documentoscopia, Balística e Drogas De Abuso". *Química Nova, 2010, submetido.*
- VI) Bruno D. Sabino, Amadeu C. Júnior, Adriano O. Maldaner, Maria Izabel M. S. Bueno, Boniek G. Vaz, Marcos N. Eberlin, Wanderson Romão. LSD and 9,10-Dihydro-LSD Analysis in Street Drug Blotter Samples (Rio de Janeiro and Brasília, Brazil) via EASI-MS. J Foren Sci, 2010, submitted.
- VII) Wanderson Romão, Boniek G. Vaz, Priscila M. Lalli, Maria Izabel M. S. Bueno, Deleon N. Correa, Virgínia L. C. N. Telles, Marcos N. Eberlin. Analyzing Brazilian Vehicle Registration Questioned Documents by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (EASI-MS). J Foren Sci, 2010, submitted.

#### Resumo

#### Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense

Embora seja um tema que desperte bastante interesse perante a sociedade científica, a aplicação da química no campo da criminalística ainda constitui uma nova linha de pesquisa no Brasil. Neste trabalho, o perfil químico de várias drogas de abuso (anfetaminas, piperazinas, cocaína e dietilamida do ácido lisérgico (LSD)), documentos e derivados de petróleo foram investigados.

Para análise de drogas de abuso, a *easy ambient sonic-spray ionization* (EASI-MS) é uma poderosa ferramenta na caracterização de amostras na sua forma original, como é o caso de amostras de *ecstasy* e LSD, que são vendidos como comprimidos e selos, respectivamente. A espectrometria de massas foi utilizada também para estudar a mobilidade iônica de isômeros da clorofenilpiperazina (*o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP), onde o *m*-CPP se enquadra na lista de substâncias proscritas. Foi também demonstrado que a cromatografia em camada delgada (CCD) continua sendo uma técnica confiável para a identificação do 3,4-metilenodimetoxianfetamina (MDMA) e outros adulterantes em comprimidos de *ecstasy*, mas ela pode fornecer resultados falso-negativos. A associação da CCD com EASI-MS potencializa a identificação de todas as anfetaminas que poderiam ser usadas na fabricação de drogas de rua, como o *ecstasy*. Uma importante ferramenta analítica para estudar os contaminantes inorgânicos em drogas de abuso é a técnica de fluorescência de raios-X. Perfis inorgânicos foram construídos para várias drogas de abuso. Esses dados, associados a ferramentas quimiométricas, permitem classificar drogas de abuso.

Para análise de documentos, EASI-MS e *Desorption electrospray ionization mass spectrometry* (DESI-MS) podem ser usados como um método de *fingerprints* diretos, robuscos, não-destrutivos, rápidos e simples para a investigação da autenticidade do papel-moeda nacional e internacional.

Uma nova metodologia foi desenvolvia para estudar derivados de petróleo: *venture easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*, V-EASI-MS. A presença de uma série homólga abundante, como as alquil-piridinas, é um indicativo de uma amostra de gasolina comercial ser de boa qualidade. A presença de outras séries homólogas com maiores valores de DBE (número de insaturações e anéis) para a classe dos nitrogenados (Classe

XV

N), é um indicativo de que adulterantes como querosene e diesel foram adicionados na gasolina.

#### Abstract

#### New Applications of Mass Spectrometry in Forensic Chemistry

The application of chemical analysis in the criminalistic field is a subject has always atract academic interesty. However in Brazil, this research field is still incipient. In this thesys, the chemical profiles of several drugs of abuse (amphetamines, piperazines, cocaine and LSD), documents and crude oil derivatives (gasoline, kerosene and diesel) were studied. For the analyzes of the drugs, easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) is shown to provide a relatively simple and selective screening tool to characterize and identify samples in their native form, as exemplified for ecstasy and LSD samples, sold in tablet and blotter forms, respectively. Mass spectrometry has also allowed the study of the ionic mobility of isomers derived of chlorophenilpiperazine (o-CPP, m-CPP e p-CPP). Only the m-CPP isomer is reported in the Brazilian lists of proscribed drugs (F and F2 Lists). It was also demonstrated that thin layer chromatography (TLC), although non expensive, reliable and versatile, may lead to false positives results. EASI-MS combined with TLC provided a powerful screening tool for the analysis of street drugs with fast and indisputable results. An important technique available for the analysis of inorganic contaminants in drugs of abuse is the X-ray fluorescence (XRF) technique. XRF has several advantageous features such as multielemental capability, good detectivity, high precision, short analytical times, and is nondestructive. These characteristics make XRF applicable to a great variety of samples, offering an efficient technique for metal determinations in drugs of abuse. In this work, XRF followed by chemometric treatment has been applied to classify drugs of abuse.

For analyzes of documents and banknotes (Brazilian real, dollar, and euro bills), two desorption/ionization techniques (DESI-MS and EASI-MS) were used as proof-of-principle techniques and ambient mass spectrometry was shown to function as a direct, nearly instantaneous, reproducible, and non-destructive method for their chemical analysis. An innovative and recently-introduced technique, Venture Easy Ambient Sonic-Spray lonization Mass Spectrometry (V-EASI-MS), was also applied for rapid and reliable typification of gasoline samples and adulteration by addition of diesel and kerosene. Without any extraction or pre-treatment procedures, samples of gasoline, kerosene, diesel, and admixtures of gasoline/diesel and gasoline/kerosene were directly analyzed by V-EASI(+)-MS.

xvii

# Índice

Capí	tulo I: In	trodução Geral	1
<b>I.</b> 1	Espect	rometria de Massas	3
	<b>I.</b> 1.1	Fontes de Ionização	5
		I.1.1.1 Ionização por Eletrospray (ESI)	5
		I.1.1.2 Ionização em condições ambientes: EASI-MS	6
		I.1.1.3 Venturi easy ambient sonic spray ionization (V-EASI-MS)	8
	<b>I.</b> 1.2	Analisadores de Massas	10
		I.1.2.1 Monoquadrupolo (Q)	10
		I.1.2.2 Tempo de Vôo (TOF)	12
		I.1.2.3 Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier	
		(FT-ICR-MS)	12
	<b>I.</b> 1.3	Espectrometria de Mobilidade Iônica	14
<b>I</b> .2	Fluores	scência de Raios-X	20
	<b>I.</b> 2.1	Espalhamento de Raios-X	21
<b>I.</b> 3	Método	os Quimiométricos	22
	<b>I.</b> 3.1	Análise de Componentes Principais (PCA)	22
<b>I</b> .4.	Químic	a Forense	23
	<b>I.</b> 4.1.	Drogas de Abuso	23
		I.4.1.1 Ecstasy	24
		I.4.1.2 1-(3-clorofenil)-piperazina ( <i>m</i> -CPP)	25
		I.4.1.3 LSD	28
		I.4.1.4 Cocaína	29
	<b>I.</b> 4.2.	Documentoscopia	29
	<b>I.</b> 4.3.	Adulteração de Combustível	32
Capí	tulo II: C	)bjetivos	35
<b>II.</b> 1.	Objetiv	o Geral	37
<b>II.</b> 2.	Objetiv	os Específicos	37
	<b>II.2</b> .1.	Drogas de Abuso	37
	<b>II.2</b> .2.	Documentoscopia	37
	<b>II.2</b> .3.	Adulteração de Combustível	37
Capí	tulo III: I	Drogas de abuso	39

<b>III.</b> 1	Introdu	ção	41
<b>III.</b> 2	Procedimento Experimental		41
	<b>III.2</b> .1	Caracterização	42
		III.2.1.1 EASI-MS	42
		III.2.1.2 ESI-FT-ICR-MS	42
		III.2.1.3 Espectrometria de mobilidade iônica	43
		III.2.1.4 Fluorescência de Raios-X (XRF)	45
		III.2.1.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	
		(GC-MS)	45
		III.2.1.6 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	45
		III.2.1.7 Tratamento Quimiométrico - PCA	46
<b>III.</b> 3	Resulta	dos	46
	<b>III.3</b> .1	Drogas sintéticas vendidas como ecstasy: 1-(3-clorofenil)-piperazina (m-	
		CPP) e MDMA	46
	<b>III.3</b> .2	Estudo de Mobilidade iônica (IMMS) dos isômeros ( <i>o</i> -CPP, <i>m</i> -CPP e <i>p</i> -	
		CPP)	52
	<b>III.3</b> .3	LSD e 9,10-Di-hidro-LSD	56
	<b>III.3</b> .4	Comprimidos de ecstasy analisados por CCD/EASI-MS	60
	<b>III.3</b> .5	Perfil Inorgânicos de Drogas de Abuso por XRF	67
<b>III.</b> 4	Conclus	são	75
Capí	tulo IV: I	Documentoscopia	79
<b>IV.</b> 1	Introdu	ção	81
<b>IV.</b> 2	Proced	mento Experimental	81
	<b>IV.2</b> .1	Caracterização	81
		IV.2.1.1 EASI-MS	81
		IV.2.1.2 DESI-MS	82
		IV.2.1.3 Análise Quimiométrica	82
<b>IV.</b> 3	Resulta	dos	82
	<b>IV.3</b> .1	Fingerprinting papel-moeda: REAL, DOLAR & EURO	82
	IV.3.2	Análise de certificados de registros de licenciamentos veiculares (CRLV)	89
<b>IV.</b> 4	Conclus	são	93
Capí	tulo V: A	dulteração de Combustível	95

<b>V.</b> 1	Introdu	ção	97
<b>V.</b> 2	Proced	imento Experimental	97
	<b>V.2</b> .1	Caracterização	98
		<b>V.</b> 2.1.1 V-EASI-MS	98
		V.2.1.2 ESI-FT-ICR-MS	98
<b>V.</b> 3	Resulta	ados e Discussões	99
<b>V.</b> 4	Conclu	são	106
Capí	tulo VI:	Conclusões Gerais e Perspectivas	107
Capí	tulo VII:	Referência Bibliográfica	111
Anex	ko I: Inst	antaneous Chemical Profiles of Banknotes by Ambient Mass Spectrometry	123
Anex	<b>ko II:</b> Am	bient Mass Spectrometry: Bringing MS into The Real World	133
Anex	<b>co III:</b> Ar	alysis of Street Ecstasy Tablets by Thin Layer Chromatography Coupled To	
Easy	, Ambien	t Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry	165

# Lista de Abreviaturas

ABDF – Bromobenzodifuranilisopropilamina

ANP – Agência nacional do petróleo

- APCI Atmospheric pressure chemical ionization
- API Ionização a pressão atmosférica (Atmospheric pressure ionization)

**ATR-IR** – Espectroscopia na região do infravermelho acoplada com reflectância total atenuada

CCS – Seção de choque de colisão

CCD - Cromatografia em camada delgada

CI - Ionização química (chemical ionization)

CRLV - Certificação de registro de licenciamento veicular

DBE - Número de insaturações e anéis (double bound equivalent)

DC – Corrente elétrica contínua (direct current)

DESI-MS – Desorption electrospray ionization mass spectrometry

DHEP - Bis(2-ettilhexil)ftalato

 $\textbf{DOB}-4\mbox{-}bromo\mbox{-}2,\mbox{5-}dimetoxian fetamina$ 

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

EHSS – Método do espalhamento de esferas rígidas

EI - Ionização por Elétrons (electron ionization)

ESI – Ionização por eletrospray (electrospray ionization)

**ESI-FT-ICR-MS** – Electrospray Ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry

ESI-QTOF - Electrospray ionization quadrupole time-of-flight

FT-ICR – Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICR – Ressonância ciclotrônica de íons (Ion Cyclotron Resonance)

IMS - Espectrometria de Mobilidade iônica

IT – Ion trap

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

- LIT Ion trap linear (Linear Ion Trap)
- LSD Dietilamida do ácido lisérgico
- *m/z* Razão massa-sobre-carga
- MALDI-MS Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- m-CPP 1-(3-chlorophenylpiperazine)
- MDA Metilenodioxianfetamina
- MDBP 1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina
- MDEA 3,4-metilenodioxietilanfetamina
- MDMA 3,4-metilenodimetoxianfetamina
- MeOPP Metoxifenilpiperazina
- MS Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry)
- N-BZP Benzilpiperazina
- o-CPP -1-(2-chlorophenylpiperazine)
- PA Método da projeção
- PCA Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis)
- **p-CPP** –1-(4-chlorophenylpiperazine)
- PMK Piperonilmetilcetona
- RF Rádio freqüência
- SNC Sistema nervoso central
- SSI Ionização por spray supersônico (sonic spray ionization)
- TFmPP Triflúormetilfenilpiperazina
- TGA Análise termogravimétrica
- TM Método da trajetória
- TOF Tempo de vôo (time-of-flight)
- V-EASI-MS Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry
- **XRF** Fluorescência de raios X (X-ray fluorescence)

# Lista de Tabelas

Tabela 1. Gases utilizados na cela de mobilidade e suas respectivas massas e dipolo de
polarizabilidade estático médio
Tabela 2. Cálculos teóricos de CCS (Å <sup>2</sup> ) para os íons dos isômeros <i>o</i> -CPP, <i>m</i> -CPP e <i>p</i> -
CPP monoprotonados nos nitrogênios secundário (NB) ou terciário (NA) usando 3
diferentes métodos: PA, EHSS e TM55
Tabela 3. Valores médios de CCS ( $CCS_{NA} + CCS_{NB}$ )/2 para o método TM
Tabela 4. Valores de Rf dos padrões obtidos pelas análises de CCD
Tabela 5. Valores de $m/z$ com alta exatidão e as fórmulas estruturais para os compostos
presentes em documentos de CRLV analisados pelo EASI(±)-FT-ICR-MS91

# Lista de Figuras

Figura 1.Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas
Figura 2. Esquema ilustrativo da resolução em analisadores de massas com (a) resolução
unitária e (b) alta resolução5
Figura 3. Esquema do processo de ionização por ESI6
Figura 4. Diagrama esquemático da técnica EASI-MS. Pressão $N_2$ de 7 bar e vazão do
solvente da ordem de 20 μL min <sup>-1</sup> 8
Figura 5. a) Design clássico do efeito Venturi; e b) design do V-EASI combinando o auto-
bombeamento causado pelo efeito Venturi e a ionização por SSI
Figura 6. Modo duplo de operação do V-EASI-MS. (a) V-EASI(+)-MS para uma solução de
30 ng mL <sup>-1</sup> de sildenafil em metanol acidificado; e (b) V-EASI(+)-MS para um comprimido
de sildenafil, usando metanol acidificado como solvente
Figura 7. Diagrama esquemático de um analisador monoquadrupolar
Figura 8. Diagrama esquemático de um analisador TOF12
Figura 9. Esquema do funcionamento de uma cela de ICR. (a) Diagrama do movimento
ciclotrônico de íons e (b) a cela de ICR. A rotação dos íons ocorre perpendicularmente ao
campo magnético B14
Figura 10. Esquema do princípio básico de operação da separação por mobilidade iônica.
17 Figura 11. Esquema da instrumentação de um equipamento de mobilidade iônica clássico. 18 Figura 12. Ondas de potencial impulsionando os íons no sistema de T-wave IMS. 19 Figura 13. Diagrama esquemático dos eletrodos planares da cela de mobilidade em um equipamento de T-wave IMS. 20 Figura 14. Representação do efeito fotoelétrico. 21 Figura 15. Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh. 22
17     Figura 11. Esquema da instrumentação de um equipamento de mobilidade iônica clássico.     18     Figura 12. Ondas de potencial impulsionando os íons no sistema de T-wave IMS.     19     Figura 13. Diagrama esquemático dos eletrodos planares da cela de mobilidade em um equipamento de T-wave IMS.     20     Figura 14. Representação do efeito fotoelétrico.     21     Figura 15. Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh.     22     Figura 16. Rotas sintéticas do ecstasy.
17     Figura 11. Esquema da instrumentação de um equipamento de mobilidade iônica clássico.     18     Figura 12. Ondas de potencial impulsionando os íons no sistema de T-wave IMS.     19     Figura 13. Diagrama esquemático dos eletrodos planares da cela de mobilidade em um equipamento de T-wave IMS.     20     Figura 14. Representação do efeito fotoelétrico.     21     Figura 15. Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh.     22     Figura 16. Rotas sintéticas do ecstasy.     25     Figura 17. Estruturas dos derivados da piperazina.
17     Figura 11. Esquema da instrumentação de um equipamento de mobilidade iônica clássico.     18     Figura 12. Ondas de potencial impulsionando os íons no sistema de T-wave IMS.     19     Figura 13. Diagrama esquemático dos eletrodos planares da cela de mobilidade em um equipamento de T-wave IMS.     20     Figura 14. Representação do efeito fotoelétrico.     21     Figura 15. Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh.     22     Figura 16. Rotas sintéticas do ecstasy.     25     Figura 17. Estruturas dos derivados da piperazina.     26     Figura 18. Apreensões dos comprimidos de ecstasy no período de 2004-2008 pela Polícia
17     Figura 11. Esquema da instrumentação de um equipamento de mobilidade iônica clássico.     18     Figura 12. Ondas de potencial impulsionando os íons no sistema de T-wave IMS.     19     Figura 13. Diagrama esquemático dos eletrodos planares da cela de mobilidade em um equipamento de T-wave IMS.     20     Figura 14. Representação do efeito fotoelétrico.     21     Figura 15. Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh.     22     Figura 16. Rotas sintéticas do ecstasy.     25     Figura 17. Estruturas dos derivados da piperazina.     26     Figura 18. Apreensões dos comprimidos de ecstasy no período de 2004-2008 pela Polícia     Federal.   27

Figura 20. Estrutura do LSD e 9,10-diidro-LSD. Figura 21. a) cédula de 100 reais, impressa em cédula lavada de um real. Abaixo, uma cédula de um real autêntica sem o fio de segurança; b) uma fotografia de uma cédula antiga de um real, vendo-se o fio de segurança que posteriormente foi abolido. Abaixo, uma cédula de um real após ter sua impressão lavada quimicamente; c) cédula falsa de vinte reais onde, no lugar da faixa holográfica, encontra-se uma faixa de papel metalizado; d) cédula falsa de cinquenta reais impressa em uma cédula lavada de cinco reais.......32 Figura 22. Esquema do planejamento experimental desenvolvido......41 Figura 23. Estruturas pré-otimizadas para os íons dos isômeros o-CPP, m-CPP e p-CPP Figura 24. EASI(+)-MS de comprimidos vendidos como *ecstasy*: (a) *m*-CPP e (b) MDMA. Figura 25. ESI(+)-MS/MS para os íons de *m/z* 194 e 423......49 Figura 26. ESI(+)-MS/MS para os sinais de (a) m/z 197, (a) m/z 365 e (b) m/z 527 presentes em comprimidos de *m*-CPP......50 Figura 27. Gráficos de (a) scores e (b) loadings para os resultados obtidos para os Figura 28. Espectros de mobilidade iônica, analisando a influência dos drift gases na separação dos isômeros o-CPP, m-CPP e p-CPP em (a) He, (b) N<sub>2</sub> e (c) CO<sub>2</sub>; (d) mistura equimolar dos três isômeros usando como drift gas CO<sub>2</sub>; e (e) amostras de ecstasy Figura 29. Estruturas para os íons dos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP monoprotonados Figura 31. (a) EASI(+)-MS e (b) EASI(+)-MS/MS de amostras contendo 9,10-diidro-LSD.59 Figura 32. Ilustração dos cromatogramas referentes aos padrões: MDEA, MDA, MDMA, metanfetamina, anfetamina, quetamina e cafeína; e comprimidos de ecstasy (designados de T1–T25), usando o eluente CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v %)......61 Figura 33. Cromatogramas referentes aos padrões: MDEA, MDA, MDMA, metanfetamina, anfetamina, quetamina e cafeína; e comprimidos de ecstasy (designados de T1-T25), usando o eluente CH3OH/NH4OH (98/2 v/v %). .....62

Figura 34. EASI(+)-MS para os spots dos padrões: (a) MDEA, (b) MDA, (c) MDMA, (d) metanfetamina, (e) anfetamina, (f) quetamina e (g) cafeína usando a fase móvel CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v %).....64 Figura 35. EASI(+)-MS dos spots referentes as amostras de ecstasy T1. ......65 Figura 36. EASI(+)-MS para os *spots* correspondentes as amostras T18......66 Figura 37. (a) Espectros de ED-XRF de comprimidos de *m*-CPP e (b) uma ampliação na região de 2-4.5 keV para as amostras: *m*-CPP 1 (----), *m*-CPP 2(----), *m*-CPP 3 (----) and *m*-Figura 38. Espectros de ED-XRF de comprimidos de ecstasy com perfil inorgânico (a) similar e (b) randômico......70 Figura 39. Gráficos de scores (a) e loadings (b) via resultados obtidos pelos espectros de ED-XRF. O símbolo (•) corresponde a região do espalhamento das linhas Rh......71 Figura 40. Espectros de ED-XRF para amostras de (a) crack, (b) cocaína e (c) LSD......73 Figura 41. Medidas de TGA para amostras de cocaína na forma de cloridrato (pó) e base Figura 43. Fingerprints usando EASI(+)-MS para notas autênticas a partir de cédulas de Figura 44. *Fingerprints* obtidos via DESI(+)-MS (Laboratório Aston, USA) para as notas Figura 45. Fingerprints obtidos usando EASI(+)-MS para as notas falsas produzidas no Figura 46. *Fingerprints* obtidos usando EASI-MS para notas de Dólar e Euro......87 Figura 47. PCA 3D usando os dados de EASI-MS para classificação das notas Figura 48. (a) Área de uma nota de R\$ 20 falsificada por uma impressora *inkjet* submetida ao sistema de imagiamento por DESI-MS 2D. (b) Imagem produzida pelo monitoramento da intensidade dos íons presente na região em vermelho (m/z 122) e marrom (m/z 597) Figura 49. EASI(±)-MS para documentos de CRLV autênticos (a e b) e falsificados (c e d). Figura 50. EASI(-)-MS/MS do íon de *m/z* 249. .....92

Figura 51. <i>Fingerprints</i> usando EASI(-)-MS de documentos <i>homemade</i> de CRLV usando
as impressoras <i>phaser</i> (a); <i>inkjet</i> (b); e <i>laserjet</i> (c)93
Figura 52. Ilustração do sistema V-EASI-MS98
Figura 53. V-EASI(+)-MS para derivados de petróleo100
Figura 54. V-EASI(+)-MS para misturas de gasolina/querosene (a-c) e a curva analítica de
calibração (d) a partir da razão dos sinais de <i>m/z</i> 190/122102
Figura 55. V-EASI(+) MS para misturas de gasolina/diesel (v/v %)
Figura 56. Comparação entre os espectros de (a) V-EASI(+)-MS e (b) ESI(+)-FT-ICR-MS
para uma amostra de diesel; (c) Gráfico da Intensidade relativa (%) <i>vs</i> DBE para a
amostra de diesel e a elucidação das estruturas das classe dos nitrogenados104
Figura 57. DBE <i>versus</i> C para Classe N: (a) gasolina, (b) querosene, (c) diesel, (d) mistura
gasolina/querosene 80/20 % (v/v) e (e) gasolina/diesel 80/20 % (v/v)



#### I. Introdução Geral

#### I.1 Espectrometria de Massas

Em se tratando em problemas relacionados com a Química Forense, uma das técnicas comumente empregadas é a espectrometria de massas (MS). A MS é uma técnica que consiste na ionização das moléculas de interesse e separação dos íons com base em suas diferentes razões massa/carga, m/z [1]. É importante ressaltar que a MS não analisa átomos neutros ou moléculas neutras e sim, espécies iônicas. Antes de discriminar os íons é necessário, primeiramente, gerá-los utilizando um sistema de ionização ou fonte de íons. Os diferentes tipos de fonte de ionização e analisadores de massas são o que determinam a aplicabilidade da MS [2]. A **Figura 1** apresenta um diagrama esquemático de um espectrômetro de massas. Em geral a análise de um composto compreende cinco etapas: *(i)* a introdução da amostra, *(ii)* a ionização das moléculas, *(iii)* a passagem por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a razão m/z, *(iv)* o detector que "conta" os íons e transforma o sinal em corrente elétrica e *(v)* o processador que converte a magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z em dados, proporcionando um espectro de massas correspondente [1].



Figura 1. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.

A **Figura 1** também mostra que o analisador de massas e o sistema de detecção são mantidos sob alto vácuo, o que não se aplica necessariamente aos sistemas de ionização, pois alguns deles estão à pressão atmosférica, fato que revolucionou a espectrometria de

massas. Os sistemas de ionização determinam a versatilidade da MS, pois as fontes de íons são responsáveis pelos tipos de analitos que podem ser analisados. Inúmeros métodos para gerar íons foram desenvolvidos ao longo da história da MS. Desse modo há métodos de ionização aplicáveis praticamente a todos os tipos de analitos, desde moléculas apolares e voláteis, onde fontes de ionização por elétrons: *electron ionization* (EI); ou a ionização química: *chemical ion*ization (CI) podem ser utilizados; passando por moléculas polares como a ionização por eletrospray (ESI, *electrospray ionization*), técnica a pressão atmosférica que transfere íons em solução para fase gasosa ou *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI); até técnicas de ionização ambiente como a e*asy ambient sonic-spray ionization* (EASI), que tornaram a introdução da amostra em MS mais simples e prática.

Existem diferentes estratégias para se discriminar os íons dependendo do analisador de massas; o mais comum é o monoquadrupolo que possui resolução unitária. Outros analisadores que podem ser citados são os analisadores de aprisionamento de íons, *ion trap* (IT), tempo de vôo (TOF) e ressonância ciclotrônica de íons (ICR), todos utilizados neste trabalho. Cada analisador possui diferenças de resolução e exatidão de acordo com sua eletrônica e princípio físico utilizado para discriminar as razões *m/z* medidas.

A **Figura 2** mostra a diferença de resolução entre dois analisadores de massas. O analisador de resolução unitária mede a massa nominal (**Figura 2a**), assim o íon de *m/z* 249 com resolução unitária pode se referir à fórmula molecular  $C_{20}H_9$ ,  $C_{19}H_7N$  ou  $C_{13}H_{19}N_3O_2$ . Já um analisador de alta resolução mede a massa exata de cada isótopo mais abundante (**Figura 2b**); assim, é possível atribuir fórmulas moleculares para cada sinal resolvido, de acordo com o seu defeito de massa: 249,0700 ( $C_{20}H_9$ ), 249,0580 ( $C_{19}H_7N$ ) e 249,1479 ( $C_{13}H_{19}N_3O_2$ ). Assim, a resolução pode ser definida como a capacidade do analisador medir *m/z* com a menor diferença possível da *m/z* teórica, o que possibilita inferir uma fórmula molecular baseada nos defeitos de massa. Existem analisadores que possuem resoluções que vão de 5.000 a 1.000.000. A exatidão é medida pelo erro calculado em ppm do desvio da medida experimental em relação ao valor de massa teórico, ou seja, ela indica o quão próximo o valor experimental está do valor verdadeiro. A alta exatidão de massas oscila de valores entre 0,1 a 50 ppm de erro. Quando menor o erro, maior é a probabilidade de a fórmula molecular atribuída ser a verdadeira.

4



**Figura 2.** Esquema ilustrativo da resolução em analisadores de massas com (a) resolução unitária e (b) alta resolução.

#### I.1.1. Fontes de Ionização

#### I.1.1.1 Ionização por Eletrospray (ESI)

No que se refere à fontes de ionização, os estudos mais recentes têm sido focados na obtenção de sistemas menos agressivos às amostras, e também capazes de ionizar as moléculas diretamente da matriz, o que facilita o processo de identificação e reduz o tempo de análise, respectivamente. Nesse sentido, uma nova vertente de fontes de ionização tem surgido, a qual permite que os íons sejam gerados em condições mais suaves em termos de temperatura e/ou pressão [3].

A primeira técnica menos agressiva de ionização e amplamente utilizada foi a ESI (do inglês *electrospray ionization*) [4], sendo aplicada especificamente para amostras em solução. Na ionização por ESI, a amostra é misturada em grande quantidade com um solvente volátil, em meio ácido ou básico, de forma a causar a protonação ou desprotonação das moléculas, **Figura 3**. A mistura é conduzida por um capilar metálico submetido a um alto potencial elétrico, resultando na formação de uma dupla camada elétrica na interface capilar/solução. Consequentemente, formam-se gotas carregadas que, com a secagem do solvente, vão aumentando a densidade de cargas até o ponto em que ocorre um fenômeno chamado de explosão coulômbica. Assim, são formadas microgotas que, com a secagem, liberam os íons [M+H]<sup>+</sup> ou [M-H]<sup>-</sup> para serem analisados pelo analisador de massas [5]. A técnica ESI tem sido amplamente utilizada nos últimos anos,

tanto para a identificação e quantificação como também para estudos de determinação estrutural. Os íons podem também ser observados na forma de adutos, onde são coordenados por cátions ou âníons: [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup>, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> ou [M+Cl]<sup>-</sup>.

Em geral a ionização por ESI (**Figura 3**) é um processo que pode ser dividido em três etapas principais: *(i)* a nebulização da solução de amostra em gotículas carregadas produzidas pela aplicação direta de voltagem no capilar (2-5 kV), *(ii)* a liberação dos íons a partir das gotículas e *(iii) o* transporte dos íons da região de pressão atmosférica da fonte de ionização para a região de alto vácuo do analisador de massas [6].



Figura 3. Esquema do processo de ionização por ESI [6].

# I.1.1.2. Ionização em condições ambiente: *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry* (EASI-MS)

Embora dotada de diversas vantagens, a ESI tem como principal limitação o fato de ser aplicada somente para amostras em solução. Nesse contexto, Cooks e colaboradores propuseram uma técnica denominada de DESI (do inglês: *desorption electrospray ionization*), onde um spray de partículas carregadas bombardeia uma superfície de uma amostra sólida, dessorvendo e ionizando as moléculas presentes. Diversas aplicações da técnica DESI têm sido apresentadas na literatura, o que denota suas significativas vantagens, tais como a velocidade de análise, a especificidade química e a aplicação em amostras complexas [7].

Hirabayashi e colaboradores [8-10] também revolucionaram o campo da espectrometria de massas, introduzindo em 1994, uma técnica de ionização a pressão atmosférica (API) nomeada de ionização por *spray* supersônico (SSI). A SSI introduziu um novo conceito de ionização em espectrometria de massas. Os íons poderiam ser produzidos sem aplicação de nenhuma voltagem, radiação ou aquecimento, onde as gotas carregadas eram produzidas usando apenas um *spray* contendo uma solução de metanol acidificada a uma velocidade supersônica. As gotas carregadas (cargas positivas e negativas) surgem a partir de uma distribuição não balanceada estatisticamente de espécies protonadas e desprotonadas. Nenhum aquecimento é necessário para dessolvatação das gotas, logo, ambos os íons gasosos [M + H]<sup>+</sup> e [M – H]<sup>-</sup>, dependendo da natureza do analito, surgem via SSI [11,12]. Poucos segundos são necessários para dessorver e ionizar o analito a partir da superfície investigada a condições ambientes, e devido a sua simplicidade, essa técnica foi denominada de *easy ambient sonic-spray ionization* (EASI, **Figura 4**), a primeira técnica ambiente baseada em SSI [3].

Em seu primeiro trabalho sobre EASI-MS [13], Eberlin *et al.* empregaram o spraysônico para a dessorção/ionização de diazepam, atenolol, tamoxifeno, propranolol, ciclobenzaprina, rosuvastatina cálcica, amlodipina, memantina e lozartam, diretamente em seus comprimidos, e a separação dos íons pelo *Q-Trap*. Os resultados foram satisfatórios permitindo a identificação exata de cada fármaco. Além disso, foi feita uma comparação entre a eficiência de ionização da DESI e EASI, sendo que essa última, na maioria dos casos apresentou maior sinal analítico. Segundo os autores, a aplicação de potencial elétrico no capilar resulta em uma densa nuvem de gotas carregadas com alta quantidade de íons de solvente, sendo então minimizado o processo de ionização do analito.

Em outro trabalho [12], Haddad *et al.* demonstraram que uma membrana de celulose pode ser usada como interface na análise quantitativa de soluções aquosas de nicotina, lozatan, rosuvastatina, memantina, propranolol por EASI-MS. Nesse caso, o fármaco (percolado como solução aquosa na face inferior de uma membrana de celulose) migrou para a parte superior da membrana onde, por ação do spray-sônico (EASI) foi ionizado e

7
conduzido ao *Q-Trap*. Verificou-se também um aumento da sensibilidade, proporcional ao tempo de passagem da solução do fármaco pela parte inferior da membrana. Os limites de detecção obtidos para os fármacos encontraram-se entre 10 e 50  $\mu$ g L<sup>-1</sup>.

Recentemente, o Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, aplica a EASI-MS com sucesso na análise dos mais diversos analitos em matrizes como fármacos [11], perfumes [14], sufactantes [15], óleos vegetais [16], biodiesel [17], própolis [18], petróleo [19] e derivados [20].



**Figura 4.** Diagrama esquemático da técnica EASI-MS. Pressão N<sub>2</sub> de 7 bar e vazão do solvente da ordem de 20  $\mu$ L min<sup>-1</sup> [3].

# I.1.1.3. Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (V-EASI)

Mais de dois séculos atrás, o físico italiano Giovanni Battista Venturi descobriu o efeito Venturi [21] através do efeito sifão. Desde então, este efeito tem sido utilizado em muitos dispositivos.

O efeito Venturi ocorre quando um líquido em alta velocidade flui através de uma seção restrita de um tubo causando uma redução da pressão do fluido, propiciando em MS um auto-bombeamento do solvente ou solução (**Figura 5A**). Em MS, poucos processos de auto-bombeamento têm sido aplicados, e alguns dispositivos relativamente

complexos baseados no efeito Venturi foram propostos para o convencional ESI-MS [22-25].

Baseado nesses conhecimentos, foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, uma técnica derivada da EASI e nomeada de v*enturi easy ambient sonic-spray ionization* (V-EASI) [26]. V-EASI-MS combina a alta velocidade do gás de nebulização (SSI) usado no EASI-MS com o auto-bombeamento resultante do efeito Venturi (**Figura 5B**). Isso permite um manuseio ainda mais fácil de qualquer substância, sem o auxílio de bombeamento elétrico (**Figura 6A**).



**Figura 5.** a) *Design* clássico do efeito Venturi; e b) *design* do V-EASI combinando o autobombeamento causado pelo efeito Venturi e a ionização por SSI.

Para amostras sólidas, o bombeamento pelo efeito Venturi de um solvente adequado somado com um fluxo SSI forma gotas carregadas (bipolar) na superfície da amostra, causando uma dessorção eficiente e a ionização do analito. Consequenemente, espectros limpos são produzidos (**Figura 6B**). Esse fenômeno caracteriza o desenvolvimento de uma fonte de ionização ambiente de modo duplo, trabalhando com qualquer solução ou amostras sólidas.



**Figura 6.** Modo duplo de operação do V-EASI-MS. **(a)** V-EASI(+)-MS para uma solução de 30 ng mL<sup>-1</sup> de sildenafil em metanol acidificado; e **(b)** V-EASI(+)-MS para um comprimido de sildenafil, usando metanol acidificado como solvente.

### I.1.2 Analisadores de Massas

#### I.1.2.1 Quadrupolares (Q)

No analisador quadrupolar, os íons são separados por sua estabilidade de trajetória em um campo criado por oscilações elétricas aplicadas nos cilindros metálicos [27]. A **Figura 7** illustra o analisador monoquadrupoar que consiste basicamente de quatro cilindros metálicos paralelos nos quais uma corrente elétrica contínua (*direct current* (DC)) e um potencial de rádio frequência (RF) são aplicados alternadamente. Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados no centro da região entre os cilindros, atravessando axialmente o quadrupolo. Suas trajetórias serão dependentes do campo elétrico produzido, onde apenas os íons de uma razão *m/z* específica terão uma trajetória estável e chegarão ao detector. A RF é variada para que íons de diferentes razões *m/z* obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo [28]. A principal vantagem de analisadores com um único quadrupolo é o seu baixo custo, fácil operação e manutenção, tornando-se uma técnica eficaz para análises de rotina em laboratórios forenses. Eles ainda permitem a realização de experimentos de MS/MS, desde que equipamentos híbridos sejam utilizados (triploquadrupolos). Como desvantagem, esses analisadores apresentam resoluções de massas unitária.



Figura 7. Diagrama esquemático de um analisador monoquadrupolar.

### I.1.2.2 Tempo de Vôo (TOF)

O analisador por tempo de vôo (TOF) foi desenvolvido por Willian Stephens em 1946 [29], mas só foi comercializado depois de 1955. Todos os íons que entram no TOF recebem um pulso de energia igual (pulso de extração), mas são acelerados de maneiras diferentes devido à sua razão *m/z* e chegam ao detector em tempos diferentes. Os íons mais leves chegam mais rapidamente ao detector do que os mais pesados, uma vez que a energia cinética das espécies ionizadas é teoricamente a mesma (**Figura 8**). Desta forma, pela medida do tempo de vôo dos íons, pode-se deduzir sua razão *m/z*, podendo analisar compostos de baixa massa molar até macromoléculas (> 100.000 Da). Em teoria, os analisadores TOF não tem um limite máximo de massas, portanto, são adequados para serem combinados com técnicas suaves de ionização como ESI e MALDI, que podem ionizar macromoléculas sem induzir a fragmentação. Equipamentos do tipo MALDI-TOF, por exemplo, transmitem os íons de forma pulsada. Essa característica quando combinada com o pulso de extração do TOF, prioriza a sua alta resolução (5-20.000), exatidão (até 5 ppm) e sensibilidade.



Figura 8. Diagrama esquemático de um analisador TOF.

Analisadores do tipo TOF podem operar em dois modos: linear ou reflectron. O modo linear é utilizado para moléculas de massa molar elevada, como proteínas, peptídeos e polímeros. O modo reflectron é utilizado para moléculas de baixa massa molar (< 10000 Da). O emprego desse modo promove um aumento da resolução, em contrapartida uma diminuição da sensibilidade [30].

# I.1.2.3 Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR-MS): alta exatidão e resolução

O analisador de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR ou simplesmente FT-MS) é considerado, até o momento, o tipo mais complexo de analisadores de massas. O FT-ICR, normalmente utilizado na caracterização de petróleo, é um analisador híbrido que apresenta na sua configuração, um *ion trap* linear, *Linear lon Trap* (LIT) e uma cela de ICR que une a alta sensibilidade do *ion trap* com a altíssima resolução do ICR [31].

O LIT é um analisador de massas que faz uso da estrutura básica de um quadrupolo, ou seja, um arranjo de quatro cilindros metálicos; no entanto, em vez de filtrar íons de todas as razões *m/z*, ele é utilizado para capturar os íons e fazer ejeção radial para o analisador ICR [31].

O ICR determina a razão *m/z* dos íons a partir da frequência ciclotrônica dos mesmos na presença de um campo magnético espacialmente uniforme, **Figura 9a.** Essa frequência é inversamente proporcional a razão *m/z*. Os íons gerados por uma fonte de ionização (por exemplo, ESI), são aprisionados na cela de ICR, também designada como *penning trap (trap* na presença de um campo magnético), onde cada íon começa a se movimentar em uma determinada posição pela ação do campo magnético uniforme. Contudo, o sinal do ICR é detectável apenas se os íons apresentarem um movimento sincronizado (em fase). Com intuito de obter essa sincronia, aplica-se um campo elétrico (RF) espacialmente uniforme com a mesma frequência ciclotrônica, tornando o movimento dos íons detectáveis. O sinal de ICR (domínio de tempo) é resultante, portanto, da corrente oriunda da detecção de uma imagem oscilante de uma carga ao se aproximar de dois eletrodos condutores opostos paralelamente. O espectro em domínio de frequência é obtido pela transformada de Fourier em um sinal de ICR digitalizado no domínio de tempo. Em seguida, após uma simples conversão matemática, este é transformado em domínio de massas ou espectro de massas, **Figura 9b** [32].

O controle do número de íons dentro da cela de ICR é essencial para obtenção de valores ótimos de resolução, exatidão e relação sinal-ruído. O efeito *space charge* altera o movimento dos íons dentro da cela de ICR podendo aumentar o tamanho do pacote de íons dentro da cela, produzindo uma maior dispersão dos íons, e consequentemente, diminuindo a resolução. Do mesmo modo, a alta densidade de carga na cela de ICR provoca fenômenos de coalescência que diminuem rapidamente o sinal de transiente [33]. A altíssima resolução é obtida quando o sinal do transiente é coletado por períodos relativamente longos que precisam ser controlados a fim de evitar perdas de resolução.



**Figura 9.** Esquema do funcionamento de uma cela de ICR. (a) Diagrama do movimento ciclotrônico de íons e (b) a cela de ICR. A rotação dos íons ocorre perpendicularmente ao campo magnético B.

O principal parâmetro a ser controlado na cela de ICR é a quantidade de íons dentro deste analisador, mantendo um valor ótimo usualmente menor que  $10^7$  (para celas de 1 cm de diâmetro). Isso assegura que as interações espaciais de cargas sejam minimizadas, permitindo a esse analisador medir *m/z* com um alto valor de resolução e exatidão [32], visto que, por exemplo, um íon de *m/z* 100 percorre 30 km em 1s na presença de uma campo magnético de 3 T, o que evidencia o motivo pelo qual o ICR fornece sinais com as características mencionadas, já que a frequência ciclotrônica de qualquer íon é coletada em milhares de ciclos em poucos segundos, fornecendo assim, valores *m/z* com alta relação sinal/ruído.

### I.1.3 Espectrometria de Mobilidade lônica

A espectrometria de mobilidade iônica (IMS) surgiu na década de 70 como uma técnica de separação de íons em fase gasosa e por isso, era inicialmente denominada "cromatografia de plasma". Mais tarde tornou-se mais comumente vista como uma técnica para detecção seletiva de compostos orgânicos. Apresentando como pontos fortes a rapidez na qual as separações ocorrem (na ordem de milissegundos), adequação para

monitoramentos em tempo real e baixo custo, a IMS logo encontrou grande aplicação nos campos militar e de segurança para análise de traços de vapores orgânicos, especialmente compostos como explosivos, drogas e agentes de guerra química. Apesar das suas qualidades, a IMS sofreu uma falta de interesse entre as décadas de 70 e 80 associada a possíveis mal entendidos gerados por comparações errôneas com a espectrometria de massas, que possui resolução de pico muito maior e informação de massa. Por isso, muitos concluíram que a IMS era uma tecnologia interessante mas não prática [34].

Entre 1980 e o começo de 1990, uma variedade de modificações no *design* dos instrumentos renovou o interesse em IMS, resultando em equipamentos de melhor resolução e na sua adequação para o uso numa vasta gama de aplicações. Entre essas modificações está o desenvolvimento da ionização por *eletrospray* (ESI) e da ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) para IMS que permitiu a análise também de compostos polares não-voláteis e de alta massa molar. Até então apenas fontes de ionização radioativas eram utilizadas para ionizar vapores de compostos orgânicos através de uma série de reações (on/moléculas [34].

A IMS separa íons de acordo com sua razão m/z e quando acoplada à espectrometria de massas (MS), uma técnica extremamente versátil, torna-se uma ferramenta analítica poderosa para a investigação de estrutura molecular e separação de amostras complexas. O acoplamento da IMS com a MS é geralmente referido como IMMS pois as duas técnicas são complementares e encaixam-se instrumentalmente tão bem que podem ser fundidas numa única medida analítica. Enquanto que a MS mede primariamente a razão m/z dos íons, a IMS adiciona uma nova dimensão aos dados conferindo para cada valor de m/z um espectro de *drift time*.

As vantagens da combinação entre a IMS e a MS foram reconhecidas ainda quando a IMS era denominada cromatografia de plasma (PC), sendo o primeiro equipamento comercial de IMMS desenvolvido pela Franklin GNO Corporation em 1971. O equipamento batizado de "Alpha II PC/MS" era usado como detector para identificação e análise de traços de compostos oxigenados.

Apesar da IMMS não ser nova, foi após a demonstração da separação de confôrmeros de proteínas por Clemmer e colaboradores que as aplicações e *designs* instrumentais para IMMS tornaram-se uma das áreas de crescimento mais rápido em espectrometria de

massas. Desde agregados iônicos inorgânicos a grandes biopolímeros, da genômica a metabolômica, e de segurança ambiental a diferenciação de isômeros ou confôrmeros por medidas de mobilidade iônica têm significantemente enfatizado o poder da espectrometria de massas [34].

### I.1.3.1 Princípios da IMS

Na IMS os íons atravessam a cela de mobilidade com um fluxo de gás contracorrente. A função do gás é atrasar os íons nesse percurso, sendo que os íons maiores são mais atrasados e assim ocorre a separação pelo tamanho. A velocidade com que diferentes íons atravessam um gás neutro contra-corrente sob a influência de um campo elétrico varia de acordo com a sua mobilidade iônica. A mobilidade iônica é característica para cada íon e depende de fatores como massa, carga e secção transversal de interação entre o íon e o gás neutro. Se a pressão do gás é suficientemente alta para uma nuvem de íons desenvolver velocidade ao atravessá-lo sob influência de um campo elétrico fraco, a velocidade de fluxo dos íons, v, será diretamente proporcional à mobilidade iônica, K, e ao campo elétrico, E:

$$v = K \times E \qquad (1)$$

A constante de mobilidade geralmente é calculada medindo-se o tempo (*drift time*) que um íon leva para atravessar a cela de mobilidade usando um rearranjo da equação (2):

$$K = L^2 / V t_d \qquad (2)$$

onde L é a distância que o íon percorre (comprimento da cela de mobilidade), *V* é a diferença de potencial que o íon experimenta, e *td* é o *drift time*, ou seja, o tempo que o íon leva para migrar pela cela de mobilidade.

O coeficiente de mobilidade de um íon atravessando um gás também é afetado por outros fatores como a densidade numérica dos átomos/moléculas do *drift gas* (*N*), a massa reduzida do íon e do átomo (ou molécula) do *drift gas* ( $\mu$ ), a temperatura absoluta do *drift gas* (*T*), a secção de choque do íon ( $\Omega$ ) e a carga do íon (*q*) [34].

$$K = \frac{3}{16} \times \frac{q}{N} \times \left(\frac{1}{\mu} \times \frac{2\pi}{kT}\right)^{\frac{1}{2}} \times \frac{1}{\Omega}$$
(3)

Considerando as condições do *drift gas* constantes para todos os íons de uma amostra, K é inversamente proporcional a razão massa/carga e a secção de choque do íon:

$$K^{-1} \alpha \left(\frac{m}{q}\right) \Omega$$
 (4)

A capacidade de separação de íons de mesma m/z mas tamanho e geometria espacial diferentes surge a partir dessa equação. Os íons com menor  $\Omega$  (e portanto com maior mobilidade) possuem uma velocidade de fluxo maior e chegam mais rapidamente ao analisador. Cada grupo de íon separado chega ao analisador de massas em tempos diferentes resultando em um pico no espectro de mobilidade (**Figura 10**) [34].



Figura 10. Esquema do princípio básico de operação da separação por mobilidade iônica.

### I.1.3.2 Instrumentação e T-wave IMS

Nos equipamentos clássicos de mobilidade iônica (**Figura 11**), os íons gerados na fonte de ionização são conduzidos por um campo elétrico para a cela de mobilidade, onde

encontram um obturador de íons, ou portão, o qual pulsa os íons para dentro da cela. Ao entrar, os íons são sujeitos a um campo elétrico fraco e uniforme, que osacelera em direção a um detector situado no final da cela de mobilidade. Um gás presente na cela a uma pressão constante (que pode ser entre 0,5 mbar e a pressão atmosférica) faz com que os íons experimentem um número de colisões, que dificultam seu progresso em direção ao detector. Íons maiores com maior secção de choque sofrem mais colisões do que os íons menores e, portanto levam mais tempo para atravessar a cela [34].



Figura 11. Esquema da instrumentação de um equipamento de mobilidade iônica clássico.

Os equipamentos clássicos necessitam que um fino feixe de íons seja introduzido periodicamente na cela de mobilidade, ou seja, enquanto um pacote de íons atravessa a cela, um "portão de íons" ou obturador impede a passagem do novo pacote. Assim, um ciclo de trabalho é criado, em que aproximadamente 99 % dos íons provenientes da amostra são descartados. Dessa forma, a sensibilidade do equipamento é prejudicada.

Na última década o *design* dos equipamentos de IMMS tem sofrido um grande desenvolvimento no sentido de aumentar a sensibilidade e aumentar a velocidade das aquisições de espectro de massas. Um dos avanços relatados é a utilização de gradiente de voltagem ao invés de voltagem fixa na cela de mobilidade. Nessa técnica, denominada *travelling wave ion mobility* (T-wave IM), a sensibilidade do espectrômetro de massas não é afetada pelo ciclo de trabalho como ocorre com as técnicas de IMS convencionais. Na T-

wave IM uma seqüência de ondas de potencial simétricas propagando continuamente através da cela de mobilidade impulsiona os íons com velocidade dependente de *K*, e espécies diferentes transitam pela cela em tempos diferentes (**Figura 12**) [34].



Figura 12. Ondas de potencial impulsionando os íons no sistema de T-wave IMS.

A fim de formar essas ondas de potencial, a cela de mobilidade é composta por uma série de eletrodos planares dispostos ortogonalmente ao eixo de transmissão dos íons (**Figura 13**). Em cada eletrodo é aplicada uma radiofreqüência (RF) de fase oposta daquela aplicada aos seus eletrodos adjacentes. Para empurrar os íons através da cela, um potencial de corrente contínua (DC) é superimposto à RF de um par de eletrodos por um eterminado tempo e em seguida é passado para o par de eletrodos adjacente e assim consecutivamente até o final da cela. Os íons saem da região onde o pulso foi aplicado para uma região a frente de menor campo, em seguida, o pulso se move para o próximo par de eletrodos e os íons são novamente conduzidos para frente. Dessa maneira, formase uma onda de campo elétrico (*"travelling wave*") que carrega os íons através do equipamento, diminuindo o seu tempo de trânsito [34].



**Figura 13.** Diagrama esquemático dos eletrodos planares da cela de mobilidade em um equipamento de T-wave IMS.

### I.2 Fluorescência de raios-X

A técnica de fluorescência de raios-X (XRF) nasceu por volta de 1912, com um trabalho apresentado por Henry Moseley. Entretanto, esta técnica somente ganhou força, a partir de 1948, através dos trabalhos elaborados pelos pesquisadores Freidman e Birks [35].

A XRF é classificada como uma técnica de emissão atômica, fundamentada no efeito fotoelétrico. Quando um átomo é submetido a um processo de irradiação utilizando-se de uma fonte de raios-X, (tubos de raios-X, indução por partícula, radioisótopos naturais, luz síncrotron, etc.) um elétron pode ser ejetado das camadas eletrônicas mais internas do átomo. Para estabilização deste estado de excitação, os elétrons das camadas eletrônicas mais externas ocupam rapidamente as vacâncias geradas, liberando a diferença de energia existente entre os dois níveis de energia. A radiação emitida para cada transição é característica para cada elemento presente na amostra. O fenômeno está representado na **Figura 14**. Desta maneira, a energia ou comprimento de onda da radiação emitida pode ser diretamente utilizada na determinação qualitativa de um elemento, assim como a intensidade da radiação emitida pode ser empregada na quantificação de tal espécie [35,36].



Figura 14. Representação do efeito fotoelétrico [37].

#### 1.2.1 Espalhamento de Raios-X

O espalhamento da radiação X ocorre quando um fóton de raios-X interage com os elétrons dos elementos químicos, sem que haja os fenômenos quantizados de absorção/emissão de energia pelo átomo. Assim, esses efeitos acontecem concomitantemente ao efeito fotoelétrico, sendo o efeito de espalhamento mais acentuado para os elementos que apresentam baixos coeficientes de absorção para a radiação X.

O espalhamento Rayleigh, também chamado de espalhamento coerente, ocorre quando a interação entre os fótons da fonte de excitação e os elétrons das camadas externas do átomo é elástica, ou seja, quando não há perda de energia durante o processo de colisão. Todos os átomos espalham fótons de raios-X pelo processo Rayleigh a uma maior ou menor extensão, embora a intensidade do espalhamento dependa do número atômico.

O espalhamento Compton, também chamado de espalhamento incoerente, ocorre quando os fótons espalhados dispersam uma pequena parte de sua energia durante a colisão, especialmente quando o elétron que colide com o fóton está ligado fracamente ao átomo [35]. Segundo Compton, os raios espalhados sofrem mudanças no comprimento de onda, caracterizadas por um aumento no seu tamanho. Nesse trabalho, Compton denominava os efeitos de espalhamento como as linhas "não modificadas" e linhas "modificadas" [38], o que hoje correspondem aos fenômenos Rayleigh e Compton.

Uma representação simples desses fenômenos se encontra na Figura 15:



Figura 15. Representação dos fenômenos Compton e Rayleigh [37].

### I.3 Métodos Quimiométricos

Devido aos grandes avanços em *hardware* e *software*, o uso de computadores para interpretar resultados de medições químicas aumentou drasticamente nos últimos anos. Paralelamente, a aquisição de dados na área de química analítica atingiu níveis bastante sofisticados com o interfaceamento de instrumentos aos computadores, produzindo uma enorme quantidade de informação, muitas vezes complexa e variada. Os modernos instrumentos analíticos têm a capacidade de produzir respostas multivariadas para cada amostra, gerando a necessidade de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados e a máxima extração de informações relevantes. Foi nesse panorama que surgiu a quimiometria, que é considerada uma área da química destinada à análise de dados de natureza multivariada [39,40]. Embora a quimiometria seja uma área relativamente nova, ela já produz um grande impacto no campo da espectrometria, de tal modo que hoje existem diversos *softwares* comerciais disponíveis para o processamento dos mais diversos métodos quimiométricos, além daqueles que já estão incorporados em muitos instrumentos analíticos comerciais [41,42].

### I.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA, do inglês, <u>*Principal Component Analysis*</u>) foi introduzida em 1901 por Karl Pearson [43] e é a base de diversos métodos de análise multivariada. Seu grande objetivo é comprimir a quantidade de informação de um conjunto de dados iniciais para um novo sistema de eixos, denominados Componentes Principais

(PC). Estas PC representam as amostras, possibilitando visualizar características multivariadas dos dados em poucas dimensões, através de uma projeção de dados sobre um subespaço dimensional menor, maximizando a variância, sem perda de informação relevante. A primeira componente principal, PC1, é a combinação linear de máxima variância (isto é, de máxima informação) das variáveis originais, ou seja, os auto vetores, num determinado eixo. A segunda componente, PC2, de segunda maior variância, é ortogonal a PC1, *i.e.*, não é correlacionada a ela. A terceira apresenta a terceira maior variância e é ortogonal às duas primeiras PC, portanto também não correlacionadas, e assim por diante. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, a informação relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras PC, que podem ser então confrontadas com padrões de características conhecidas [44-46].

Atualmente, as aplicações dos métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados, que envolvem PCA e outros, à espectrometria de raios X e à espectrometria de massas, têm apresentado resultados bastante promissores nas mais diversas áreas como: materiais, análise forense [47], investigações arqueológicas [48], alimentos [37], agricultura [49] e outras [50].

### I.4 Química Forense

A Química Forense é o ramo das ciências forenses voltado para análise e caracterização de substâncias diversas em matrizes tais como drogas lícitas e ilícitas, venenos, acelerantes e resíduos de incêndio, explosivos, resíduos de disparo de arma de fogo, combustíveis, tintas, fibras, dentre outros. Dentro dessa introdução será destacado algumas aplicações relacionadas com drogas de abuso, falsificação de documentos e adulteração de combustíveis.

### I.4.1 Drogas de Abuso

As substâncias psicotrópicas, normalmente derivadas de plantas, são usadas pela humanidade na busca de experiências religiosas ou mesmo de prazer e bem estar desde suas origens. Tais drogas atuam no sistema nervoso central (SNC), modificando o humor, a consciência, os sentimentos, as sensações, o estado de vigília, dentre outros. Porém, o uso abusivo, inconsequente e indiscriminado é um fenômeno mais recente e cada vez mais disseminado nas sociedades contemporâneas.

As substâncias químicas comumente usadas como drogas de abuso e que determinam drogadição, isto é, que causam dependência psíquica e física, podem ser classificadas em três grandes classes de acordo com a sua principal ação no SNC:

1) Depressores do SNC: opiáceos/opióides, etanol, barbitúricos;

Estimulantes do SNC: cocaína ou crack, anfetaminas, anorexígenos;

**3)** Pertubadores do SNC: drogas alucinógenas, como LSD, psilocibina, mescalina, canabinóides [51].

### I.4.1.1 Ecstasy

O composto 3,4-metilenodimetoxianfetamina (MDMA), um dos componentes ativos mais encontrados no mercado do *ecstasy*, é um derivado anfetamínico, classificado como droga alucinógica. Além do MDMA, outras anfetaminas, seus derivados e compostos como cafeína, aspirina e paracetamol são normalmente encontrados. Portanto, o termo *ecstasy* normalmente é usado quando se refere a droga na forma como ela é vendida, onde a sua composição total é desconhecida [52-55].

O MDMA foi sintetizado pela primeira vez em 1912 e patenteado na Alemanha em 1914 pela Farmacêutica Merck, com a intenção de ser comercializado como inibidor de apetite, chegando a ser distribuído na primeira Guerra Mundial aos soldados. O MDMA possui massa molar de 193,24 g mol<sup>-1</sup>, sendo um líquido a temperatura ambiente. Normalmente, ele é comercializado na forma de sal de cloridrato ( $C_{11}H_{16}NCIO_2$ ), composto branco cristalino com ponto de fusão entre 148-149 °C [51,52].

A maioria das sínteses do MDMA utilizam como material de partida compostos que contêm o anel metilenodioxifenil, como safrol, isosafrol, ou ainda piperonilmetilcetona (PMK). Existem 3 rotas sintéticas descritas na literatura para a produção do MDMA, **Figura 16**. As duas primeiras consistem na conversão do PMK pela reação de Leuckart's ou pela aminação redutiva. O terceiro método utiliza como material de partida o safrol via reação de bromação [51].



Figura 16. Rotas sintéticas do ecstasy.

# I.4.1.2 1-(3-Clorofenil)-piperazina (m-CPP)

Novas classes de drogas sintéticas estão sendo utilizadas no mercado ilícito, principalmente nos países da Europa. Dentro deste grupo de substâncias, pode-se destacar os derivados da piperazina, introduzidos no mercado como alternativas dos anfetamínicos e são vendidos livremente na internet na forma de pó, cápsulas ou comprimidos. Na maioria das vezes, essas substâncias estão presentes ou misturadas com outros compostos psicoativos, como ecstasy. Os derivados da piperazina incluem a benzilpiperazina (N-BZP), 1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina (MDBP), (TFMPP), meta-clorofenilpiperazina triflúormetilfenilpiperazina (*m*-CPP) 1.4е metoxifenilpiperazina (MeOPP), Figura 17. Todos possuem a estrutura básica da piperazina [51]. Estes compostos vêm se popularizando, sendo vendidos em festas de raves e night clubs, causando diversos efeitos tóxicos e em alguns casos, podendo levar o usuário a morte. Entre esses compostos, destaca-se a m-CPP. Ela estimula a liberação de serotonina. através de interações com neurônios serotoninérgicos, receptores adrenérgicos e dopaminérgicos [56,57], causando efeitos que são semelhantes aos da euforia provocada pelos anfetamínicos e às alucinações do LSD e mescalina.



Figura 17. Estruturas dos derivados da piperazina.

A principal aplicação legal da *m*-CPP é destinada à produção de trazodona (antidepressivo) e outras três substâncias (nefazodona, etoperidona e mepiprazola). No Brasil, em novembro de 2008, a *m*-CPP foi incluída na portaria 344 de 12.05.98 da ANVISA, na lista F (lista das substâncias de uso proscrito no Brasil) e na lista F2 (lista das substâncias psicotrópricas) [51].

O gráfico mostrado na **Figura 18** ilustra informações fornecidas pela Polícia Federal sobre a quantidade de comprimidos apreendidos de *ecstasy* em todo território Nacional, no período de 2004-2008. Pode-se observar um grande aumento na quantidade de comprimidos apreendidos.



**Figura 18.** Apreensões dos comprimidos de *ecstasy* no período de 2004-2008 pela Polícia Federal [58].

Inicialmente, a *m*-CPP era apenas apreendida na forma de comprimidos sem logo, arredondados e de coloração amarela. Entretanto, em meados de 2005 na Holanda, outras características físicas foram observadas nos comprimidos, como: colorações branco-acinzentados ou branco-amarelados e pequenas manchas multicoloridas. Hoje, os comprimidos de *m*-CPP têm sido apreendidos em diversas cores, formas, tamanhos e com ou sem logos, sendo impossível uma distinção visual para a classificação dos comprimidos apreendidos como *ecstasy* em MDMA e *m*-CPP [56]. A **Figura 19** mostra alguns comprimidos de *m*-CPP e MDMA apreendidos pela Polícia Técnico-Científica do Rio de Janeiro e a Polícia Federal.



Figura 19. Comprimidos vendidos como ecstasy: m-CPP (esquerdo) e MDMA (direito).

# I.4.1.3 LSD

A dietilamida do ácido lisérgico (LSD), **Figura 20**, descoberta por Hoffman em 1938, é a substância de maior poder alucinógeno conhecida. O LSD foi estudado e usado terapeuticamente por muito tempo em diversos países; no Brasil ele é uma substância de uso proibido para todo e qualquer fim, proibição essa balizada por leis e regulamentações específicas [59]. A síntese do LSD consiste, basicamente, de três etapas: (a) reações de clivagens de amidas derivadas do alcalóide do *ergot*, usando hidrazina anidra. O produto da reação (b) hidrazina do ácido lisérgico reage com 2,4-pentanodiona, formando o intermediário pirazol, que por fim, reage com (c) dietilamina, formando o LSD [60]. Ilegalmente, o LSD é vendido na forma de selos (*blotter papers*), onde a dose vendida varia de 40-120 μg e custa de US\$ 3-5 [61].

A partir de 2004, entretanto, alguns materiais suspeitos, sob a forma de selos, passaram a apresentar resultados negativos para o LSD. Os espectros de FTIR, por exemplo, eram bastante semelhantes aos espectros de LSD, tornando-se necessário determinar qual a nova substância que estava sendo apreendida [59]. Esta substância era o 9,10-diidro-LSD, que até o momento não se encontra proscrita na lista de substâncias entorpecentes. Em 2004, Clare [62] correlacionou a atividade de espécies como as tripitaminas alucinógenas, LSD e 9,10-diidro-LSD com parâmetros de lipofilicidade, substituintes amina e a conformações de orbitais moleculares. O autor descobriu que a atividade dessas espécies são, principalmente, associadas a conformação dos nodos em orbitais  $\pi$  ocupados. Ele sugere que a droga 9,10-diidro-LSD é completamente inativa.

Além do 9,10-diidro-LSD, outras drogas já foram encontradas na forma de selos, entretanto, com menor frequência. São elas: 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB) [63] e bromobenzodifuranilisopropilamina (ABDF) [64]. A **Figura 20** mostra a estrutura do LSD e do 9,10-dihidro-LSD.



Figura 20. Estrutura do LSD e 9,10-diidro-LSD.

### I.4.1.4 Cocaína

A cocaína é um alcalóide encontrado e isolado de folhas do vegetal *Erytroxylum coca Lam*, um arbusto ramificado originário da zona tropical dos Andes. Ilegal em vários países do mundo, a cocaína pode ser comercializada, principalmente sob duas formas: **a**) na forma de cloridrato; ou **b**) na forma de base livre (pasta base, cocaína base livre, merla, *free-base* e *crack*). A principal diferença entre as formas está na via de administração: o cloridrato, normalmente um pó branco e cristalino, é administrado por via intravenosa e por inalação intranasal, já a cocaína base livre é administrado via intrapulmonar, por apresentar baixo ponto de fusão e volatilizar-se em torno de 95 °C. Com um menor custo do que o cloridrato de cocaína, a "pedra" ou *crack* é hoje uma das drogas em grande expansão no mercado ilícito, principalmente entre os indivíduos de classes populacionais de menor poder aquisitivo [51].

### I.4.2 Documentoscopia

A Documentoscopia é a parte da criminalística que estuda os documentos para verificar se são autênticos e, em caso contrário, determinar a sua autoria. Ela se distingue

de outras disciplinas, que também se preocupam com os documentos, porque tem um cunho nitidamente policial: não se satisfaz com a prova da ilegitimidade do documento, mas procura determinar quem foi o seu autor e os meios empregados.

A primeira fabriqueta de dinheiro falso no Brasil foi descorbeta em 1731, no Rio de Janeiro. Os falsários e seus auxiliares, por sentença, foram condenados à morte e executados um ano depois. No passado, a introdução de dinheiro falso no nosso meio já constituia uma calamidade nacional. Logo após a proclamação de nossa Independência, a contrafação de moedas de cobre foi de tal monta que, na praça, as falsas corriam paralelamente às autênticas e até repartições arrecadadoras e pagadoras não as diferenciavam [65].

Atualmente, toda a atenção dos falsários moedeiros está voltada para o papel-moeda nacional e estrangeiro, daí a preocupação da casa da moeda em sempre buscar e melhorar os elementos de segurança presentes no papel-moeda.

As cédulas do papel-moeda monetário atual (Real) apresentam vários elementos de segurança, usados principalmente no papel e no processo de impressão. O papel com que são impressas as cédulas é constituído de três camadas justapostas, formando um todo inseparável (camadas externas são de celulose de madeira, e a interna de celulose de algodão). Na camada interna, também chamada de Linden, são colocados vários elementos de segurança [65]:

a) Filetes coloridos – afloram à superfície;

b) Fita magnética – aciona as modernas contadoras de papel-moeda e é facilmente observável;

c) Filetes fluorescentes – Apenas observados com efeitos de raios ultravioletas;

d) Filigrana, também chamada de marca d'água, representado pelo símbolo da República.

Três são os processos de impressão usados na feitura das cédulas. São eles:

a) Calcográfico: que oferece relevo ao tato. Com eles são impressos, no anverso e reverso da cédula, imagem latente, próxima à inscrição do valor literal da cédula, e as microletras *BCBCB*.

b) Off-set: o fundo de segurança e o registro de superposição, impressos, no mesmo local, de uma e outra fase da cédula, representa as armas da República. A exata superposição e complementação das cores só pode ser observada por transparência.

Ainda, esse processo permite que, na trama do fundo de segurança, a impressão da palavra FALSA, não fique identificada em uma observação comum. Numa cópia xerox, entretanto, a expressão *Falsa*, repetidamente, fica gravada.

c) Tipográfico: São impressas as numerações alfanuméricas das cédulas.

Nos anos 40, não tendo os falsários meios para reproduzir os índices de segurança das cédulas em circulação, dificilmente apareciam cédulas falsas – elas eram falsificadas mediante elevação do seu valor. A princípio, a técnica de alteração era grosseira e consistia, simplesmente, no transplante de uma cédula para outra, de recortes contendo cifras e dizeres. É evidente que um exame atento da cédula denunciava a falcatrua, pois os recortes eram superpostos e, com isso, ficavam em relevo, perceptíveis ao tato. Naquela época, as cédulas mais alteradas foram as de dez mil réis para cem mil réis e as de dez cruzeiros para quinhentos cruzeiros.

Com o passar dos anos, os falsários aprimoraram a sua técnica. As cédulas brasileiras eram impressas nos Estados Unidos, pelo American Bank note Company, tendo o suporte constituído de duas lâminas de papel justapostas. Colocadas as cédulas dentro de um recipiente com água, depois de algum tempo, as lâminas de papel podiam ser separadas. Dava-se início ao processo da "indústria" de cédulas falsificadas. Após separadas as duas lâminas, numa delas o falsário retirava um recorte contendo o valor numérico e literal da cédula. Justapostas novamente, aqueles claros eram preenchidos com outros recortes, com o novo valor. Com o aparecimento das cédulas do padrão *cruzeiro*, que eram impressas numa lâmina simples de papel, essas modalidade de fraude desapareceu. Atualmente, não se alteram cédulas, mas são falsificadas totalmente, onde o processo mais usado é o *off-set.* As **Figuras 21a-d** mostram algumas fotografias de casos reais de falsificações de cédulas de 20, 50 e 100 reais [65].



Figura 21. a) cédula de 100 reais, impressa em cédula lavada de um real. Abaixo, uma cédula de um real autêntica sem o fio de segurança; b) uma fotografia de uma cédula antiga de um real, vendo-se o fio de segurança que posteriormente foi abolido. Abaixo, uma cédula de um real após ter sua impressão lavada quimicamente; c) cédula falsa de vinte reais onde, no lugar da faixa holográfica, encontra-se uma faixa de papel metalizado;
d) cédula falsa de cinquenta reais impressa em uma cédula lavada de cinco reais.

### I.4.3 Adulteração de Combustível

A adulteração de combustível é um caso preocupante e de grande ocorrência em todo o território nacional, levando a Agência Nacional do Petróleo – ANP – a intensificar esforços no sentido de coibir essa ação ilícita. O uso de gasolina adulterada traz diversas consequências, sendo que as primeiras a serem notadas pelos consumidores são os danos provocados no veículo. Uma gasolina com excesso de álcool anidro provoca a desregulagem do motor e o aumento do consumo de combustível. A adição de solventes como o tolueno provoca a deterioração de tubos e mangueiras de borracha. Além da ação sobre o veículo, o uso de combustíveis adulterados afeta o meio ambiente, uma vez que, na combustão, são usados aduterantes contendo alto teor de compostos de N e S, aumentando a emissão de gases tóxicos como NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub> [66].

O combustível com maiores índices de adulteração é a gasolina, uma mistura de hidrocarbonetos obtidos do refino do petróleo, sendo constituída, principalmente, por compostos contendo entre 4 e 12 átomos de carbono, cuja faixa de destilação varia de 30 a 220 °C, sob pressão atmosférica [66].

A adulteração da gasolina envolve a modificação de sua composição original através da adição de álcool etílico anidro em porcentagens superiores ao estabelecido pela ANP; e solventes diversos, como refinados petroquímicos e diesel. Dentro desse trabalho, será enfatizada a adulteração de gasolina por outros derivados de petróleo como querosene e o diesel.

O querosene, também conhecido como parafina ou óleo parafínico, era o principal produto desejado pela indústria do refino de petróleo até o surgimento dos motores de combustão interna. O querosene é constituída basicamente por hidrocarbonetos entre 8 e 18 átomos de carbono, cuja faixa de destilação varia de 150 a 300 °C, sob pressão atmosférica [67]. Já o diesel é um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil e com odor forte e característico. Ele é formulado por moléculas de 8 a 40 átomos de carbono, sendo, portanto mais pesado do que a gasolina [66].

Para controlar a prática da adulteração da gasolina pela adição de solventes, o governo brasileiro tem desenvolvido e implementado um programa que determina o uso de marcadores químicos com o objetivo de monitorar possíveis fraudes cometidas à gasolina [68,69]. Entretanto, esse procedimento apresenta um custo elevado. Inúmeros trabalhos têm sido registrados na literatura aplicando a técnica GC-MS no controle da qualidade da gasoline [70,71]. A interpretação dos dados, entretanto, não é tão simples e tratamentos quimiométricos são necessários [72,73]. Neste trabalho, propõe-se uma nova metodologia para detectar a presença de adulterantes na gasolina de forma rápida, simples e segura.

# Capítulo II

# Objetivos

# II. Objetivos

# **II.1 Objetivos Gerais**

Desenvolver novas metodologias analíticas, usando principalmente a espectrometria de massas para solucionar problemas relacionados à análise de drogas de abuso, papelmoeda, documentos e gasolina adulterada.

# II.2 Objetivos Específicos

# II.2.1 Drogas de Abuso

- Estudar o perfil químico de drogas sintéticas vendidas como ecstasy.
- Analisar drogas semi-sintéticas como LSD e 9,10-Diidro-LSD.
- Identificar a presença de isômeros orto/meta/para-clorofenilpiperazina, em

amostras comerciais vendidas como *ecstasy*, suspeitas de conterem *m*-CPP.

• Analisar o perfil inorgânico de drogas de abuso.

# II.2.2 Documentoscopia

• Obter *Fingerprints* químicos do papel-moeda: Real, Dólar e Euro;

• Analisar documentos de certificação de registro de licenciamento veicular (CRLV);

# II.2.3 Adulteração de Combustível

Analisar derivados de petróleo e misturas de gasolina/querosene e gasolina/diesel;



## III. Drogas de Abuso

# III.1 Introdução

Neste capítulo foi investigado o perfil orgânico e inorgânico de várias drogas de abuso. O estudo foi dividido em cinco tópicos: **a**) drogas sintéticas vendidas como *ecstasy: m*-CPP e MDMA; **b**) LSD e 9,10-Diidro-LSD; **c**) estudo da mobilidade iônica (IMMS) dos isômeros *orto/meta/para*-clorofenilpiperazina (*o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP); **d**) Análise de comprimidos de *ecstasy* por CCD/EASI-MS; e **e**) estudo do perfil inorgânico de drogas de abuso por Fluorescência de Raios-X. As técnicas empregadas dentro de cada tópico mencionado são mostradas no fluxograma da **Figura 22**.





# **III.2 Procedimento Experimental**

# III.2.1 Reagentes e Amostras

a) Solventes: Metanol grau-HPLC, ácido fórmico e hidróxido de amônia foram obtidos da Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA). Clorofórmio (CHCI<sub>3</sub>), isopropanol, (CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH) e ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) foram obtidos da Merck S.A.

**b) Drogas de Abuso:** Trinta comprimidos vendidos como *ecstasy* foram apreendidos pela Policia Civil do Estado do Rio de Janeiro e foram caracterizadas pelo nosso laboratório. Soluções padrões (1 mg mL<sup>-1</sup>) de MDMA, 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), metilenodioxianfetamina (MDA), quetamina, cafeína, metanfetamina e anfetamina foram obtidos pela Radian (Austin,TX, USA). Vinte e seis amostras de LSD foram apreendidas pela Polícia Federal Brasileira e Civil do Rio de Janeiro. Padrões de *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP foram obtidos pela Radian (Austin,TX, USA) e dez amostras suspeitas de

apresentarem *m*-CPP foram fornecidas pelo Hospital das Clínicas da Unicamp, dissolvidas em metanol (1 mg L<sup>-1</sup>).

### III.2.2 Caracterização

### III.2.2.1 EASI-MS

Os experimentos foram realizados utilizando um espectrometro de massas com um único quadrupolo como analisador (LCMS- 2010EV-Shimadzu Corp., Japan), equipado com uma fonte EASI *home-made*. Um spray ácido foi preparado, sendo constituído de ácido fórmico em metanol (0,1 % v/v), sob uma vazão de 20  $\mu$ L min<sup>-1</sup> e N<sub>2</sub> a uma pressão de 7 bar. O ângulo existente entre a entrada do espectrômetro e a fonte de ionização foi de  $\approx$  45 °. Cada amostra foi analisada diretamente pelo EASI-MS, sem qualquer preparo de amostra. O tempo necessário para a análise de cada amostra foi de  $\approx$  10 s.

Para confirmar a estrutura de alguns compostos identificados sobre a superfície dos comprimidos de *ecstasy*, experimentos de ESI-QTOF *(electrospray ionization quadrupole time-of-flight)* com resolução e exatidão de massas de 5.000 e 50 ppm, respectivamente, foram realizados. Neste caso, é necessário a preparação da amostra a uma concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>. As condições usadas foram as seguintes: **(a)** voltagem do capilar: 3 kV; **(b)** voltagem do cone: 8 V; **(c)** temperatura de dessolvatação do gás: 100 °C; **(d)** *Collision-induced dissociation* (CID): 4-40 eV.

# III.2.2.2 Electrospray Ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FT-ICR-MS)

Para os experimentos de ESI-FT-ICR-MS, uma concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> foi preparada em uma solução de metanol acidificado (0,1 % de ácido fórmico). A infusão direta no equipamento foi feita utilizando uma fonte automatizada nano-ESI (Advion BioSciences, Ithaca, NY). Um volume de 100 μL de amostras foi colocado em placas de amostragem de 96 poços e analisadas por um espectrômetro de massas 7.2T LTQ FT Ultra. As condições gerais de ESI foram: **a**) pressão do gás: 0,3 psi; **b**) voltagem no capilar: 1,55 kV; e **c**) vazão de injeção: 250 nL min<sup>-1</sup>. Os espectro de massas foram obtidos após o processamento de 100 *microscans* via *software Xcalibur 2.0*. Modificando a fonte, experimentos de EASI-FT-ICR-MS também podem ser realizados neste equipamento.

### III.2.2.3 Espectrometria de Mobilidade lônica

As medidas de mobilidade iônica e de espectrometria de massas foram feitas usando o espectrômetro de massas com "travelling wave ion mobility" Synapt HDMS (Waters Corp., Milford, EUA), equipado com uma fonte de ionização do tipo ESI. Soluções de 1 mg L<sup>-1</sup> dos isômeros o-CPP, m-CPP e p-CPP e misturas desses isômeros (1:1:1) foram preparadas em metanol acidificado com 0,1 % de ácido fórmico, sendo infundidas diretamente no equipamento pela fonte de ESI, utilizando uma bomba de seringa com vazão de 5,00 L min<sup>-1</sup>. Espectros de massas foram adquiridos no modo positivo de íons. Os íons de *m/z* 197, referentes aos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP *e p*-CPP protonados, foram selecionados no guadrupolo. As celas trap e transfer foram operadas a pressões de 10<sup>-2</sup> mbar de argônio. Num primeiro experimento, a cela de mobilidade foi preenchida com hélio (He) e uma condição ótima de pressão de 4,0 mbar foi utilizada. Outros gases foram testados na cela de mobilidade: nitrogênio (N<sub>2</sub>) a 3,0 mbar e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 1,5 mbar. A velocidade da onda de potencial foi mantida em 250 m/s em todos os experimentos enguanto que a altura da onda variou de 5 a 30 V, dependendo da pressão e gás utilizados, de forma a manter os picos de mobilidade sempre no centro do espectro. Após a otimização das condições operacionais, dez soluções suspeitas de conterem m-CPP em amostras de *ecstasy* foram investigadas.

## III.2.2.3.1 Cálculos de Seção de Choque de colisão (CCS)

As estruturas para os íons dos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP monoprotonados nos nitrogênios secundário ou terciário, foram construídas e pré-otimizadas em termos de geometria de equilíbro pelo método semi-empírico PM3, **Figura 23.** Após a pré-otimização, as estruturas foram novamente otimizadas pelo método funcional de densidade B3LYP, com funções de base 6-31G\*, utilizando-se o *software* Spartan 08 v1.2.0. O programa foi configurado para fornecer a distribuição de cargas do tipo Mulliken, sendo estes valores utilizados no cálculo dos valores de CCS.
# Protonação no N secundário



**Figura 23.** Estruturas pré-otimizadas para os íons dos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP monoprotonados nos nitrogênios secundário ou terciário.

Valores de CCS teórico foram estimados por meio do software MOBCAL [74,75] disponível livremente. Três diferentes métodos com graus de complexidade crescentes foram empregados: o método da projeção (PA), o método do espalhamento de esferas rígidas (EHSS) e o método da trajetória (TM). O código disponível para o MOBCAL foi ajustado de forma a considerar como gases de mobilidade: N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, além do padrão He, substituindo-se os valores de massa e polarizabilidade por valores apropriados para os outros gases. Todos os cálculos foram realizados em um Intel Core2Quad Q9550 (2833 MHz) com 4096 MB SDRAM DDR2, operando com Windows XP 64-bit SP2 (Spartan 08 v.1.2.0) ou Ubuntu v.9.04. 64-bit (MOBCAL).

# III.2.2.4 Fluorescência de Raios-X (XRF)

As amostras foram submetidas à irradiação, usando-se o equipamento de bancada de ED-XRF (SHIMADZU, EDX 700), com tubo de raios-X de Ródio (Rh) e detector semicondutor de Si(Li). O tempo de irradiação sob ar foi de 250 s. As demais condições foram: tempo morto do detector de Si(Li) de 25 %, 3 mm de colimação do feixe, 50 kV de voltagem, 100  $\mu$ A de corrente aplicada ao tubo de raios-X de Rh. A faixa de energia foi de 0 a 40,96 keV, com passo de 0,02 keV, resultando em 2048 pontos para cada espectro. Para as amostras na forma de comprimido, os mesmos foram moídos e colocados dentro de celas de teflon cobertas com filme de Mylar<sup>TM</sup> (3  $\mu$ m de espessura). As amostras foram irradiadas em triplicata e os resultados foram, posteriormente, tratados usando quimiometria.

# III.2.2.5 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS)

As análises por GC-MS foram realizadas usando um equipamento da *Thermo Scientific* (Austin, Texas), modelo ITQ 700. A taxa de aquisição foi de 3 scans s<sup>-1</sup>, operando no modo *splitless*, com gás de arraste He em vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. O analisador de massas com fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) foi operado a uma voltagem de 70 eV e temperatura de aquecimento a 250 °C. O sistema de injeção do GC também foi mantido a 250 °C.

Soluções padrões de cafeína (1 mg mL<sup>-1</sup>) foram injetadas manualmente. O programa de aquecimento usado no forno do cromatógrafo foi: **(a)** temperatura inicial de 130 °C, durante 1 min; **(b)** um aumento até 280 °C a uma taxa de 17 °C min<sup>-1</sup>; e (c) aquecimento constante a 280 °C durante 11 min.

# III.2.2.6 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Placas cromatográficas (Sílica gel 60 GF 254, Merck, 6100 Darmstadt, Germany) foram ativadas durante 30 min a 80 °C e armazenadas. Posteriormente, 3 µL de soluções padrões de MDMA, MDEA, MDA, cafeína, quetamina e vinte e cinco soluções de amostras de *ecstasy* foram aplicadas nas placas cromatográficas. As placas foram eluídas em uma câmara horizontal (Camag, Switzerland). Quatro diferentes fases móveis foram estudadas: CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (50/50 v/v %); CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH (20/75/5 v/v/v %); CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH

(98/2 v/v %); and CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH/NH<sub>4</sub>OH (95/5 v/v %). A revelação das manchas foram feitas usando luz ultravioleta (UV) a 254 nm.

## III.2.2.7 Tratamento Quimiométrico – Análise de Componentes Principais (PCA)

Para os dados de MS, os espectros foram acumulados, centrada na média e alinhados para construção das matrizes. No caso das amostras de *ecstasy*, por exemplo, uma matriz 60 X 600 (amostras x variáveis (m/z 50-800)) foi construída. Um procedimento similar foi realizado com os dados obtidos a partir das medidas de XRF, onde uma matriz 90 X 2048 foi construída (amostras x variáveis, valores de keV do espectro). Os dados foram processados usando o programa *Pirouette v. 3.11*.

## **III.3 Resultados**

# III.3.1 Drogas sintéticas vendidas como *ecstasy*: 1-(3-clorofenil)-piperazina (m-CPP) e MDMA

Dos trinta comprimidos vendidos como *ecstasy*, visualmente, quatro não apresentaram nenhum tipo de logo, sendo evidências iniciais que levaram a suspeitar que esses comprimidos contenham o ingrediente ativo m-CPP. A **Figura 24a** mostra, de uma maneira geral, como são os espectros de EASI(+)-MS para esses comprimidos. Analisando o perfil químico do espectro, observa-se que o princípio ativo é detectado como molécula protonada ( $[M + H]^+$ : m/z 197). Como excipientes, lactose (na forma de adutos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>: m/z 365 e 381, respectivamente), *clusters* de glicose ( $[G_3 - 2H_2O + Na]^+$ : m/z 527 e  $[G_3 - 2H_2O + K]^+$ : 543) e vários oligossacarídeos (m/z 600-900) foram também detectados. Entre os oligossacarídeos observados, adutos de Na<sup>+</sup> (m/z 605, 633, 661, 689, 717, 745, 773 e 801) e de K<sup>+</sup> (m/z 621, 649, 677, 705, 733, 761, 789, 817) são identificados. Os símbolos A, B, X e Y mostrados na **Figura 24a** correspondem a padrões de clivagem glicosídicas [76,77]. A presença desses oligossacarídeos fornecem um aspecto diferenciado para esses comprimidos que, consequentemente, acabam apresentando uma textura maleável e flexível, podendo ser comparado a um chiclete.

A **Figura 24b** mostra o espectro de EASI(+)-MS para uma amostra de *ecstasy* contendo o ingrediente ativo MDMA. O MDMA é identificado como molécula protonada,  $([M+H]^+: m/z \ 194)$ . Adicionalmente, fragmentos característicos ( $m/z \ 163$ , 135 e 105) da molécula são também observados. Como excipiente, lactose foi identificada ( $[M+Na]^+: m/z$ 

365), podendo atuar como adoçante. O sinal de m/z 423 corresponde a um sal protonado de hidrocloreto de MDMA formado por duas moléculas de MDMA e uma de ácido clorídrico [2MDMA + Cl + 2H]<sup>+</sup>.





As estruturas dos íons de m/z 194 e 423 foram confirmadas via experimentos de ESI(+)-MS/MS, **Figura 25a-b.** O espectro de ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 194 forma íons de m/z 163, 135 e 105. Já para o íon de m/z 423, o ESI(+) MS/MS gera o íon [MDMA + H]<sup>+</sup> de m/z 194 como fragmento principal. Essa estrutura nunca foi relatada na literatura

utilizando experimentos de MS a condições ambientes. Logo esse sinal serve como íon marcador na identificação de MDMA em comprimidos de *ecstasy*.

Os experimentos de ESI(+)-MS/MS foram também realizados para os sinais de m/z197 (**Figura 26a**), 365 e 527 (**Figura 26 b-c**), respectivamente. O ESI(+)-MS/MS do m/z197 envolve, inicialmente, a clivagem do anel piperazina (perda neutra de -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), produzindo o íon de m/z 154. Subsequentemente, outras perdas neutras ocorrem (- H-Cl e CH<sub>2</sub>=NH), produzindo os íons de m/z 118 e 91 (íon tropílio), respectivalmente. A presença de um átomo de cloro na molécula gera um padrão isotópico característico, onde o sinal do [M+2] m/z 199 apresenta 1/3 da intensidade relativa do [M+1] m/z 197, o que corrobora para a identificação do m-CPP, **Figura 24a**. Quando se usam analisadores do tipo TOF, uma maior exatidão e resolução nos valores m/z são obtidos. Para o íon de m/z 197, o valor de m/z experimental foi de 197,088. Esse resultado concorda com o valor teórico (m/z = 197,085). Além do m-CPP, outros dois isômeros de posição poderiam estar presentes: o-CPP e p-CPP. Todos têm o mesmo valor de m/z e, portanto, os mesmos valores de massas exatas. A Legislação Brasileira enquadra apenas o isômero *meta* como de uso proscrito. Portanto, dentro desse trabalho, um estudo mais aprofundado sobre os isômeros da CPP será realizado por experimentos de mobilidade iônica, unidade **III.3.2**.



Figura 25. ESI(+)-MS/MS para os íons de *m/z* 194 e 423.

O espectro de ESI(+)-MS/MS para a molécula de lactose (*m/z* 365) é mostrado na **Figura 26b**, onde íons fragmentos de *m/z* 347, 305, 203 e 185 são observados. Nyadong *et al.* [78] conseguiram distinguir moléculas de lactose e sacarose analisando os framentos produzidos em experimentos de MS/MS. A presença dos ions de *m/z* 347 e *m/z* 305 servem como ions diagnósticos para a identificação de moléculas de lactose. Ambos os sinais são formados via perdas neutras de H<sub>2</sub>O e duas moléculas de formaldeído (CH<sub>2</sub>O), respectivamente. Logo, pode-se atribuir os sinais correspondentes ao dissacarídeo observado nos comprimidos de *m*-CPP oriundos da molécula de lactose. Os demais sinais de *m/z* 203 e 185 são formados via clivagens de ligação glicosídica, gerando íons [monosacarídeo + H + Na]<sup>+</sup> e [monosacarídeo – H<sub>2</sub>O + H + Na]<sup>+</sup>, respectivamente.

A **Figura 26c** corresponde ao ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 527, [G<sub>3</sub> – 2 H<sub>2</sub>O + Na<sup>+</sup>], onde G = glicose. A fragmentação desse composto gera a formação de um dissacarídeo via eliminação de uma unidade de glicose (m/z 365). A mesma analogia poderia ser feita ao íon de m/z 543 (**Figura 24a**).



**Figura 26.** ESI(+)-MS/MS para os sinais de (a) m/z 197, (a) m/z 365 e (b) m/z 527 presentes em comprimidos de *m*-CPP.

O PCA foi usado para avaliar o desempenho dos *fingerprints químicos* obtidos usando a técnica EASI-MS para as análises de *m*-CPP e seus excipientes em comprimidos de *ecstasy*. A **Figura 27** mostra os gráficos de *scores* (**Figura 27a**) e *loadings* (**Figura 27b**) para todas os comprimidos de *ecstasy* analisados. No gráfico dos *scores*, (**Figura 27a**), as 3 PC, explicam 40,4 % da variância total, separando os comprimidos de *ecstasy* em 3 grandes grupos: comprimidos contendo *m*-CPP em baixa concentração (*m*-CPP 1 e *m*-CPP 2), alta concentração (*m*-CPP 3 e *m*-CPP 4) e o restante dos comprimidos contendo, em sua maioria, o princípio ativo MDMA.

A **Figura 27b** mostra os gráficos dos *loadings*, onde é possível enfatizar quais as variáveis mais significativas para o agrupamento ou separação das amostras. Para o grupo das amostras de *ecstasy*, as variáveis com m/z 105, 135, 163, 194, 195, 423, 424 e 425 são as mais importantes, onde todos os sinais (com exceção do m/z 195)

correspondem a molécula de MDMA. O íon de m/z 195 corresponde a molécula da cafeína protonada, normalmente presente como adulterante. Para os dois outros grupos contendo m-CPP em diferentes concentrações, as variáveis de m/z 197 and 199 estão mais próximas das amostras de m-CPP 3 e m-CPP 4 (que apresentam maior concentração). Portanto, é possível classificar as amostras contendo m-CPP em função da concentração do ingrediente ativo, usando a técnica EASI-MS.



**Figura 27.** Gráficos de (a) *scores* e (b) *loadings* para os resultados obtidos para os espectros de EASI-MS das amostras de *m*-CPP e *ecstasy*.

Uma melhor classificação das amostras de *ecstasy* foi obtida quando se exclui da matriz do PCA, as amostras contendo m-CPP. Comparando com os valores da variância total explicada pela **Figura 27a**, as 3 PCs conseguiram explicar, em um novo processamento dos dados, uma maior quantidade de informação, 83,2 %. Através dos dados de PCA, foi observado a formação de um novo grupo de amostras, separadas pelos demais comprimidos de *ecstasy*. Essas amostras não apresentam MDMA. Em seu lugar, o anastésico lidocaína ([M + H]<sup>+</sup>: m/z 235) e um derivado de metanfentamina (m/z 254) foram identificados.

# III.3.2 Estudo da Mobilidade lônica (IMMS) dos isômeros *orto/meta/para*clorofenilpiperazina (*o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP)

A espectrometria de mobilidade iônica (IMS) separa íons de mesmos valores de m/z, desde que suas conformações, configurações espaciais ou cargas das espécies investigadas sejam diferentes. O acoplamento do IMS com a MS é geralmente referido como IMMS. Enquanto que a MS mede a razão m/z dos íons, a IMS adiciona uma nova dimensão aos dados, conferindo para cada valor de m/z, um espectro de *drift time* [34]. Para estudar a mobilidade iônica de uma mistura é importante calcular a resolução (R<sub>s</sub>) entre os picos de mobilidade que é dada pela equação 5:

$$R_{s} = 2 \Delta t d / (w_{1} + w_{2})$$
(5)

onde  $\Delta$ td é a diferença entre o *drift time* de dois isômeros e w é a largura a meia altura do pico de mobilidade de cada isômero. Baseado nestas características, se faz necessário o desenvolvimento de uma metodologia que identifique todos os isômeros da clorofenilpiperazina (*o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP), já que os isômeros *o*-CPP e *p*-CPP não estão na lista de substâncias proscritas.

Inicialmente, com o objetivo de estudar qual é o melhor *drift gas* para separar uma mistura equimolar contendo os três isômeros, três gases foram testados, apresentando diferentes valores de polarizabilidades e massas molares, **Tabela 1**.

Drift gas	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Polarizabilidade (10 <sup>-24</sup> cm <sup>3</sup> )
Hélio (He)	4,0026	0,2050
Nitrogênio (N <sub>2</sub> )	28,0123	1,7403
Dióxido de carbono	44,0098	2,9110
(CO <sub>2</sub> )		

**Tabela 1.** Gases utilizados na cela de mobilidade e suas respectivas massas e dipolo de polarizabilidade estático médio [79].

Uma solução de 1 mmol L<sup>-1</sup> de cada isômero foi separadamente infudida na fonte de ESI(+). A **Figura 28** mostra os espectros de mobilidade iônica obtidos para esses isômeros, usando diferentes *drift gases*: (a) He, (b) N<sub>2</sub> e (c) CO<sub>2</sub>. Quando o He é usado

como *drift gas*, obtém-se uma leve separação do isômero *o*-CPP, em relação aos isômeros *m*-CPP e *p*-CPP, usando uma pressão ótima de 4,0 mbar. O R<sub>s</sub> referente aos isômeros *o*-CPP e *p*-CPP foi de 0,28, **Figura 28a**. Quando substitui-se He por N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, **Figura 28b-c**, uma melhor separação do isômero *o*-CPP em relação aos isômeros *m*-CPP e *p*-CPP ocorre. Uma condição ótima é obtida quando se trabalha com o gás CO<sub>2</sub> ( $R_{s(o,p)} = 1,10$ ). Assim, o aumento da polarizabilidade e da massa molar do *drift gas* tem grande influência na separação do isômero *o*-CPP. Em todos os casos, a mobilidade iônica dos isômeros *m*-CPP e *p*-CPP e *p*-CPP é idêntica. A **Figura 28d** mostra a mobilidade iônica para misturas equimolares dos três isômeros, onde o primeiro pico observado a 5,13 ms é referente ao *o*-CPP e o segundo, a 5,85 ms, a mistura dos outros dois isômeros, *m*-CPP e *p*-CPP.

A fim de averiguar a capacidade da técnica na identificação dos isômeros presentes em casos reais de drogas de abuso vendidas como *ecstasy*, a mobilidade iônica de dez amostras, fornecidas pelo Hospital das Clínicas da Unicamp, foram determinadas utilizando como *drift gas* o CO<sub>2</sub>, **Figura 28e**. Todos os resultados mostraram a presença de um único pico a 5,80 ms. Provalmente, um único isômero (*m*-CPP ou *p*-CPP) ou uma mistura de *m*-CPP e *p*-CPP deverá estar presente na amostra. Uma discussão mais detalhada pode ser feita quando o processo de síntese do *m*-CPP é estudado.

A principal rota sintética utilizada para a produção do *m*-CPP é a reação de *m*cloroanilina com bis(2-cloroetil)amina ou a reação da piperazina com *m*-diclorobenzeno. A síntese dos isômeros *o*-CPP e *p*-CPP pode ser realizada de maneira análoga. Entretanto, se a síntese do material de partida desses isômeros for realizada por laboratórios clandestinos, um grau de pureza elevado é de se esperar apenas para o isômero *m*cloroanilina. Isso se deve ao fato dos isômeros *o*-cloroanilina e *p*-cloroanilina serem produzidos via cloração da anilina. Logo, uma mistura de ambos deverá acontecer na síntese da clorofenilpiperazina [56,57].

Até 2005, a *m*-CPP era vendida comercialmente na forma de base ou sal com purezas de 95-98 % [80]. Os resultados obtidos neste trabalho corrobora com a hipótese de laboratórios comerciais terem desenvolvido o ingrediente ativo *m*-CPP. Caso essa droga fosse desenvolvida por laboratórios clandestinos, os mesmos não estariam preocupados com a qualidade do produto final. Por fim, os isômeros *o*-CPP e *p*-CPP não apresentam

atividade farmacológica. Essa informação fortalece a hipótese de que o único pico observado na **Figura 28e** corresponde ao isômero m-CPP.



**Figura 28.** Espectros de mobilidade iônica, analisando a influência dos *drift gases* na separação dos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP em (a) He, (b) N<sub>2</sub> e (c) CO<sub>2</sub>; (d) mistura equimolar dos três isômeros usando como *drift gas* CO<sub>2</sub>; e (e) amostras de *ecstasy* contendo provavelmente apenas *m*-CPP, usando CO<sub>2</sub> como *drift gas*.

Os resultados dos cálculos de CCS (Å<sup>2</sup>) para os íons dos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP, monoprotonados nos nitrogênios secundário (NB) ou terciário (NA), **Figura 29,** são mostrados na **Tabela 2**. Comparando os resultados obtidos pelos dois primeiros métodos utilizados (PA e EHSS), uma diferença significativa nos valores de CCS são observados para o isômero *o*-CPP em relação aos isômeros *m*-CPP e *p*-CPP, independente do sítio de protonação (NA ou NB). Esse resultado corrobora com os resultados dos experimentos de mobilidade iônica (IMMS).



**Figura 29.** Estruturas para os íons dos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP monoprotonados nos nitrogênios secundário (NB) ou terciário (NA).

**Tabela 2.** Cálculos teóricos de CCS ( $Å^2$ ) para os íons dos isômeros *o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP monoprotonados nos nitrogênios secundário (NB) ou terciário (NA) usando 3 diferentes métodos: PA, EHSS e TM.

	Sítio	CCS Teórico (Å <sup>2</sup> )								
Isômero	H <sup>+</sup>		ΡΑ			EHSS			ТМ	
		Не	N <sub>2</sub>	<b>CO</b> <sub>2</sub>	Не	N <sub>2</sub>	<b>CO</b> <sub>2</sub>	Не	N <sub>2</sub>	
~CPP	N <sub>A</sub>	84,64	84,64	84,64	89,48	89,48	89,48	81,71	103,45	123,77
0-OFF	$N_{B}$	83,92	83,92	83,92	88,56	88,56	88,56	82,25	113,82	137,43
m-CDD	N <sub>A</sub>	87,79	87,78	87,79	93,36	93,40	93,37	84,36	108,10	130,24
<i>III</i> -OFF	$N_{B}$	87,74	87,34	87,74	92,66	92,66	92,66	85,09	121,49	147,83
<i>p</i> -CPP	N <sub>A</sub>	87,90	87,90	87,90	92,71	92,71	92,71	84,42	106,74	125,47
	$N_{B}$	88,39	88,39	88,39	93,40	93,40	93,40	85,74	120,76	145,17

Quando se comparam os resultados obtidos pelo método TM, observa-se que os valores de CCS para um mesmo isômero varia em função do gás utilizado no cálculo teórico. Esse método, portanto, melhor se aproxima dos resultados experimentais obtidos. Além disso, a diferença de CCS observada entre um mesmo isômero aumenta quando se passa de He para  $N_2$  e CO<sub>2</sub>.

Para melhor avaliar o desempenho do método TM, a média dos valores de  $CCS_{NA}$  e  $CCS_{NB}$  foram comparadas entre os isômeros, **Tabela 3**. A diferença da CCS para o isômero *o*-CPP em relação aos isômeros *m*-CPP e *p*-CPP aumenta na seguinte ordem: He < N<sub>2</sub> < CO<sub>2</sub>. Esse resultado concorda com os valores de R<sub>s</sub> experimentais observados entre os isômeros.

laômoro	CCS TM (Å <sup>2</sup> )				
ISOINEIO	Не	N <sub>2</sub>			
(1) <i>o</i> -CPP	81,98	108,63	130,60		
(2) <i>m</i> -CPP	84,73	114,80	139,03		
(3) <i>p</i> -CPP	85,08	113,75	135,32		
(4) Média <i>m</i> -CPP + <i>p</i> -CPP	84,90	114,28	137,17		
Diferença (4) – (1)	2,92	5,65	6,57		

Tabela 3. Valores médios de CCS (CCS<sub>NA</sub> +CCS<sub>NB</sub>)/2 usando o método TM.

# III.3.3 LSD e 9,10-Diidro-LSD

O perfil químico de vinte e seis amostras vendidas como LSD foram investigados usando a técnica EASI(+)-MS. Entre elas, dezesseis amostras mostraram resultados positivos para o composto LSD, sete para uma nova substância, 9,10-diidro-LSD, e três apresentaram resultados negativos para ambas. A **Figura 30a** mostra o espectro de EASI(+)-MS para o LSD, obtido diretamente sobre a superfície do selo. O LSD foi detectado na forma de molécula protonada, ([LSD + H]<sup>+</sup>: m/z de 324). Cocaína também foi encontrada como contaminante, ([COCAÍNA + H]<sup>+</sup>: m/z de 304), em outras cinco amostras contendo LSD. Acoplando a fonte EASI a um equipamento híbrido o LTQ–FT Ultra, que possui um analisador do tipo LIT ( *linear ion trap*), experimentos de MS/MS foram realizados, **Figura 30b**.

O ESI-FT-ICR-MS permite obter dados de *m/z* contendo altíssima resolução e exatidão [19]. Resoluções de 1 milhão e um erro de massa menor que 1 ppm foram obtidos. A massa teórica e experimental para a estrutura do LSD protonada foi registrado,  $[C_{20}H_{25}ON_3 + H]^+$ , sendo 324,2070 e 324,2072, respectivamente. Isso correspondene a um erro de massa = 0,650 ppm. Outros íons de *m/z* 399, 421 e 556 são detectados no espectro de EASI-MS, **Figura 30a.** Resultados obtidos pela técnica EASI-FT-ICR-MS

permitem identificar as possíveis fórmulas estruturais e os valores de DBE (*double bound* equivalent = número de insaturações e anéis) sendo,  $[C_{24}H_{34}O_3N_2 + H]^+$ , 9;  $[C_{24}H_{34}O_3N_2 + Na]^+$ , 9; e  $[C_{32}H_{41}O_5N_2 + Na]^+$ , 13, respectivamente. Experimentos de EASI-MS/MS foram realizados para estas espécies: 556  $\rightarrow$  421 e 191; 421 $\rightarrow$  389, 348, 321, 191 e 147; e 399  $\rightarrow$  326. Estas espécies não estão associadas a nenhum alcalóide *ergot*, como ergovalina ( $[M+H]^+$ : m/z 534), ergotamina ( $[M+H]^+$ : m/z 582), ergocornina ( $[M+H]^+$ : m/z 562), ergocriptina ( $[M+H]^+$ : m/z 576) ou ergocristina ( $[M+H]^+$ : m/z 610) [81]. Os resultados de EASI-MS/MS e os valores de m/z relatados não são compatíveis, o que indica a existência de impurezas ou contaminantes provenientes da fabricação do selo e não do ingrediente ativo. A identificação dessas espécies podem ser extremamente importante para a classificação dessas amostras em função da sua origem de produção.



Figura 30. (a) EASI(+)-MS e (b) EASI(+)-MS/MS de LSD.

A **Figura 31a** mostra o espectro de EASI(+)-MS para as amostras contendo 9,10diidro-LSD,  $[9,10\text{-diidro-LSD} + H]^+$ : m/z de 326. Comparando com o experimento de EASI MS/MS realizado para a molécula de LSD, **Figura 31b**, os fragmentos de m/z 253 e 225, diferem de 2 unidades de massa para os fragmentos de m/z 251 e 223 do LSD, **Figura 30b**, o que caracteriza a hidrogenação na dupla ligação presente no carbono C9-C10. Este resultado corrobora com a estrutura do 9,10-diidro-LSD. As massas teórica e experimental também foram calculadas, onde, para a estrutura  $[C_{20}H_{27}ON_3 + H]^+$ , valores de 326,2227 e 326,2229 foram encontrados, respectivamente, e um erro de massa de 0,768 ppm foi registrado. Até o momento, não existe nenhum trabalho na literatura e registro da Anvisa sobre a utilização dessa substância como droga de abuso. A possibilidade da presença de outras drogas semisintéticas derivadas do alcalóides *ergot* podem também ser excluídas. São elas: etilamida do *d*-ácido lisérgico (LAE-32, 295 Da), dimetilamida do *d*-ácido lisérgico (267 Da), morfolida do *d*-ácido lisérgico (337 Da), ergonovina (325 Da) e  $\alpha$ -hidroxi-etanolamida do *d*-ácido lisérgico (311 Da) [60].



Figura 31. (a) EASI(+)-MS e (b) EASI(+)-MS/MS de amostras contendo 9,10-diidro-LSD.

# III.3.4 Comprimidos de ecstasy analisados por CCD/EASI-MS

Antes de averiguar a aplicabilidade e a eficiência do sistema CCD/EASI-MS, foi avaliado a capacidade de separação do sistema CCD observando os valores de Rf (Fator de Retardamento) para os padrões analisados. Quatro diferentes fases móveis foram testadas: CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (50/50 v/v %), CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH (20/75/5 v/v/v %), CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v %); e CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH/CH<sub>3</sub>OH (95/5 v/v %). Os melhores resultados foram encontrados para os eluentes CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v %); e CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH/CH<sub>3</sub>OH (95/5 v/v %). Quatro diferente ter conseguido separar os compostos MDMA (principal ingrediente ativo encontrado nos comprimidos de *ecstasy*) e a metanfetamina, apenas os dois últimos eluentes permitem uma nítida separação e resolução para todos os outros padrões. Os valores de Rf são mostrados na **Tabela 4.** 

Para a realização das medidas de EASI(+)-MS, usam-se as manchas do cromatograma pertencentes ao sistema CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v %), **Figura 32 e Figura 33**, as quais apresentam uma maior diferença nos valores de Rf para os padrões utilizados.



**Figura 32.** Ilustração dos cromatogramas referentes aos padrões: MDEA, MDA, MDMA, metanfetamina, anfetamina, quetamina e cafeína; e comprimidos de *ecstasy* (designados de T1–T25), usando o eluente  $CH_3OH/NH_4OH$  (98/2 v/v %).



**Figura 33.** Cromatogramas referentes aos padrões: MDEA, MDA, MDMA, metanfetamina, anfetamina, quetamina e cafeína; e comprimidos de ecstasy (designados de T1–T25), usando o eluente  $CH_3OH/NH_4OH$  (98/2 v/v %).

	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>3</sub> COOH	CH₃OH:NH₄OH	CH <sub>3</sub> CH(CH <sub>3</sub> )OH:NH <sub>4</sub> OH
Compostos	(50:50) v/v %	(75:20:5) v/v %	(98:2) v/v %	(95:5) v/v %
MDEA	0,62	0,74	0,71	0,87
MDA	0,48	0,60	0,67	0,81
MDMA	0,37	0,64	0,56	0,62
Metanfetamina	0,35	0,62	0,57	0,62
Anfetamina	0,71	0,66	0,66	0,70
Quetamina	0,86	0,71	0,84	0,80
Cafeína	0,84	0,94	0,77	0,70

Tabela 4. Valores de Rf dos padrões obtidos pelas análises de CCD.

As Figuras 34a-g mostram os espectros de EASI(+)-MS das manchas correspondentes aos padrões revelados no sistema CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH (98/2 v %). Eles foram detectados nas seguintes formas: MDEA ( $[M + H]^+$ : m/z 208 e  $[M + Na]^+$ : m/z 230), Figura **34a**; MDA ( $[M + H]^+$ : m/z 180), Figura 34b; MDMA ( $[M+H]^+$ : m/z 194 e m/z 163 e 135), Figura 34c; metanfetamina (M + H]<sup>+</sup>: m/z 150 e m/z 91), Figura 34d; anfetamina (M + H]<sup>+</sup>: m/z 136), Figura 34e; quetamina (M + H]<sup>+</sup>: m/z 237), Figura 34f; e cafeína (M + H]<sup>+</sup>: m/z195), Figura 34g. Entre os spots analisados, observa-se que a molécula de cafeína apresenta uma menor eficiência de ionização, devido a uma menor relação sinal/ruído presente no espectro de EASI(+)-MS. Provavelmente, a alta polaridade da molécula da cafeína aumenta sua capacidade de interação com a fase estacionária que é extremamente polar (Sílica Gel). Isto favorece o processo de adsorção dessa molécula e, consequentemente, dificulta o processo de dessorção e ionização do analito.



**Figura 34.** EASI(+)-MS para os *spots* dos padrões: **(a)** MDEA, **(b)** MDA, **(c)** MDMA, **(d)** metanfetamina, **(e)** anfetamina, **(f)** quetamina e **(g)** cafeína usando a fase móvel CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v %).

A Figura 35 mostra o espectro de EASI(+)-MS referente ao *spot* da amostra T1, Figura 32. Um resultado positivo para a molécula de MDMA (*m/z* 194) foi observado. Outras amostras apresentam resultados positivos para o MDMA (T2-T5, T7-T17, T20-25), entretanto, seus valores de Rf para esses *spot* são também equivalentes ao padrão metanfetamina (veja Figura 32). Portanto, a revelação do *spot* usando EASI(+)-MS é irrefutável contra a possibilidade de se obter resultados falso-positivos, sendo uma combinação inteligente na conclusão de laudos periciais. Resultados negativos para o MDMA foram observados para as amostras T6, T18-19. Para a amostra T6, o valor de Rf condiz aos *spots* dos padrões de cafeína e quetamina. Analisando o *spot* da amostra T6, o espectro de EASI(+)-MS mostra que nenhum sinal é observado correspondente aos padrões de MDMA, cafeína ou quetamina. Entretanto, as análise obtidas por GC-MS mostram resultados positivos para cafeína, como indicado pelas análises de CCD. O tempo de retenção e o espectro de EI-MS (*electron impact mass spectrometry*) são característicos da molécula da cafeína.



Figura 35. EASI(+)-MS dos spots referentes as amostras de ecstasy T1.

Os valores de Rf para os *spots* correspondentes as amostras T18 e T19 são similares ao padrão de quetamina. Entretanto, quando se usa a técnica EASI(+)-MS, para a revelação dos *spots* das amostras T18-19, constata-se a presença de lidocaína ([M + H]<sup>+</sup> m/z 235), **Figura 36**. Além de ambas apresentaram o analgésico lidocaína como ingrediente ativo, o perfil físico dessas amostra (logo, dimensão e massa) são

semelhantes. Essas informações são evidências de que elas apresentam a mesma origem de produção.

Outras manchas são observadas para as amostras T9, T16 e T17. O segundo *spot* observado para essas amostras coincidem com os valores de Rf para a solução padrão de cafeína. Esses resultados são confirmados através da técnica de GC-MS. O terceiro *spot* observado para as amostras T16 e T17 não foi identificado pela técnica EASI(+)-MS. Novamente, a grande interação da fase móvel com essas manchas, fenômeno que também aconteceu com o processo de ionização da molécula de cafeína, inviabilizam a sua identificação. Entrentanto, os resultados de GC-MS são negativos para a molécula de quetamina, mostrando uma concordância de ambas as técnicas. Uma outra curiosidade é que novamente, amostras de *ecstasy* (T16 e T17) mostram um perfil químico similar aos *spots* revelados pelo CCD, indicando uma possível associação do processo de síntese.



Figura 36. EASI(+)-MS para os *spots* correspondentes as amostras T18.

O limite de detecção para as medidas de CCD, foi calculado usando como padrão o princípio ativo MDMA. Dez replicatas de corridas cromatográficas foram realizadas variando a concentração de soluções padrões de MDMA. Um valor de 3,0  $\pm$  0,2 µg foi encontrado. Esse resultado mostra que a CCD continua sendo uma técnica útil na análise de rotina de comprimidos de *ecstasy* apreendidos em laboratórios forenses.

#### III.3.5 Perfil inorgânico de drogas de abuso por Fluorescência de Raios-X

A **Figura 37a** mostra o espectro de ED-XRF para as 4 amostras contendo *m*-CPP. Observa-se que todos os espectros apresentam linhas K $\alpha$  características para os elementos CI (2,60 keV), K (3,30 keV), Ca (3,62 keV), Fe (6,40 keV) e Cu (8,02 keV). Comparando com os resultados de EASI-MS, a presença de CI deve-se a composição do ingrediente ativo, *m*-CPP, onde esse elemento faz parte de sua estrutura elementar. A presença de K se deve a formação de aduto na composição dos oligossacarídeos, **Figura 24**.

As linhas mais intensas do espectro são relacionadas com os efeitos de espalhamento Compton (linhas Rh K $\alpha$  (19,20 keV) e Rh K $\beta$  (21,56 keV)) e Rayleigh (linhas Rh K $\alpha$  (20,16 keV) e Rh K $\beta$  (22,74 keV)). Esses efeitos (Compton (espalhamento incoerente) e Rayleigh (espalhamento coerente)) contribuem siginificativamente para a obtenção de informações referentes a composição orgânica da matriz em estudo. A região do espalhamento dos espectros de raios-X é principalmente associada com elementos leves (C, H, O, etc.) onde as linhas características para esses elementos nunca serão vizualizadas pelas medidas de ED-XRF. Portanto, essa região é uma fonte útil para fornecer informações qualitativas e/ou quantitavias sobre a composição desses elementos leves quando os resultados são associados a tratamentos quimiométricos [82-84].

Uma ampliação na região de 2-4 keV do espectro de ED-XRF é mostrado na **Figura 37b**, onde observa-se de maneira mais detalhada as linhas K $\alpha$  características para os elementos CI, K e Ca. Uma maior variação das intensidades das linhas K $\alpha$  referentes ao elemento CI ocorre. De maneira análoga aos resultados obtidos pelo EASI-MS *plus* PCA, pode-se estimar a concentração relativa da *m*-CPP em comprimidos de *ecstasy* analisando as linhas correspondentes ao CI. Essas linhas decrescem na seguinte ordem: *m*-CPP 4 > *m*-CPP 3 > *m*-CPP 1 > *m*-CPP2.



**Figura 37. (a)** Espectros de ED-XRF de comprimidos de *m*-CPP e **(b)** uma ampliação na região de 2-4.5 keV para as amostras: *m*-CPP 1 (----), *m*-CPP 2(<sup>.....</sup>), *m*-CPP 3 (—) and *m*-CPP 4 (—).

As **Figura 38a-b** mostram os espectros de ED-XRF para os comprimidos de *ecstasy*, sendo subdividos em dois grupos em função do perfil inorgânico obtido: **(a)** similar e **(b)** randômico. Semelhante aos resultados obtidos por ED-XRF para as amostras contendo *m*-CPP, linhas K $\alpha$  referentes aos elementos CI (2,60 keV), Ca (3,62 keV), Fe (6,40 keV) e Cu (8,02 keV) estão também presentes no primeiro grupo de amostras (similar), **Figura 38a**, correspondendo a grande maioria dos comprimidos. Entretanto, a intensidade das linhas K $\alpha$  para o CI é bastante intensa quando se compara com os resultados obtidos para as amostras de *m*-CPP. Essa maior concentração de CI é justificada pela formação do sal de cloridrato de MDMA, [2MDMA + CI + 2H]<sup>+</sup>, observado também pelos resultados de EASI-MS. Uma explicação para a formação desse sal está no processo de síntese do MDMA, onde após a etapa de destilação ocorre a remoção do excesso de reagentes como a metilamina e solventes. Posteriormente, o produto é cristalizado pela adição de ácido clorídrico, HCI, o que forma o sal MDMA.HCI [85,86].

Analisando ainda a **Figura 38a**, observam-se outras linhas K $\alpha$  que correspondem ao P (1,98 keV), Ti (4,48 keV), Zn (8,64 keV) e Pt (9,42 keV); entretanto, eles estão presentes apenas em algumas amostras. São elas: ecs-10 (P), ecs-19 (Ti), ecs-13, ecst-14 (Zn) e

ecs-18 (Pt). Linhas K $\beta$  (7,06) para o elemento Fe é apenas verificado em amostras que apresentam uma maior concentração desse elemento, como: ecs-7, ecs-13 e ecs-14.

A **Figura 38b** mostra os espectros de ED-XRF para os comprimidos de *ecstasy* do grupo de amostras classificadas como randômicas. Para as amostras ecs-20, ecs-22 e ecs-23 (**grupo A**, sem MDMA), em geral, elas apresentam uma maior concentração de Ca (linhas K $\alpha$  e K $\beta$  = 3,62 e 4,00, respectivamente), onde a intensidade dessas linhas chegam a ser maiores do que as linhas referentes aos efeitos Compton e Rayleigh. Diferentemente, as amostas ecs-24 e ecs-25 (**grupo B**), **Figura 38b**, apresentam uma baixa concentração elementar. Já para a amostra ecs-26 (**grupo C**), novos elementos são observados como V (linhas K $\alpha$  = 5,00 e K $\beta$  = 5,50 keV). Hf (linhas L $\alpha$  = 7,90 e linhas L $\beta$  = 9,02 keV), e Zr (linhas K $\alpha$  = 15,76 e K $\beta$  = 17,68 keV). O grande diferencial da técnica ED-XRF quando comparada com técnicas como absorção atômica (AA) e espectrometria de massa atômica favorecida por plasma (ICP-MS), está na identificação de elementos inertes (Zr, Ti e Hf, por exempo) onde nenhuma preparação de amostras (com exceção da moagem) é necessária.

Em geral, existem 3 rotas sintéticas para a produção do MDMA via aminação redutiva do 3,4-metilenodioxifenil-2-propanona (piperonilmetilcetona, MD-P2P ou PMK) + metilamina: (1) H<sub>2</sub>/Pt a pressões elevadas (3-4 bar); (2) NaBH<sub>4</sub> a baixas temperaturas (do inglês conhecido como *cold method*); e (3) amálgama de mercúrio/alumínio (HgCl<sub>2</sub> + AI) [87]. Entre essas possibilidades, a técnica de ED-XRF é capaz de detectar apenas os elementos Hg e Pt. Os demais elementos como B, Na e AI são considerados elementos leves, não sendo vizualizados nos espectros de XRF. Portanto, através dos dados obtidos, apenas a amostra ecs-18 é produzida utilizando a rota (1). Todas as outras amostras devem ser produzidas via rota (2), desde que o Na do reagente NaBH<sub>4</sub> não pode ser identificado por XRF. O elemento utilizado para a rota (3), Hg (L $\alpha$  = 9,9 keV) não foi identificado em nenhuma das amostras.



**Figura 38.** Espectros de ED-XRF de comprimidos de *ecstasy* com perfil inorgânico (a) similar e (b) randômico.

As **Figura 39a-b** mostram os gráficos para os *scores* e *loadings* obtidos para os dados dos espectros de ED-XRF. Observa-se que as 3 PCs explicam 85,1 % da variância total. Analisando os gráficos dos *scores*, **Figura 39a**, foi observado a formação de dois grandes grupos, que são: comprimidos de *ecstasy* contendo MDMA e *m*-CPP. Adicionalmente, algumas amostras encontram-se separadas pelos gráficos de *scores*. De maneira análoga aos resultados obtidos pelo EASI-MS, as amostras presentes no **grupo A** (ecs-22, ecs-23 e ecs-24) não apresentam o composto MDMA. Elas apresentam um perfil inorgânico distinto, como mostrado no gráfico de *loadings*, **Figura 39b**. O gráfico de *loadings* também mostra que a região do espalhamento é responsável pela separação dos grupos *m*-CPP e MDMA. Para as amostras de *ecstasy* o CI é a variável responsável pelo agrupamento.





Seis amostras de cocaína base livre na forma de *crack*, oito na forma de cloridrato e quinze de LSD foram também analisadas por ED-XRF, **Figura 40a-c**. Para o processo de refino ou produção de cocaína na forma de cloridrato (pó) ou base livre (*crack*), contaminantes como óxido de cálcio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e permanganato de potássio podem estar presentes [88,89]. A presença desses compostos irá produzir linhas de emissão para os elementos Ca (K $\alpha$  e K $\beta$  = 3,62 e 4,00 keV, respectivamente), S (K $\alpha$  = 2,28 keV), Cl (K $\alpha$  = 2,60 keV) e Mn (K $\alpha$  = 5,82 keV). De todos os perfis inorgânicos analisados, o resultado observado para as amostras de *crack* mostra uma baixa concentração de elementos químicos, como por exemplo para o Cl e Ca ([Cl] = 553 ± 115 mg g<sup>-1</sup> e [Ca] = 460 ± 110 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente), **Figura 40a.** Esses valores são estimados pelo método de calibração interno do equipamento baseado em cálculos teóricos a partir da intensidade da radiação emitida [90]. A concentração desses dois elementos pode ser associados ao processo de refino.

Como aditivos diluentes, carbonato ou bicarbonato de sódio podem ser adicionados. Medidas de análise termogravimétrica (TGA) foram realizadas com o objetivo de estudar a estabilidade térmica entre as amostras de cocaína e crack, **Figura 41**. As amostras foram aquecidas sob atmosfera de argônio em um faixa de 100-1000 °C. Após o aquecimento, uma grande perda de massa variando de 200-300 °C foi observada para as amostras de *crack*. Calculando a área da derivada primeira uma perda de massa de  $\approx$  90 % é obtida.

Ao final do processo de aquecimento (800 °C), uma massa residual menor que 5 % foi observado. Para as amostras de cocaína, além da casual perda de massa na faixa de 200-300 °C, outros eventos ocorrem a temperaturas maiores que 300 °C. No final do procedimento, massas residuais de  $\approx$  30 % são observadas. Isto pode ser um indicativo de que uma grande quantidade de contaminantes inorgânicos estão presentes para amostras de cocaína, quando comparado com as amostras de *crack*. Óxido de cálcio e bicarbonato de sódio devem ser os contaminantes majoritários ([Ca] = (731 ± 100) mg g<sup>-1</sup>). Os resultados de ED-XRF corroboram com esta afirmação, onde intensas linhas de emissão para o elemento Ca são observadas, **Figura 40b**. Além do Ca, o elemento Sr (K $\alpha$  = 14,14 keV) foi também encontrado. Já o Zn (K $\alpha$  = 8,64 keV) foi detectado em apenas uma única amostra.

A **Figura 40c** mostra os espectros de ED-XRF para as amostras de LSD. Vários elementos foram encontrados: S, Cl, Ca, Ti, Fe, Cu, Zn e Sr; entretanto, como as amostras foram analisadas sobre a superfície do papel, essas espécies observadas são contaminantes oriundos do papel e não da rota sintética do LSD.



Figura 40. Espectros de ED-XRF para amostras de (a) crack, (b) cocaína e (c) LSD.



**Figura 41.** Medidas de TGA para amostras de cocaína na forma de cloridrato (pó) e base livre (*crack*).

Os resultados de XRF mostram que é possível construir *fingerprints* químicos a partir da composição inorgânica de drogas de abuso. A partir dos perfís inorgânicos obtidos para cada classe de droga de abuso, é possível a construção de um banco de dados que, se for aliado a ferramentas quimiométricas como redes neurais e algorítimo genético, permitirá a classificação de uma droga ilícita, sem a necessidade de avaliar a sua composição orgânica, ou seja, a identificação do ingrediente ativo [91]. A **Figura 42a-b** mostra o gráfico de *scores e loadings* para todas as drogas de abuso. Observa-se que as três componentes principais são capazes de descrever, aproximadamente, toda a variância observada pelo sistema (99 %), agrupando as amostras em função de sua classe correspodente: *ecstasy*, cocaína ou LSD. Adicionalmente, se alguma amostra possuir contaminação com outro ingrediente ativo, como no caso do LSD, onde alguns selos estão contaminados com cocaína, a técnica fornece informações químicas suficientes para distinguir e detectar essa contaminação.



Figura 42. Gráfico de (a) scores e (b) loadings para todas as drogas de abuso.

# III.4. Conclusão

Foi demonstrado que a técnica EASI-MS é capaz de caracterizar a composição orgânica de comprimidos de *ecstasy* contendo m-CPP ou MDMA e selos de LSD ou 9,10diidro-LSD. Para os comprimidos de *ecstasy*, os resultados de EASI(+)-MS contendo o ingrediente ativo *m*-CPP mostraram a sua detecção na forma de molécula protonada, [*m*-CPP + H]<sup>+</sup>, *m*/*z* 197. Além disso, várias outras substâncias presentes como excipientes foram identificadas: lactose (*m*/*z* 365), *clusters* de glicose (*m*/*z* 527 e 543) e oligossacarídeos com *m*/*z* variando de 600-900. Para os comprimidos contendo MDMA, a substância ativa pode estar presente de duas maneiras: na sua forma protonada, [MDMA + H]<sup>+</sup>, *m*/*z* 194, e na forma de sal [MDMA + CI + 2H]<sup>+</sup>, *m*/*z* 423. Como excipientes, foram identificados principalmente lactose e cafeína.

Para as análises dos selos, a técnica de EASI-MS mostraram a presença dos ingredientes ativos na forma de molécula protonada:  $[LSD + H]^+$  de m/z 324 e [9,10-diidro-LSD + H]<sup>+</sup> de m/z 326. Experimentos de EASI-MS/MS ajudaram na identificação estrutural do 9,10-diidro-LSD, onde a hidrogenação da dupla ligação na posição C9-C10 da molécula do LSD pode ser facilmente confirmada. Resultados com altíssima resolução e exatidão de massas forneceram os valores experimentais do m/z para íon 324 e 326 (m/z

324.2072 e 326.2229) estando em boa concordância com os valores teóricos de m/z (m/z 324.2070 and 326.2227).

A mobilidade iônica dos isômeros clorofenilpiperazina (*o*-CPP, *m*-CPP e *p*-CPP) foram estudadas. A metodologia desenvolvida conseguiu separar apenas o isômero *o*-CPP, usando  $CO_2$  como *drift gas*. Casos reais de drogas de abuso vendidas como *ecstasy* contendo *m*-CPP foram também analisadas. Todos os resultados mostraram a presença de um único pico, correspondendo ao isômero (*m*-CPP ou *p*-CPP) ou uma mistura de *m*-CPP e *p*-CPP. Em geral, a presença do isômero *o*-CPP pode ser descartada em drogas de abuso.

Foi também demonstrado que a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) continua sendo confiável na identificação do MDMA e outras anfetaminas que podem estar presentes em comprimidos de *ecstasy*. Entre as fases móveis estudadas, os sistemas CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v %); e CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH/CH<sub>3</sub>OH (95/5 v/v %) mostraram-se mais eficientes separando o MDMA (principal substância ativa encontrada na fabricação do *ecstasy*) de todas as outras anfetaminas (MDA, MDEA, anfetamina) e adulterantes (ketamina e cafeína). A associação desta técnica com a EASI(+)-MS gera resultados inquestionáveis na identificação de todas as anfetaminas que poderiam ser usadas na fabricação do comprimido. Dos 25 comprimidos analisados, o sistema CCD/EASI(+)-MS identificou resultados negativos para 3 amostras. Ao invés de apresentarem MDMA, foram usados lidocaína e cafeína como ingrediente ativo. Para a molécula de cafeína, que não era facilmente dessorvida do *spot* da placa do CCD, medidas de GC-MS confirmaram a presença desse estimulante nos comprimidos.

O perfil inorgânico das drogas de abuso como *ecstasy*, LSD e cocaína foram estudados por fluorescência de raios-X (XRF). Para os comprimidos de *ecstasy* contendo apenas *m*-CPP, Cl, K, Ca, Fe e Cu foram os elementos químicos encontrados. Entre esses elementos, o Cl age como um indicativo da concentração do ingrediente ativo de *m*-CPP nos comprimidos. Para os comprimidos de *ecstasy* contendo MDMA, Cl também estava presente, entrentanto, em maior concentração. Neste caso, a presença do Cl está diretamente relacionada com o processo de produção de MDMA, que provavelmente, é realizado usando HCl. Dessa forma, um sal de composição conhecida é formado, como identificado pelos resultados de EASI-MS. Além disso, uma maior variedade de elementos químicos foi identificado nos comprimidos de MDMA como: P, Cl, Ca, Fe, Cu, Zn, Pt, V, Hf,

Ti, Pt e Zr. Para as amostras de LSD vários elementos também foram encontrados (S, Cl, Ca, Ti, Fe, Cu, Zn e Sr); entretanto, essas espécies identificadas são oriundas do selo e não da rota sintética do ingrediente ativo. Foi possível diferenciar amostras de *crack* de cloridrato de cocaína. Para as amostras de *crack*, menores linhas de emissão foram observadas para os elementos Cl, Ca, Fe e Cu em relação às amostras de cloridrato de cocaína. Os elementos Cl e Ca estão relacionados ao processo de refino ou de diluição da cocaína. Finalmente, os dados de XRF combinado com tratamentos quimiométricos (PCA) permitiram classificar todas as drogas de abuso.

# Capítulo ocumentos the second
### IV. Documentoscopia

### IV.1 Introdução

Atualmente, os trabalhos que empregam a MS na área de documentoscopia têm se preocupado com a identificação estrutural de corantes e pigmentos presentes no papelmoeda. Entretanto, o principal alvo dessas análises químicas vem focando a identificação de contaminantes oriundos do uso de drogas de abuso.

Dentro desse capítulo, objetiva-se investigar, usando as técnicas EASI-MS e DESI-MS o perfil químico de cédulas autênticas de Real, Dólar, Euro, e as notas falsas apreendidas pela Polícia Federal, analisando diretamente a superfície da cédula, sem qualquer prépreparação ou modificação visual. Adicionalmente, EASI-MS foi também aplicada para investigar a composição química de documentos de certificação de registro de licenciamento veicular (CRLV).

### **IV.2. Procedimento Experimental**

### IV.2.1 Reagentes e Amostras

 a) Solventes: Metanol grau-HPLC, ácido fórmico e hidróxido de amônia foram obtidos da Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA).

b) Documentos: Notas autênticas e falsas foram cedidas pelo Departamento da Polícia Federal (São Paulo, SP), apreendidas entre os anos de 2007 e 2008. Documentos de CRLV foram também fornecidos ao nosso laboratório pela Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo (2009).

### IV.2.2 Caracterização

### IV.2.2.1 Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (EASI-FT-ICR-MS)

Os experimentos de EASI-MS foram realizados utilizando um espectrômetro de massas Qtrap (Applied Byosystems) e um *ion trap* linear de um MS híbrido, LTQ-FT-ICR-MS Ultra (ThermoScientific, Bremen, Alemanha). Resultados com alta resolução (400.000 para *m*/*z* 400 e acúmulo de 100 microscans) foram também obtidos. Os principais parâmetros do LTQ usados foram: voltagem do spray = 5kV, nenhum controle de ganho automático (AGC desligado), tempo de injeção de 250 ms e acúmulo de 2 *microscans*. Os experimentos de EASI-MS foram obtidos no modo positivo de aquisição de íons, EASI(+)-

MS, onde um spray ácido era preparado (ácido fórmico em metanol, 0,01 % v/v), sob vazão de 20  $\mu$ L min<sup>-1</sup> e N<sub>2</sub> a uma pressão de 7 bar.

### IV.2.2.2 Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI-MS)

Os dados de DESI-MS foram registrados no Laboratório Aston (Purdue University, USA) usando um *Ion Trap linear* (Thermo Fisher, LTQ (San Jose, CA, USA)), equipado com uma fonte automática baseada no *design* da Empresa Prosolia (Indianapolis, IN, USA). Os principais parâmetros operacionais do LTQ são: **a)** voltagem do spray = 5 kV; **b)** controle de gás manual; **c)** tempo de injeção = 250 ms; **d)** e acúmulo de 2 *microscans*. Os parâmetros da fonte de ionização são: pressão do gás (N<sub>2</sub>) a 7 bar e spray acidificado (0,1% de ácido fórmico), usando uma vazão de 5  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. As imagens foram registradas usando uma placa automatizada, movida no plano x,y em relação ao capilar de ionização. O tamanho do *spot* formado pelo *spray* foi de 250 – 250 mm<sup>2</sup>. O tamanho do pixel e a área analisada foram de 200 – 200 mm<sup>2</sup> e 2 – 2 cm<sup>2</sup>, respectivamente. O tempo total gasto para aquisição de uma imagem foi de 1,5 h [92].

### IV.2.2.3 Análise Quimiométrica (PCA)

Os dados de EASI-MS foram registrados pelo *software* Analyst 4.1 (Applied Biosystems, USA). Os espectros foram acumulados, centrados na média e alinhados gerando uma matriz de dados com íons variando de m/z 100 – 1000. Para classificação das notas, o algoritmo PCA foi utilizado através do *software* Pirouette v. 3.11.

### IV.3 Resultados e Discussão

### IV.3.1 Fingerprints de papel-moeda: REAL, DÓLAR E EURO

As medidas de EASI-MS foram realizadas diretamente sobre a superfície de notas autênticas brasileiras (R\$), de diferentes valores nominais (diferentes *designs* e cores, **Figura 43**). Na **Figura 44** podem ser vizualizados os *Fingerprints* obtidos via DESI(+)-MS (Laboratório Aston, USA) para as notas autênticas e falsas (*inkjet* e *laserjet*) correspondentes ao real. As notas foram também falsificadas por um processo de *scanning/printing e* três marcas de impressoras foram analisadas: *laserjet, inkjet e phaser* (**Figura 45**).

Notas autênticas de todas as denominações foram testadas, e o *fingerprint* de 3 diferentes cédulas (R\$ 20, 50 e 100) foram obtidos via EASI(+)-MS, **Figura 43.** Alguns íons observados com valores de m/z 284, 523 e 551 são oriundos da contaminação do solvente (metanol usado na produção do spray) e da superfície das notas. Entretanto, uma série de íons diagnósticos foram também detectados com valores de m/z 391, 413, 429, 803 e 819. O íon contaminante de m/z 284 é uma amina alifática (C<sub>19</sub>H<sub>41</sub>N). Na maioria dos casos, foi possível encontrar como contaminante o íon de m/z 304, que corresponde a molécula de cocaína protonada.



**Figura 43.** *Fingerprints* usando EASI(+)-MS para notas autênticas a partir de cédulas de 20, 50 e 100 reais.

A **Figura 44** mostra os resultados dos *fingerprints* obtidos por DESI-MS para as notas autênticas e falsificadas realizadas no Laboratório Aston usando as impressoras *inkjet* e *laserjet*. Ao comparar os *fingerprints* para as notas autênticas de real (R\$), um perfil químico similar é observado por ambas as técnicas (**Figura 43** e **Figura 44**). Para o *fingerprint* correspondente as notas autênticas obtidas via DESI-MS, nota-se, novamente, a presença de impurezas (m/z de 285, 305, 523 e 551) e dos íons diagnósticos (m/z 391, 413, 429, 803 e 819) correspondente a um plastificante, como será discutido posteriormente. Portanto, as técnicas EASI(+)-MS e DESI(+)-MS fornecem um perfil químico característico na análise da superfície de notas autênticas brasileiras (R\$), permitindo a reprodução dos dados em outros laboratórios, independente de alterações na fonte de ionização. Em alguns casos, a manipulação dessas notas podem adicionar aos *fingerprints,* íons correspondentes a moléculas de triacilglicerídeos (TAG). Neste estudo, essas moléculas com massas em torno de 900 Da [93] não foram detectadas.

A partir dos dados obtidos pela EASI(+)-MS, foram indentificadas as estruturas correspondentes aos íons diagnósticos presentes nas notas autênticas. Elas correspondem ao plastificante bis(2-etilexil)ftalato detectado como  $[M + H]^+$ : m/z 391;  $[M + Na]^+$ : m/z 413;  $[M + K]^+$ : m/z 429,  $[2M + Na]^+$ : m/z 803 e  $[2M + K]^+$ : m/z 819. O íon de m/z 494 é atribuído ao biocida, um sal de amônio quaternário: diexadecildimetril amônio.



**Figura 44.** *Fingerprints* obtidos via DESI(+)-MS (Laboratório Aston, USA) para as notas autênticas e falsas (*inkjet* e *laserjet*) correspondentes ao real.

A **Figura 45** mostra os *fingerprints* obtidos pelo EASI(+)-MS para notas falsas reproduzidas no Laboratório Thomson. Os íons detectados para as impressoras *inkjet* e *phaser* correspondem a uma série oligomérica de m/z 300-900 e m/z 700-1300, respectivamente. Em contrapartida, o *fingerprint* para a impressora *laserjet* apresenta poucos íons marcadores (m/z 629, 734, 793 e 835). É bastante nítida a diferença entre os *fingerprints* obtidos entre as notas falsificadas e autênticas. Os íons marcadores presentes nas impressoras (notas falsas) correspondem a álcoois graxos etoxilados e propoxilados, detectados como adutos de sódio, [M + Na]<sup>+</sup>.



**Figura 45.** *Fingerprints* obtidos usando EASI(+)-MS para as notas falsas produzidas no Laboratório Thomson usando as impressoras: *inkjet; laserjet* e *phaser*.

Os *fingerprints* obtidos pelo EASI(+)-MS e DESI(+)-MS para as notas falsas produzidas pelo Laboratório Thomson e Aston mostram uma grande concordância para a impressora *inkjet* (**Figura 44** e **Figura 45**), diferentemente, da impressora *laserjet*, onde espectros distintos são observados. A não reprodutividade dos dados para esta impressora pode ser devido a diferenças na composição química existente entre o lote americano e brasileiro. Os resultados para os espectros de DESI(+)-MS (**Figura 44**) e EASI(+)-MS (**Figura 45**) mostram íons diagnósticos diferentes de *m/z* 680 e 793, respectivamente, referentes a impressora *laserjet*.

As notas de Dolar e Euro foram também analisadas pelo EASI(+)-MS (**Figura 46**). Os íons diagnósticos de m/z 391, 413, 429, 803 e 831 presentes nas notas brasileiras não são

detectados. O perfil químicos dessas notas estrangeiras assim como as notas falsificadas, são também dominados por distribuições oligoméricas de íons correspondentes a álcoois graxos propoxilados; entretanto, elas são separadas por unidades de repetição de m/z 58. Essas distribuições são bastante distintas para ambas as notas. Para o Euro, essa distribuição é centrada em m/z = 900, onde os oligômeros detectados são espécies [M + Na]<sup>+</sup>. Para o dólar, a distribuição oligomérica é centrada em m/z = 500, formando espécies [M + H]<sup>+</sup>.



Figura 46. *Fingerprints* obtidos usando EASI-MS para notas de Dólar e Euro.

Para testar a habilidade da técnica ambiente EASI-MS na detecção da autenticidade de notas brasileiras, 50 notas (R\$) apreendidas pela Polícia Federal e classificadas como autênticas ou falsificadas pelos laboratórios periciais (classificação baseada em testes sensoriais e ópticos), foram tratadas estatisticamente pelo algorítmo PCA. Os resultados obtidos são ilustrados por um gráfico PCA 3D, **Figura 47**. Observa-se um bom

agrupamento para as amostras autênticas, e uma clara separação de 3 outros grupos de amostras falsificadas pelas impressoras *laserjet*, *inkjet* e *offset*. Apesar de não mostrado no trabalho, o espectro de MS para as notas falsificadas pela impressora *offset*, apresenta íons diagnósticos de m/z de 150, 173, 207, 229, 235, 245, 284 e 304. As duas últimas variáveis (presentes também nas notas autênticas) podem ser responsáveis por aproximar o grupo desta impressora com o grupo de amostras autênticas.



**Figura 47.** PCA 3D usando os dados de EASI-MS para classificação das notas verdadeiras e falsas.

Usando a técnica DESI-MS, é possível obter imagens a partir de íons diagnósticos presentes na área superficial analisada. Selecionando a área correspondente ao número 20 (nota de R\$ 20) para as notas falsificadas em impressoras *inkjet*, **Figura 48a**, foi possível produzir uma imagem através da ionização de íons seletivos pelo monitoramento dos sinais identificados nas regiões ilustradas em vermelho (m/z 122) e marrom (m/z 597), **Figura 48b**. Esses íons como mostrado na **Figura 44**, não fazem parte do *cluster* oligomérico, apresentando uma baixa intensidade relativa. Nota-se que o sistema *ambient MS* fornece uma confirmação inquestionável da autenticidade da nota investigada, onde cada amostra apresentará um íon específico para formação de uma imagem.



**Figura 48. (a)** Área de uma nota de R\$ 20 falsificada por uma impressora *inkjet* submetida ao sistema de imagiamento por DESI-MS 2D. **(b)** Imagem produzida pelo monitoramento da intensidade dos íons presente na região em vermelho (m/z 122) e marrom (m/z 597) sobre o número 20.

### IV.3.2 Análise de certificados de registros de licenciamentos veiculares (CRLV)

Inicialmente, *fingerprints* de dez documentos de CRLV classificados como autênticos foram obtidos nos dois modos de aquisição de íons, usando a técnica EASI-MS. Os resultados são mostrados nas **Figura 49a-b.** Três diferentes posições foram analisadas, onde um mesmo *fingerprint* químico foi obtido.

O espectro de EASI(+)-MS, mostrado na **Figura 49a**, é bastante similar aos obtidos para as notas autênticas do papel-moeda, onde os íons de m/z 284, 391, 413, 429, 494, 523, 551 e 803 são também detectados.

Experimentos de EASI-MS/MS dessas espécies foram realizados. Os valores de m/z, a fórmula mínima, o DBE e o erro previsto (ppm) são mostrados na **Tabela 5**.

Os resultados de EASI-MS/MS para o íon de m/z 391 confirmam a presença do plastificante bis(2-etilexil)ftalato, DHEP. Os fragmentos observados foram de m/z 279, 167 e 149 (espécie majoritária), **Tabela 5**. A formação do fragmento de m/z 279 envolve a perda neutra (112 Da) a partir do íon de m/z 391, correspondendo a eliminação do grupo etilexil. Adicionalmente, uma outra perda neutra ocorre (112 Da), produzindo o ácido tereftálico protonado, com m/z de 167 [HCO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>H + H]<sup>+</sup>. Por fim, o fragmento mais

intenso é formado (m/z 149, HO<sub>2</sub>CC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO<sub>2</sub><sup>+</sup>) via eliminação de uma molécula de H<sub>2</sub>O. Os íons de m/z 413 e 429 observados na **Figura 49a**, correspondem a adutos de sódio [M + Na]<sup>+</sup> e potássio [M + K]<sup>+</sup>, onde M corresponde ao plastificante DHEP. O íon de m/z 803 é um *cluster* do plastificante DHEP, [2DHEB + Na]<sup>+</sup>. Os valores de DBE obtidos para todos os compostos comprovam essas afirmações.

Os resultados de EASI-MS/MS para o íon de m/z 494 também confirmaram a presença do biocida, o cátion diexadecildimetilamônio,  $[CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_2(CH_2)_{15}CH_3]^+$ . Entre os fragmentos observados para este composto, **Tabela 5**, o íon de m/z 270 é o mais intenso, correspondendo à estrutura  $[CH_3(CH_2)_{15}N=CH_2CH_3]^+$ . Ele é formado via eliminação do grupo hexadecano,  $CH_3(CH_2)_{14}CH_3$ , a partir do íon precursor. Sais quaternários de amônio correspondem a uma importante classe de sufactantes, tendo uma ampla variedade de aplicações como fungicidas, biocidas, amaciantes, condicionadores, ativadores, etc. Em documentos, eles podem agir como biocidas.

O *fingerprint* químico para os documentos autênticos de CRLV no modo EASI(-)-MS é mostrado na **Figura 49b**. Nenhum composto foi detectado.



Figura 49. EASI(±)-MS para documentos de CRLV autênticos (a e b) e falsificados (c e d).

Os *fingerprints* químicos obtidos pela técnica EASI(±)-MS para os documentos falsificados de CRLV são mostrados nas **Figura 49c-d.** Resultados similares são observados entre os documentos autênticos e falsos, quando se comparam os espectros obtidos no modo positivo de aquisição de íons (**Figura 49a** e **Figura 49c**). Entretanto, um perfil químico distinto foi observado para os experimentos realizados no modo negativo. Um sinal bastante intenso foi observado apenas para os documentos falsos (íon de m/z 249), **Figura 49d**.

Modo de	Íon	Fragmentos (MS/MS) m/z	Fórmula		Erro
aquisição de	Precursor		Estrutural	DBE	(ppm)
íons	m/z				
-	249,15	205, 137	$[C_{15}H_{21}O_3 - H]^-$	5,0	1,20
+	391,29	279, 167 e 149	[C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> + H] <sup>+</sup>	6,0	0,93
+	413,27		[C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> + Na]⁺	6,0	0,44
+	429,24		[C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> + K] <sup>⁺</sup>	6,0	1,02
+	494,57	426, 408, 298 e 270	[C <sub>34</sub> H <sub>71</sub> N +H] <sup>+</sup>	0	1,12
+	803,55	735	[C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>8</sub> + Na] <sup>⁺</sup>	12	1,94

**Tabela 5.** Valores de m/z com alta exatidão e as fórmulas estruturais para os compostos presentes em documentos de CRLV, analisados pelo EASI(±)-FT-ICR-MS.

Os experimentos de EASI-MS/MS para o íon de m/z 249 é mostrado na **Figura 50**. Sua dissociação gera dois fragmentos, um íon intenso de m/z 205 e outro de m/z 137. O íon de m/z 205 corresponde à estrutura [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, sendo formado via eliminação da molécula neutra CO<sub>2</sub>. O íon de m/z 137 corresponde ao íon hidroxi-benzílico, [CO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH]<sup>-</sup>, produzido via eliminação da parte alifática do íon precursor (CH<sub>2</sub>=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, m/z 112). O DBE de 5,0 e o erro de massa apontam para a fórmula mínima [C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, indicando uma espécie aromática com uma ligação dupla adicional (provalmente uma carbonila). Portanto, todos os resultados obtidos apontam para o ácido 4-octiloxibenzóico (HOOCC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>).

Geralmente, a formulação de uma tinta é feita a partir de um corante (derivado de um composto aromático), um modificador de viscosidade, um antiestático, e um estabilizante. Entre essas propriedades, o ácido 4-octiloxibenzóico age como um estabilizante, que está presente em um concentração inferior a ca. 1 wt %. Portanto, a presença desse

estabilizante serve como marcador químico, indicando a falsificação de documentos de CRLV.



Figura 50. EASI(-)-MS/MS do íon de m/z 249.

Com o objetivo de identificar a possível origem do íon de m/z 249, o documento de CRLV foi escaneado em nosso laboratório e impresso em 3 diferentes marcas de impressoras: laserket, phaser e a inkjet. Resultados de EASI-MS para o modo negativo de aquisição de íons foram obtidos, EASI(-)-MS, e são mostrados nas **Figura 51a-c**. Para a impressora *phaser*, os íons obtidos apresentam m/z de 283, 311, 513, 535 e 588 (**Figura 51a**). Analisando a impressora *inkjet*, um único íon intenso de m/z 209 é observado (**Figura 51b**). Já a impressora *laserjet* mostra íons de m/z 249, 500 e 772 (**Figura 51c**).

Ao comparar os *fingerprints* químicos obtidos, o íon de *m/z* 249 mostra-se presente na impressora *laserjet*, sendo uma evidência química da origem da falsificação, uma vez que esta impressora não é utilizada na confecção de documentos veiculares. Não se pode

descartar a hipótese de que procedimentos de lavagem de documentos de CRLV podem ter sido praticados pelos falsificadores, onde dessa forma, marcadores químicos de ambas as impressoras *offset e laserjet* estariam presentes.



**Figura 51.** *Fingerprints* usando EASI(-)-MS de documentos *homemade* de CRLV usando as impressoras *phaser* (a); *inkjet* (b); e *laserjet* (c).

### IV.4 Conclusão

EASI-MS e DESI-MS é um método de *fingerprinting* direto, robusco, não-destrutivo, rápido e simples para a investigação da autenticidade do papel-moeda nacional, internacional e de documentos de CRLV. Foi mostrado que a técnica apresenta uma excelente reprodutibilidade em análise interlaboratoriais, independente das variações existentes no processo de ionização. Para investigações forenses, esse método poderia

ser usado para complementar resultados de inspeções feitas complementando experimentos tradicionais como a microscopia e, dessa forma, ajudando especialistas em problemas que apresentam uma maior complexidade. EASI-MS poderia ainda fornecer informações sobre a origem da falsificação do papel-moeda.

O sistema de imagiamento pode ser implementado em laboratórios forenses, onde marcadores químicos polares e incolores poderiam ser usados. Assim, eles seriam irreprodutíveis por sistemas de *scanning* ou fotocópias, sendo apenas identificado pelo sistema MS (DESI-MS ou EASI-MS). Um novo item de segurança, portanto, poderia ser criado, podendo exclusivamente distinguir cada cédula.



### V. Adulteração de Combustível

### V.1 Introdução

No início de 2010, uma nova técnica, derivada da EASI-MS, tem sido desenvolvida pelo nosso grupo: *Venture Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (V-EASI-MS).* Neste capítulo, será demonstradas as potencialidades de V-EASI-MS para identificar e controlar a qualidade de amostras de gasolinas comerciais adulteradas pela adição de querosene e diesel. A metodologia desenvolvida não requer nenhum procedimento de preparo de amostra, uma vez que as amostras de gasolina, querosene, diesel e blendas de gasolina/querosene e gasolina/diesel são analisadas diretamente por V-EASI(+)-MS.

Adicionalmente, os resultados são também confirmados pela técnica ESI-FT-ICR-MS. Gráficos de DBE (número de insaturações e anéis) *vs* número de carbonos (C) foram construídos com o objetivo de confirmar e aprofundar as discussões dos resultados obtidos por V-EASI(+)-MS.

### V.2 Procedimento Experimental

### V.2.1 Materiais e Reagentes

a) Solventes: Metanol grau-HPLC e ácido fórmico foram obtidos da Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA).

**b) Combustíveis:** Amostras de gasolina tipo C e diesel de boa qualidade foram fornecidas pela Central Analítica da Unicamp. Uma amostra comercial de querosene também foi fornecida pela King Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). A amostra de gasolina C foi adulterada por diesel (misturas de gasolina/diesel = 99/1, 90/10, 75/25 e 50/50 % v/v) e querosene (gasolina/querosene = 90:10, 75:25 e 50:50 % v/v).

Soluções de gasolina, diesel, querosene e misturas de gasolina foram preparadas (500  $\mu$ L da amostra por 1 mL de metanol acidificado) em um Eppendorf<sup>®</sup> e foram analisadas diretamente por V-EASI-MS.

### V.2.2 Caracterização

### V.2.2.1 Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (V-EASI-MS)

Uma fonte de V-EASI-MS apresenta um *design* similar a fonte de EASI-MS. A principal diferença está na substituição do sistema de bombeamento (bomba automática), onde na tubulação em forma de T (aço inoxidável), um de seus orifícios é substituído por um capilar de sílica de 100-125  $\mu$ m, que por efeito *Venturi*, proporciona a sucção do analito investigado a 20  $\mu$ L min<sup>-1</sup>, **Figura 52.** Metanol é utilizado como solvente.



Figura 52. Ilustração do sistema V-EASI-MS.

### V.2.2.2 Electrospray Ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FT-ICR-MS)

Para os experimentos de ESI-FT-ICR-MS, uma concentração de 50  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> foi preparada em uma solução de metanol acidificado (0,1 % de ácido fórmico). A infusão no equipamento foi feita utilizando uma microseringa de 500  $\mu$ L (Hamilton, Reno, NV) a uma vazão de 5  $\mu$ L min<sup>-1</sup> dentro de uma fonte de ESI. O espectrômetro de massas (7.2T LTQ FT Ultra, ThemoScientific, Bremen, Germany) foi operado no modo positivo de aquisição de íons em uma região de *m*/*z* 100 – 800. As condições gerais de ESI foram: **a)** pressão do gás: 0,3 psi; **b)** voltagem no capilar: 3,1 kV e temperatura de tranferência de íons de 270 °C. Os espectros de massas foram obtidos após a aquisição de 100 *microscans.* O *software Xcalibur 2.0* foi utilizado para o processamento dos dados.

Para ajudar a sumarizar, interpretar e vizualizar os dados de MS, gráficos de número de carbono (C) *vs* DBE foram construídos de acordo com as espécies polares detectadas, que em sua maioria, pertencem a classe dos nitrogenados, classe N. Esses gráficos foram processados usando o *software* PetroMS [19], onde a composição elementar é atribuída com base nos valores de *m/z obtidos*.

### V.3 Resultados e Discussão

A técnica de ionização V-EASI-MS foi utilizada para a determinação de compostos polares em derivados de petróleo. Sem qualquer procedimento de preparo de amostra, os espectros de V-EASI(+)-MS para a gasolina, querosene e diesel são mostrados nas Figura 53a-c. Para uma amostra de gasolina de boa gualidade, uma série de íons característicos de m/z 94, 108, 122, 136, 150 e 164 são observados **Figura 53a**. Essas espécies correspondem a série homóloga de moléculas da classe N, que são as alquilpiridinas protonadas, [C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>, possuindo número de C que varia de 6 – 11 e DBE = 4,0 [94]. Para o guerosene, duas séries homólogas para a classe N foram encontradas: a primeira série é idêntica ao encontrado na gasolina (íons de m/z 122, 136 e 150). A segunda é específica e mais abundante, correspondendo à moléculas protonadas com íons de *m/z* 176, 190, 204, 218, 232 e 246, **Figura 53b**. Estas espécies são também derivadas das alguilpiridinas; entretanto, apresentam um anel alifático ligado a estrutura da piridina. Isto aumenta o DBE em uma unidade (DBE = 5). A fórmula estrutural dessas espécies é mostrada na Figura 53b onde o número de C varia de 12 – 17. Para o diesel, o espectro de V-EASI(+)-MS mostra uma grande quantidade de espécies polares, Figura 53c. Quando uma mistura desse tipo é analisada em um equipamento de resolução unitária (como um monoquadrupo, por exemplo), os sinais estão muito próximos, formando sinais contínuos a baixas intensidades relativas (< 50 %), o que torna impossível a determinação e interpretação das fórmulas estruturais e, respectivamente, da identificação das classes presentes. Shi et al. mostraram que a classe N costuma ser a espécie polar dominante em derivados de petróleo [95], apresentando uma abundância de até 93 %. Marshal et al. [96] mostraram que a classe N está entre as espécies polares mais estáveis, sendo difícil a sua remoção, mesmo com a realização de hidrotratamentos catalíticos.

De uma maneira geral, todas as amostras são ricas em marcadores naturais com valores de m/z diferentes e específicos, que aumentam a medida que a distribuição da massa molar de uma determinada fração de petróleo aumenta.



Figura 53. V-EASI(+)-MS para derivados de petróleo.

As **Figura 54 e Figura** 55 mostram misturas de gasolina/querosene e gasolina/diesel em várias proporções, respectivamente. Para as misturas de gasolina/querosene consegue-se um limite de detecção de até 10 % (v/v), **Figura 54c**. Adicionalmente, se for monitorado a variação da razão da intensidade relativa do íon m/z 190 (querosene) pelo m/z 122 (gasolina), uma relação linear entre as intensidades desses sinais e um coeficiente de correlação de Pearson de 0,97099 foi obtido, **Figura 54d**. Portanto, foi possível estimar a concentração de querosene presente em amostras comerciais de gasolina usando a equação da reta:

$$y = 0.061x + 0.01044$$
 (2)

onde y = razão da intensidade relativa dos sinais (*m/z* 190 / *m/z* 122) e x = concentração de querosene na mistura. Skrobot *et al.* [71] estudaram a aplicação da quimiometria no tratamento de matrizes de dados obtidas por medidas de GC para detectar a presença de solventes em amostras de gasolina comercial. O modelo construído pelos autores indicam a presença de nafta, *tiner* ou querosene na gasolina. Entretanto, ele falhou quando concentrações muito baixas estão presentes nas misturas. No caso das misturas gasolina/querosene, o modelo só detectou até 20 % (v/v). Logo, os resultados obtidos pela técnica V-EASI(+)-MS encontram-se em perfeita concordância com a literatura. Além disso, o procedimento e a interpretação dos resultados usando V-EASI-MS é bem simples, rápido e eficiente. Para as misturas de gasolina/diesel, consegue-se obter limites de detecção menores do que 1 % (v/v), **Figura 55c.** Isto é devido ao fato das amostras de diesel serem "ricas" em marcadores polares naturais, o que não acontece com amostras de querosene, **Figura 53b**.



**Figura 54.** V-EASI(+)-MS para misturas de gasolina/querosene (**a-c**) e a curva analítica de calibração (**d**) a partir da razão dos sinais de m/z 190/122.



Figura 55. V-EASI(+) MS para misturas de gasolina/diesel (v/v %).

Afim de identificar as estruturas presentes nas amostras de diesel, experimentos de ESI-FT-ICR-MS foram realizados. A **Figura 56a-b** mostra os espectros de V-EASI-MS e ESI-FT-ICR-MS para a amostra de diesel. Observa-se uma excelente correlação entre os

dois sistemas de ionização. Uma distribuição gaussiana centrada em  $m/z \approx 400$  foi observada em ambos os casos. Similar às amostras de gasolina e querosene, as espécies polares mais intensas observadas nas amostras de diesel também pertencem a classe N. A **Figura 56c** mostra um gráfico de intensidade relativa (%) *versus* DBE para a classe N. Pode-se observar que as espécies mais abundantes apresentam valores de DBE em torno de 7-9 e suas estruturas são mostradas na parte superior. Estas espécies são reportadas na literatura [95]. Além disso, marcadores naturais nitrogenados presentes nas amostras de querosene, DBE = 5, estão também presentes nas amostras de diesel; entretanto, em uma menor concentração, como mostrado na **Figura 56c**. Já os marcadores naturais nitrogenados para a amostra de gasolina, DBE = 4, estão ausentes nas amostras de diesel, o que potencializa a utilização dessas espécies como íons diagnósticos para identificar possíveis adulterações.



**Figura 56.** Comparação entre os espectros de **(a)** V-EASI(+)-MS e **(b)** ESI(+)-FT-ICR-MS para uma amostra de diesel; **(c)** Gráfico da Intensidade relativa (%) *vs* DBE para a amostra de diesel e a elucidação das estruturas das classe dos nitrogenados.

Em Petroleômica, com a finalidade de sumarizar, visualizar e interpretar os dados devido a sua imensa complexidade, alguns gráficos são comumente utilizados como gráfico de Kendrick [97] e o diagrama de van Krevelen [98]. Usando a técnica ESI(+)-FT-

ICR-MS e o software PetroMS desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa [19], foi possível construir gráficos de DBE versus número de C para amostras de gasolina, querosene e diesel, Figura 57a-c, analisando apenas a classe N. Nesses gráficos, foi possível observar a variação da série homóloga em função do DBE. O aumento do grau de insaturação aumentará valores de DBE, sendo que quanto maior for o valor do DBE, mais alta será a linha do gráfico DBE x C. Em comparação com os resultados obtidos na Figura 53, pode-se agora identificar outras séries homólogas que estão presentes na gasolina e no querosene, entretanto, em menores proporções (coloração azul = intensidades < 10 %). Em geral, as séries homólogas variaram de 5 a 20 carbonos, sendo mais dispersa para a amostra de querosene. A série homóloga mais abundante para as amostras de gasolina e querosene apresentam valores de DBE = 4 e 5 e número de C = 8 e 16, respectivamente. Para a amostra de diesel, séries homólogas existentes com C variando de 15 a 50 e o DBE = 4 – 16 foram observadas. As séries mais abundantes são centradas em DBE = 7-9 e C = 25-30. As Figuras 57d-e mostram os gráficos de DBE vs C para misturas de gasolina/querosene e gasolina/diesel a uma concentração de 80/20 % v/v. Em ambos os casos, a presença de querosene e diesel muda drasticamente o perfil da distribuição esperada para uma amostra de gasolina comercial. Maiores dispersões nos valores de DBE e número de C são observados quando uma pequena fração de diesel ou querosene estão presentes na gasolina comercial.



**Figura 57.** DBE *versus* C para Classe N: (a) gasolina, (b) querosene, (c) diesel, (d) mistura gasolina/querosene 80/20 % (v/v) e (e) gasolina/diesel 80/20 % (v/v).

### V.4 Conclusão

Uma nova e simples metodologia foi desenvolvida para uma análise rápida e confiável para caracterizar e controlar a qualidade de derivados de petróleo, principalmente da gasolina comercial. Derivada do EASI-MS, *venturi easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry* (V-EASI-MS) é uma metodologia que permite detectar e quantificar adulterações na gasolina comercial a partir da adição de querosene ou diesel. Os limites de detecção obtidos, principalmente para o diesel, mostraram-se menores do que os descritos na literatura.

Os resultados de V-EASI(+)-MS mostraram a presença de uma única e abundante série homóloga correspondente às alquilpiridinas (DBE = 4.0) para uma amostra de gasolina comercial. Esse resultado pode ser usado como um indicativo para considerar que a gasolina comercial se encontra isenta da adição de solventes como o querosene e o diesel. Neste caso, a presença de outras séries homólogas com maiores valores de DBE deverá estar presente. Esses resultados foram também confirmados via aplicação por infusão direta por ESI(+)-FT-ICR-MS.

# Capítulo VI Conclusões

Gerais

### VI. Conclusões Gerais e Perspectivas

Neste trabalho, o perfil químico de várias drogas de abuso (anfetaminas, piperazinas, cocaína e LSD), documentos e derivados de petróleo foram investigados. Técnicas de ionização à condições ambientes como a *easy ambient sonic-spray ionization* são poderosas ferramentas na caracterização de amostras na sua forma original, como é o caso de amostras de *ecstasy* e LSD, que são vendidos como comprimidos e selos. Quando um simples analisador de massas (monoquadrupolo) é combinado com uma fonte de EASI, o perfil químico de várias drogas de abuso foi obtido além de várias outras espécies como lactose, glicose, oligossacarídos, lidocaína e cafeína. Quando se desejou obter informações mais conclusivas sobre o perfil orgânicos dessas drogas, analisadores de massas com maiores resoluções e exatidões como FT-ICR-MS e TOF foram utilizados.

A mobilidade iônica dos isômeros clorofenilpiperazina foram estudadas. A metodologia desenvolvida consegue separar apenas isômero *o*-CPP, usando CO<sub>2</sub> como *drift gas*. Casos reais de drogas de abuso vendidas como *ecstasy* contendo m-CPP foram também analisadas. Todos os resultados mostraram a presença de um único pico, correspondendo ao isômero (*m*-CPP ou *p*-CPP) ou uma mistura de *m*-CPP e *p*-CPP. Logo, a presença do isômero *o*-CPP pode ser descartado nas drogas de abuso estudadas.

Foi também demonstrado que a cromatografia em camada delgada (CCD) continua sendo uma técnica confiável para a identificação do MDMA e outros adulterantes em comprimidos de *ecstasy*; entretanto, a possibilidade de obterem resultados falso-negativos não pode ser descartada. A associação da CCD com EASI-MS potencializa a identificação de todas as anfetaminas que poderiam ser usadas na fabricação do comprimido de *ecstasy*.

Uma outra importante metodologia que pode ser empregada na determinação de contaminantes inorgânicos em drogas de abuso é a técnica de fluorescência de raios-X (XRF). Perfis inorgânicos foram construídos para várias drogas de abuso. Esses dados, associados a ferramentas quimiométricas permitiram classificar as drogas de abuso estudadas.

Para análise de documentos, EASI-MS e DESI-MS podem ser usados como um método de *fingerprints* direto, robusco, praticamente não-destrutivo, rápido e simples para a investigação da autenticidade do papel-moeda nacional e internacional. Para investigações forenses, esse método poderia ser usado para complementar resultados de

inspeções feitas usando microscopia tradicional e ajudando especialistas em problemas que apresentam uma maior complexidade, agregando informações sobre a origem da falsificação do papel-moeda, como por exemplo, o tipo de impressora usada. O sistema de imagiamento pode ser implementado em laboratórios forenses, onde marcadores químicos polares e incolores poderiam ser usados. Logo, um novo item de segurança poderia ser criado, podendo ser distinguível para cada cédula e substituído rotineiramente, o que dificultaria a falsificação. *Fingerprints* de EASI-MS são também metodologias úteis para analisar a autenticidade de documentos veículares. O estabilizante de m/z 249 é um marcador químico que indica a falsificação, sendo originado provalvemente de tintas utilizadas por impressoras de tipo *laserjet*.

Uma nova metodologia foi desenvolvia para estudar derivados de petróleo: *venture easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*, V-EASI-MS. A presença de uma série homólga abundante, como as alquil-piridinas é um indicativo de que uma amostra de gasolina comercial seja considerada de boa qualidade. A presença de outras séries homólogas com maiores valores de DBE para a classe N é indicativo de que adulterantes como querosene e diesel foram adicionados na gasolina.

# Capítulo VII Referências

### Bibliográficas

### VII. Referências Bibliográficas

- [1] Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. "Spectrometric identification of Organic Compounds", 7. ed., John Wiley & Sons Ed., Danvers, 2005.
- [2] Ham, B. M. Even electron mass spectrometry with biomecule applications. Jonh Wiley & Sons Ed., Hoboken, 2008.
- [3] Alberici, Rosana M.; Simas, Rosineide C.; Sanvido, Gustavo B.; Romão, W.; Lalli, P.
  M.; Benassi, M.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world". Anal Bioanal Chem, v. 398, p. 265, 2010.
- [4] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. **Science**, v. 246, p. 64, 1989.
- [5] Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Quím Nova, v. 29, p. 287, 2006.
- [6] Cole, R. B. "Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals instrumentation and applications". Jonh Wiley & Sons Ed., New York, 1997.
- [7] Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; Takats, Z.; Wiseman, J. M. Ambient Mass Spectrometry, Science, v. 311, p. 1566, 2006.
- [8] Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. Anal Chem, v. 66, p. 4557, 1994.
- [9] Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. Sonic Spray Mass Spectrometry. Anal Chem, v. 67, p. 2878, 1995.
- [10] Hirabayashi, A.; Hirabayashi, Y.; Sakairi, M.; Koizumi, H. Rapid Commun Mass Spectrom, v. 10, p. 1703, 1996.
- [11] Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. Multiply-charged Ion Formation by Sonic Spray. Rapid Commun Mass Spectrom, v. 20, p. 2901, 2006.
- [12] Haddad, R.; Sparrapan. R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-Membrane Interface Mass Spectrometry for Direct Analysis of Solution Constituents. Anal Chem, v. 80, p. 898, 2008.
- [13] Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 20, p. 2901, 2006.

- [14] Haddad, R.; Catharino, R. R.; Marques, L. A.; Eberlin, M. N. Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 22, p. 3662, 2008.
- [15] Saraiva, A. S.; Abdelnur, P. V.; Catharino, R. R.; Nunes, G.; Eberlin, M. N. Fabric softeners: nearly instantaneous characterization and quality control of cationic surfactants by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom,** v. 23, p. 357, 2009.
- [16] Simas, R. C.; Catharino, R. R.; Cunha, I. B. S.; Cabral, E. C.; Barrera-Arellano, D.; Eberlin, M. N.; Alberici, R. M. Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry, **Analyst**, v. 135, p. 738, 2010.
- [17] Abdelnur, P. V.; Eberlin, L. S.; de Sá, G. F.; Souza, V.; Eberlin, M. N. Single-shot biodiesel analysis: nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 80, p. 7882, 2008.
- [18] Sawaya, A. C. H. F.; Abdelnurb, P. V.; Eberlin, M. N.; Kumazawac, S.; Ahnd, M. R.; Bangd, K. S.; Nagarajae, N.; Bankovaf, V. S.; Afrouzang, H. Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass Spectrometry, **Talanta**, v. 81, p. 100, 2010.
- [19] Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Simas, R. C.; Nascimento, H. D. L.; Klitzke, C. F.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Neto, E. V. S.; Rodgers, R. P.; Eberlin, M. N. Petroleomics by EASY(±) FT-ICR MS. Anal Chem, v. 82, p. 3990, 2010.
- [20] Alberici, R. M.; Simas, R. C.; de Souza, V.; de Sá, G. F.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N. Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Anal Chim Acta, v. 659, p. 15, 2010.
- [21] Geankoplis, C. J. **Transport processes and unit operations**, 3<sup>rd</sup> ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1993.
- [22] Wachs, T.; Henion, J. Electrospray Device for Coupling Microscale Separations and Other Miniaturized Devices with Electrospray Mass Spectrometry. Anal Chem, v. 73, p. 632, 2001.
- [23] Asano, K. G.; Ford, M. J.; Tomkins, B. A.; Van Berkel, G. J. Self-Aspirating Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source for Direct Sampling of Analytes on

Surfaces and in Liquid Solutions. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 19, p. 2305, 2005.

- [24] Geromanos, S.; Philip, J.; Freckleton, G.; Tempst, P. In Jection adaptable Fine Ionization Source ('JaFIS') for continuous flow nano-electrospray. Rapid Commun Mass Spectrom, v. 12, p. 551, 1998.
- [25] Geromanos, S.; Freckleton, G.; Tempst, P. Tuning of an electrospray ionization source for maximum peptide-ion transmission into a mass spectrometer. Anal Chem, v. 72, p. 777, 2000.
- [26] Haddad, R. H.; Milagre, M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. Easy ambient sonicspray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. Anal Chem, v. 80, p. 2744, 2008.
- [27] Leary, J. J.; Schmidt, R. L. Quadrupole mass spectrometers: na intuitive look at the math. J. Chem Edu, v. 73, p. 1141, 1996.
- [28] Miller, P. E.; Denton, M. B. The quadrupole mass filter:basic operating concepts. J. Chem. Edu, v. 63, p. 617, 1986
- [29] Stephens, W. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. Phys Reviews, v.69, p. 691, 1946.
- [30] Dass, C. Fundamental of contemporary mass spectrometry. Jonhn Wiley & Sons ed. New Jersey, 2007.
- [31] Hoffmann, E.; Stroobant, V. Mass spectrometry: principles and applications, 3<sup>rd</sup>
  ed. John Wiley & Sons Inc, London, 2007.
- [32] Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Ernmetta, M. R.; Rodgers, R. P.; Blakney, G. T.; Nilsson, C. L. Fourier transform ion cyclotron resonance: state of the art. Eur J Mass Spect, v. 13, p. 57, 2007.
- [33] Deng, W.; Gomez, A. Influence of space charge on the scale-up of multiplexed electrospray. Aer Sci, v. 38, p. 1062, 2007.
- [34] Lalli, P. M. Dissertação de mestrado: "Mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas: Interferência de parâmetros do *drift-gas* na resolução de anilinas substituídas e determinação da mobilidade intrínseca de agregados de liquidos iônicos", Campinas, 2009.
- [35] Jenkins, R. X-Ray Fluorescence Spectrometry. 2.ed., Wiley-Interscience, New York, 1999.
- [36] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nienman, T. A. Príncipios de Análise Instrumental, 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- [37] Bortoleto, G. G. Desenvolvimento de métodos analíticos usando espectrometria de raios X e quimiometria. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- [38] Compton, A. H. The corpuscular properties of light. **Phy Rev Supplement**, v. 1, p. 74, 1929.
- [39] Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. Quím Nova, v. 22, p. 724, 1999.
- [40] Hopke, P. K. The evolution of chemometrics. Analy Chim Acta, v. 500, p. 365, 2003.
- [41] Geladi P. Chemometris in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochim Acta B**, v. 58, p. 767, 2003.
- [42] Hopke, P. K. The evolution of chemometrics. Anal Chim Acta, v. 500, p. 365, 2003.
- [43] Pearson, K. On lines and planes of closest fit. Phylosoph Magaz. v. 2, p. 559, 1901.
- [44] Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. Principal component analysis. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 2, p, 37, 1987.
- [45] Silva, F. V.; Kamogawa, M. Y.; Ferreira, M. M. C.; Nóbrega, J. A.; Nogueira, A. R. A. A discriminação geográfica de águas minerais do Estado de São Paulo através da análise exploratória. Eclética Quím, v. 27, p. 91, 2002.
- [46] Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. Quím Nova, v. 29, p. 1401, 2006.
- [47] Sanvido, G. B.; Haddad, R.; Neto, R. C. S.; Cosso, R. G.; Maldaner, A. O.; Maia, D. R. J.; Eberlin, L. S.; Eberlin, M. N. EASI-MS Fingerprinting of Banknotes: Authenticity and Couterfeiting Process. 1° Encontro Nacional de Química Forense, 2008.
- [48] Luo, L. Chemometrics and its applications to x-ray spectrometry. X-Ray Spectrom, v. 35, p. 215, 2006.
- [49] Alexandre, T. L. Espectrometria de Raios-X aliada à Quimiometria no Estudo de Vegetais. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- [50] Pereira, F. M. V. Potencialidades da espectroscopia de raios-X combinada à Quimiometria para o controle de qualidade de tintas e produtos relacionados. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

- [51] Passagli, M.; "Toxicologia Forense", 2a Ed, ed. Millennum, Campinas, 2009.
- [52] Schawartz, S. H.; Miller, N. S. MDMA (Ecstasy) and the rave: a review. Pediatrics, v. 100, p. 705, 1997.
- [53] Morton, J. Ecstasy: pharmacology and neurotoxicity. **Pharmacology**, v. 5, p. 79, 2005.
- [54] Kalant, H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs.Can Med Assoc J, v. 165, p. 917, 2001.
- [55] Gowing, L. R.; Henry-Edwards, S. M.; Irvini, R. J.; Ali, R. L. The health effects of ecstasy: a literature review. **Drug and Alcohol Review**, v. 21. p. 53, 2002.
- [56] Bossong, M. G.; Brunt, T. M.; Van Dijk, J. P.; Rigter, S. M.; Hoek, J.; Goldschmidt, H. M. J.; Niesink, R. J. M. mCPP: an undesired addition to the ecstasy market. J
   Psychopharmacol 2009, doi:10.1177/0269881109102541.
- [57] Nikolova, N. D. I. Piperazine based Substances of Abuse: A New Party Pills on Bulgarian Drug market. **J Psychopharmacol**, v. 652, 2007.
- [58] < <u>http://www.dpf.gov.br/</u>>, acessado em outubro de 2010.
- [59] Maldaner, A. O.; Souza, D. L.; Botelho, E. D.; Talhavini, M. 9,10-Dihidro-LSD: Uma nova substância encontrada em selos e micropontos. 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2009.
- [60] Fester, U. "Pratical LSD Manufacture". Loompanics Unlimited Ed., pag. 24, Washington, 1995.
- [61] Clarkson, E. D.; Lesser, D.; Paul, B. D. Effective GC-MS procedure for detecting iso-LSD in urine after base-catalyzed conversion to LSD. Clinical Chemistry, v. 44, p. 287, 1998.
- [62] Clare B. W. A novel quantum theoretic QSAR for hallucinogenic tryptamines: a major factor is the orientation of  $\pi$  orbital nodes. **J Mol Struct: Theochem,** v. 712, p. 143, 2004.
- [63] Costa, J. L.; Wang, A. Y.; Micke, G. A.; Maldaner, A. O.; Romano, R. L.; M.-Júnior, H. A.; Neto, O. N.; Tavares, M. F. M. Chemical identification of 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB). Foren Sci Intern, v. 173, p. 130, 2007.
- [64] Kauppila, T. J.; Arvola, V.; Haapala, M.; Pol, J.; Aalberg, L.; Saarela, V.; Franssila, S.; Kotiaho, T.; Kostiainen, R. Direct analysis of illicit drugs by desorption atmospheric pressure photoionization. **Rapid Commun Mass Spectrom,** v. 22, p. 979, 2008.
- [65] Mendes LB. "Documentoscopia", 3 ed., Millennium Ed., Campinas, 2010.

- [66] Takeshita, E.V. Tese de doutorado: "Adulteração de Gasolina por Adição de Solventes: Análise dos Parâmetros Físico-Químicos". Florianópolis, 2006.
- [67] Heinemann, H. The Chemistry and Technology of Petroleum. Chapter 26: Products. 4<sup>th</sup> Edition, Taylor & Francis Group. New York, 2006.
- [68] ANP, National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels, Ordinance N°. 274, <u>http://www.anp.gov.br</u>, 1/11/2001.
- [69] Alberici, R. M.; Simas, RC.; de Souza, V.; de Sá, G. F.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N. Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Anal Chim Acta, v. 659, p. 15, 2010.
- [70] Moreira, L. S.; D'Avila, L. A.; Azevedo, D. A. Automotive Gasoline Quality Analysis by Gas Chromatography: Study of Adulteration. **Chromatographia**, v. 58, p. 501, 2003.
- [71] Skrobot, V. L.; Castro, E. V. R.; Pereira, R. C. C.; Pasa, V. M. D.; Fortes, I C. P. Use of Principal Component Analysis (PCA) and Linear Discriminant Analysis (LDA) in Gas Chromatographic (GC) Data in the Investigation of Gasoline Adulteration. Energy & Fuels, v. 21, p. 3394, 2007.
- [72] Rigo, T. R. M.; Flumignan, D. L.; Boralle, N.; Oliveira, J. E. <sup>1</sup>H NMR Fingerprinting of Brazilian Commercial Gasoline: Pattern-Recognition Analyses for Origin Authentication Purposes. Energy & Fuels, v. 23, p. 3954, 2009.
- [73] Kiser, C. R.; Borges, J. L.; Santos, A. R.; Azevedo, D. A.; D'Avila, L. A. Quality control of gasoline by 1H NMR: Aromatics, olefinics, paraffinics and oxygenated and benzene contents. Fuels, v. 89, p. 99, 2010.
- [74] Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long Range Potential. J Phys Chem, v. 100, p. 16082, 1996.
- [75] Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F. An Exact Hard Spheres Scattering Model for the Mobilities of Polyatomic Ions. Chem Phys Lett, v. 261, p. 86, 1996.
- [76] Mechref, Y.; Novotny, M.V. Structural characterization of oligosaccharides using MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. Anal Chem, v. 75, p. 4895, 2003.
- [77] Lewandrowski, U.; Resemann, A.; Sickmann, A. Laser-Induced Dissociation/High-Energy Collision-Induced Dissociation Fragmentation Using MALDI-TOF/TOF-MS Instrumentation for the Analysis of Neutral and Acidic Oligosaccharides. Anal Chem, v. 77(10), p. 3274, 2005.

- [78] Nyadong, L.; Harris, G. A.; Balayssac, S.; Galhena, A. S.; Malet-martino, M.; Martino, R.; Parry, R. M.; Wang, M. D.; Fernández, F. M.; Gilard, V. Combining Two-Dimensional Diffusion-Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Imaging Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry for the Integral Investigation of Counterfeit Pharmaceuticals. Anal Chem, v. 81, p. 4803, 2009.
- [79] CRC Handbook of Chemistry and Phsics, 70th ed.; Lide, D. R.; Ed.; Boca Raton, 1989.
- [80] m-Chlorophenylpiperazine (mCPP). Annex 1 Technical information on mCPP, European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction, <u>http://www.emcdda.europa.eu/www/advancedsearch.cfm</u>, acessado em Julho de 2010.
- [81] Lehner, A. F.; Craig, M.; Fannin, N.; Bush, L.; Tobin T. Fragmentation patterns of selected ergot alkaloids by electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. J Mass Spectrom, v. 39, p. 1275, 2004.
- [82] Pereira, F.M.V.; Bueno, M.I.M.S. Direct chromium speciation using X-ray spectrometry and chemometrics. Chemom Intell Lab Syst, v. 92, p. 131, 2008.
- [83] Potts, P. J.; Ellis, A. T.; Kregsamer, P.; Streli, C.; Vanhoof, C.; West, M.; Wobrauschek, P. J. Atomic spectrometry update X-ray fluorescence spectrometry. J Anal At Spectrom, v. 21, p. 1076, 2006.
- [84] Tsuji, K.; Injuk, J.; Grieken, V. X-ray Spectrometry: Recent Techonological Advances, John Wiley & Sons, Chichester, 2004.
- [85] Koper, C.; Boom, C. V. D.; Wiard, W.; Schrader, M.; De Joode, P., Peijil, G. Van Der.; Bolck, A. Elemental analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): A tool to determine the synthesis method and trace links. Foren Sci Intern, v. 171, p. 171, 2007.
- [86] Muratsu, S.; Ninomiya, T.; Kagoshima, Y.; Matsui, J. Trace elemental analysis of drugs os abuse using synchrotron radiation Total Reflection X-Ray Fluorescence analysis (SR-TXRF). J Forensic Sci, v. 47, p. 944, 2002.
- [87] Cason T. A. D. An evaluation of the potential for clandestine manufacture of 3,4methylenedioxyamphetamine (MDA) analogs and homologs. J Forensic Sci, v. 35(3), p. 675, 1990.

- [88] Moore, J. M.; Casale, J. F. In-depth chromatographic analyses of illicit cocaine and its precursor, coca leaves. **J Chromatography A,** v. 674, p. 165, 1994.
- [89] Casale, J. F.; Boudreau, D. K.; Jones, L. M. Tropane Ethyl Esters in Illicit Cocaine: Isolation, Detection and Determination of New Manufacturing By-Products from the Clandestine Purification of Crude Cocaine Base with Ethanol. J Forensic Sci, v. 53, p. 661, 2008.
- [90] Omote, K.; Kohno, H.; Toda, K. X-ray analysis utilizing the fundamental parameter method for the determination of the elemental composition in plant samples. Anal Chim Acta, v. 307, p. 117, 1995.
- [91] Fidêncio, P. H.; Poppi, R. J.; Andrade, J. C.; Abreu, M. F. Use of Radial Basis Function Networks and Near-Infrared Spectroscopy for the Determination of Total Nitrogen Content in Soils from Sao Paulo State. Anal Scie, v. 25, p. 945, 2008.
- [92] Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Dill, A. L.; Cooks, R. G. Latent Fingerprint Chemical Imaging by Mass Spectrometry. Science, v. 321, p. 805, 2008.
- [93] Simas, R. C.; Catharino, R. R., Cunha, I. B. S.; Cabral, E. C.; Barrera-Arellano, D.; Eberlin, M.N.; Alberici, R. M. Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 135, p. 738, 2010.
- [94] Alberici, R. M.; Simas, R. C.; de Souza, V.; de Sá, G.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N. Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Anal Chim Acta, v. 659, p. 15, 2010.
- [95] Shi, Q.; Xu, C.; Zhao, S.; Chung, K. H.; Zhang, Y.; Gao, W. Characterization of Basic Nitrogen Species in Coker Gas Oils by Positive-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. **Energy Fuels**, v. 24, p. 563, 2010.
- [96] Klein, G. C.; Rodgers R. P.; Marshall, A. G. Identification of hydrotreatment-resistant heteroatomic species in a crude oil distillation cut by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. Fuels, v. 85, p. 2071, 2006.
- [97] Hughey, C. A.; Hendrickson, C. L.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. Kendrick Mass Defect Spectrum: A Compact Visual Analysis for Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra. Anal Chem, v. 73, p. 4676, 2001.

[98] van Krevelen, D. W. Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. **Fuel**, v. 29, p. 269, 1950.

# ANEXO I

# Analyst

Interdisciplinary detection science

www.rsc.org/analyst

Volume 135 | Number 10 | October 2010 | Pages 2453-2744



ISSN 0003-2654

### **RSC**Publishing

**CRITICAL REVIEW** James F. Rusling *et al.* Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer PAPER

Marcos N. Eberlin *et al*. Instantaneous chemical profiles of banknotes by ambient mass spectrometry



#### Instantaneous chemical profiles of banknotes by ambient mass spectrometry

Livia S. Eberlin,<sup>*ab*</sup> Renato Haddad,<sup>*a*</sup> Ramon C. Sarabia Neto,<sup>*a*</sup> Ricardo G. Cosso,<sup>*c*</sup> Denison R. J. Maia,<sup>*c*</sup> Adriano O. Maldaner,<sup>*d*</sup> Jorge Jardim Zacca,<sup>*d*</sup> Gustavo B. Sanvido,<sup>*a*</sup> Wanderson Romão,<sup>*a*</sup> Boniek G. Vaz,<sup>*a*</sup> Demian R. Ifa,<sup>*b*</sup> Allison Dill,<sup>*b*</sup> R. Graham Cooks<sup>*b*</sup> and Marcos N. Eberlin<sup>*a*</sup>

Received 16th April 2010, Accepted 2nd June 2010 DOI: 10.1039/c0an00243g

Using two desorption/ionization techniques (DESI and EASI) and Brazilian real, US\$ dollar, and euro bills as proof-of-principle techniques and samples, direct analysis by ambient mass spectrometry is shown to function as an instantaneous, reproducible, and non-destructive method for chemical analysis of banknotes. Characteristic chemical profiles were observed for the authentic bills and for the counterfeit bills made using different printing processes (inkjet, laserjet, phaser and off-set printers). Detection of real-world counterfeit bills and identification of the counterfeiting method has also been demonstrated. Chemically selective 2D imaging of banknotes has also been used to confirm counterfeiting. The nature of some key diagnostic ions has also been investigated *via* high accuracy FTMS measurements. The general applicability of ambient MS analysis for *anti*-counterfeiting strategies particularly *via* the use of "invisible ink" markers is discussed.

#### Introduction

Banknote counterfeiting is a major type of financial crime. This illegal and potentially profitable practice has been expanding worldwide both in quantity and sophistication.<sup>1</sup> US dollars, owing to their global circulation, have been the greatest target for counterfeiting, but since the introduction of the euro as the common currency in the European Union, counterfeiting of euro banknotes has also become a great threat. In Brazil, after the economic stability achieved with the introduction of the real (R\$) currency in 1994, there has also been an increasing growth in banknote counterfeiting and sophistication. Forensic laboratories in law-enforcement institutions worldwide are therefore confronted with an increasing demand to analyze larger numbers of samples with faster responses and with reliable verdicts for samples fabricated with greater sophistication than ever before. Frequent improvements in computational image-capturing devices, image-processing software and copying and printing equipment have contributed to the increasing diversity and sophistication of the counterfeiting process. To confront this worldwide economic threat, it has been mandatory to develop more effective security items as well as analytical techniques able to perform rapid and ideally automated high throughput screening of banknote authenticity.

Spotting of counterfeit banknotes by the general public has relied mostly on sensory tests based on the look, feel and tilt angle, but the most sophisticated counterfeit notes often escape these subjective tests. An increasing number of security items such as sophisticated security papers, latent images, watermarks, magnetic strips, special printing techniques, holograms and areas

banknotes able to characterize and distinguish between original and counterfeit samples. IR spectroscopy and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) have also been used to correlate the chemical profiles of colored toner samples to the color photocopiers and the toner extracted from counterfeit banknotes.<sup>3</sup> Mass spectrometry<sup>4</sup> and laser desorption mass spectrometry<sup>5</sup> have also been used to detect colorants and pigments on banknotes. The main target of chemical analysis of banknotes has not been focused on counterfeiting, but rather on the detection of contamination by illegal drugs.<sup>6</sup>

> Recently, a series of desorption/ionization techniques for direct ambient mass spectrometry analysis has been introduced.<sup>7</sup> These revolutionary techniques have provided fast chemical profiles with unprecedented simplicity and speed. Ionization is performed in the open atmosphere followed by mass

with IR or UV light responses are therefore being applied, with a consequent increase in production costs. Counterfeiting uses

mainly computational reproduction methods, which include

image-capturing in electronic media (scanners), processing

(software) and printing (laser, ink-jet, off-set) or direct photo-

copying. Owing to the diversity of counterfeiting methods and

their increasing dissemination and sophistication, and counter-

reactions from the counterfeiters based on knowledge of the

security items employed, new security items and techniques must

constantly be created or improved for the law enforcement

agencies to stay "one step ahead". Although sensory inspection

of security items and optical evaluation of image quality and

patterns are most desirable and can still detect most counterfeit

banknotes, chemical analysis of banknotes, especially if new

security tests are based on chemical fingerprinting screening, may

provide an automated, fast and reliable approach able to detect

requirements but it has been only sporadically tested by forensic

laboratories. Microscope ATR-infrared spectroscopy applied at

several colorful selected areas.<sup>2</sup> for instance, has been shown to

provide an effective method for chemical analysis of euro

Chemical fingerprinting of banknotes could fullfill these

forgery of increasing quality with reliable results.

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brazil <sup>b</sup>Aston Laboratory, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA <sup>c</sup>Brazilian Federal Police, Ministry of Justice, São Paulo Division, São Paulo, SP, 05038-090, Brazil <sup>d</sup>Daravilan, Echard, Police, Ministry of Lating, National Institute of

<sup>&</sup>lt;sup>d</sup>Brazilian Federal Police, Ministry of Justice, National Institute of Criminalistics - INC, Brasilia, DF, 70.390-145, Brazil

spectrometric characterization directly from sample surfaces with little or no sample preparation or pre-separation procedures. The field was pioneered with desorption electrospray ionization (DESI)8 and direct analysis in real time (DART)9 but a variety of related techniques are currently available including ASAP,<sup>10</sup> ELDI,<sup>11</sup> EESI,<sup>12</sup> DAPPI,<sup>13</sup> and EASI.<sup>14,15</sup> Both DESI<sup>16</sup> and EASI17 have also been used to investigate ink manuscripts with regard to ink composition and aging. In addition, DESI-MS<sup>18</sup> as well as DART-MS<sup>19</sup> and DAPPI<sup>20</sup> have seen extensive use in the detection of counterfeit drugs, including 2D chemicalselective images of the tablets.18 Ambient MS seems therefore to be an attractive alternative for banknote inspection at the molecular level due to its ability to provide direct, fast and highly specific molecular signatures and chemical selective images from printed surfaces. DESI-MS and/or EASI-MS have already been applied with success in other forensic areas such as the detection of adulteration of oils,<sup>21</sup> perfumes,<sup>22</sup> and biofuels,<sup>23</sup> and the forensic applications of ambient mass spectrometry have recently been reviewed.24 Herein we investigate, via EASI-MS and DESI-MS, the ability of ambient mass spectrometry to allow chemical fingerprinting of banknotes, and discuss the general application of this approach for similar cases such as drug packages and tax labels and invisible bar codes.

#### Experimental

#### Chemical reagents and samples

Methanol of HPLC grade was purchased from Merck SA (Rio de Janeiro, Brazil) and Aldrich (USA) and used without further purification. Authentic and counterfeit banknotes were analyzed directly by EASI-MS or DESI-MS without any sample treatment. "Real-world" counterfeit banknotes were provided from apprehended samples by the Brazilian Federal Police Department in São Paulo-Brazil between the years 2008 and 2009.

#### MS data

Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) data in the positive ion mode was collected at the ThoMSon laboratory using either a QTRAP mass spectrometer (Applied Byosystems) or the linear ion trap of a hybrid LTO FTMS Ultra mass spectrometer (ThermoScientific, Bremen, Germany) with a homemade EASI source, which is described in detail elsewhere.15 The EASI and DESI sources are similar in design, with the EASI source being simplified to operate without an applied voltage in the sonic spray ionization<sup>25</sup> mode. Typical operation conditions were as follow: flow rate of acidified (0.1% formic acid) methanol of 20 mL min<sup>-1</sup>, nebulizing gas back pressure of ca. 30 bar, curtain gas pressure of 5 bar, de-clustering potential of 100 V probe, tip-to-banknote samples distance of ca. 2 mm, and capillary-banknotes-entrance angle of ca. 30 degrees. High resolution and high accuracy EASI-FTMS data were collected using the ICR cell of a 7.2T LTQ FTMS Ultra mass spectrometer with a mass resolving power of ca. 400 K at m/z 400 by summing 100 microscans. DESI-MS data were acquired at the Aston Laboratory (Purdue University) using a Thermo Fisher LTO (San Jose, CA, USA) linear ion trap mass spectrometer, equipped with a custom-built automated DESI ion source based on

a design by Prosolia (Indianapolis, IN, USA). The main LTQ operating parameters were as follows: spray voltage 5 kV; no automatic gain control; MS injection time 250 ms; and 2 microscans were summed. The DESI source used nitrogen sheath gas pressure 7 bar; scattering angle ca 10° and an acidified (0.1% formic acid) methanol–water 9:1 solution was sprayed at volumetric flow rates of 1.5 ml min<sup>-1</sup> at a nitrogen pressure of *ca*. 150 psi. DESI-MS imaging was carried out using an automated stage moving in an x,y plane in relation to a static extended bent capillary, which is described in detail elsewhere.<sup>26</sup> The size of the spray spot, under the normal DESI experimental conditions used, was measured to be *ca*. 250 × 250 µm<sup>2</sup> or less.<sup>27</sup> The pixel size was 200 × 200 µm<sup>2</sup>. Total time for imaging acquisition was *ca*. 20 min/cm<sup>2</sup>. The area covered during imaging was mapped by 100 × 100 pixels.

#### Chemometric analysis

EASI-MS data of the banknote samples were extracted using Analyst 4.1 (Applied Biosystems). Mass spectral data were accumulated, centered and aligned to generate a final data matrix of all samples for ions ranging from m/z 100 to 1000. To classify the banknotes, principal component analysis (PCA) was performed, for simplicity, on the total EASI-MS data with no omission of background or impurity ions. The Pirouette v. 3.11 program was used.

#### **Results and discussion**

#### Authentic R\$ banknotes of variable denominations

To test the ability of both EASI-MS and DESI-MS to fingerprint banknotes, we first analyzed authentic Brazilian real (R\$) banknotes of different nominal values (different designs and color profiles, see inserts in Fig. 1) as well as homemade counterfeit samples prepared by scanning authentic bills and printing copies using either laser jet, inkjet or phaser printers and common laser print paper (white alkaline paper).

Authentic R\$ banknotes of all denominations were tested, and Fig. 1 shows representative EASI(+)-MS for three common R\$ bills. Note that many different spots of the bill surface were examined but quite similar EASI-MS data were obtained throughout the whole printed surface. In general, total ion current for the R\$ bills was substantially low and most ions in the low m/z region are likely due to solvent and surface contaminants (see below). EASI-FTMS detects, however, a series of diagnostic ions of m/z 391, 413, 429, 803 and 819 in all the R\$ samples analyzed. Blank EASI-MS spectra using white paper and also a sample of authentic R\$ banknote paper<sup>28</sup> showed very low abundance "paper" ions (mostly of m/z 193 and 223 but with variable profiles)<sup>16</sup> that were undetectable from the banknote surfaces.

As Fig. 2 illustrates, similar chemical profiles with little variation as a function of banknote denomination or specific spots on the printed note surface were also observed for the DESI-MS experiment. Note the set of background ions probably due to solvent and surface contamination (m/z 304 for cocaine) and the series of diagnostic ions of m/z 391, 413, 429 and 803 and 819 due to the banknote plasticizer (see below). Therefore, regardless of the banknote nominal value and their contrasting artistic and



Fig. 1 Illustrative EASI(+)-MS of Brazilian R\$ banknotes of three different denominations obtained at printed areas. Background ions (o) as well as a series of diagnostic ions (\*) of *m*/*z* 413, 429, 803 and 819 are marked.

color patterns as well as the age or degree of use of the notes, both EASI-MS and DESI-MS appear to provide a characteristic chemical signature for the whole bill surface for authentic Brazilian R\$ banknotes due to the detection of a set of diagnostic ions (m/z 391, 413, 429 and 803 and 819). Note that hand grease from the manipulation of these bank notes should mainly add human triacylglicerides (TAG) but these molecules with masses around 900 Da<sup>21</sup> escaped detection with the solvent systems used in all notes investigated, even for the oldest ones.

Acquiring mass spectra using the high resolution and high accuracy ICR cell of the LTQ FTMS instrument, as well as examining the fragmentation profile as revealed by EASI-FTMS/ MS (not shown), allowed us to identify the nature of the diagnostic ions for the R\$ banknotes. They were found to correspond mainly to the plasticizer bis(2-ethylhexil)phthalate (M) detected as  $[M + H]^+$  of m/z 391;  $[M + Na]^+$  of m/z 413;  $[M + K]^+$  of m/z 429,  $[2M + Na]^+$  of m/z 803 and  $[2M + K]^+$  of m/z 819.

For the background ions, for instance, the ion of m/z 494 was attributed to the dihexadecyl dimethyl quaternary ammonium salt (C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> probably due to hand manipulation. Such salts are common in personal care products, wherein they are often added as softeners.<sup>29</sup> The ion of m/z 284 is due to contamination by a C<sub>19</sub>H<sub>41</sub>N aliphatic amine (as revealed by high accuracy m/z data) whereas those of m/z 523 and 551 are common lab contaminants from detergents.<sup>29</sup> The ion of m/z 304, which was sometimes detected, corresponds to protonated cocaine as evidenced by EASI-FTMS and probed by EASI-FTMS/MS data (not shown).<sup>30</sup> Cocaine is a common contaminant of banknotes in circulation.<sup>26</sup>

Fig. 3 displays representative EASI-MS fingerprints for the three types of homemade counterfeit samples. As compared to the authentic bills, ions with much higher abundance were easily detected for these counterfeit bills. The spectra were also very characteristic; those for inkjet and phaser bills displayed a broad oligometric series of ions from m/z 300–900 and from m/z700-1300, respectively, whereas those for laserjet bills showed a less diverse set of marker ions, the most characteristic being those of m/z 629, 734, 793 and 835. Note in Fig. 3 the highly contrasting EASI-MS chemical signatures for the homemade counterfeit bills as compared to those in Fig. 1 for the authentic bills. Again, high accuracy EASI-FTMS analysis allowed us to assign these marker ions to ethoxylated (repeating ions separated by 44 m/z units) or propoxylated (58 m/z units) alcohols detected mainly as [M + Na]<sup>+</sup> (Fig. 3). EASI-MS data was also very reproducible as several authentic samples and counterfeit samples analyzed on different days displayed similar profiles.

The EASI-MS data of Fig. 1 and 3 can be compared to the DESI-MS data of Fig. 2. Note that both DESI-MS and EASI-MS provide distinct chemical signatures for each sample type. Both techniques were also able to detect similar sets of diagnostic ions. For the inkjet printers, characteristic sets of oligomeric markers (mainly ethoxylated alcohols) centered around m/z 600 and separated by 44 m/z units were detected by both EASI-MS and DESI-MS. The counterfeit laser print bill analyzed by DESI-MS (Fig. 2) was produced by a laser printer from a different brand to that used to collect the EASI-MS data (Fig. 3); hence, both profiles were distinctive but very different from those of laserjet printers and authentic bills. In the DESI-MS profile for



Fig. 2 DESI(+)-MS of an authentic Brazilian R\$ banknote and homemade counterfeit banknotes made by using inkjet or laserjet printers.

the laser printer, a single and dominant diagnostic ion of m/z 680 was detected (Fig. 2), whereas the laserjet printer used in the EASI-MS experiment produced a richer set of major ions (Fig. 3).

For the authentic bills, although different samples, operators, instruments and ambient desorption/ionization techniques and their specific settings were used in the two laboratories, the same set of diagnostic ions was detected by both EASI-MS (Fig. 1) and DESI-MS (Fig. 2), most particularly those of m/z 391, 413, 429, 803 and 819 arising from the banknote plasticizer and from a common biocide.

#### Dollar and euro banknotes

Authentic samples of dollar and euro banknotes were also analyzed by EASI-FTMS (Fig. 4). Note that the set of diagnostic ions of m/z 391, 413, 429 and 803 and 831 that characterize the Brazilian R\$ banknotes were nearly undetected. The chemical profiles of the euro and dollar bills are unique and dominated by much more abundant oligomeric distributions of ions arising mainly from propoxylated alcohols separated by 58 m/z units. These distributions are quite distinctive for both the euro and dollar bills. The distribution for the euro bills is centered around m/z 900 and the oligomers are detected mainly as  $[M + Na]^+$ whereas that for the dollar bills is less diverse, and centered around m/z 500 being detected mainly as  $[M + H]^+$ .

#### "Street" counterfeit bills

To test the ability of ambient mass spectrometry to detect "realworld" samples, 50 representative samples of R\$ banknotes apprehended by the Brazilian Federal Police and classified as either authentic or counterfeit by classical forensic approaches (based on sensory tests and optical inspection) were analyzed by EASI-MS. Fig. 5 summarizes the results in a 3D PCA plot (see below). As observed for the homemade samples (Fig. 3), the EASI-MS chemical profiles of the street counterfeit samples (not shown) differ markedly from the characteristic chemical signatures systematically observed for the authentic samples (Fig. 1). As evidence for the reliability of ambient MS data to identify the counterfeiting method, all street bills classified as inkjet or laserjet counterfeit by EASI-MS had been also classified as such by microscopic inspection by an expert in the forensic laboratories of the Brazilian Federal Police. A unique chemical signature was also observed for some samples identified by microscopic inspection as being manufactured by a higher quality method using most likely off-set printing. Note that visual inspection of such high quality counterfeit samples is more intricate and can lead to false negatives.

#### Chemometric analysis

To statically test the performance of EASI-MS fingerprinting for R\$ banknote analysis, PCA data treatment was performed. Fig. 5 shows a scatter plot of PC1  $\times$  PC2  $\times$  PC3 for the total



Fig. 3 EASI(+)-MS of homemade counterfeit banknotes made by using inkjet, laserjet and phaser printers. The oligomeric series of ethoxylated and propoxylated alcohols identified in these bills are marked.



**Fig. 4** EASI(+)-MS fingerprints of authentic dollar and euro banknotes. The main identified oligomeric series of ethoxylated/propoxylated alcohols are marked.



**Fig. 5** 3D PCA of the EASI(+)-MS data of authentic and counterfeit "street" confiscated Brazilian R\$ banknotes.

EASI-MS data. For simplicity, no subtraction of background or impurity ions was performed. Note the grouping of the authentic samples and their clear separation from the three major types of counterfeit samples. Even better separation was noted, however, when background and impurity ions were omitted, or when focusing on sets of diagnostic ions, but this data treatment requires the intervention of an expert.

#### Ambient MS 2D imaging

As already discussed, the data of inkjet counterfit bills are dominated by a characteristic oligomeric cluster of ions (Fig. 2



**Fig. 6** (Left) R\$ 20 inkjet counterfeit bill photography of a *ca.*  $2 \times 2$  cm<sup>2</sup> area around number 20 and (right) chemically selective DESI(+)-MS 2D image of the same area produced by monitoring the intensity of trace but diagnostic ions for the red (*m*/*z* 122) and brown (*m*/*z* 597) counter regions along number 20.

and 3) attributed mainly to ethoxylated alcohols. However, by creating selective 2D ion images of portions of the notes, minor but diagnostic ink ions could be identified. Fig. 6 illustrates this feature for an inkjet R\$ 20 bill for which ink ions were identified for the red (m/z 122) and brown (m/z 597) colors of the number 20. Note that such 2D imaging provides an unquestionable confirmation of the counterfeit nature of such bills since the same ion-selective 2D DESI-MS data collected from an authentic bill produced a fully dark image (not shown).

Fig. 7 also illustrates the use of selective 2D ion images for an authentic US\$ 5 bill analysis. In this case DESI-MS in the



**Fig. 7** a) Optical image of an authentic US\$ 5 bill. b) Zoomed in optical image of the number 5 ( $1.5 \times 1.2$  cm area). Chemically selective DESI-(–)-MS image for the ions of c) m/z 325.3, identified as dodecylbenzene sulfonate, and d) m/z 339.3, identified as tridecylbenzene sulfonate. e) DESI(-)-MS of the printed area of number five in the authentic dollar bill and f) DESI(-)-MS/MS of the ion of m/z 325.3, identified as dodecylbenzene sulfonate.<sup>31</sup> The most abundant fragment ion of m/z 183 corresponds to the loss of a neutral decane molecule of 142 Da.

negative ion mode was used, and the spectrum (Fig. 7e) showed a characteristic set of marker ions, mainly those of m/z 311, 325, 339 for number 5. Fig. 7c and d show the exact reproduction of the number 5 by chemically selective 2D DESI imaging. More secure identification can also be performed *via* collision induced dissociation of marker ions, as Fig. 7f illustrates for that of m/z 325.

#### Final remarks and conclusions

As exemplified herein for Brazilian real, dollar and euro bills, as proof-of-principle cases, and by using two ambient ionization techniques (DESI and EASI) performed in two laboratories using different instrumentation and operating conditions, ambient mass spectrometry seems to provide an unbiased, direct, non-destructive and robust method for the analysis of banknotes. Nearly instantaneous detection of counterfeit samples and the counterfeit printing method seems to be attainable via comparison of their characteristic chemical profiles. Ambient MS could be used as a complementary technique to the traditional forensic microscopic inspection and help the expert in the case of dubious or more sophisticated samples. It could also be useful for the forensic scientist to link counterfeit bills to their production sites or to a particular brand, or even to a specific printer. Ambient MS can also be easily automated for high throughput analysis using, for instance, devices similar to those applied for banknote counting.

Effective anti-counterfeiting items based on ambient-MS detection could also be developed such as the use of polar (for efficient DESI-MS or EASI-MS detection) but colorless chemical markers ("invisible inks" irreproducible by photocopying or scanning) placed on specific spots on the banknote, which could be changed periodically. The use of unique compositions of plasticizers or ink emulsifiers or polar markers (such as ionic cationic dyes<sup>16,17</sup> for improved DESI or EASI detection) can also be envisaged for the production of authentic bills with unique chemical signatures. These unknown (by the general public) and invisible diagnostic chemicals could therefore function as effective markers of banknote authenticity, production site or even for the period of production if periodically replaced. The use of similar approaches as a security item in tax labels and packages of valuable products such as high-cost drugs also seems attractive. For drug packages, for instance, the external inspection by ambient mass spectrometry of "invisible ink" spots or even



**Fig. 8** (Left) An "invisible stamp" simulated by using black ink and black paper and (right) the image resulting from diagnostic ion-selective development by 2D DESI-MS imaging.

stamps could be used as a rapid and non-destructive screening method of counterfeiting detection of the inviolate sample. To illustrate the principle, we have stamped the Purdue University logo on black paper using black ink to simulate the application of an "invisible" stamp and have revealed the image *via* 2D DESI-MS using the most abundant crystal violet<sup>17</sup> marker ion of m/z 372 (Fig. 8). One could also propose the use of different invisible inks to make an invisible bar code that would contain key information about the product such as production batch, date and manufacture.

Miniature mass spectrometers able to operate with ambient ionization techniques are also being made more compact and robust.<sup>32</sup> Therefore, the use of such hand-portable and affordable instruments would allow on-site (in banks or markets for instance) and wide-spread application of this nearly instantaneous and unbiased chemical fingerprinting method for banknote analysis and chemical security items.

#### Acknowledgements

We thank the Brazilian Research foundations FAPESP, CNPq, and FINEP and the US National Science Foundation CHE 0848650 for financial support and the forensic research team of the Brazilian Federal Police for samples and discussions. We also thank Arjowiggins Security Brazil for providing samples of the authentic money paper used in the production of Brazilian R\$ bills.

#### References

- 1 M. Azoury, D. Cohen, K. Himberg, P. Qvintus-Leino, T. Saari and J. Almog, J. Forensic Sci., 2004, **49**, 1015.
- 2 A. Vila, N. Ferrer, J. Mantecón, D. Bretón and J. F. García, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **559**, 257.
- 3 N. Mizrachi, Z. Aizenshtat, S. Levy and R. Elkayam, J. Forensic Sci., 1998, 43, 353.
- 4 A. Acampora, P. Ferranti, A. Malorni and A. Milone, *J. Forensic Sci.*, 1991, **36**, 579–586.
- 5 (a) T. Mukai, M. Kusatani, S. Honda, S. Kawabata, H. Nakazumi and S. Kyokaishi, J. Japan Soc. of Colour Material, 2006, 79, 375– 381; (b) E. Di Donato, C. C. S. Martin and B. S. De Martinis, *Quim. Nova*, 2007, 30, 1966.
- 6 (a) R. Sleeman, I. F. A. Burton, J. F. Carter and D. J. Roberts, Analyst, 1999, 124, 103–108; (b) K. A. Ebejer, R. G. Brereton, J. F. Carter, S. L. Ollerton and R. Sleeman, Rapid Commun. Mass Spectrom, 2005, 19, 2137; (c) S. J. Dixon, R. G. Brereton, J. F. Carter and R. Sleeman, Anal. Chim. Acta, 2006, 559, 54; (d) S. Armenta and M. de la Guardia, Trends Analyt. Chem., 2008, 27, 344.
- 7 (a) G. A. Harris, L. Nyadong and F. M. Fernandez, Analyst, 2008, 133, 1297; (b) Daniel J. Weston, Analyst, 2010, 135, 661; (c) Demian R. Ifa, Chunping Wu, Zheng Ouyang and R. Graham Cooks, Analyst, 2010, 135, 669; (d) R. M. Alberici; R. C. Simas; G. B. Sanvido; W. Romão; P. M. Lalli; M. Benassi; I. B. S. Cunha; M. N. Eberlin. Anal. Bioanal. Chem. In press; (e) D. R. Ifa, C. Wu, Z. Ouyang and R. G. Cooks, Analyst, 2010, 135, 669.
- 8 Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologari and R. G. Cooks, *Science*, 2004, **306**, 471.
- 9 R. B. Cody, J. A. Laramée and H. D. Durst, Anal. Chem., 2005, 77, 2297.

- 10 C. N. McEwen, R. G. McKay and B. S. Larsen, Anal. Chem., 2005, 77, 7826.
- 11 J. Shiea, M. Z. Huang, H. J. Hsu, C. Y. Lee, C. H. Yuan, I. Beech and J. Sunner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 3701.
- 12 (a) H. Chen, Y. Shuiping, A. Wortmann and R. Zenobi, Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46, 7591–7594; (b) K. Chingin, G. Gamez, H. Chen, L. Zhu and R. Zenobi, Rapid Commun. Mass Spectrom, 2008, 22, 2009.
- 13 M. Haapala, J. Pól, V. Saarela, V. Arvola, T. Kotiaho, R. A. Ketola, S. Franssila, T. J. Kauppila and R. Kostiainen, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 7867.
- 14 (a) R. Haddad, R. Sparrapan and M. N. Eberlin, *Rapid Commun.* Mass Spectrom., 2006, 20, 2901; (b) E. C. Figueiredo, G. B. Sanvido, M. A. Z. Arruda and M. N. Eberlin, *Analyst*, 2010, 135, 726.
- 15 (a) R. Haddad, H. M. S. Milagre, R. R. Catharino and M. N. Eberlin, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 2744; (b) R. Haddad, H. M. S. Milagre, R. R. Catharino and M. N. Eberlin, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 2744– 2750.
- 16 D. R. Ifa, L. Gumaelius, L. S. Eberlin, N. E. Manicke and R. G. Cooks, *Analyst*, 2007, **132**, 461.
- 17 Priscila M. Lalli, Gustavo B. Sanvido, Jerusa S. Garcia, Renato Haddad, Ricardo G. Cosso, Denison R. J. Maia, Jorge J. Zacca, Adriano O. Maldaner and Marcos N. Eberlin, *Analyst*, 2010, **135**, 745.
- 18 (a) L. Nyadong, M. D. Green, V. R. De Jesus, P. N. Newton and F. M. Fernandez, Anal. Chem., 2007, 79, 2150; (b) C. Ricci, L. Nyadong, F. M. Fernandez, P. N. Newton and S. G. Kazarian, Anal. Bioanal. Chem., 2007, 387, 551; (c) L. Nyadong, G. A. Harris, S. Balayssac, A. R. Galhena, M. Malet-Martino, R. Martino, R. M. Parry, M. D. Wang, F. M. Fernndez and V. Gilard, Anal. Chem., 2009, 81, 4803.
- 19 R. R. Steiner and R. L. Larson, J. Forensic Sci., 2009, 54, 617.
- 20 (a) L. Luosujarvi, U. M. Laakkonen, R. Kostiainen, T. Kotiaho and T. J. Kauppila, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, 23, 1401; (b) T. J. Kauppila, V. Arvola, M. Haapala, J. Pol, L. Aalberg, V. Saarela, S. Franssila, T. Kotiaho and R. Kostiainen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, 22, 979.
- 21 R. C. Simas, R. R. Catharino, I. B. S. Cunha, E. C. Cabral, D. Barrera-Arellano, M. N. Eberlin and R. M. Alberici, *Analyst*, 2010, **135**, 738.
- 22 R. Haddad, R. R. Catharino, L. A. Marques and M. N. Eberlin, Rapid Commun. Mass Spectrom, 2008, 22, 3662.
- 23 (a) P. V. Abdelnur, L. S. Eberlin, G. F. de Sa, V. de Souza and M. N. Eberlin, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 7882; (b) L. S. Eberlin, P. V. Abdelnur, A. Passero, G. F. de Sa, R. J. Daroda, V. de Souza and M. N. Eberlin, *Analyst*, 2009, **234**, 1652–1657.
- 24 D. R. Ifa, A. U. Jackson, G. Paglia and R. G. Cooks, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 1995.
- 25 A. Hirabayashi, M. Sakairi and H. Koizumi, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2878.
- 26 D. R. Ifa, N. E. Manicke, A. L. Dill and R. G. Cooks, *Science*, 2008, 321, 805.
- 27 (a) D. R. Ifa, J. M. Wiseman, Q. Y. Song and R. G. Cooks, Int. J. Mass Spectrom., 2007, 259, 8; (b) J. M. Wiseman, D. R. Ifa, A. Venter and R. G. Cooks, Nat. Protoc, 2008, 3, 517.
- 28 A piece of an authentic banknote paper for the Brazilian real currency was kindly provided by the Arjowiggins Security Company, Brazil.
- 29 (a) B. O. Keller, J. Suib, A. B. Young and R. M. Whittal, Anal. Chim. Acta, 2008, 627, 71; (b) S. A. Saraiva, P. V. Abdeinur, R. R. Catharino, G. Nunes and M. N. Eberlin, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2009, 23, 357.
- 30 N. Talaty, C. C. Mulligan, D. R. Justes, A. U. Jackson, R. J. Noll and R. G. Cooks, *Analyst*, 2008, **133**, 1532.
- 31 A. J. Borgerding and R. A. Hites, Anal. Chem., 1992, 64, 1450.
- 32 (a) L. Gao, R. G. Cooks and Z. Ouyang, Anal. Chem., 2008, 80, 4026; (b) R. Syms, Anal. Bioanal. Chem., 2009, 393, 427–429.

# ANEXO II

#### ISSN 1618-2642, Volume 398, Number 1



This article was published in the above mentioned Springer issue. The material, including all portions thereof, is protected by copyright; all rights are held exclusively by Springer Science + Business Media. The material is for personal use only; commercial use is not permitted. Unauthorized reproduction, transfer and/or use may be a violation of criminal as well as civil law. **REVIEW** 

## Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world"

Rosana M. Alberici · Rosineide C. Simas · Gustavo B. Sanvido · Wanderson Romão · Priscila M. Lalli · Mario Benassi · Ildenize B. S. Cunha · Marcos N. Eberlin

Received: 10 February 2010/Revised: 26 April 2010/Accepted: 29 April 2010/Published online: 3 June 2010 © Springer-Verlag 2010

Abstract Mass spectrometry has recently undergone a second contemporary revolution with the introduction of a new group of desorption/ionization (DI) techniques known collectively as ambient mass spectrometry. Performed in an open atmosphere directly on samples in their natural environments or matrices, or by using auxiliary surfaces, ambient mass spectrometry (MS) has greatly simplified and increased the speed of MS analysis. Since its debut in 2004 there has been explosive growth in the applications and variants of ambient MS, and a very comprehensive set of techniques based on different desorption and ionization mechanisms is now available. Most types of molecules with a large range of masses and polarities can be ionized with great ease and simplicity with the outstanding combination of the speed, selectivity, and sensitivity of MS detection. This review describes and compares the basis of ionization and the concepts of the most promising ambient MS techniques known to date and illustrates, via typical analytical and bioanalytical applications, how ambient MS is helping to bring MS analysis deeper than ever into the "real world" open atmosphere environment-to wherever MS is needed.

**Keywords** Mass spectrometry · Ambient ionization · Desorption · Ion sources · Direct analysis · Ionization mechanisms

#### Introduction

Mass spectrometry (MS) has become a powerful and widerange technique in analytical and bioanalytical analysis. This overwhelming success and broadness has resulted mainly from the unmatched abilities of MS to detect, count, and characterize atoms and molecules of many types, compositions, and sizes [1]. The combination of high sensitivity, selectivity, and speed ("The 3 S trademark of MS") has long been a major advantage of MS. More recently, MS has also become very general with regard to types of molecules and mixtures, being able to handle not only relatively small and thermally stable organic molecules but also nearly all types of biomolecules, organic and inorganic salts, organometallic complexes, supramolecular entities and biological species such as viruses and bacteria [2–8].

To deal with such great variety of atoms and molecules, and matrices and mixtures, however, MS needs to promote efficient ionization to generate diagnostic ions, ideally for each component, that can be transferred to the high vacuum environment of mass spectrometers where they are characterized and counted. The main drawback of MS analysis could therefore be summarized in a single lacking propertysimplicity. Major difficulties occurred in the process of transferring the analyte molecules from their "real world" ambient environment, in which target molecules are normally found often in condensed forms together with matrices and in complex mixtures, into the clean but quite "inhospitable" high vacuum MS environment in which traditional MS ionization techniques, for example electron ionization (EI), chemical ionization (CI), and secondary ion MS (SIMS) [1] had normally to be performed on pure gaseous molecules. Preseparation steps were also often inevitable in MS analysis of mixtures, and thermally unstable and less volatile molecules were simply untreatable.

R. M. Alberici (⊠) · R. C. Simas · G. B. Sanvido · W. Romão · P. M. Lalli · M. Benassi · I. B. S. Cunha · M. N. Eberlin (⊠) ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP 13083-970, Brazil e-mail: rmalberici@hotmail.com e-mail: eberlin@iqm.unicamp.br

But, nearly two decades ago, a revolution occurred and new MS ionization techniques most clearly typified by electrospray ionization (ESI) were introduced. ESI launched a revolutionary concept of MS ionization in which ions were produced outside the mass spectrometer, directly from molecules present and pre-ionized in solutions, typically via protonation, deprotonation, cationization or anionization. These solvated ions are then "ejected" by electro-spraying directly from the analyte solution initially into the "real world" atmospheric pressure ambient gas phase. Finally, the relatively cold gaseous ions (most frequently little or no dissociation occurs during ESI), most typically  $[M + H]^+$ ,  $[M - H]^-$ , and  $[M + Na]^+$  species, are subsequently conducted from the ambient atmosphere into the high vacuum of the mass spectrometer for counting and characterization. ESI and a range of related atmospheric pressure ionization (API) techniques, for example atmospheric pressure chemical ionization (APCI), atmospheric pressure photon ionization (APPI) [1], and matrix-assisted laser ionization (MALDI) have tremendously simplified and broadened the scope of MS analysis, enabling it to handle a much wider variety of molecules with a great range of polarities and nearly unlimited masses with greater simplicity. Extreme examples of such new abilities are provided, for instance, by the ionization and mass measurements of proteins [9], viruses [10], and even intact bacteria [11].

Although API techniques have tremendously simplified MS analysis, to prepare suitable analyte solutions for such techniques—still requires some sample treatment, for example extraction of molecules from their natural environments or matrices, preparation of solutions in appropriate ultra-pure solvents with pH and salt content adjustments, and sometimes derivatization or pre-separation steps. API-MS analysis still involves, therefore, a substantial amount of sample preparation that may cause chemical interferences and disturbance of the analyte environment and its spatial distribution in the matrix.

Recently, however, a second contemporary revolution occurred in MS with the introduction of a new family of direct sampling desorption/ionization (DI) techniques, now known collectively as ambient mass spectrometry (recently reviewed in Refs. [12-21]). These techniques have shown that MS can handle molecules directly in their "real world" natural environments or when placed on auxiliary surfaces. Desorption and ionization forming the required gaseous ions occur under ambient open-atmosphere conditions with very little or no sample preparation. Although sporadic attempts to achieve this had been made previously [15], this second revolution was no doubt triggered by desorption electrospray ionization (DESI) and direct analysis in real time (DART). After these two landmark techniques were introduced and widely advertised, a diverse set with a rapidly growing number of variants was soon launched. These techniques include, as most typical examples, desorption atmospheric pressure photon ionization (DAPPI), atmospheric pressure solids analysis probe (ASAP), desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI), dielectric barrier discharge ionization (DBDI), plasma-assisted desorption/ionization (PADI), low-temperature plasma ionization (LTP), flowing afterglow-atmospheric pressure glow discharge (FA-APGDI), matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI), electrospray-assisted laser desorption ionization (ELDI), laser ablation-electrospray ionization (LAESI), infrared laser-assisted desorption electrospray ionization (IR-LADESI), secondary electrospray ionization (SESI), extractive electrospray ionization (EESI), neutral desorption EESI (ND-EESI), fused droplet ESI (FD-ESI), paper spray ionization (PSI), and easy ambient sonicspray ionization (EASI).

These revolutionary desorption/ionization techniques have the compelling advantages of simplicity of the (bio) analytical MS method, as a result of elimination of timeconsuming and sometimes chemically disturbing samplepreparation steps, and potentially high sample throughput, enabling direct MS analysis of samples in the open atmosphere of the laboratory or in their natural environment. They have, therefore, added a new feature to MS analysis-simplicity. This simplicity has increased the speed of MS by delivering unprecedented ease of use and, naturally, less training and specialization requirements for the analyst. The relevance of ambient MS is reflected by the explosive growth in variants and, particularly, in the number of applications, which range from explosives (homeland security), drugs and pharmaceuticals, lipids, metabolites, peptides and proteins, forensic analysis, pathology, environmental science, fuels, drinks and beverages, crude and vegetable oils, polymers, perfumes, tissue imaging, and reaction monitoring. The combination of such simple to use and direct sampling techniques with portable and user-friendly mass spectrometers [22, 23] seems now to make feasible the ultimate dream of mass spectrometriststo bring MS into the real world and to make MS analysis available everywhere-wherever it is needed.

This review describes and compares the basis of ionization and the concepts of most the promising ambient MS techniques known to date and illustrates, via typical analytical and bioanalytical applications, how ambient MS has helped to bring MS analysis much deeper into the "real world" ambient environment in which most analytes of interest occur.

#### The "ionization trees" of MS

Ambient MS techniques are now being applied directly from samples in their natural ambient environment but they have been built upon a great deal of knowledge accumulated since the pioneering work of many mass spectrometrists who developed classical ionization concepts used in previous high-vacuum or API techniques. Previous reviewers have attempt to categorize ambient ionization techniques mostly on the basis of their dominant desorption and/or evaporation principles, for example spray, aerosol, laser, plasma, heating, or acoustic radiation. But we argue that, although different and sometimes overlapping ionization principles are used, or are yet not fully understood, these techniques are better understood and categorized according to the basis of their method of ionization, that is, the parent ionization technique from which they have flourished. Figure 1a attempts, therefore, to categorize major ambient MS techniques known to date in "ionization trees" according to their roots, branches, and leaves (variants). Figure 1b is an attempt to organize the present "biodiversity in the acronym zoo" [18] merging similar techniques into their most representative description (this is fully discussed in the "Conclusion" section). A summary of the major ambient MS techniques emphasized in this review is presented, in chronological order, in Table 1.

#### **ESI-based techniques**

#### DESI

Desorption electrospray ionization (DESI) is by far the most popular ambient MS techniques, and is one of two

pioneering techniques first described by Cooks and collaborators in 2004 [24]. The basis of DESI is unquestionably settled as ESI [25]. DESI has been by far the most investigated and used ambient technique. It has been applied to a myriad of samples and mixtures and is commonly performed directly from analytes molecules placed on their natural matrices or placed on auxiliary surfaces, for example glass, paper, metal, plastic, and TLC silica plates (Fig. 2) [14]. Major DESI conditions to be optimized are the ESI voltage, solvent composition and pH, angle of incidence of the ESI spray, and distances for the spray and MS orifice. In DESI, analyte ions are produced by the bombardment of the analyte surface with a stream of either positively or negatively ESI-charged droplets produced from an acidic or basic solution, typically of 1:1 methanol-water or pure methanol. DESI seems also to be one of the most universal techniques able to handle a large variety of molecules ranging from small molecules to large biomolecules [16] and, as recently reported, even to apolar hydrocarbons after in-situ derivatization [26].

Aspects of the desorption/ionization mechanism of DESI have been studied quite extensively [16, 27]. It seems to involve a "droplet pickup" or "splashing" process with subsequent ESI-like ion evaporation from the secondary DESI droplets. The solid/liquid extraction process is driven by surface wetting followed by momentum transfer as a result of subsequent droplet—thin film collisions. As a result of spraying, a localized aqueous solvent layer is created on the surface, and the buildup of a wetted surface serves to



Fig. 1 The "ionization trees" in MS showing the "root" technique (*brown*) and the major ambient MS techniques known to date (the branches in *green*) and some of their variants (the leaves in *red*). (a)

Full view according to the present "acronym zoo". (b) Proposed simplified view with merging of closely related techniques into the one that best describes the desorption/ionization principle

Acronym	Description	Basic technique <sup>a</sup>	Year	Key ref.
SESI	Secondary electrospray ionization	SESI	2000 <sup>b</sup>	[51]
DESI	Desorption electrospray ionization	ESI	2004	[24]
DART	Direct analysis in real time	GDI	2005	[92]
ASAP	Atmospheric solids analysis probe	(AP)CI	2005	[86]
FD-ESI	Fused-droplet ESI	ESI	2002	[59]
DAPCI	Desorption atmospheric pressure chemical ionization	APCI (GDI) <sup>d</sup>	2006	[89]
EASI	Easy ambient sonic-spray ionization	SSI	2006	[127]
EESI	Extractive electrospray ionization	ESI	2006	[58]
ELDI	Electrospray-assisted laser desorption ionization	ESI/LDI	2006	[76]
MALDESI <sup>c</sup>	Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization	MALDI + ESI	2006	[77]
ND-EESI	Neutral desorption EESI	ESI	2007	[72]
DAPPI	Desorption atmospheric pressure photon ionization	APPI	2007	[120]
PADI	Plasma-assisted desorption/ionization	GDI	2007	[110]
DBDI	Dielectric barrier discharge ionization	GDI	2007	[111]
LAESI	Laser-assisted ESI	LDI + ESI	2007	[128]
FA-APGDI	Flowing afterglow-atmospheric pressure glow discharge	GDI	2008	[109]
IR-LADESI	Infrared laser-assisted desorption ESI	LDI + ESI	2008	[129]
LTP	Low-temperature plasma ionization	PD	2008	[102]
PSI	Paper spray ionization	ESI	2010	[74]
V-EASI	Venturi easy ambient sonic-spray ionization	V-EASI	2010	[145]

Table 1 Summary of major ambient MS techniques known to date, in chronological order

<sup>a</sup> The basic techniques are: EI, electron ionization; GDI, gas discharge ionization; ESI, electrospray ionization; LDI, laser desorption ionization; PI, photon ionization; and SSI, supersonic spray ionization

<sup>b</sup> Although SESI was introduced ca four years previously, and sporadic reports describing ambient MS approaches appeared even earlier (see, for example, Ref. [15]), DESI and DART are without doubt the two pioneering techniques that prompted the development and broad applications of ambient ionization techniques

<sup>c</sup> There seems to be no consensus about whether MALDESI (API-MALDI + ESI) should be classified as an ambient ionization technique, because AP-MALDI may still requires a substantial amount of sample work up. We have included MALDESI with the understanding that it uses atmospheric pressure MALDI and that the matrix may be simply deposited (by spraying, for example) on the top of the sample thus causing little or no sample perturbation with retention of analyte spatial distribution

<sup>d</sup> See the "acronym zoo" section



DESI

extract analytes from the solid phase into the thin liquid film. Subsequent droplet collisions cause the "splashing" of progeny droplets off the surface.

Ions are formed in DESI via a ESI-like process; hence, via proton or cation transfer from solvent (S) cations for example  $[S + H]^+$  or  $[S + Na]^+$ , or proton abstraction from solution anions such as OH<sup>-</sup> or OAc<sup>-</sup> (Fig. 2), or via anion complexation that forms  $[M + Cl]^-$ , for instance. The impacting solvent droplets have diameters typically smaller than 10 µm and reach the sample surface with a speed higher than 100 ms<sup>-1</sup> [27]. DESI efficiency depends, therefore, on the efficiency of both spray desorption of the analyte from the surface, and its transfer to the solvent layer, and of the ESI-like ionization process. [16, 28]. The major conditions that affect desorption/ionization efficiency by DESI include:

- geometric conditions, for example the angle of incidence (α), the angle formed with the entrance orifice of the spectrometer (β), the distance between the source and the surface of the spray (d<sub>1</sub>), and the distance between the surface and the MS orifice spectrometer entrance (d<sub>2</sub>);
- 2. spray conditions, for example the solvent and nebulization gas flow rates and the ESI voltage;
- 3. chemical conditions, for example the type of solvent and the additives used to assist ESI ionization; and
- 4. surface conditions, for example the type of surface (glass, plastic or paper, for instance) [27].

 $\alpha$  and  $d_1$  seem to affect the ionization process directly whereas  $\beta$  and  $d_2$  usually affect sensitivity. The optimum adjustment is usually 5–10° for  $\beta$  and 0–2 mm for  $d_2$ . The spray conditions affect the characteristics of the DESI mass spectrum, because they determine size distribution, average charges, and the impact forces of the droplets [12].

A high gas flow rate reduces the initial size of the droplets and increases the impact speed. This phenomenon is advantageous until a certain point because it improves desolvation. Above a certain limit, however, the small size and the high speed of the droplets may cause premature evaporation, probably causing less efficient ionization of peptides and proteins [29, 30]. The solvent flow rate affects the size distribution and the average charge of droplets. Higher solvent flow rates form bigger droplets and may cause excessive accumulation of liquid in the surface. As for ESI, DESI solvent composition must be optimized in accordance with the polarity and solubility of the analyte. Major DESI solvents include typical ESI solvents, for example methanol, water, acetonitrile, and mixtures of these solvents [27]. Less polar or apolar molecules are not efficient ionized and, to overcame this limitation, in-situ derivatization by reactive DESI has been applied [26].

The characteristics of the surface may be crucial for DESI, and for most ambient MS techniques. Particularly for

DESI, the surface may directly affect ionization because of its electric conductivity [29]. Because the DESI mechanism involves the action of charged droplets, their neutralization at the surface must be avoided. The electrostatic properties of isolating surfaces are very important, and signal stability has been observed to depend on the polarity of the spray. Polytetrafluorethylene (PTFE) is a highly electronegative polymer providing higher signal stability for DESI(–) whereas poly(methyl methacrylate) (PMMA) surfaces seem to improve DESI(+). High affinity of molecules with the surface reduces DESI sensitivity. PTFE is a common DESI surface, because of its low affinity for most analytes, whereas rough surfaces, for example paper, seem to give the highest DESI sensitivities [29].

DESI sources, and those of most ambient ionization techniques, can easily replace API sources and are therefore adaptable to nearly all API mass spectrometers [14]. DESI sources have been adapted, for instance, to linear triple quadrupoles [30], ion traps [31], orbitraps [32], quadrupole time of flight (QTOF) instruments [33], ion mobility-TOF and ion mobility-QTOF [34], and Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometers [35]. Because the samples are usually analyzed without any preseparation, high resolution and high accuracy of mass measurement and the ability to perform fragmentation by tandem MS/MS are valuable features of the mass spectrometers in the analysis of complex mixtures [36].

The figures of merit in DESI have also been comprehensively investigated [12, 14]. Limits of detection (LODs) have been reported to be typically 1 to 10 fmol for small molecules such as explosives [37]. The reproducibility of quantitative results are ca 5–10%. Relatively good accuracy with  $\pm$ 7% relative error have been reported, suggesting that DESI can be successfully used in quantitative analysis [38].

Since its introduction in 2004, DESI has been used in numerous applications, including forensic analysis [19], imaging [39–41], metabolomics [12], drugs [36], proteins [42], redox transformation [43], lipidomics [17], and hydrocarbons [44] and the examples are still growing at an impressive rate. Figure 3 displays illustrative DESI data. Figure 3a shows a typical profile of lipids, mostly glycer-ophosphocholines (PCs), obtained directly from the surface of rat tissue, and Fig. 3b illustrates direct analysis of pharmaceutical samples on the surface of an aspirin tablet, showing the desorption and ionization of aspirin as  $[M + H]^+$  and  $[M + Na]^+$  [45]. Figure 3c shows a DESI(–)-MS of 2,4,6 trinitrotoluene (TNT) in which TNT is detected as  $[M - H]^-$  and as a Meisenheimer complex with the methoxide anion [46].

Another unique application of DESI recently shown is its ability to produce chemically selective latent fingerprints (LFP) with profiles of exogenous and endogenous chemicals in the particular fingerprint pattern (Fig. 4). These LFP supply improved forensic information because they can Author's personal copy

**Fig. 3** Typical DESI(+)-MS for (a) lipid profile of rat tissue, (b) aspirin directly from the tablet surface, and (c) DESI(-)-MS of the explosive TNT. Adapted from Refs. [45] and [46]



provide, for instance, evidence of contact with explosives or substances of abuse. Figure 4a shows the distribution of cocaine, monitored as the ion of m/z 304, in an LFP on glass. The level of detail of the image, acquired with a pixel size of 150 µm by 150 µm, enables clear distinction of the ridges and minutiae. Figure 4b was produced with the usual fingerprint-identification tools [47].

#### DESI imaging

Imaging MS has also been triggered by the contemporary revolutions in MS and has emerged as a powerful technique for 3D chemical analysis in the biological sciences [48, 49]. DESI has also been used for imaging MS and was recently used to construct an impressive 3D molecular image of a mouse brain from coronary sections (Fig. 5). This chemically selective 3D image enables direct visualization of endogenous components in substructures of the brain [40]. The marker ions detected by DESI-MS correspond mainly to deprotonated free fatty acids FFA), phosphatidylserines

(PS), phosphatidylinositols (PI), and sulfatides (ST), with PS 18:0/22:6 being the major lipid found in the grey matter and ST 24:1 the major lipid found in the white matter, whereas polyunsaturated phospholipids were observed in the olfactory tissue [40].

#### Reactive DESI

Cooks and collaborators [50] have also recently introduced a new variant to DESI, termed "reactive DESI". By adding a selective reagent to the spray solution, chemical selectivity in DESI ionization can be greatly increased, particularly toward less polar analytes, as shown recently by the detection of cholesterol in samples such as dried serum samples (Fig. 6) and animal tissue sections. Direct and rapid analysis of cholesterol was accomplished in the ambient environment using betaine aldehyde incorporated into the spray solvent. This "charged reactant" reacts selectively and rapidly with the hydroxyl group of cholesterol molecule forming an hemiacetal salt. The charge site in this "charged derivative" Fig. 4 (a) DESI(+)-MS image of distribution of cocaine on a latent fingerprint (LFP) blotted on glass. (b) Ink LFP blotted on paper and optically scanned. Adapted from Ref. [47]



then functions as a "hook" for DESI "fishing". The experiment therefore combines desorption by DESI with in-situ chemical derivatization plus charging. By use of reactive DESI imaging, the distribution of cholesterol has also been recorded in rat brain tissues (Fig. 6). Traditional MS imaging methods, including normal DESI, are much less successful for low-polarity compounds. Quantitative analysis of cholesterol in serum by use of reactive DESI resulted in good precision at physiological levels.

#### SESI

In 2000, Hill and collaborators introduced a gas-phase introduction and a "nearly" ambient ionization technique

termed secondary ESI (SESI) [51]. The principle of SESI, which was first described in 1994 [52], relies on the gasphase interaction between charged particles created by ESI and neutral gaseous molecules from gases or sample vapor. The major advantage perceived at first was higher sensitivity (detectability) for small volatile molecules compared with the "primary" ESI approach. A series of relatively small and low-polarity drug molecules, for example heroin and cocaine, were evaluated; they were dissolved in methanol–water solutions and these solutions were heated to created a vapor inside the SESI chamber. SESI is, therefore, an ESI-based method for charging neutral gaseous molecules. It seems to be quite effective in forming ions not only from neutral vapors, but also from small



Fig. 5 DESI(-)-MS forming 3D chemically selective images of a mouse brain. (a) PS 18:0/22:6 in *green*, (b) ST 24:1 in *red*, and (c) PI 18:0/22:6 in *blue*. Distributions of the lipids: (d) PS 18:0/22:6 and ST 24:1, and (e) PS 18:0/22:6 and PI 18:0/22:6. Adapted from Ref. [40]

Fig. 6 (a) DESI(+)-MS of a dried human serum spot using  $ACN-CHCl_3$  (1:2) as spray solvent. (b) Reactive DESI(+)-MS of a dried human serum spot doped with cholesterol-d7 as internal standard using  $ACN-CHCl_3$  (1:2) with 50 ppm beta-ine aldehyde (BA) as the spray solvent. The *inset* shows the selective reaction applied for derivatization plus charging. Adapted from Ref. [50]





aerosol particles [53]. Two mechanism of SESI were proposed:

- a solution mechanism in which the gaseous analyte molecules dissolve in the charged ESI droplets, and then interact with the highly charged surface of such droplets leads to more efficient ionization than ESI; or
- 2. gas phase ion-molecule reactions betweens ESI-formed gaseous ions and the neutral analytes.

SESI-MS has also been used to detect chemical warfare agent simulants from both aqueous and gas phase samples [54], for explosive vapor detection [55], and to analyze human skin vapors [56] and gaseous volatile organic compounds [57]. Recently [53], a study has compared SESI sensitivity to volatile explosives, when coupled to modern API-MS systems, with more conventional approaches such as GC–MS and PTR–MS. The results

show unmatched MS detectability for gaseous explosives with LOD as low as 1 ppt for TNT and PETN vapors with sampling times of 0.1 s.

#### ESSI, ND-EESI, and FD-ESI

In 2006, Cooks and co-workers introduced a variant of SESI (Fig. 1) which they termed "extractive electrospray ionization" (EESI). As for SESI, EESI was directed, particularly, at the most volatile molecules [58]. In DESI or related spray techniques, solid or liquid molecules are first "picked up" directly from a solid surface by the spray droplets and then transported to the mass spectrometer. Volatile molecules are therefore difficult to handle, because they evaporate quickly from the surface. EESI was proposed to solve this limitation of DESI and to handle volatile analytes (Fig. 7). EESI, as for SESI, is an ESI-



Fig. 7 Schematic diagram of EESI

derived non-invasive technique directed mainly toward volatile or semi-volatile molecules in which a vapor or a fine spray of neutral droplets of the analyte molecules in a solution are dispersed into the stream of charged droplets produced by ESI. The molecules are then incorporated into the droplets and become ionized via an ESI-like process. One of the advantages of EESI is the reduction of ion suppression effects by the matrix. Shiea and co-workers [59–61] have also introduced a quite similar technique merging aerosol particles carrying the analytes with an ESI stream; this was termed "fused droplet ESI" (FD-ESI). This technique has been used as a simple method to obtain, directly, high-quality mass spectra of biological molecules (for example peptides and proteins) dissolved in water.

An advantage of EESI and these related techniques, compared with their basic technique ESI, has been related to design. Samples are introduced by a separate channel, which is electrically grounded and located orthogonally to the high-voltage ESI channel [58]. For less polar molecules which are not efficiently ionized on contact with the ESIcharged droplets, ionization promoted by Ag<sup>+</sup> cationization has been used [62]. EESI-MS has been applied to the analysis of the (semi) volatile constituents of complex samples such as milk [58], exhaled breath [62], fruit flavors [63], explosives [64], diethyl phthalate in perfumes [65], diethylene glycol in toothpaste products [66], and virgin olive oil [67, 68]. Figure 8 shows a typical application of EESI-MS [63]. Bananas of different quality and at different stages of maturity were investigated, for example normal maturity (Fig. 8a) and very over-ripe (Fig. 8b) bananas. The bananas were placed in a glass container and the volatile compounds carried directly into the gas inlet of the EESI source. Note the distinctive spectra and the detection of  $\beta$ damascone (m/z 192), an aromatic marker of fruit maturity.

For liquids of high viscosity or highly complex liquid mixtures, the use of a microejecting mechanism [69] can be

beneficial. This process creates an aerosol of microdroplets of the liquid or complex solutions which are transported to the ESI source by a stream of air or nitrogen gas. Zenobi and collaborators [70] introduced this subtle variant of EESI (Fig. 7) and termed it "neutral desorption EESI" (ND-EESI). ND-EESI relies upon initial desorption of sample molecules into a neutral gas stream (rather than a charged solvent stream as used in EESI) coincident with the ESI plume to give ESIlike spectra [20]. It main advantage seems to be its tolerance of highly complex matrices because of separation of the sampling and ionization processes in both space and time. It has been used, for instance, for rapid analysis of living tissues [70], rapid screening of ingredients in pharmaceutical samples [71], investigation of analytes on different types of samples [72], and for detection of trace amounts of non-volatile explosives, for example TNT, which accumulate easily on skin surfaces, sampled by using a novel air-tight ND enclosure for rapid tandem EESI mass spectrometric analysis [64]. Gu and collaborators [73] recently reported another application based on improved design of the ND-EESI setup-detection of explosives on the skin surface via a geometry-independent neutral desorption EESI set (GIND-EESI).

#### PSI

Cooks and collaborators [74, 75] recently introduced a new ESI-based ambient technique termed "paper spray ionization" (PSI). Analyte transport was achieved by capillary action in a porous material with a macroscopically sharp point, and a high electric field was used to perform ionization. Pneumatic assistance is not required to transport the analyte. A voltage is simply applied to the wet paper, which is held in front of a mass spectrometer (Fig. 9). PSI-MS was applied to qualitative and quantitative analysis of therapeutic drugs in whole blood. Another application of PSI was the use the paper's property in chemical separations integrating therefore three

274

**Fig. 8** EESI(+)-MS of (**a**) normal-maturity bananas and (**b**) very overripe bananas, and (**c**) schematic diagram of the EESI sampler. Adapted from Ref. [63]



analytical procedures: sample collection, analyte separation, and analyte ionization. PSI seems promising for clinical applications, including neonatal screening, therapeutic drug monitoring, and personalized medicine.

#### LDI-based techniques

By benefiting from the improved ability of lasers to desorb analyte molecules from surfaces and the outstanding ability of highly-charged ESI droplets to perform ionization in the open air, several new ambient MS techniques (Fig. 1) have been introduced combining LDI with ESI. These include, mainly, ELDI [76], MALDESI [77], LAESI [78] and IR-LADESI [79].

#### ELDI

Shigea and collaborators [76] proposed the first of such LDI plus ESI arrangements and termed the technique "electrospray-assisted LDI" (ELDI). In ELDI, no matrix is used and analytes are desorbed and partially ionized by the



laser forming a plume composed basically of neutral molecules and mono-charged species. Subsequently, this plume is subjected to ESI and multi-charged species are formed. ELDI has been used to characterize chemicals on different surfaces [80], has been coupled with TLC [81], has been used to desorb and ionize proteins and peptides in multi-charged forms of up to 66 kDa [82], and has been used to detect intact proteins in dried biological fluids (e.g. blood, tears, saliva, and serum), bacterial cultures, and tissue [76].

#### MALDESI

Muddiman and collaborators [77] have also introduced an ambient MS technique which they termed "matrix-assisted laser-desorption electrospray ionization" (MALDESI; Fig. 10). As in the ELDI arrangement, ESI is performed on a plume of neutral and ionized molecules but this plume is now formed via MALDI using, therefore, an auxiliary organic matrix. MALDESI combines MALDI and ESI and has therefore merged branches from two trees of MS ionization techniques (Fig. 1). The predominant mechanism of ion generation in MALDESI seems to be ESI, as evidenced by the preferential formation of multiply charged species for biological molecules (Fig. 10) [77, 83]. The use of a matrix for laser ionization during MALDESI seems to be beneficial compared with ELDI, particularly for biomolecules (Fig. 11). MALDESI-MS has been used extensively, for example for "top-down" proteomics analysis, directly from sample tissues, of intact proteins [77], polypeptides [83], biomolecules [84], and carbohydrates [85]. Although traditional MALDI involves considerable sample preparation and is performed under high vacuum, MALDESI is regarded here as an ambient ionization technique because it is performed in an open atmosphere and the matrix can be simply (but carefully) deposited on the surface of the undisturbed sample.

Figure 10 illustrates the mechanism and process of MALDESI. Note that the MALDESI arrangement is essentially the same as for ELDI but differs by the use of a matrix. Desorption and (partial) ionization is promoted by laser radiation whereas the plume of desorbed analyte molecules and ions is incorporated into the ESI droplets in which ESI-like ionization and ion transfer to the gas phase occur.

MALDESI has also been used to identify compounds previously separated by thin-layer chromatography [81], to detect multi-charged proteins and peptides [82], and for the direct intact analysis of polypeptides and their sequences via tandem MS/MS experiments [83]. For instance, direct intact analysis of the melittin peptide (the principal active component of bee venom) was performed by MALDESI-MS and multiply charged ions were observed. Figure 12 shows MALDESI-MS/MS data for the  $[M + 4H]^{4+}$  ion. Only the y-ion series was observed, and from this a partial protein sequence was determined.

#### LAESI and IR-LADESI

Two very subtle variants of ELDI were reported, almost at the same time as ELDI, and termed "laser assisted" ESI (LAESI) [78] and "infrared-laser assisted desorption ESI" (IR-LADESI) [79]. Both LAESI and IR-LADESI are also matrix-free and differ from ELDI by use of either a UV or IR laser. The penetration capacity of IR lasers is several orders of magnitude better than that of UV lasers, which results in more material being transferred to the plume per laser shot by IR-LADESI than by LAESI. LAESI was first reported by Nemes and Vertes, who used a UV Er:YAG laser to create the ablation plume [78]. A laser source at 90° to the sample surface was used to facilitate sample ablation. LAESI has been applied to the analysis of proteins, lipids, and metabolites, and to in vivo spatially resolved metabolomic



Fig. 10 Schematic diagram of MALDESI



profiling [78]. Murray and collaborators [79] introduced IR-LADESI and used the technique to analyze biological fluids and pharmaceuticals. IR-LADESI differs from LAESI mostly in the angle of incidence of the laser source (45°) on the sample surface, and lower pulse energies which result in both ablation and desorption of surface neutrals [85]. IR-LADESI is thought to mostly desorb small, highly volatile materials as free molecules which are then incorporated directly into the ionizing ESI droplets.

#### **APCI-related techniques**

#### ASAP

By using a simple modification to either an ESI or APCI source, MecEwen and collaborators [86, 87] introduced a new ambient MS technique termed "atmospheric solids analysis probe" (ASAP). The modification enabled introduction of solid or viscous liquid samples directly into the hot gas and droplet stream of an APCI (or ESI) source. A borosilicate capillary melting-point tube was used as the probe. In ASAP,

therefore, the APCI probe is operated normally with a solvent spray or it can be used as a source of hot nitrogen gas (typically heated to 400–500 °C) to desorb the analyte from the solid probe; ionization is then performed by 6 kV corona discharge available in APCI sources. ASAP is easy to install in a commercial API source and its main advantage is that it widens the range of analytes compared with conventional APCI. The ionization mechanism of ASAP is therefore the same as APCI, being best suited to molecules which are not too large (<1000 Da) and of medium polarity [86]. Figure 13 shows the basic arrangement for the ASAP source with the analyte molecules (M) being introduced to the APCI spray region with the help of a solid probe.

Figure 14 shows illustrative examples of the use of ASAP-MS for analysis of PEG and spinach. PEG 440 was diluted with methanol (1 mg mL<sup>-1</sup>) and coated on to the closed end of a melting-point tube probe. Note that the typical oligomeric PEG profile (Fig. 14a) is obtained from ASAP-MS analysis, with the PEG oligomers being detected mainly as  $[M + H]^+$ , a characteristic of the gas phase " salt-free" APCI process. ESI and related techniques based on solution ionization have been reported to detect PEG mainly

Fig. 12 MALDESI(+)-MS/MS of the  $[M + 4H^+]^{4+}$  melittin precursor ion. The *inset* shows the AA sequence for the melittin peptide with the  $y_{11}-y_{13}$  and  $y_{15}-y_{17}$  fragment ions. Adapted from Ref. [83]



277

Fig. 13 Schematic diagram of ASAP



as  $[M + Na]^+$  [88]. For spinach, fresh samples were run by first inserting the tissue so that it protruded from the open end of the melting-point tube and then placing the tissues in the path of the hot nitrogen gas. Several volatile components of the spinach sample were readily desorbed and ionized, including lipids, canthaxanthin (*m*/*z* 565), astaxanthin (*m*/*z* 626), and carotenoids (*m*/*z* 431 and 537) [86].

#### DAPCI

Scrivens and collaborators [89, 90] were the first to describe desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI). This technique is similar in concept to ASAP, but in DAPCI gaseous reagent ions generated by atmospheric pressure corona discharge are directed on to condensed-phase samples, causing desorption and ionization of the neutral target molecules. The ionization mechanism of DAPCI is mostly APCI-like, and DAPCI is, therefore, more sensitive for compounds of moderate polarity. For example, DAPCI enables much more efficient detection of the weakly polar corticosteroids (the active ingredients in proctosedyl ointment) than DESI [91]. DAPCI can also be performed by simple modification of an APCI source [90]. The efficiencies of DESI-MS, DART-MS, and DAPCI-MS in the analysis of drugs and biological samples have been compared; it was, for example, shown that DAPCI and DESI were able to ionize the three active ingredients present in a solid Anadin extra tablet: paracetamol (m/z 152), aspirin (m/z 182), and caffeine (m/z195) whereas DART missed the protonated aspirin [89].

#### **GDI-related techniques**

#### DART

In 2005, Cody and Laramée [92] described another pioneering ambient MS technique termed "direct analysis in real time" (DART). Figure 15 shows a basic arrangement for the DART source. As for DESI, DART is now a highly popular, commercially available, widespread ambient MS technique. It has been used in many applications and can handle gases, liquids, and solids. DART also seems to be applicable to molecules of a wide range of polarities (but limited by size) on different surfaces, for example concrete, asphalt, human skin, business cards, and fruit and vegetable skins. DART has been used, for instance, in different applications such as forensics [93, 94], pharmaceutics [95], food chemistry [96, 97], biological samples [98-100], and chemical analysis [101-104]. An automated DART source has also been shown to enable quite accurate quantitative analysis of drugs such as verapamil, alprozolam, and praparacaine directly from biological matrixes such as rat plasma, brain, liver, and bile [100].

DART forms mainly  $[M + H]^+$  ions from more polar analytes and has an interesting wide range of applicability because of its unique ionization mechanism (see below); it has also been shown to be capable of handling low-polarity or nonpolar molecules by producing relatively abundant molecular ions (M<sup>+</sup>). Figure 16 shows the detection, as M<sup>+</sup>, of an un-derivatized *n*-alkane and cholesterol by



DART-MS that was made possible by adjusting the source settings and by introducing small amounts of a charge-exchange reagent (fluorobenzene) into the DART sampling region [102].

The basic technique from which DART flourished (Fig. 1) is now established as the most classical of all ionization techniques, as applied by Thomson in his cathode ray tubes, that is, gas-discharge ionization (GDI).



Fig. 16 DART(+)-MS with reduced DART/orifice distance and increased grid potential for (a) cholesterol with addition of fluorobenzene vapor, and (b) *n*-hexadecane. Adapted from Ref. [102]



At first, however, it was not clear which sub-type of GDI was operating in DART: corona or glow discharge. A recent study concluded that DART is based on a corona-to-glow discharge transition [105].

The DART arrangement (Fig. 15) is one of the most complex among the ambient MS techniques and consists of several chambers through which a gas (He or N<sub>2</sub>) flows at, typically, 1 L min<sup>-1</sup>. A potential of several kilovolts (1– 5 kV) causes electrical glow discharge (GD) that produces ions, electrons, and excited-state neutral species. DART plasma is created, therefore, mostly via atmospheric pressure glow discharge ionization [102]. The gas exiting the GD chamber passes through a perforated intermediate electrode (Fig. 15, a), an optional gas heater, and a grid electrode (Fig. 15, b) with an insulation cap (Fig. 15, c). The perforated intermediate electrode removes ions from the gas stream, and the gas heater adjusts gas temperature (thermal analyte desorption) from room temperature up to 250°C [92] or even 500°C [102]. The grid (Fig. 15, b) serves to remove ions with opposite polarity to prevent signal loss by ion-ion recombination, acting therefore as an ion repeler. Finally, the insulation cap protects the sample and operator from any exposure to the grid. Ionization occurs when the DART gas makes contact with the sample at a contact angle of  $0^{\circ}$  or reflected off a sample surface at ca 45° [92].

There seem to be different interpretations of the ionization mechanism to which DART should be linked, but it seems clear to us that the most characteristic feature of DART is its unique primary ionization mechanism, that is, Penning ionization [92, 102]. Because ions are removed

from the gas stream after the electrical discharge, in DART the analyte surface is exposed to a stream of hot but *neutral* gas atoms or molecules (N). As in Penning ionization, the N species have been electronically excited by GDI, forming "metastable" species N\*, which transfers energy to the analyte molecule (M) with lower IE thus forming  $M^{+\bullet}$  and an electron  $e^-$  (Eq. 1).

$$N^{*} + M \to M^{+\bullet} + e^{-} \tag{1}$$

Helium is the most typical DART gas and has a longlived  $2^3$ S state with an internal energy of 19.8 eV, which is higher than the ionization energies of common atmospheric gases. He\*( $2^3$ S) can therefore efficiently ionize atmospheric water molecules (Eq. 2) that may react further with neutral water molecules (in a typical but secondary CI-like cascade of reactions) forming protonated water clusters [(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> + H]<sup>+</sup>. For the more polar analytes, these clusters finally transfer a proton to the analyte molecule M (Eq. 3).

$$\operatorname{He}^{*}(2^{3}S) + n\operatorname{H}_{2}O \rightarrow \left[ (\operatorname{H}_{2}O)_{n-1} + \operatorname{H} \right]^{+} + O\operatorname{H}^{\bullet} + \operatorname{He}(1S^{1})$$
(2)

$$[(H_2O)_n + H]^+ + M \rightarrow [M + H]^+ + nH_2O$$
 (3)

Figure 17a shows a background DART(+) spectrum containing mainly protonated water and its clusters  $[(H_2O)_n + H]^+$  of m/z 19, 37, and 55 and protonated ammonia (m/z 18) and common laboratory solvent molecules, for example methanol (m/z 33), acetonitrile (m/z 42), ethanol (m/z 47), and acetone (m/z 59) [102]. These ions are,



Fig. 17 DART(+)-MS for (a) typical DART settings, and (b) altered settings such as the distance of the sampling orifice and grid potential. DART(+)-MS of dibenzosuberone under (c) typical and (d) altered conditions. Adapted from Ref. [102]

therefore, the secondary products of ambient Penning ionization (Eqs. 1–3). Under these "acidic" conditions M, as exemplified for dibenzosuberone, is detected mostly as  $[M + H]^+$  (Fig. 17c). When the DART electrode grid potential was increased from 250 to 650 V, an abundant  $O_2^{+\bullet}$  ion of m/z 32 was observed (Fig. 17b), and M was then detected as both M<sup>+•</sup> (Eqs. 5 and 6) and  $[M + H]^+$ (Fig. 17d) from primary Penning ionization (charge exchange with  $O_2^{+\cdot}$ ) and proton transfer [92, 102].

#### DART + DESI

Very recently, Fernandez and collaborators [106] developed a interesting and versatile dual DART + DART ambient ionization source which they termed "desorption electrospray metastable-induced ionization" (DEMI). DEMI integrates the advantages of DESI (particularly powerful for analyzing thermally labile, nonvolatile, polar molecules in a mass range reported to be as high as 66 kDa [107]) and DART (suitable for the analysis of molecules with a broad range of polarities in a more limited mass range of up to ~800 Da [102]). This dual DART + DESI source can be operated in three modes: DESI-only, DART-only, and DART + DESI. As an illustrative example, a binary mixture of dibromodibenzosuberone (366 Da) and angiotensin I (1296 Da) standards was deposited on to glass slides and analyzed by the dual source. Figure 18 shows the resulting spectra. Only the lower polarity, lower MW dibromodibenzosuberone was observed in the DART-only mode as [M +  $H^+$  of m/z 367. In the DESI-only mode (Fig. 18b), only the higher polarity, higher MW, angiotensin I was observed as  $[M + 2H]^{2+}$  of m/z 649 and  $[M + H]^{+}$  of m/z 1297. In the DART + DESI mode, both ionic species from dibromodibenzosuberone and angiotensin I were observed (Fig. 18c) [106].

#### FA-APGDI

Andrade and collaborators [108] have introduced another GDI-based technique, somewhat similar to DART, which they termed "flowing afterglow-atmospheric pressure glow discharge" (FA-APGDI) [108, 109]. It resembles DART but benefits from a simpler instrumental arrangement. The plasma is produced inside a discharge chamber by glow discharge between a tungsten pin (the powered electrode) and a brass plate (counter electrode). The discharge gas (He) enters the chamber through a suitable orifice and excited He\* formed in the discharge exit to the atmosphere through a small orifice in the center of the plate electrode causing desorption and ionization (first by Penning ionization) of the analytes. FA-APGDI has been used to analyze pharmaceutical tablets, food, and some organic substances (amines, acids, polyaromatic hydrocarbons) [109].

#### PADI, DBDI, and LTP

Three ambient MS techniques based on GDI using the generated plasma to assist ionization have also been described. Plasma-assisted desorption/ionization (PADI) was first reported by Barret and collaborators [110], dielectric barrier discharge ionization (DBDI) by Zhang and collaborators [113], and low-temperature plasma (LTP) (Fig. 19) by Ouyang and collaborators [112]. The plasma is produced with lower potentials and higher currents than in

Fig. 18 Mass spectra obtained from a binary mixture of dibromodibenzosuberone and angiotensin I deposited on to a glass slide and air dried and analyzed with the dual DART + DESI source operated in (a) DARTonly mode, (b) DESI-only mode, and (c) DEMI (DART + DESI) mode. Adapted from Ref. [106]



techniques based on corona discharge. A stable and lowtemperature plasma is produced, but its operation under atmospheric pressure results in some limitations, for example the glow-to-arc transition (GAT) [108]. PADI and DBDI use different principles to avoid GAT and therefore to preserve the desirable analytical features of GDs at atmosphere pressure.

The main feature characterizing PADI [110] and DBDI [111] is the direct exposure of the sample to the plasma and the use of radiofrequency instead of direct current to avoid transient instabilities at the electrodes [108]. The radiofrequency signal in PADI is applied to a stainless steel wire usually operated over 200-500 V peak-to-peak and less

LTP

than 5 W total applied power, resulting in a plasma with an operating temperature close to that of the ambient surroundings. The non-thermal plasma is cold to the touch and causes no sample heating, enabling thermally sensitive samples to be analyzed. DBDI uses the concept of dielectric barrier discharge (DBD) [113] to produce the plasma. A hollow stainless steel needle works as discharge electrode, the counter electrode is a copper sheet, and a piece of glass slide mounted on the surface of the copper sheet works as the discharge barrier. The piece of glass slide also serves as sample plate, on which several samples may be applied at different points and a 3D moving stage enables any chosen point to be positioned near the needle electrode. Helium (or


Author's personal copy

other gases) flows through the hollow needle and the alternating potential applied between the two electrodes forms a stable plasma between the tip of the needle electrode and the glass slide. The analytes (M) on the glass slide surface are therefore desorbed and ionized by the plasma. In PADI little or no fragmentation is observed, and mostly protonated or deprotonated molecules are formed. In DBDI the discharge time has to be controlled to reduce fragmentation. PADI has been used to analyze plant alkaloids and pharmaceutical tablets and creams [110] whereas DBDI have been applied to mixtures of amino acids and to explosives [113, 114].

Figure 19 shows a schematic diagram of the LTP arrangement. A glass tube acts as the dielectric barrier. Copper tape wrapped around this tube acts as an outer electrode to which an AC high voltage of 3-5 kV is applied, oscillating at a frequency of 2-5 kHz. Inside the glass tube, an inner-grounded electrode is placed coaxially. The plasma is generated inside the tube aided by the discharge gas that flows with a rate of typically  $0.4 \text{ Lmin}^{-1}$ . He, Ar, N<sub>2</sub>, or even air has been used as discharge gas. The LTP probe is electrically isolated, so there is no risk to the operator of electric shocks. The LTP plasma reaches a maximum temperature of ca 30°C, therefore causing no thermal damages to most surfaces or human skin. These features make LTP-MS attractive for applications requiring low temperature for desorption, for example airport security check points or for portable MS systems.

LTP is regarded here as a variant of PADI (Fig. 1), although it also shares main features with DBDI, because it uses similar ionization and desorption principles [113]. The non-equilibrium plasma in LTP is generated by AC highvoltage discharges on a non-conducting coating, and this non-equilibrium plasma forms several chemically active species, for example high-energy electrons, metastable neutrals, and radical ions, which can ionize the analyte molecules. LTP differs from DBDI mainly in the experimental arrangement. In DBDI, the sample has to be placed between the electrodes submitted to alternating voltages. In LTP, the plasma protrudes outside the tip of a glass tube and can then be placed in direct contact with analyte molecules hanging on the sample surface. LTP(+) normally generates  $[M + H]^+$  and/or  $M^+$  whereas LTP(-) generates mainly  $M^$ and/or  $[M - H]^{-}$  depending on the nature of the analyte molecules. Note that this dual ionization mechanism can mislead interpretation of the mass spectrum. LTP-MS has been applied to several types of samples, for example explosives [112], pesticides [115], pharmaceutical drugs, drugs of abuse [116], and even bulk solutions such as olive oil [117]. Figure 20 illustrates, as an example, the LTP(-)-MS spectrum of phthalic acid, detected mainly as  $[M - H]^{-}$ .

LTP-MS has recently been used in a unique way to monitor in-situ organic reactions directly from the reaction solution surface [118]. Figure 21 shows an illustration of the principles of LTP-MS monitoring of reactions. Initially (A), the reaction pot contains only reactant A ( $H_2NCH_2CH_2NH_2$ ) and only A-ions are desorbed/ionized by LTP. Reactant B (CH<sub>3</sub>COH) is then added (B) and hence ions of both A and B are formed. But the A + B reaction takes place and at time C both reactants and C-product ions are formed. Ambient ion/molecule reactions have also been performed and monitored by LTP-MS in an attempt to increase its selectivity [119].

#### **APPI-related technique**

#### DAPPI

Kostiainen, Kotiaho and collaborators [120] reported the first photonionization-based ambient MS technique (Fig. 22), which they termed "desorption atmospheric pressure photonionization" (DAPPI) [14, 121, 122]. In DAPPI, a heated N<sub>2</sub> plus solvent jet produced by a microchip nebulizer is directed toward the sample causing desorption of the analytes [123], which are photoionized in the gas phase (Fig. 22). DAPPI(+) produces  $M^+$  or  $[M + H]^+$ ions [120-122], depending on the nature of the analyte (proton affinity and IE) and the spray solvent used. Figure 23 shows an illustrative example from DAPPI-MS analysis of heroin [123] using either toluene or acetone as the spray solvent. With toluene,  $M^+$  of m/z 369 was formed whereas acetone formed preferentially  $[M + H]^+$  of m/z 370. Tablets and cream formulations can be analyzed directly by DAPPI but powdered samples must be compressed to prevent puffing of the powder [123]. DAPI-MS has also been used to analyze illicit drugs on a variety of surfaces [121]. Compared with DESI, DAPPI has been reported to have equal or higher sensitivity for a variety of analytes, including MDMA, testosterone, verapamil, and anthracene. In a comparative study, the sensitivity of DAPPI was shown to be similar to that of DESI when analyzing polar analytes and better when analyzing non-polar analytes [121]. In the same way as for APPI, use of toluene and acetone as dopants facilitates ionization by DAPPI of neutral non-polar compounds and compounds with high proton affinities, respectively [14].

#### SSI-related techniques

#### EASI

In 1994, Hirabayashi and collaborators [124–126] also revolutionized mass spectrometry by introducing an API technique termed "sonic spray ionization" (SSI). SSI was unique and revolutionary because it introduced a new concept of ionization to mass spectrometry. For the first



time in the history of MS, ions could be produced without the assistance of voltage, radiation, or heating. The charged droplets were produced simply by spraying an acidified solution of the analyte in methanol at sonic speed. Charge (both negative and positive) in these very minute droplets with limited charge capacity arises from a statistically unbalanced distribution of cations and anions. Because no heating is necessary for droplet desolvation, the gaseous analyte ions [M  $+HJ^+$  and/or  $[M - H]^-$  may arise from the charged droplets (depending on the nature of M) at room temperature. In SSI, therefore, ions are formed with the assistance of compressed nitrogen (or even air) only. We [127, 128] then showed that a stream of very minute bipolar positively or negatively charged droplets produced by sonic spraying of methanolic solutions can also efficiently desorb and ionize analytes from surfaces under ambient conditions, and therefore introduced



Fig. 21 Schematic diagram of LTP in-situ monitoring of organic reactions in solution. Adapted from Ref. [118]



easy ambient sonic-spray ionization (EASI, Fig. 24), an SSIbased ambient technique (Fig. 1).

The main advantages of EASI are therefore:

- 1. its great simplicity, because only compressed nitrogen or air is required;
- 2. its ability to simultaneous produce both negatively and positively charged droplets, hence no need to switch

high potentials in changing from EASI(+) to EASI(-), or vice-versa;

- 3. the low charge concentration on the droplets, which seems to reduce solvent noise [127] thus favoring the analyte ions and therefore improving signal-to-noise ratios:
- the extreme softness of the ionization process [129]; 4.
- 5. no thermal degradation; and



Ref. [123]



no electrochemical, discharge, or oxidation interferences, which are known to occur in ESI [42, 43] and ESI-based techniques [130, 131].

The high-velocity sonic EASI spray also facilitates deep matrix penetration for solid samples, thus providing quite homogenous sampling and long-lasting ion signals [127]. The signal-to-noise advantage of EASI is not surprising, because, compared with ESI for example, SSI has been shown to provide as much as a 40-fold gain in signal-to-noise ratio in the quantification of amino acids [132].

EASI seems, therefore, highly suitable for portable mass spectrometers. EASI is also based on one of the softest ionization techniques (SSI) thus favoring the detection of intact analyte ions. This softness is advantageous for the analysis of fragile molecules and complex mixtures providing a more quantitative single component-one-ion mode of detection. Ionization in EASI is a solution process and its mechanism resembles that of SSI with EASI(+) forming, typically, [M +  $H^{+}$  and/or  $[M + Na(K)]^{+}$  ions and EASI(-) forming mainly  $[M - H]^{-}$  ions in a process free from voltage interferences. Concurrent  $M^{+}$  or  $M^{-}$  species have never been observed in EASI-MS experiments. EASI has been coupled to membrane introduction mass spectrometry (EASI-MIMS) [128] for analysis of solution constituents, to thin-layer chromatography (EASI-TLC-MS) for mixtures requiring some preseparation [133], and high-performance TLC (HPTLC) [134].

One limitation of EASI is the ultra-high-velocity spray stream, which can easily blow samples away. For compact solids, samples crystallized on rough surfaces, and viscous oils this blowing is not a problem. For volatile fuels, for instance, this problem can be circumvented by enabling solvent evaporation and by acquiring data for the residual polar markers [135]. EASI-MS has been applied with success to the analysis of different analytes and matrixes, for example drug tablets [127], perfumes [136], surfactants [137], vegetable oils [138], biodiesel [134, 139], propolis [140], ink [141], crude oils [142], and counterfeit bank notes [143]. Its applications in fuel analysis has been recently reviewed [135].

In forensic applications, EASI-MS has been used for analysis of ballpoint pen ink writing directly from paper surfaces [141], enabling non-destructive fingerprinting identification of ink from different pens. Accelerated degradation resulted in different EASI-MS profiles for each dye. Basic violet 3 (m/z 372), the most common dye in blue pens, furnished a cascade of degradation products (of m/z358, 344, 330, and 316 from consecutive demethylation) whose abundances increased linearly with time. This cascade of degradation products functions therefore as a "chemical clock" for ink aging (Figs. 25a and 25b). Analysis of documents of different ages has confirmed the relative ink dating capabilities of EASI-MS with applications to forgery, superposition, and crossing of lines.

EASI( $\pm$ )-MS has also been shown to furnish comprehensive triacylglycerides (TAG) and free fatty acid (FFA) profiles from vegetable oils and these marker components were detected mainly either as [TAG + Na]<sup>+</sup> (Fig. 25c) or [FFA – H]<sup>-</sup>ions from a single droplet of the oil. EASI(+)-MS was also shown to cause no fragmentation of TAG ions, hence diacylglycerides (DAG) and monoacylglycerides (MAG) profiles and contents could be concomitantly measured. The EASI( $\pm$ )-MS profiles of TAG and FFA enable authentication and quality control and the method was proposed for assessing levels of adulteration, acidity, oxidation, or hydrolysis of vegetable oils in general. EASI(+)-MS has also been used to determine the level of oil oxidation (Fig. 25d), and proposed for single-shot biodiesel analysis [134, 139]. Figures 25e and f show typical EASI spectra obtained from samples of



Fig. 25 EASI(+)-MS of (a) fresh ink writing from blue pen and (b) after accelerated aging performed with a 60-W incandescent light for 19 h; (c) TAG in pure soybean oil and (d) oxidized TAG in soybean oil; (e) high-quality soybean biodiesel and (f) low-quality soybean biodiesel

soybean biodiesel of high and low quality, respectively, prepared by transesterification with methanol. Fatty acid methyl esters (FAME) are detected as  $[FAME + Na]^+$  of m/z 317 corresponding to linoleic acid ester (predominant), m/z 319 of oleic acid ester, and m/z 315 of linolenic acid ester. [FAME + K]<sup>+</sup> ions of m/z 331, 333, and 335 are also observed. DAG and TAG contaminants can be seen in Fig. 25f as  $[DAG + Na]^+$  ions around m/z 639 and  $[TAG + Na]^+$  ions around m/z 903 for a low-quality biodiesel sample.

Ambient MS has been performed typically on inert surfaces, but the advantageous use of active surfaces for ambient MS analysis has recently been demonstrated in EASI-MS experiments. Molecularly imprinted polymers (MIP) were used as a selective surface able to sequester target analytes from urine [144]. Analyte extraction was achieved by dipping the MIP probe into analyte solution percolating through an extraction/washing cell. After the extraction period, the MIP probe was washed using a washing solution and then removed. Finally, the whole MIP surface on the probe was submitted to EASI-MS (Fig. 26a). EASI desorbed the analytes from the MIP surface to the gas phase for MS analysis. Five phenothiazines (chlorpromazine, perphenazine, triflupromazine, thioridazine and prochlorperazine) were chosen as proof-of-principle drugs. A chlorpromazine-imprinted methacrylic polymer was synthesized and used to prepare an MIP probe. The MIP-EASI-MS technique using acidified methanol as solvent has been shown to enable quantification of all five drugs in urine with LOQ of ca. 1 mmol  $L^{-1}$  (Figs. 26b and c).

## V-EASI

Very recently, an extremely simple and easy to assemble and use ionization technique derived from EASI has been described for "*easier than ever*" ambient mass spectrometry [145]. The technique incorporated the classical and widely used Venturi effect and was termed "Venturi easy ambient sonic-spray ionization" (V-EASI). It can also operate in dual mode for both solutions and solid samples (Fig. 27). V-EASI uses solely the forces of a sonic stream of nitrogen or air to cause the combined result of solution self-pumping via the Venturi effect and ionization via sonic spray. For liquid samples, the Venturi effect of such high velocity gas was used to pump the analyte solution to the spray region where sonic-spray ionization (SSI), which forms intact negatively and/or positively charged molecular gaseous species, occurs. For solid samples, the Venturi effect was used to pump the SSI solvent, and the stream of very minute bipolar charged droplets formed by SSI was used to bombard the sample surface causing desorption and ionization of the analytes. V-EASI was shown to produce rather clean spectra dominated by single molecular species for a variety of solutions and solid samples, for example drug tablets, peptides, proteins, crude oil, and cocaine. As for EASI, V-EASI has also the advantage of being a voltage-free, heat-free, and radiation-free technique operating at room temperature with sole assistance of compressed nitrogen (or air) causing, therefore, no thermal, electrical, or discharge interferences. The even greater simplicity of V-EASI than EASI with no electrical power requirement makes V-EASI highly suitable for its use in miniature mass spectrometers.

The V-EASI arrangement also seems ideal for the realtime, continuous, and on-line monitoring of reaction solutions, as Fig. 28 illustrates. This type of monitoring by MS is an ultimate dream for reaction monitoring, because reactions could be followed in real time by this rapid and highly sensitive mass spectrometry technique with characterization of the changing composition of the reaction solution in terms of reactants, products, and, most interestingly, longlived or even transient intermediates. Figure 28 shows three representative V-EASI(+) spectra acquired during the course of a Morita–Baylis–Hillman (MBH) reaction [146]. At the very beginning (Fig. 28a), V-EASI(+)-MS is able to intercept the first intermediate  $[3 + H]^+$  of m/z 199. After 30 min (Fig. 28b), the second key MBH intermediate was also clearly detected as  $[5 + H]^+$  of m/z 306. After 2 h (Fig. 28c),



**Fig. 26** (a) Schematic diagram of MIP-EASI(+)-MS analysis of target molecules from solution. (b, c) MIP-EASI(+)-MS of a urine sample spiked with 5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> chlorpromazine (*m*/*z* 320), triflupromazine (*m*/*z* 353), thioridazine (*m*/*z* 371), prochlorperazine (*m*/*z* 374), and

perphenazine (m/z 404) using either (b) a non-imprinted polymer (NIP) or (c) a molecularly imprinted polymer (MIP) probe. Adapted from Ref. [144]



Fig. 27 Schematic diagram of V-EASI

the final MBH product was detected as both  $[6 + H]^+$  of m/z 194 and  $[6 + Na]^+$  of m/z 216.

#### Quantitation by ambient MS?

Despite its somewhat less controlled fashion and the first impression that ambient mass spectrometry would not have quantitation as of its best figures-of-merit, qualitative analysis has been proved to work also. But there still much to be tested with regard to extensive analytical validation experiments, because most work on ambient MS has not tested the quality of quantitation whereas other workers have reported limited analytical results such as limit-ofdetection (LOD), dynamic range, and linearity.

Cooks and collaborators [38] reported an elaborate study of quantitative aspects of DESI, including intra and interday reproducibility. Quantification of propranolol was



Fig. 28 V-EASI(+)-MS on-line monitoring of the MBH reaction of methyl acrylate with 2-pyridinecarboxyaldehyde in the presence of DABCO. (a) t=0 min, (b) t=30 min, (c) t=2 h

achieved by the use of internal standards homogenized with the surface spot. Use of an isotope-labeled internal standard has been shown to result in better analytical performance with linearity of the order of 0.99 and relative standard deviation ranging from 1% to 17%. Use of an analogous internal standard (atenolol) resulted in poorer performance, with linearity from 0.82 to 0.99. Fernandez and collaborators [147] also quantified artesunate by DESI directly from the antimalarial tablet by adding isotope-labeled internal standard to the tablet. Cooks and collaborators using PSI [74] also quantified imatinib in dried blood spots by spiking it with the deuterated internal standard ( $R^2$ =0.99).

The use of internal standards, preferably isotopologues, carefully homogenized throughout the sample[20] seems, therefore, to be the best approach for superior quantification by ambient mass spectrometry [117, 148, 149], although this procedure clearly has the disadvantages of disturbing the spatial resolution of the analyte and adding the need for sample preparation to a technique for which it has previously been stressed as unnecessary. When highly accurate measurements are not required, undisturbed samples can also be quantified by use of external standards. We have , for example, shown that FFA in crude vegetable oils can be quantified by EASI-MS with external standards, with reasonable linearity (r=0.98) [138].

### The "acronym zoo" in ambient MS

In Fig. 1a we have tried to classify all major ambient techniques according to its basic technique using a "tree" approach. But it seems clear from this discussion that in these trees there is much overlapping of very closely related techniques and a tendency to create a new acronym every time a variant is added. In Fig. 1b we offer, therefore, our view on how the current "acronym zoo" [18] in the field of ambient MS could be organized into a set of less diverse but firmly distinct ionization trees.

For the EI tree, we consider that DAPCI and ASAP could be merged into ASAP, because the latter is the technique most closely related to an ambient desorption/ionization process based on APCI. In fact, DAPCI is actually, in our view, most properly classified as a GDI (gas discharge ionization)-derived technique and should therefore be placed in the GDI tree (actually merged with PADI, see below). ASAP is, unfortunately, an appealing but poor acronym, because its description (atmospheric solids analysis probe) provides no clue of its principles of desorption and ionization whereas the best acronym for it (DAPCI), which correctly describes the principles, has already been used in another approach. Although still confusing, the least bad solution could be to replace ASAP by DAPCI, with DAPCI referring now to the original ASAP approach. For the GDI tree, DBDI, PADI, LTP, and FA-APGDI are, without doubt, very similar approaches based on plasma-assisted ionization; they could, therefore, all be merged to a single term and acronym. Among these, PADI seems to best describe the principle of plasma-assisted desorption/ionization and should be selected to represent the group. DART is, however, unique and should be kept, because it is the only ambient ionization technique using a neutral stream of gas and Penning ionization as its primary ionization step.

For the ESI tree, DESI is, without doubt, a directly ESIrelated ambient desorption/ionization technique. SESI, FD-ESI, EESI, and ND-ESSI do describe a distinctive principle based on secondary ESI but they are very closely related. Among these, SESI was the first to be reported and the one that seems to provide the best acronym focusing on the "secondary" aspect of ESI. For the ESI plus MALDI tree, ELDI, LAESI, and IR-LADESI are indeed very subtle variants and should be merged. Because ESI is the major ionization principle, we argue that the process is best described as *laser-assisted* ESI, not as electrospray-assisted LDI, hence LAESI is proposed as the most appropriate acronym. MALDESI is, however, unique, because a matrix is used, and matrices are known to strongly affect desorption and ionization in MALDI.

No diversity or controversy is observed for the PI and SSI trees. Although V-EASI is unique, because it uses the Venturi effect for pumping, it may also be prudent to merge it with EASI for the sake of simplicity.

### **Final Remarks**

Ambient MS is still a very juvenile field but has already experienced explosive growth in terms of many new variants, combinations, hybridization, and applications. Ambient MS has been so successful because it has substantially simplified MS analysis compared to the tough early days of high vacuum mass spectrometry. Little or literally no sample pre-separation, preparation, or derivatization are required and the mass spectra are most often acquired directly for samples in their open atmosphere, real world, natural environment. They seem, therefore, ideal for portable and miniaturized mass spectrometers, which are now being constructed in sizes as small as those of match boxes.

The field has flourished rapidly because it benefited from knowledge accumulated from decades of developments in classical ionization and desorption techniques. It now offers a very comprehensive set of techniques based on different desorption and ionization principles that can handle most types of molecules with a large range of masses and polarities. Ambient MS will certainly endure, because it has already been probed in a myriad of applications with samples being efficiently analyzed, both qualitatively and quantitatively, with unmatched speed and simplicity. Naturally, this rapid growth has created a somewhat chaotic scenario in terms of terms, acronyms, and classifications, but this current "acronym zoo" should soon be resolved. It now seems that applications will continue to grow but most, if not all possible basic techniques have been used in a diverse set of intelligent designs, hence the explosion of variants seems to have reached a somewhat calm level. There are currently several subtle variants with overlapping mechanisms and target applications, hence some of these acronyms will eventually disappear or merge into a common one. Because ease and simplicity are key words in this area, together with compatibility with miniature mass spectrometers, the most complicated approaches requiring more elaborated instrumentation and power requirements or those still requiring some sample work up will tend to vanish. A robust, simple, easy (to use and implement) wide-range set of ambient MS techniques will then be established.

The ultimate objective of MS—to bring MS to the "real world" open-atmosphere environment—to enable rapid, selective, and highly sensitive qualitative and quantitative chemical and biochemical analyses with great ease and simplicity, avoiding pre-separation and work-up for samples in their natural environment and primary location—wherever MS is needed—is now fully feasible.

Acknowledgements The authors thank the Brazilian science foundations FAPESP, CNPq, CAPES, and FINEP for financial assistance.

#### References

- 1. Hoffmann E, Stroobant V (2007) Mass spectrometry: principles and applications, 3rd edn. Wiley, London
- Oberacher H (2008) On the use of different mass spectrometric techniques for characterization of sequence variability in genomic DNA. Anal Bioanal Chem 391:135–149
- Kaltashov IA, Zhang M, Eyles SJ, Abzalimov RR (2006) Investigation of structure, dynamics and function of metalloproteins with electrospray ionization mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 386:472–481
- Nielen MWF (1999) Maldi time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. Mass Spectrom Rev 18:309–344
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomalecules. Science 246:64–71
- Karas M, Bahr U, Gieβmann U (1991) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Mass Spectrom Rev 10:335–357
- Cole RB (1997) Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications. Wiley, New York
- Santos LS (2010) Reactive intermediates: MS investigations in solution. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- 9. Kinter M, Sherman NE (2000) Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry (Hardcover). Wiley, New York
- Bothner B, Siuzdak G (2004) Electrospray ionization of a whole virus: analyzing mass, structure, and viability. Chembiochem 5:258–260
- Wilkins CL, Lay JO (2006) Identification of microorganisms by mass spectrometry (Chemical Analysis: a series of monographs on analytical chemistry and its applications) (Hardcover). Wiley, New York
- 12. Takats Z, Wiseman JM, Cooks RG (2005) Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. J Mass Spectrom 40:1261–1275
- Cooks RG, Ouyang Z, Takáts Z, Wiseman JM (2006) Ambient mass spectrometry. Science 311:1566–1570
- Venter A, Neflieu M, Cooks RG (2008) Ambient desorption mass spectrometry. Trends Anal Chem 27:284–290
- Van Berkel GJ, Pasilis SP, Ovchinnikova O (2008) Established and emerging atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for mass spectrometry. J Mass Spectrom 43:1161–1180
- Harris GA, Nyadong L, Fernandez FM (2008) Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry. Analyst 133:1297–1301
- Manincke NE, Wiseman JM, Ifa DR, Cooks RG (2008) Desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry and tandem mass spectrometry (MS/MS) of phospholipids and sphingolipids: ionization, adduct formation, and fragmentation. J Am Soc Mass Spectrom 19:531–543
- Chen H, Gamez G, Zenobi R (2009) What can we learn from ambient ionization techniques? J Am Soc Mass Spectrom 20:1947–1963
- Ifa DR, Jackson AU, Paglia G, Cooks RG (2009) Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 394:1995–2008
- Weston DJ (2010) Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and applications areas. Analyst 135:661–668
- 21. Ifa DR, Wu C, Ouyang Z, Cooks RG (2010) Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview. Analyst 135:669–681
- 22. Ouyang Z, Cooks RG (2009) Miniature mass spectrometers. Annu Rev Anal Chem 2:187–214
- Huang G, Xu W, Visbal-Onufrak MA, Ouyang Z, Cooks RG (2010) Direct analysis of melamine in complex matrices using a handheld mass spectrometer. Analyst 135:705–711
- 24. Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG (2004) Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. Science 306:471–473
- 25. Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG (2004) Electrosonic spray ionization. A gentle technique for generating folded proteins and protein complexes in the gas phase and for studying ion-molecule reactions at atmospheric pressure. Anal Chem 76:4050–4058
- Wu C, Qian K, Nefliu M, Cook RG (2010) Ambient analysis of saturated hydrocarbons using discharge-induced oxidation in desorption electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom 21:261–267
- Costa AB, Cooks RG (2008) Simulated splashes: elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. Chem Phys Lett 464:1–8
- Chipuk JE, Brodbelt JS (2008) Transmission mode desorption electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom 19:1612–1620
- Volny M, Venter A, Smith SA, Pazzi M, Cooks RG (2008) Surface effects and electrochemical cell capacitance in desorption electrospray ionization. Analyst 133:525–531

- Shin YS, Drolet B, Mayer R, Dolence K, Basile F (2007) Desorption electrospray ionization-mass spectrometry of proteins. Anal Chem 79:3514–3518
- 31. Myung S, Wiseman JM, Valentine SJ, Takats Z, Cooks RG, Clemmer DE (2006) Coupling desorption electrospray ionization with ion mobility/mass spectrometry for analysis of protein structure: evidence for desorption of folded and denatured States. J Phys Chem B 110:5045–5051
- 32. Hu QZ, Talaty N, Noll RJ, Cooks RG (2006) Desorption electrospray ionization using an Orbitrap mass spectrometer: exact mass measurements on drugs and peptides. Rapid Commun Mass Spectrom 20:3403–3408
- 33. Weston DJ, Bateman R, Wilson ID, Wood TR, Creaser CS (2005) Direct analysis of pharmaceutical drug formulations using ion mobility spectrometry/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with desorption electrospray ionization. Anal Chem 77:7572–7580
- 34. Kauppila TJ, Talaty N, Salo PK, Kotiaho T, Kostiainen R, Cooks RG (2006) New surfaces for desorption electrospray ionization mass spectrometry: porous silicon and ultra-thin layer chromatography plates. Rapid Commun Mass Spectrom 20:2143–2150
- 35. Bereman MS, Nyadong L, Fernandez FM, Muddiman DC (2006) Direct high-resolution peptide and protein analysis by desorption electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 20:3409–3411
- Williams JP, Scrivens JH (2005) Rapid accurate mass desorption electrospray ionisation tandem mass spectrometry of pharmaceutical samples. Rapid Commun Mass Spectrom 19:3643–3650
- Takats Z, Cotte-Rodriguez I, Talaty N, Chen H, Cooks RG (2005) Direct trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. Chem Commun 1950-1952
- Ifa DR, Manicke NE, Rusine AL, Cooks RG (2008) Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces. Rapid Commun Mass Spectrom 22:503–510
- 39. Ifa DR, Wiseman JM, Song Q, Cooks RG (2007) Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). Int J Mass Spectrom 259:8–15
- Eberlin LS, Ifa DR, Wu C, Cooks RG (2009) Three-dimensional visualization of mouse brain by lipid analysis using ambient ionization mass spectrometry. Angew Chem 49:873–876
- 41. Eberlin LS, Dill AL, Costa AB, Ifa DR, Cheng L, Masterson T, Koch M, Ratliff TL, Cooks, RG. (2010) Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chem 82:3430–3434
- Pasilis SP, Kertesz V, Van Berkel GJ (2008) Unexpected analyte oxidation during desorption electrospray ionization-mass spectrometry. Anal Chem 80:1208–1214
- Benassi M, Wu C, Nefliu M, Ifa DR, Volny M, Cooks RG (2009) Redox transformations in desorption electrospray ionization. Int J Mass Spectrom 280:235–240
- 44. Wu C, Qian K, Nefliu M, Cooks RG (2010) Ambient analysis of saturated hydrocarbons using discharge-induced oxidation in desorption electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom 21:261–267
- 45. Chen H, Talaty NN, Takats Z, Cooks RG (2005) Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. Anal Chem 77:6915–6927
- 46. Cotte-Rodriguez I, Takats Z, Talaty N, Chen H, Cooks RG (2005) Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization. Anal Chem 77:6755–6764

- 47. Ifa DR, Manicke NE, Dill AL, Cooks RG (2008) Latent fingerprint chemical imaging by mass spectrometry. Science 321:805
- Reyzer ML, Caprioli RM (2005) MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery. J Proteome Res 4:1138–1142
- Caldwell RL, Caprioli RM (2005) Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. Mol Cell Proteomics 4:395–401
- Wu C, Ifa DR, Manicke NE, Cooks RG (2009) Rapid, direct analysis of cholesterol by charge labeling in reactive desorption electrospray ionization. Anal Chem 81:7618–7624
- Wu C, Siems WF, Hill HH (2000) Secondary electrospray ionization ion mobility spectrometry/mass spectrometry of illicit drugs. Anal Chem 72:396–403
- Chen YH, Hill HH, Wittmer DP (1994) Analytical merit of electrospray ion mobility spectrometry as a chromatographic detector. J Microcolumn Sep 6:515–524
- 53. Martínez-Lozano P, Rus J, de la Mora GF, Hernández M, de la Mora JF (2009) Secondary electrospray ionization (SESI) of ambient vapors for explosive detection at concentrations below parts per trillion. J Am Soc Mass Spectrom 20:287–294
- 54. Steiner WE, Clowers BH, Haigh PE, Hill HH (2003) Secondary ionization of chemical warfare agent simulants: atmospheric pressure ion mobility time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem 75:6068–6076
- Tam M, Hill HH (2004) Secondary electrospray ionization-ion mobility spectrometry for explosive vapor detection. Anal Chem 76:2741–2747
- Martinez-Lozano P, de la Mora JF (2009) On-line detection of human skin vapors. J Am Soc Mass Spectrom 20:1060–1063
- Dillon LA, Stone VN, Croasdell LA (2010) Optimization of secondary electrospray ionization (SESI) for the trace determination of gas-phase volatile organic compounds. Analyst 135:306–314
- Chen H, Venter A, Cooks RG (2006) Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation. Chem Commun 19:2042–2044
- Chang DY, Lee CC, Shiea J (2002) Detecting large biomolecules from high-salt solutions by fused-droplet electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chem 74:2465–2469
- 60. Fan S, Chi-Yang L, Shiea J (2005) Eliminating the interferences from TRIS buffer and SDS in protein analysis by fused-droplet electrospray ionization mass spectrometry. J Proteome Res 4:606– 612
- Pan CT, Shiea J, Shen SC (2007) Fabrication of an integrated piezo-electric micro-nebulizer for biochemical sample analysis. J Micromech Microeng 17:659–669
- 62. Chen HW, Wortmann A, Zhang WH, Zenobi R (2007) Rapid in vivo fingerprint of non-volatile compounds in breath by extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Angew Chem Int Ed 46:580–583
- 63. Chen H, Sun Y, Wortmann A, Gu H, Zenobi R (2007) Differentiation of maturity and quality of fruit using noninvasive extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem 79:1447–1455
- 64. Chen H, Hu B, Hu Y, Huan Y, Zhou Z, Qiao X (2009) Neutral desorption using a sealed enclosure to sample explosives on human skin for rapid detection by EESI-MS. J Am Chem Soc Mass Spectrom 20:719–722
- Chingi K, Chen H, Gamez G, Liang Z, Zenobe R (2009) Detection of diethyl phthalate in perfumes by extractive electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chem 81:123–129
- 66. Ding J, Haiwei G, Yang S, Li M, Li J, Chen H (2009) Selective detection of diethylene glycol in toothpaste products using neutral desorption reactive extractive electrospray

ionization tandem mass spectrometry. Anal Chem 81:8632-8638

- 67. Law WS, Chen H, Ding J, Yang S, Zhu Y, Gamez G, Chingin K, Ren Y, Zenobi R (2009) Rapid characterization of complex viscous liquids at the molecular. Angew Chem Int Ed 48:1–5
- 68. Law WS, Chen HW, Balabin R, Berchtold C, Meier L, Zenobi R (2010) Rapid fingerprinting and classification of extra virgin olive oil by microjet sampling and extractive electrospray ionization mass spectrometry. Analyst 135:773–778
- Luque de Castro MD, Priego-Capote F (2007) Lesser known ultrasound-assisted heterogeneous sample-preparation procedures. TrAC 26:154–162
- Chen HW, Wortmann A, Zenobi R (2007) Neutral desorption sampling coupled to extractive electrospray ionization mass spectrometry for rapid differentiation of biosamples by metabolomic fingerprinting. J Mass Spectrom 42:1123–1135
- Williams JP, Scrivens JH (2008) Coupling desorption electrospray ionization and neutral desorption/extractive electrospray ionization with a travelling-wave based ion mobility mass spectrometer for the analysis of drugs. Rapid Commun Mass Spectrom 22:187–196
- 72. Chen H, Yang S, Wortmann A, Zenobi R (2007) Neutral desorption sampling of living objects for rapid analysis by extractive electrospray ionization mass spectrometry. Angew Chem Int Ed 46:7591–7594
- 73. Gu H, Yang S, Li J, Hu B, Chen H, Zhang L, Fei Q (2010) Geometry-independent neutral desorption device for the sensitive EESI-MS detection of explosives on various surfaces. Analyst 135:779–788
- 74. Wang H, Liu J, Cooks RG, Ouyang Z (2010) Paper spray for direct analysis of complex mixture using mass spectrometry. Angew Chem Int Ed 49:877–880
- Liu J, Wang H, Manicke NE, Lin JM, Cooks RG, Ouyang Z (2010) Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. Anal Chem 82:2463–2471
- Huang MZ, Hsu HJ, Lee JY, Jeng J, Shiea J (2006) Direct protein detection from biological media through electrosprayassisted laser desorption ionization/mass spectrometry. J Proteome Res 5:1107–1116
- 77. Sampson JS, Hawkridge AM, Muddiman DC (2006) Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix assisted laser desorption electrospray ionization (MAL-DESI) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 17:1712–1716
- Nemes P, Vertes A (2007) Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. Anal Chem 79:8098–8106
- Rezenom YH, Dong J, Murray KK (2008) Infrared laser-assisted desorption electrospray ionization mass spectrometry. Analyst 133:226–232
- Guo H, Liu A, Ye M, Yang M, Guo D (2007) Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by highperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 21:715–729
- Lin S-Y, Huang M-Z, Chang H-C, Shiea J (2007) Using electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to characterize organic compounds separated on thin-layer chromatography plates. Anal Chem 79:8789–8795
- Peng IX, Shiea J, Ogorzalek RR, Loo JA (2007) Electrosprayassisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry of peptides and proteins. Rapid Commun Mass Spectrom 21:2541–2546
- 83. Sampson JS, Hawkridge AM, Muddiman DC (2007) Direct characterization of intact polypeptides by matrix-assisted laser

desorption electrospray ionization quadrupole Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 21:1150–1154

- 84. Sampson JS, Hawkridge AM, Muddiman DC (2008) Development and characterization of an ionization technique for analysis of biological macromolecules: liquid matrix-assisted laser desorption electrospray ionization. Anal Chem 80:6773–6778
- Sampson JS, Murray KK, Muddiman DC (2009) Generation of multiply charged peptides and proteins by radio frequency acoustic desorption and ionization for mass spectrometric detection. J Am Soc Mass Spectrom 20:597–600
- McEwen CN, McKay RG, Larsen BS (2005) Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. Anal Chem 77:7826–7831
- 87. McEwen C, Gutteridge S (2007) Analysis of the inhibition of the ergosterol pathway in fungi using the atmospheric solids analysis probe (ASAP) method. J Am Soc Mass Spectrom 18:1274–1278
- Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y (2001) Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. Biochem J 355:545–561
- Williams JP, Patel VJ, Holland R, Scrivens JH (2006) The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin. Rapid Commun Mass Spectrom 20:1447–1456
- 90. Song Y, Cooks G (2006) Atmospheric pressure ion/molecule reactions for the selective detection of nitroaromatic explosives using acetonitrile and air as reagents. Rapid Commun Mass Spectrom 20:3130–3138
- Williams JP, Srivens JH (2005) Rapid accurate mass desorption electrospray ionisation tandem mass spectrometry of pharmaceutical samples. Rapid Commun Mass Spectrom 19:3643–3650
- Cody RB, Laramée JA, Durst HD (2005) Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. Anal Chem 77:2297–2303
- 93. Laramée JA, Cody RB, Nilles JM, Durst HD (2007) Forensic analysis on the cutting edge. In: Blackleage RD (ed) Forensic Applications of DART (Direct Analysis in Real Time) Mass Spectrometry. Wiley, NJ
- 94. Jones RW, Cody RB, McClelland JF (2006) Differentiating writing inks using direct analysis in real time mass spectrometry. J Forensic Sci 51:915–918
- 95. Fernandez FM, Cody RB, Green MD, Hampton CY, McGready R, Sengaloundeth S, White NJ, Newton PN (2006) Characterization of solid counterfeit drug samples by desorption electrospray ionization and direct-analysis-in-realtime coupled to time-of-flight mass spectrometry. ChemMed-Chem 1:702–705
- 96. Haefliger OP, Jeckelman N (2007) Direct mass spectrometric analysis of flavors and fragrances in real applications using DART. Rapid Commun Mass Spectrom 21:1361–1366
- 97. Vail T, Jones PR, Sparkman OD (2007) Rapid and unambiguous identification of melamine in contaminated pet food based on mass spectrometry with four degrees of confirmation. J Anal Toxicol 31:304–312
- Pierce CY, Barr JR, Cody RB, Massung RF, Woolfitt AR, Moura H, Thompson HA, Fernandez FM (2007) Ambient generation of fatty acid methyl ester ions from bacterial whole cells by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. Chem Commun 8:807–809
- 99. Yew JY, Cody RB, Kravitz EA (2008) Cuticular hydrocarbon analysis of an awake behaving fly using direct analysis in realtime time-of-flight mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA 105:7135–7140

- 100. Yu S, Crawford E, Tice J, Musselman B, Wu JT (2009) Bioanalysis without sample cleanup or chromatography: the evaluation and initial implementation of direct analysis in real time ionization mass spectrometry for the quantification of drugs in biological matrixes. Anal Chem 81:193–202
- 101. Morlock G, Ueda Y (2007) New coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry. J Chromatogr A 1143:243–251
- 102. Cody RB (2009) Observation of molecular ions and analysis of nonpolar compounds with the direct analysis in real time ion source. Anal Chem 81:1101–1107
- 103. Song L, Dykstra AB, Yao H, Bartmess JE (2009) Ionization mechanism of negative ion-direct analysis in real time: a comparative study with negative ion-atmospheric pressure photoionization. J Am Soc Mass Spectrom 20:42–50
- 104. Wells JM, Roth MJ, Keil AD, Grossenbacher JW, Justes DR, Patterson GE, Barket DJ Jr (2008) Implementation of DART and DESI ionization on a fieldable mass spectrometer. J Am Soc Mass Spectrom 19:1419–1424
- 105. Shelley JT, Wiley JS, Chan GCY, Schilling GD, Ray SJ, Hieftje GM (2009) Characterization of direct-current atmosphericpressure discharges useful for ambient desorption/ionization mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 20:837–844
- 106. Nyandong L, Galhena AS, Fernandez FM (2009) Desorption electrospray/metastable-Induced Ionization: a flexible multimode ambient ion generation technique. Anal Chem 81:7788–7794
- 107. Shin YS, Drolet B, Mayer R, Dolence K, Basile F (2007) Desorption electrospray ionization-mass spectrometry of proteins. Anal Chem 79:3514–3518
- 108. Andrade FJ, Wetzel WC, Chan GCY, Webb MR, Gamez G, Ray SJ, Hieftje GM (2006) A new, versatile, direct-current helium atmospheric-pressure glow discharge. J Anal At Spectrom 21:1175–1184
- 109. Andrade FJ, Shelley JT, Wetzel WC, Webb MR, Gamez G, Ray SJ, Hieftje GM (2008) Atmospheric pressure chemical ionization source. 2. Desorption-ionization for the direct analysis of solid compounds. Anal Chem 80:2654–2663
- 110. Ratcliffe LV, Rutten FJM, Barrett DA, Whitmore T, Seymour D, Greenwood C, Aranda-Gonzalvo Y, Robinson S, McCoustra M (2007) Surface analysis under ambient conditions using plasmaassisted desorption/ionization mass spectrometry. Anal Chem 79:6094–6101
- 111. Sonnenfeld A, Tun TM, Zajícková L, Kozlov KV, Wagner H-E, Behnke JF, Hippler R (2001) Deposition process based on organosilicon precursors in dielectric barrier discharges at atmospheric pressure-A comparison. Plasma Process Polym 6:237–266
- 112. Harper JD, Charipar NA, Mulligan CC, Zhang X, Cooks RG, Ouyang Z (2008) Low-temperature plasma probe for ambient desorption ionization. Anal Chem 80:9097–9104
- 113. Na N, Zhao MX, Zhang SC, Yang CD, Zhang XR (2007) Development of a dielectric barrier discharge ion source for ambient mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 18:1859–1862
- 114. Na N, Zhang C, Zhao MX, Zhang SC, Yang CD, Fang X, Zhang XR (2007) Direct detection of explosives on solid surfaces by mass spectrometry with an ambient ion source based on dielectric barrier discharge. J Am Soc Mass Spectrom 42:1079–1085
- 115. Wiley JS, Garcia-Reyes JF, Harper JD, Charipar NA, Ouyang Z, Cooks RG (2010) Screening of agrochemicals in foodstuffs using low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. Analyst. doi:10.1039/b919493b
- 116. Jackson A, Garcia-Reyes JF, Harper JD, Wiley JH, Molina-Diaz A, Ouyang Z, Cooks RG (2010) Analysis of drugs of abuse in biofluids by low temperature plasma (LTP) ionization mass spectrometry. Analyst. doi:10.1039/b920155f
- 117. Garcia-Reyes JF, Mazotti F, Harper JD, Charipar NA, Oradu S, Ouyang Z, Sindona G, Cooks RG (2009) Direct olive oil analysis

by low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 23:3057–3062

- 118. Ma X, Zhang S, Lin Z, Liu Y, Xing Z, Yang C, Zhang X (2009) Real time monitoring of chemical reactions by mass spectrometry utilizing a low temperature plasma probe. Analyst 134:1863–1867
- 119. Benassi M, Garcia-Reyes JF, Cooks RG (2009) Ambient Ion/ molecule reactions using a low temperature plasma probe. Extended Abstract presented at 18th International mass spectrometry conference, in Bremen, Germany, from August 30th to September 4th
- 120. Haapala M, Pol J, Saarela V, Arvola V, Kotiaho T, Ketola RA, Franssila S, Kauppila TJ, Kostiainen R (2007) Desorption atmospheric pressure photoionization. Anal Chem 79:7867–7872
- 121. Kauppila TJ, Arvola V, Haapala M, Pol J, Aalberg L, Saarela V, Franssila S, Kotiaho T, Kostiainen R (2008) Direct analysis of illicit drugs by desorption atmospheric pressure photoionization. Rapid Commun Mass Spectrom 22:979–985
- 122. Luosujärvi L, Arvola V, Haapala M, Pol J, Saarela V, Franssila S, Kotiaho T, Kostiainen R, Kauppila TJ (2008) Desorption and ionization mechanisms in desorption atmospheric pressure photoionization. Anal Chem 80:7460–7466
- 123. Luosujarvi L, Laakkonen U-M, Kostiainen R, Kotiaho T, Kauppila TJ (2009) Analysis of street market confiscated drugs by desorption atmospheric pressure photoionization and desorption electrospray ionization coupled with mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 23:1401–1404
- 124. Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H (1994) Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Anal Chem 66:4557–4559
- 125. Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H (1995) Sonic spray mass spectrometry. Anal Chem 67:2878–2882
- 126. Hirabayashi A, Hirabayashi Y, Sakairi M, Koizumi H (1996) Multiply-charged ion formation by sonic spray. Rapid Commun Mass Spectrom 10:1703–1705
- 127. Haddad R, Sparrapan R, Eberlin MN (2006) Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 20:2901–2905
- 128. Haddad R, Sparrapan R, Kotiaho T, Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization-membrane interface mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. Anal Chem 80:898–903
- 129. Takats Z, Nanita SC, Cooks RG, Schlosser G, Karoly Vekey K (2003) Amino acid clusters formed by sonic spray ionization. Anal Chem 75:1514–1523
- Chen ML, Cook KD (2007) Oxidation artifacts in the electrospray mass spectrometry of a peptide. Anal Chem 79:2031–2036
- 131. Boys BL, Kuprowski MC, Noel JJ, Konermann L (2009) Protein oxidative modifications during electrospray ionization: solution phase electrochemistry or corona discharge-induced radical attack? Anal Chem 81:4027–4034
- Sorensen MB, Aaslo P, Egsgaard H, Lund T (2008) Determination of D/L-amino acids by zero needle voltage electrospray ionisation rapid commun. Mass Spectrom 22:455–461
- 133. Haddad R, Milagres HMS, Catharino RR, Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. Anal Chem 80:2744–2750
- 134. Eberlin LS, Abdelnur PV, Passero A, de Sá GF, Daroda RJ, Souza V, Eberlin MN (2009) Analysis of biodiesel and biodieselpetrodiesel blends by high performance thin layer chromatography combined with easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Analyst 134:1652–1657
- 135. Alberici RM, Simas RC, de Sá GF, Daroda RJ, Souza V, Eberlin MN (2010) Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Anal Chim Acta 659:15–22
- 136. Haddad R, Catharino RR, Marques LA, Eberlin MN (2008) Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization

mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection. Rapid Commun Mass Spectrom 22:3662–3666

- 137. Saraiva AS, Abdelnur PV, Catharino RR, Nunes G, Eberlin MN (2009) Fabric softeners: nearly instantaneous characterization and quality control of cationic surfactants by easy ambient sonicspray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 23:357–362
- 138. Simas RC, Catharino RR, Cunha IBS, Cabral EC, Barrera-Arellano D, Eberlin MN, Alberici RM (2010) Characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonicspray ionization mass spectrometry. Analyst 135:738–744
- 139. Abdelnur PV, Eberlin LS, de Sá GF, Souza V, Eberlin MN (2008) Single-shot biodiesel analysis: nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. Anal Chem 80:7882–7886
- 140. Sawaya ACHF, Abdelnurb PV, Eberlin MN, Kumazawac S, Ahnd MR, Bangd KS, Nagarajae N, Bankovaf VS, Afrouzang H (2010) Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Talanta 81:100–108
- 141. Lalli PM, Sanvido GB, Garcia JS, Haddad R, Cosso RG, Maia DRJ, Zacca JJ, Maldaner AO, Eberlin MN (2010) Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Analyst 135:745–750
- 142. Corilo YE, Vaz BG, Simas RC, Nascimento HDL, Klitzke CK, Pereira RCL, Bastos WL, Rodgers RP, Eberlin MN (2010) Petroleomics by EASI(+/-) FT-ICR MS. Anal Chem 82:3990– 3996
- 143. Haddad R, Sarabia Neto RC, Cosso RG, Maia DRJ, Maldener AO, Zacca JJ, Sanvido GB, Romão W, Vaz BG, Eberlin LS, Ifa

DR, Manicke NE, Dill A, Cooks RG, Eberlin MN (2010) Instantaneous Chemical Profiles of Banknotes by Ambient Mass Spectrometry. Anal Chem. Accepted

- 144. Figueiredo EC, Sanvido GB, Zezzi MA, Eberlin MN (2010) Molecularly imprinted polymers as analyte sequesters and selective surfaces for easy ambient sonic-spray ionization. Analyst 135:726–730
- 145. Santos VG, Regiani T, Dias FFG, Romão W, Klitzke CF, Coelho F, Eberlin MN (2010) Development and applications of Venturi easy ambient sonic-spray ionization (V-EASI): Easier than ever ambient mass spectrometry. Nature Chem. Submitted
- 146. Amarante GW, Milagre HMS, Vaz BG, Ferreira BRV, Eberlin MN (2009) Dualistic nature of the mechanism of the Morita – Baylis – Hillman reaction probed by electrospray ionization mass spectrometry. J Org Chem 74:3031–3037
- 147. Nyadong L, Late S, Green MD, Banga A, Fernandez FM (2008) Direct quantitation of active ingredients in solid artesunate antimalarials by noncovalent complex forming reactive desorption electrospray ionization mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 19:380–388
- 148. Perez JJ, Harris GA, Chipuk JE, Brodbelt JS, Green MD, Hampton CY, Fernandez FM (2010) Transmission-mode direct analysis in real time and desorption electrospray ionization mass spectrometry of insecticide-treated bednets for malaria control. Analyst 135:712–719
- 149. Wiseman JM, Evans CA, Bowen CL, Kennedy JH (2010) Direct analysis of dried blood spots utilizing desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. Analyst 135:720–725

# ANEXO III

# ANALYSIS OF STREET ECSTASY TABLETS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY COUPLED TO EASY AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY

Bruno D. Sabino,<sup>a,b</sup> Morena L. Sodré,<sup>a</sup> Emanuele A. Alves,<sup>a</sup> Hannah F. Rozenbaum,<sup>a</sup> Fábio O. M. Alonso,<sup>a</sup> Deleon N. Correa,<sup>c</sup> Marcos N. Eberlin,<sup>c\*</sup>, Wanderson Romão<sup>c\*</sup>

a) Institute of Criminalistic Carlos Éboli, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 20060-050, Rua Pedro I, 28, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

- b) National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality, Av. N. Sra. das Graças, 50 Xerém, 22250-020 Duque de Caxias - RJ - Brasil
- c) ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas UNICAMP, 13084-971, Campinas, SP, Brazil

#### Abstract

Ecstasy is a famous illicit drug with varying drug composition, but it usually contains 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as the main active ingredient. The common procedure to identify ecstasy tablets uses testing kits, but its low specificity may lead to false positives. Thin layer chromatography (TLC) is used worldwide in forensic investigations due to its simplicity, low-cost and versatility but may also lead to false positives. In this study, TLC separation of seven common ecstasy drugs: MDMA, metamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), amphetamine, caffeine and lidocaine was attained, and twenty five apprehended street ecstasy tablets analyzed by TLC. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) was then performed directly on the surface of each TLC spot for MS characterization. The combination of TLC with EASI-MS is shown to provide a relatively simple and powerful screening tool for forensic analysis of street drugs with fast and indisputable results.

\*Corresponding authors: Marcos N. Eberlin and Wanderson Romão wandersonromao@gmail. com/ Phone + 55 19 3521 3049 eberlin@iqm.unicamp.br/ Phone: + 55 19 3521 3073

KEYWORDS: ecstasy tablets; MDMA; illicit drug; TLC; EASI-MS;

#### INTRODUCTION

Ecstasy, also known as "candy", "XTC" and "Adam", is a popular illicit drug sold worldwide in the form of colored tablets with varying logos and shapes. Ecstasy most often contain 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Figure 1), but 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) or 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) are also found particularly in samples known as "Eve" tablets. These amphetamines display close chemical compositions and biological effects.

Renfroe and co-workers [1] were the first to report the chemical composition of ecstasy tablets. They analyzed, from 1972 to 1985, hundreds of tablets of ecstasy sent anonymously to their laboratory. All samples sent before 1975 were found to contain only MDA. The first tablet with MDMA was found in 1975, the second in 1976 and, during the next years the number of tablets with MDMA increased progressively. In the beginning of the 80's, MDMA was the main drug found in ecstasy tablets. Other amphetamine analogues, such as methamphetamine (Figure 1) and other psychoactive substances including ketamine have also been found in ecstasy tablets. Other drugs such as caffeine, amphetamine, lidocaine, and adulterants have been found in ecstasy tablets.



FIGURE 1. STRUCTURES AND MW OF DRUGS NORMALLY FOUND IN ECSTASY TABLETS.

Forensic laboratories analyze ecstasy tablets mainly using ecstasy testing kits, which are often based on the Marquis or Simon tests and develop specific colors such as dark blue or black. These tests display, however, low selectivity leading sometimes to false-positives [2]. Additional techniques have therefore been employed to confirm the kit results such as gas chromatography (GC), GC coupled to mass spectrometry (GC-MS) [3], high performed liquid chromatography (HPLC) [4] and HPLC coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) [5]. These instrumental techniques naturally require more skilled operators and are much more effort and time consuming.

Thin layer chromatography (TLC) is a classical, simple, low-cost, fast, and versatile separation technique [6] and has been widely used in forensic investigations. A variety of developing reagents are also available, such as ninhydrin and the Marquis reagent for anphetamines [7]. The main drawbacks of TLC are limited resolving power and lack of a unquestionable method for structural characterization. Recently, a new class of ionization techniques for ambient mass spectrometry [8-11] has been developed. These techniques allow desorption, ionization, and MS characterization of analytes directly from their natural surfaces and matrixes [12], becoming therefore an attractive solution for direct characterization of TLC spots. Among these techniques, easy ambient sonic spray ionization (EASI) is likely the simplest, gentlest, and most easily implemented [13]. An EASI source can be constructed and installed in a few minutes from simple MS laboratory parts (Figure 2) requiring no voltages, no UV lights, no laser beams, no corona or glow discharges, and no heating, and as shown recently, even with no pumping systems [14]. EASI relies on the forces of a high velocity stream of N<sub>2</sub> (or even air) to accomplish analyte desorption and supersonic spray ionization (SSI) [15]. EASI has already been successfully tested with different analytes in different matrices and in various applications such as aging of ink writings on paper surfaces [16], perfumes [17], surfactants [18], biodiesel [19], propolis [20], cloth softeners [21]. EASI has been coupled to membrane introduction mass spectrometry [22], TLC [23], HPTLC [24] and has applied molecularly imprinted polymers as selective surfaces [25].



Figure 2. Schematic of TLC/EASI-MS. Supersonic spray produces a bypolar stream of very minute charged droplets (blue spray) that bombard the TLC silica surface causing desorption and ionization of the analyte molecules that rest on the target spot (green dots). Analytes are ionized often as  $[M = H]^+$  or  $[M - H)^-$ , or both. EASI is assisted only by compressed nitrogen or air, and causes no oxidation, electrical, discharge, or heating interferences.

In this work, the coupling of TLC and EASI-MS has been tested in a "real world" forensic application. First, TLC separation has been optimized for seven standards of drugs normally found in street ecstasy tablets. A total of 25 street ecstasy tablets apprehended by the Rio de Janeiro Police Department were then analyzed by TLC/ EASI-MS.

# Experimental

# **Reagents and Samples**

HPLC and P.A. grade methanol (CH<sub>3</sub>OH), chloroform (CHCl<sub>3</sub>), isopropanol (CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH), acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH), and ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) were obtained from Merck. Twenty five street ecstasy tablets were provided by the Rio de Janeiro Civil Police. MDMA, MDEA, MDA, ketamine, caffeine, methamphetamine, and amphetamine standards solutions (1 mg mL<sup>-1</sup>) were purchased from Radian (Austin, TX, USA).

# **Ecstasy Tablets**

The ecstasy tablets were provided by the Carlos Éboli Institute of Criminalistic. The Rio de Janeiro police apprehended these tablets during the years of 2008 and 2009. The tablets displayed diameter, thickness, and weight of ca.  $0.79 \pm 0.11$  cm,  $0.44 \pm 0.15$  cm, and  $260 \pm 56$  g, respectively, with a variety of shapes, logos, and colors. Tablets were pulverized and a 10 mg of the sample was partially dissolved in 10 ml of methanol. After centrifugation, the upper layer was transferred to a glass vial and analyzed by TLC.

# TLC

Precoated plates (silica gel 60 GF 254, Merck, 6100 Darmstadt, Germany) were used. These plates were dried for 30 min at 80 °C and then stored in a desiccator. A volume of ca 3  $\mu$ l of a sample or standard solution were carefully applied to the TLC plate, which were developed in an horizontal chamber (Camag, Switzerland). The total developing distance was 8 cm. Four different solvent systems were tested as eluents: CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (50/50 v/v); CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH (20/75/5 v/v); CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>4</sub>OH (98/2 v/v); and CH<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH/NH<sub>4</sub>OH (95/5 v/v). After experimental development, the plates were dried at 100 °C for 15 min. Spots were detected under ultraviolet (UV) radiation at 254 nm.

## Limit of detection (LOD)

The LOD of MDMA in the TLC plates used was set as the minimum compound concentration that could be visualized by UV with an acceptable level of precision of  $\leq$  15% and accuracy of ± 15% in 10 replicates.

# EASI-MS

Experiments were performed on a single quadrupole mass spectrometer (LCMS- 2010EV -Shimadzu Corp.,

Japan) equipped with a home-made EASI source, which is described in detail elsewhere [15]. Acidified methanol (0.1% in volume of formic acid) at a flow rate of 20  $\mu$ L min<sup>-1</sup> and compressed N<sub>2</sub> at a pressure of 100 *psi* were used to form the supersonic spray. The capillary-surface entrance angle was of ca 45°. Each TLC spot was directly analyzed by EASI-MS, without any sample preparation. Spectra were collected on each spot for about 10 s.

# Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS).

GC/MS was conducted using a Thermo Scientific (Austin, Texas) Focus gas chromatograph coupled to an ITQ 700 Thermo mass selective detector. The mass spectra scan rate was 3 scans s<sup>-1</sup>. The GC was operated in the splitless mode with a carrier gas (helium grade 5) flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer was operated using 70 eV electron ionization (EI) and a source temperature of 250 °C. Both the GC injector and the transfer line were maintained at 250 °C. The mass spectra reported were obtained after background subtraction and by averaging ca five scans. Samples (caffeine standard solution and tablets) were diluted in HPLC grade methanol to give a final concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>, and 1 µL was introduced via manual injection. The GC temperature program used consisted of an initial temperature of 130 °C for 1 min then increased to 280 °C at 17 °C min<sup>-1</sup> and held for 11 min.

# **Results and Discussion**

TLC separation of the seven common ecstasy tablet components was evaluated using four different solvent systems as eluents (Table I).  $CHCl_3/CH_3OH$  (50/50 v/v) was inefficient since it caused spot tailing for most standards and ecstasy samples tested.  $CHCl_3/CH_3OH/$  $CH_3COOH$  (20/75/5 v/v) provided well defined spots for both the samples and standards, but MDMA, metamphetamine, amphetamine, and ketamine presented too close Rf values (0.62-0.71). The best results were obtained for  $CH_3CH(CH_3)OH/CH_3OH$  (95/5 v/v) and, most particularly, for  $CH_3OH/NH_4OH$  (98/2 v/v) (Figure 3). Although close Rf values for MDMA (main drug expected in ecstasy tablets) and metamphetamine were observed, good separation and resolution was observed for MDA, MDEA, amphetamine, ketamine, and caffeine (Figure 3 and Table I).



Figure 3. TLC data for the seven common ecstasy components tested as well as for the 25 samples of apprehended street ecstasy tablets using  $CH_3OH:NH_4OH$  (98:2) v/v as the eluent. Spots developed by UV are represented by dark black or gray (less intense) ovals.

#### **TLC/EASI-MS**

For TLC, we selected therefore  $CH_3OH/NH_4OH$  (98:2) v/v as the best eluent and the components of each spot (Figure 3) were then subjected to desorption, ionization, and *m/z* measurements by EASI-MS in the positive ion mode using acidified methanol as the spray solvent.

Table I. Rf values for the seven drug standards as a function of different TLC eluents

Compound	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH (50:50) v/v	CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>3</sub> COOH (75:20:5) v/v	CH₃OH:NH₄OH (98:2) v/v	CH <sub>3</sub> CH(CH <sub>3</sub> )OH:NH <sub>4</sub> OH (95:5) v/v
MDEA	0.62	0.74	0.71	0.87
MDA	0.48	0.60	0.67	0.81
MDMA	0.37	0.64	0.56	0.62
Metamphetamine	0.35	0.62	0.57	0.62
Amphetamine	0.71	0.66	0.66	0.70
Ketamine	0.86	0.71	0.84	0.80
Caffeine	0.84	0.94	0.77	0.70

Figure 4 shows the "on-spot" EASI-MS acquired directly from the surface of the TLC spots of each of the seven standards used. Note the unambiguous characterization of each drug, mostly as a single ion (which facilitates spectra interpretation and analyte characterization) corresponding to their protonated molecules, that is,  $[M + H]^+$ . MDEA was the only drug that was also detected as [MDEA + H<sub>2</sub>0 + H]<sup>+</sup> and [MDEA + Na]<sup>+</sup>. Signal-to-noise ratio was quite high for all standards ex-

cept caffeine (Figure 4). LOD was evaluated for TLC of MDMA and found to be of  $3 \pm 0.3 \mu g$ . For the caffeine spot, the low sensitivity of EASI-MS seems to result from its polarity and high affinity to silica that hampered desorption from the TLC plate by the EASI droplets containing acidified methanol. We are currently searching for an EASI-spray solvent or mixture of solvents that could provide proper desorption and ionization of caffeine from the silica in TLC spots.



FIGURE 4. EASI-MS COLLECTED DIRECTLY ON THE SURFACE OF THE TLC SPOTS CORRESPONDING TO THE SEVEN COMMON ECSTASY COMPONENTS TESTED: (A) MDEA, (B) MDA, (c) MDMA, (d) METAMPHETAMINE, (E) AMPHETAMINE, (F) KETAMINE, AND (G) CAFFEINE.

Figure 5 shows the EASI-MS for the single TLC spot of sample T1 (Figure 3), a representative street sample of ecstasy. Note there could be doubt about the composition of this spot based on TLC alone, since both MDMA and metamphetamine displayed quite close Rf values (Figure 3). But the presence of MDMA (m/z 194) is unmistakably confirmed by EASI-MS. This result illustrates the importance of the TLC/EASI-MS coupling for rapid and unambiguous analysis of ecstasy tablets. Sample T6 also provided a dubious case since its single TLC spot, judging by the Rf value, could be interpreted as corresponding to either ketamine or caffeine. EASI-MS of this T6 spot (not shown) displayed very low overall abundance (mostly noise) and failed to detect therefore the intense protonated molecule of m/z 238 expected for ketamine (Figure 4). Since EASI-MS sensitivity to caffeine using acidified methanol as the spray solvent was found to be very poor (Figure 4), the spot was assigned to caffeine. GC/MS data (not shown) confirmed that the main constituent of T6 was indeed caffeine.



FIGURE 5. EASI-MS COLLECTED DIRECTLY ON THE SURFACE OF THE SINGLE TLC SPOT OF SAMPLE T1.

Figure 3 shows that most ecstasy tablets displayed a single TLC spot with Rf values (and EASI-MS data) corresponding to MDMA. Tablets T18 and T19 displayed, however, a single spot corresponding, as far as only TLC and Rf values are concerned, to ketamine. But EASI-MS analysis for T18 (Figure 6) and T19 clearly points to an erroneous TLC attribution since the  $[M + H]^+$  ion of *m/z* 235 indicates lidocaine as the main spot constituent. Both T18 and T19 samples displayed similar shape, logo, dimension, and mass indicating common origin.



FIGURE 6. EASI-MS COLLECTED DIRECTLY ON THE SURFACE OF THE SINGLE TLC SPOT FOR TABLET T18. A SIMILAR SPECTRUM WAS COLLECTED FOR T19.

In contrast to most ecstasy tablets showing a single TLC spot, samples T9, T16 and T17 displayed two or three spots. Some of these spots (Figure 3) have Rf values corresponding to caffeine, and this attribution was confirmed by GC/MS (data not shown). A third spot observed for T16 and T17 with the highest Rf value could be attributed to ketamine. But again EASI-MS discarded ketamine, showing very low ion abundance and mostly noise. These spots were therefore labeled as "unknown". Tablets T16 and T17 also displayed similar shapes, logos and colors, indicating common origin.

# CONCLUSIONS

Validation of methods used to detect drugs using TLC analysis is crucial to generate undisputable results, particularly in forensic investigations. TLC is a simple, low-cost, versatile, and popular technique used widely in forensic screening of illicit drugs, but may lead to false positives or erroneous attributions due to limited resolution and lack of an undisputable and selective method for structural characterization particularly for unexpected components. EASI-MS performed directly on the surface of TLC spots provides rapid and secure MS characterization. The coupling of TLC with FASI-MS constitutes therefore a valuable tool in forensic investigations, as demonstrated herein for a "real world" case involving the analysis of apprehended street ecstasy tablets. Although a few cases have required more elaborated GC/MS analysis, or a few spots remained identified, rapid screening of samples by TLC/EASI-MS provided secure identification for most samples, greatly speeding the overall analysis time and increasing its accuracy. EASI is the simplest ambient ionization technique currently available for ambient mass spectrometry [9], being easily implemented in all API mass spectrometers. Miniature mass spectrometers able to operate with ambient ionization techniques are also being made more compact and robust, and with diminishing costs [26, 27]. Therefore, the use of such compact and affordable instruments would allow widespread use of the EASI-MS technique in most forensic laboratories. TLC is also the simplest and the most popular separation technique in forensic investigations. The coupling of TLC to EASI-MS provides therefore a suitable technique for simple, rapid and secure forensic investigations. The favorable characteristics of TLC/EASI-MS indicate many advantageous applications in forensic analysis.

# ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Rio de Janeiro Police Department, Institute of Criminalistics for providing the apprehended ecstasy samples, and the Brazilian science foundation's FAPESP, CNPq, FAPERJ and FINEP for financial assistance.

# REFERENCES

- 1. Renfroe, C. L.; *J. Psychoactive Drugs*, 1986, 18, 363.
- Jeffrey, W. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. Moffat, A.; Osselton, M.; Widdop, B.; Galichet, L.,eds.; London, UK: Pharmaceutical Press, 2004.
- 3. Sherlock, K.; Wolff, K.; Hay, A. W.; Conner, M. J. Accid. Emerg. Med., 1999, 16, 194.
- 4. Sadeghipour, F.; Veuthey, J. L. *J. Chromatogr. A*, 1997, 787, 137.
- 5. Bogusz, M. J. J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl., 2000, 748, 3.
- Kato, N.; Pharm, B.; Fujita, S.; Pharm, B.; Ohta, H.; Fukuba, M.; Pharm, M.; Toriba, A.; Hayakawa, K. J. Forensic Sci., 2008, 53, 1367.
- 7. Zakrzewska, A.; Parczewski, A.; Kazmierczak, D.; Ciesielski, W.; Kochanaa, J. Acta Chim. Slov., 2007, 54, 106.
- Ifa, D. R.; Wu, C.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. Analyst, 2010, 135, 669.
- 9. Alberici, R. M.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Romão, W.; Lalli, P. M.; Benassi, M.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N. *Anal Bioanal. Chem.*, 2010, in press.
- 10. Harris, G. A.; Nyadong, L.; Fernandez, F. M. *Analyst*, 2008, 133, 1297.
- 11. Chen, H.; Gamez, G.; Zenobi, R. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2009, 20, 1947.
- 12. Ifa, D. R.; Gumaelius, L. M.; Eberlin, L. S.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G. *Analyst*, 2007, 132, 461.
- 13. Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Anal Chem.*, 2008, 80, 898.
- Santos, V. G.; Regiani, T.; Dias, F. F. G.; Romão, W.; Klitzke, C. F.; Coelho, F.; Eberlin, M. N. Angew. Chem. Int. Ed., 2010, submitted.

- 15. Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2006, 20, 2901.
- Lalli, P. M; Sanvido, G. B.; Garcia, J. S.; Haddad, R.; Cosso, R. G.; Maia, D. R. J.; Zacca, J. J.; Maldaner, A. O.; Eberlin, M. N. *Analyst*, 2010, 135, 745.
- 17. Haddad, R.; Catharino, R.R.; Marques, L. A.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, 22, 3662.
- Saraiva, S. S.; Abdelnur, P. V.; Catharino, R. R.; Nunes, G.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, 23, 357.
- 19. Abdelnur, P. V.; Eberlin, L. S.; Sá, G. F.; Souza, S V.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* 2008, 80, 7882.
- Sawaya, A.C.H.F.; Abdelnur, P. V.; Eberlin, M. N.; Kumazawa, S.; Ahn, M.-R.; Bang, K-S.; Nagaraja, N.; Bankova, V. S.; Afrouzan, H. *Talanta*, 2010, 81, 100.
- Saraiva, S. A.; Abdelnur, P. V.; Catharino, R. R.; Nunes, G.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, 23, 357.
- 22. Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.*, 2008, 80, 898.
- 23. Haddad, R.; Milagre, H. M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. Anal. Chem. 2008, 80, 2744-2750.
- 24. Eberlin, L.S.; Abdelnur, P. V.; Passero, A.; de Sa, G. F.; Daroda, R. J.; de Souza, V.; Eberlin, M. N. *Analyst*, 2009, 134, 1652.
- 25. Figueiredo, E. C.; Sanvido, G. B.; Arruda, M. A. Z.; Eberlin, M. N. *Analyst*, 2010, 135, 726.
- 26. Gao, L.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. Anal. Chem. 2008, 80, 4026.
- 27. Syms, R. Anal. Bioanal. Chem. 2009, 393, 427-429.