

IMPORTÂNCIA DA EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS DE IONIZAÇÃO À PRESSÃO AMBIENTE EM ESPECTROSCOPIA DE MASSAS NAS ANÁLISES FORENSES

Erinaldo do Nascimento Carvalho

Bacharel em Química pela Universidade de Brasília.

Especialista em Ciências Forenses IFAR/PUC

E-mail: eriunb@yahoo.com.br

Resumo

A Os métodos derivados da ionização à pressão ambiente (API) têm sido um avanço na química analítica. As técnicas de ionização electrospray ionization (ESI) e sonic-spray ionization (SSI) mudaram o caminho da espectrometria de massas (MS). Um dos métodos de ionização discutido neste trabalho, o Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (EASI), foi derivado do SSI. A técnica EASI-MS foi desenvolvida em 2006 pelo fundador e coordenador do laboratório ThoMson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Unicamp, o professor Marcos N. Eberlin, e tem-se mostrado eficaz na química forense para análise de drogas de abuso, documentos falsos, perfumes, bebidas, entre outros..

Descritores: Ionização por eletrospray, espectrometria de massas, EASI, química forense.

IMPORTANCE OF AMBIENTE PRESSURE IONIZATION METHODS EVOLUTION IN MASS SPECTROMETRY IN FORENSIC ANALYSIS

Abstract

The methods derived from ambient pressure ionization (API) have been a progress in analytical chemistry. The electrospray ionization (ESI) and sonic-spray ionization (SSI) techniques have changed the way of mass spectrometry (MS). One of ionization methods argued in this paper, the Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (EASI) was derived from SSI. The EASI-MS technique was developed in 2006 by Mass Spectrometry ThoMson Unicamp's Chemistry Institute lab founder and coordinator Professor Marcos Eberlin N. and it has been shown effective in forensic chemistry for drug of abuse, counterfeit documents, perfume, alcoholic drink and others.

Keywords : Electrospray ionization, mass spectrometry, EASI, forensic chemistry.

INTRODUÇÃO

A química forense tem ganhado destaque no ambiente da criminalística, visto que novos métodos vêm sendo implementados, embora haja um pequeno número de publicações de artigos nessa área em comparação à química analítica em geral (ROMÃO et al., 2011). Buscam-se novos métodos analíticos que sejam reprodutivos, rápidos e não destrutivos. Isso é importante, já que se pode manter um vestígio praticamente intacto e também proceder a celeridade da análise, reduzindo o tempo de cada perícia.

Até o ano de 2000, as publicações relacionadas a métodos analíticos forenses estavam relacionadas à espectroscopia molecular por infravermelho, Raman, fluorescência molecular e também espectroscopia de separação como cromatografia e eletroforese. Após a invenção de novos métodos aplicados à espectrometria de massas, foram publicados mais de cem artigos a partir de 2005 (ROMÃO et al., 2011).

Apesar da aparição tardia de publicações na área, a espectrometria de massas existe desde início dos anos 1900, criada por J. J. Thomson (GROSS et al., 2012). Foram criados métodos revolucionários que mudaram as perspectivas da análise pelo espectrômetro de massas. Entre esses métodos, pode-se citar a Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI), divulgada pela primeira vez em 1985 por Hillenkamp e colaboradores, e também a inovadora Electrospray Ionization (ESI), de J. B. Fenn (GROSS et al., 2012), um método de ionização que rendeu o prêmio Nobel de química de 2002 ao químico americano (CORREA et al., 2016).

Os novos métodos aplicados à espectrometria de massas representaram um verdadeiro avanço nessa área, pois apenas condições físicas à pressão atmosférica (condições ambientes) eram requeridas. Um grande marco para esses novos métodos foi o advento da ionização à pressão ambiente (API) que tem aberto portas para análises em matrizes complexas utilizando pouco ou nenhum preparo da amostra (CHEN et al., 2009).

Os métodos derivados do ESI variam de acordo com as propriedades físico-químicas do analito. Pode-se destacar as técnicas Desorption Electrospray Ionization (DESI) e Electrospray-assisted laser desorption Ionization (ELDI). Todos esses métodos são técnicas de ionização por dessorção, e possuem como vantagem o fato de poderem atuar em amostras não gasosas, não voláteis e estáveis termicamente. Por isso, o método de dessorção dispensa volatilização e posterior ionização do analito, sendo esta ionização realizada por meio de energia de diversas formas como campo elétrico elevado (ESI) e feixe de laser (MALDI). Como esta ionização no método de dessorção é realizada diretamente na amostra, os espectros podem ser simples, consistindo em apenas um pico do íon molecular ou íon molecular protonado (SKOOG, 2007).

Porém, um outro método ainda mais inovador e prático na química analítica surgiu e foi publicado em 1994 por Atsumu Hirabayashi enquanto estudava algumas proteínas, o Sonic Spray Ionization (SSI) (HIRABAYASHI et al., 1994). Esta técnica inovadora foi desenvolvida por acaso a partir dos métodos termospray ionization (TSI) e o já citado ESI. O diferencial do SSI é que ele não utiliza o aquecimento do TSI e nem a alta voltagem do ESI (HIRABAYASHI et al., 1994).

O foco deste trabalho consiste no estudo da técnica que foi derivada da SSI-MS, a EASI-MS (Easy Ambient Sonic-Spray Ionization- Mass Spectrometry). A EASI-MS pode ser considerada uma técnica revolucionária por sua elevada praticidade ao permitir análise em ambiente aberto em um laboratório e por eliminar a necessidade de preparações extensivas da amostra. Por ser um método menos agressivo à amostra, isto é, submetido a condições menos drásticas de pressão e temperaturas, por exemplo, e por permitir a obtenção de íons intactos ou pouco dissociados, a técnica EASI-MS é perfeita para amostras frágeis e misturas complexas (ALBERICI et al., 2010).

METODOLOGIA

Este é um trabalho de revisão bibliográfica baseado em artigos científicos encontrados nas bases de dados PubMed, Scielo e Google acadêmico, além de livros, dissertações e teses em bibliotecas das universidades brasileiras e sites de pesquisa acadêmica. Foi uma pesquisa qualitativa visando os conceitos e diversos tipos de análises dos métodos analíticos em questão.

RESULTADOS

Na pesquisa inicial foram encontrados 34 artigos e 5 livros. Foram escolhidos primariamente 30 artigos e 5 livros e destes, 22 artigos e 4 livros foram selecionados, pois continham os conteúdos de interesse desta revisão e foram incluídos no estudo.

DISCUSSÃO

Espectrometria de massas

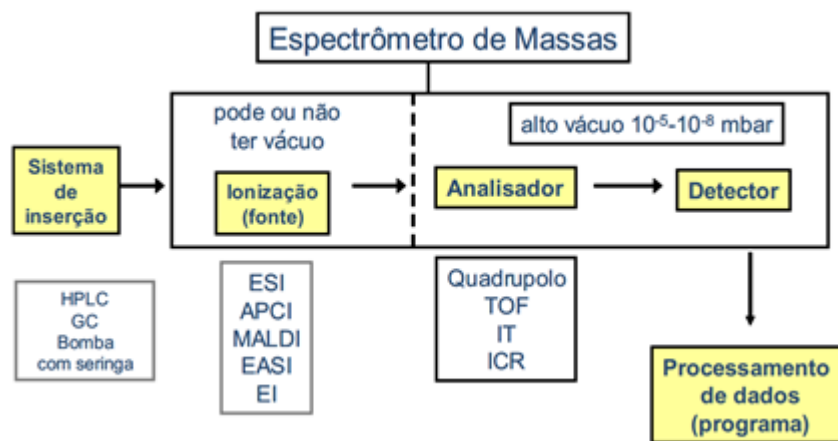
A espectrometria de massa é um método bastante versátil e pode ser utilizada para quase todas as espécies químicas da tabela periódica (SKOOG, 2007). É uma ferramenta indispensável para a bioquímica, química, farmácia e medicina. Essa técnica é essencial para a elucidação de estruturas na ciência forense, controle de qualidade de drogas e polímeros (GROSS, 2004).

A espectrometria de massas consiste basicamente em quatro etapas, conforme observado na Figura 1. Na primeira etapa, a amostra é submetida à atomização, posteriormente a amostra é submetida à ionização por uma fonte que pode ou não estar

em pressão atmosférica; as outras duas, que necessariamente estão sob uma alta pressão negativa, são o analisador e o detector (SKOOG, 2007).

Existem basicamente 6 métodos de ionização mais conhecidos: ionização por impacto eletrônico (EI), ionização química (CI), bombardeamento por átomos rápidos (FAB), ionização por desorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização por eletrospray (ESI) (DINIZ, 2011).

Figura 1- Desenho esquemático de um espectrômetro de massas



Fonte: Romão, 2010

A etapa de introdução da amostra para atomização/ionização é o grande problema da espectroscopia atômica, como cita Skoog (2007) em seu livro de Análise Instrumental, o “calcanhar de Aquiles” da espectroscopia. Quanto mais exato, preciso e amplo o limite de detecção do método de atomização/ionização da amostra, melhor será o seu desempenho e aceitação na espectrometria de massas. Outro fator imprescindível é a facilidade com que a amostra pode ser introduzida no espectrômetro para análise. Isso depende do estado físico e químico tanto do analito quanto da matriz da amostra (SKOOG, 2007).

Durante muito tempo, as análises feitas por espectrometria de massas tinham como analitos amostras voláteis ou que pudessem ser volatilizadas, um processo que é

conhecido na química como derivatização (FRIAS et al., 2013; GROSS et al., 2012). Com o avanço dos estudos analíticos, novos métodos que permitiam a análise da amostra sem manipulações, isto é, aquecimento, diluições excessivas ou derivatizações foram sendo recepcionados na química forense (GROSS et al. 2012; LORDEIRO, 2011).

Um método de muita importância na espectrometria atômica é o API (*Atmospheric Pressure Ionization*), pois os processos de ionização deixaram de exigir condições drásticas de pressão. Isto foi, com certeza, um grande avanço, pois algumas propriedades de estado podem influenciar na análise e com isso ter-se um método pouco robusto (COVEY; THOMSON; SCHNEIDER, 2009).

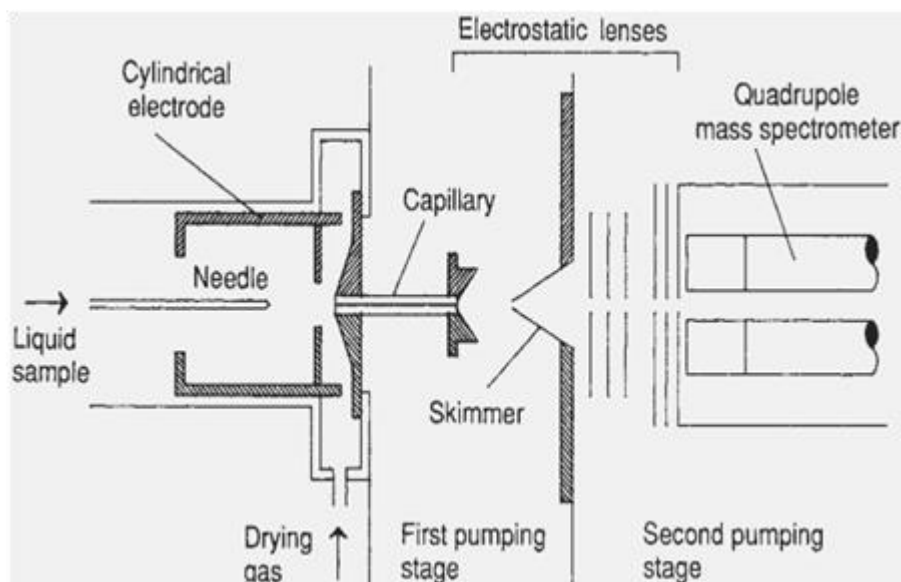
A API foi a primeira técnica a fazer uma interface direta da solução em análise com o espectrômetro de massa (GROSS, 2004). Ela teve seus primeiros indícios divulgados na literatura em 1917, mas existem referências que tenha havido testes bem antes, em 1745 (BRUINS; COVEY; HENION, 1987). A API inspirou outras técnicas que hoje utilizam o mesmo modelo de ionização à pressão atmosférica: ESI, SSI e EASI.

Ionização por Eletrospray (ESI)

A ESI é um “método de ionização suave e que realiza a transferência dos íons em solução para a fase gasosa” (AMAD et al., 2000), sendo um exemplo de uma técnica que utiliza a API.

A técnica de ionização por eletrospray pode ser usada em moléculas grandes, termoestáveis e moléculas carregadas como proteínas e ácidos nucleicos (AMAD et al., 2000). O solvente do analito é volátil e a amostra é pouco concentrada. Isso ajuda na transferência de fase do analito em solução à pressão atmosférica para a fase iônica gasosa em direção ao analisador de massa. A figura 2 apresenta um esquema geral da ionização por eletrospray.

Figura 2 - Esquema da fonte de ionização por eletrospray



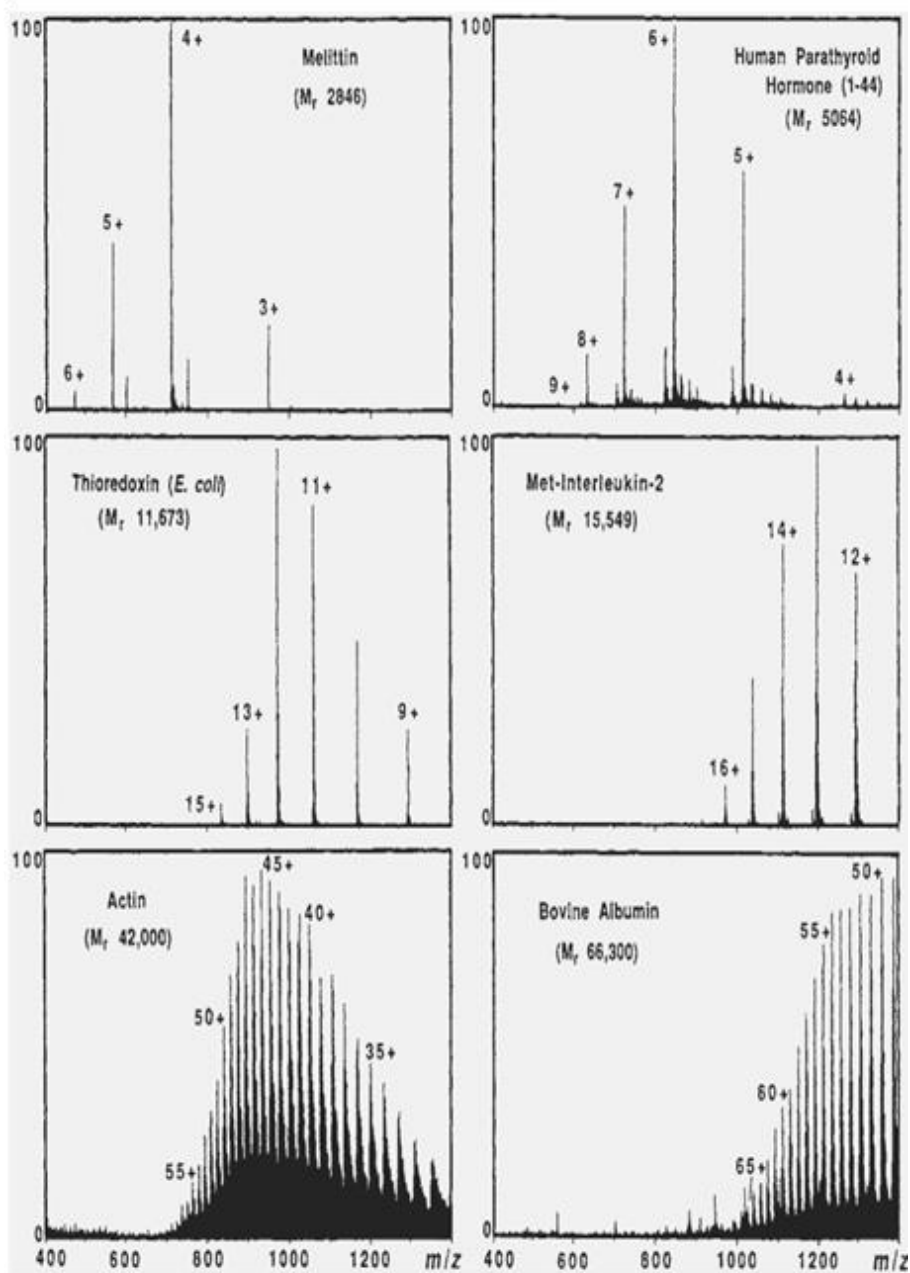
Fonte: Skoog, 2007

O padrão do espectro de massa da ESI é mostrado na figura 3 e mostra que ela é uma técnica indicada para grandes massas moleculares (GROSS, 2004). Por conta de todos esses fatores é que os métodos de ionização por eletrospray representam um avanço na análise por espectrometria de massas. Esses métodos são menos agressivos à amostra, podem ionizá-la diretamente da matriz e reduzem, conseqüentemente, o tempo de análise.

Para se obter a ionização pelo ESI, o líquido da solução passa por um tubo capilar a um fluxo lento (1-10 μ L/min.) em direção a um fluxo de gás inerte (geralmente nitrogênio) (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). O gás inerte age como uma fonte de calor para a vaporização do solvente (GROSS, 2004). Uma voltagem é aplicada ao longo do tubo capilar por meio de um cone (Figura 4) que recobre esse capilar (SKOOG, 2007). Isso faz com que a amostra na solução fique altamente carregada na ponta do capilar por conta do campo elétrico criado, fazendo com que se forme um cone, chamado de cone de Taylor (DOMIN; CODY, 2015). As gotas então saem do capilar carregadas e com a secagem do solvente há um aumento de densidade de cargas a ponto de haver uma alta repulsão das partículas

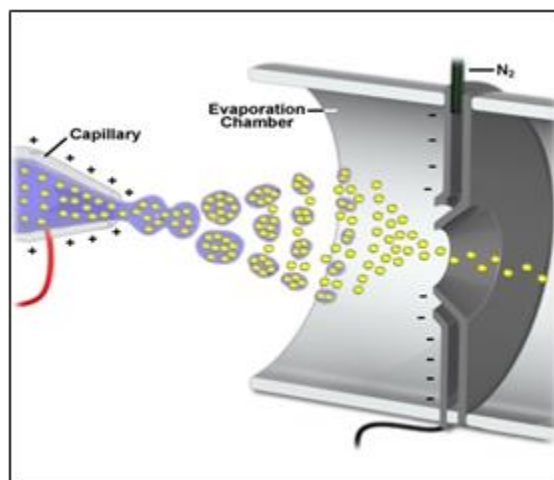
carregadas. A essa grande repulsão, dá-se o nome de explosão coulômbica (ROMÃO et al., 2011).

Figura 3 - Padrão do espectro de massa da ionização por eletrospray



Fonte: GROSS, 2004

Figura 4 - Cone gerador do campo elétrico



Fonte: nationalmaglab.org

Sonic Spray Ionization (SSI)

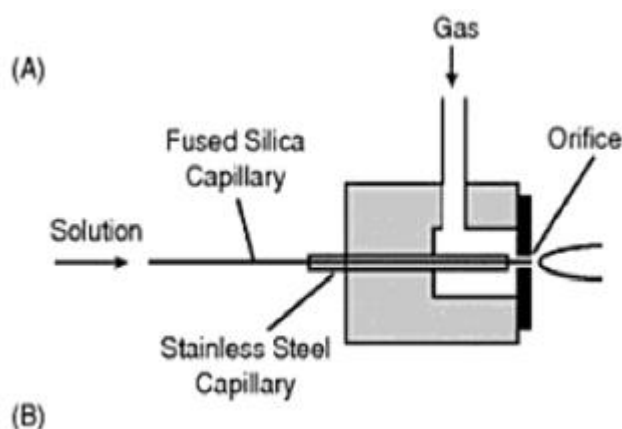
Uma técnica que introduziu um novo conceito na espectrometria de massas foi a ionização por spray sônico, a SSI. Hirabayashi e colaboradores, em um artigo publicado em 1994, na *Analytical Chemistry*, mostraram que uma nova técnica revolucionaria o mundo da espectrometria de massas (ROMÃO et al., 2011; HIRABAYASHI et al., 1994).

Pela primeira vez na história da química analítica, uma fonte de ionização que não necessitava de voltagem, radiação, aquecimento ou descarga elétrica, mas apenas um cilindro com gás comprimido e um spray supersônico era necessário para gerar uma fonte de íons (DOMIN; CODY, 2015).

A SSI aproxima-se muito em semelhança com a ESI, porém, sem a aplicação de qualquer campo elétrico (BJÖRKMAN et al., 2002). O processo de ionização da SSI, embora ainda não seja totalmente esclarecido (CHEN et al., 2013), pode ser explicado pela formação não balanceada de cargas que se formam na superfície do solvente que passa pelo capilar e que é atingido pelo nitrogênio supersônico (GROSS et al., 2012; ROMÃO et al., 2011).

Basicamente, para que se inicie o processo de ionização na SSI, uma solução é ejetada por um capilar de sílica fundida em direção a outro capilar de aço inoxidável. O gás nitrogênio passa coaxialmente à sílica fundida por um orifício e nebuliza a solução a uma alta velocidade (velocidade supersônica). O spray que surge já na ponta do capilar contém as gotículas carregadas do gás formado, que ao secarem, irão para o espectrômetro de massa, conforme pode ser visto na Figura 5 (GROSS et al., 2012).

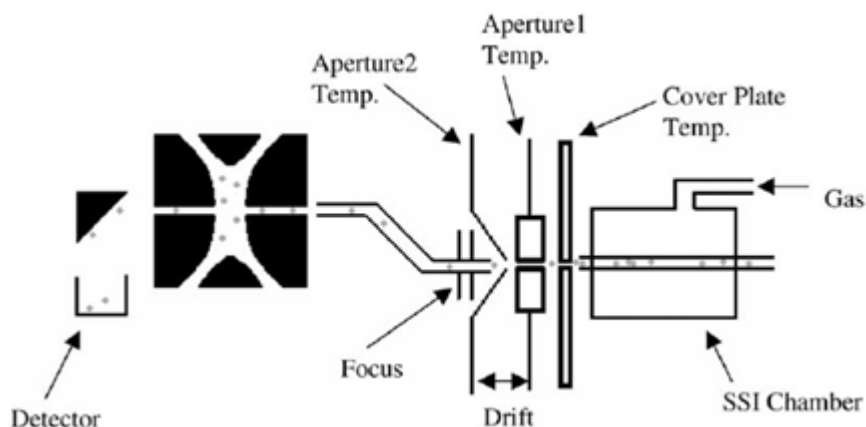
Figura 5 - Modelo de ionização por spray sônico (SSI)



Fonte: GROSS et al., 2012

Alguns artigos mostram que certos parâmetros são otimizados na análise feita por SSI, embora outros ainda possuem melhores resultados na ESI. Várias características podem modificar a otimização da análise na interface SSI/ESI como polaridade das moléculas da amostra, fluxo da solução ionizante, infusão direta ou indireta, isto é, utilizando-se uma coluna de separação, pressão do gás nebulizador, tensão aplicada no capilar e temperatura aplicada na fase de ionização. A figura 6, retirada do artigo de Björkman e colaboradores (2002), mostra alguns parâmetros modificados pelos autores no estudo da análise de um fármaco (tolteroidina) e seus metabólitos, além de alguns esteroides.

Figura 6 - Desenho esquemático de um spray sônico utilizado no estudo comparativo de ionização SSI/ESI



Fonte: BJÖRKMAN et al., 2002

Apesar da SSI ser um grande avanço na espectrometria de massas, há algumas desvantagens em relação à ESI, a depender do parâmetro estudado, como relatado anteriormente. No trabalho de Björkman e colaboradores (2002), já citado, os fatores mostrados na figura 6 mostraram que, para o SSI, o melhor resultado foi obtido nas seguintes condições: Ap1 (Aperture 1 Temp., 110°C; CoP (Cover Plate Temp., 284°C; Focus, 35V; Drift, 80 V; e N₂ (pressão do gás nitrogênio), 320kPa. Eles também observaram que no caso do estudo da tolteroidina e seus metabólitos, a infusão direta da amostra não mostrou diferença entre SSI e ESI. Porém, utilizando-se uma separação cromatográfica, a repetibilidade da análise diminuiu em ambos os casos. O alargamento do pico também foi observado no SSI, provavelmente por conta de que, nesse modelo, a alta velocidade do fluxo de gás pode causar uma turbulência ao redor do spray e com isso causar o alargamento do pico. Porém, nas mesmas condições de temperatura e pressão anteriores, a simetria do pico não é afetada.

A eficiência da ionização por SSI também é mostrada mais eficiente nesse trabalho quando se trata de um analito mais polar: Björkman et al. (2002) também estudaram os diferentes metabólitos da tolteroidina. Quando utilizaram um aumento do gradiente da acetonitrila para deixar a fase móvel mais polar na análise de mudanças estruturais da tolteroidina, obtendo-se a tolteroidina n-desalquilada, a eficiência da ESI para separar as duas moléculas foi melhor. Já o fluxo da fase móvel não produz necessariamente um

melhor resultado se for aumentado a pressão do gás nitrogênio, ou seja, aumentando-se o fluxo junto com a vazão do gás, não se aumenta a eficiência da análise.

Outro estudo mais antigo (HIRABAYASHI et al., 1997) mostra que o método ESI foi utilizado em proteínas para produzir íons multicarregados. A ionização por ESI mostrou-se instável para voltagens aplicadas em soluções com condutividades diferentes de 10^{-1} a 10^{-7} S/m e fluxo da solução acima de 10 μ l/ min, influenciando na reprodutibilidade dos resultados. Um novo método de ionização por eletrospray foi então utilizado, o nanoelectrospray, com capilar bem mais fino e conseqüentemente com fluxo de 50 nl/min.. Porém, a ionização apenas apresentava íons unicamente carregados, o que não mostra necessariamente uma identidade da amostra, já que não houve quebra das moléculas do analito. A solução para esses problemas foi uma fonte SSI, que não aplicava tensão elétrica no capilar. Na SSI, a reprodutibilidade do íon formado foi muito alta.

De SSI a EASI

A técnica EASI-MS foi desenvolvida em 2006 pelo fundador e coordenador do laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Unicamp, o professor Marcos N. Eberlin, sendo que a Polícia Federal do Brasil já fez uso dessa técnica (PIVETTA, 2010). Esta técnica consiste em uma espectroscopia de ionização em que a amostra não é submetida a qualquer preparo antes de ser analisada. Possui ampla aplicação e já foi testada em diferentes tipos de analitos e superfícies: tintas de caneta em superfícies de papel, perfumes, documentos de veículos, MDMA (metilenodioximetanfetamina, o Ecstasy), metanfetaminas, MDEA (3,4-metilenodioxietilmetanfetamina) e MDA (3,4-metilenodioximetanfetamina) (ROMÃO, 2010).

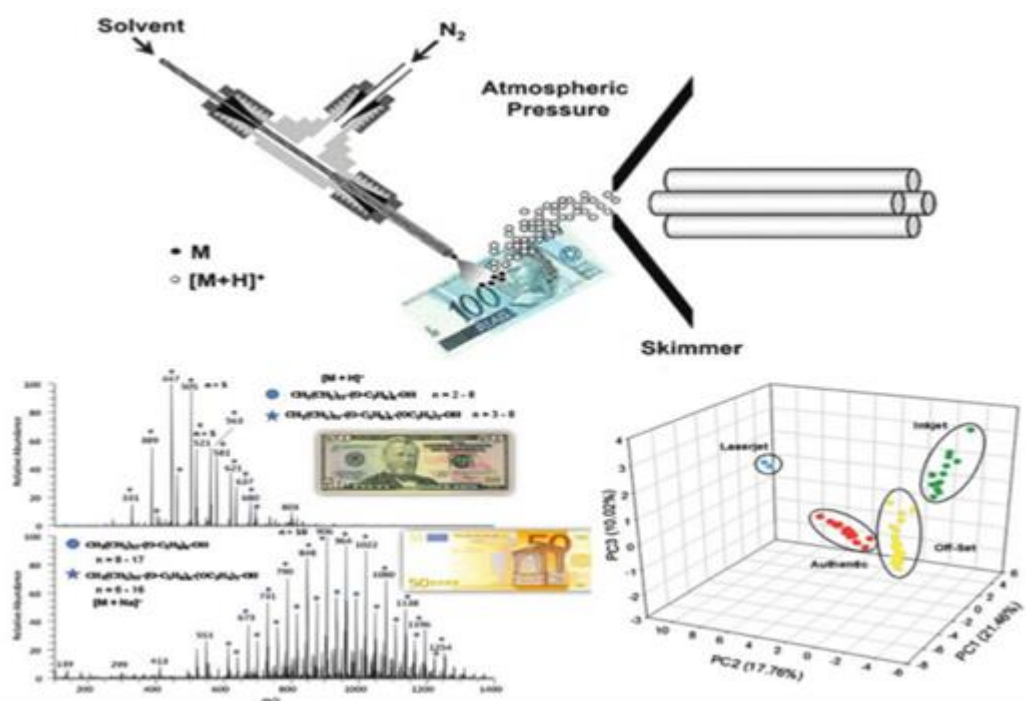
O modelo de ionização EASI foi baseado na SSI. Utilizando-se um solvente contendo metanol acidificado que passa por um spray supersônico, a amostra é

bombardeada pelos íons que formaram no spray, causando uma dessorção e ionização do analito na superfície, como é observado na Figura 7 (BATAGLIAN et al., 2015).

O Professor Eberlin iniciou os seus trabalhos com o método EASI analisando comprimidos através de suas superfícies. Eberlin comparou o uso do EASI com o método mais usual na química analítica que é o DESI-MS (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry*). Ele utilizou o spray supersônico para análise por dessorção e ionização dos comprimidos de diazepam, atenolol, tamoxifeno, propranolol, ciclobenzaprina, rosuvastatina cálcica, amlodipina, memantina e losartana empregando o analisador de aprisionamento de íons, *Ion Trap* (IT). Em seguida, Eberlin comparou sua análise pelo EASI e pelo DESI. O resultado mostrou que o EASI teve maior sinal analítico e conseqüentemente maior eficiência que o DESI. Experimentos realizados na perícia de perfumes mostram a eficiência do EASI-MS. Como há uma abundância de íons neste método, não por fragmentação, mas por diferenças na razão m/z , ele pode ser acoplado a um novo espectrômetro de massa (EASI/MS/MS) para fornecer um novo padrão espectroscópico pela fragmentação dos íons mais importantes (HADDAD et al., 2008). Isso pode representar uma forma de se distinguir uma amostra de produtos falsificados muito semelhantes aos originais, pois como o objetivo principal da espectrometria de massa é individualizar uma molécula pelo seu padrão de ionização, o acoplamento MS/MS, criará um padrão que distinguirá uma molécula com íon molecular com massa muito semelhante da outra.

Um desenho esquemático (figura 7) da análise de tintas utilizadas em cédulas ajuda a compreender melhor como a análise é feita por EASI.

Figura 7 - Análise de tinta em cédulas por fonte de ionização EASI-MS



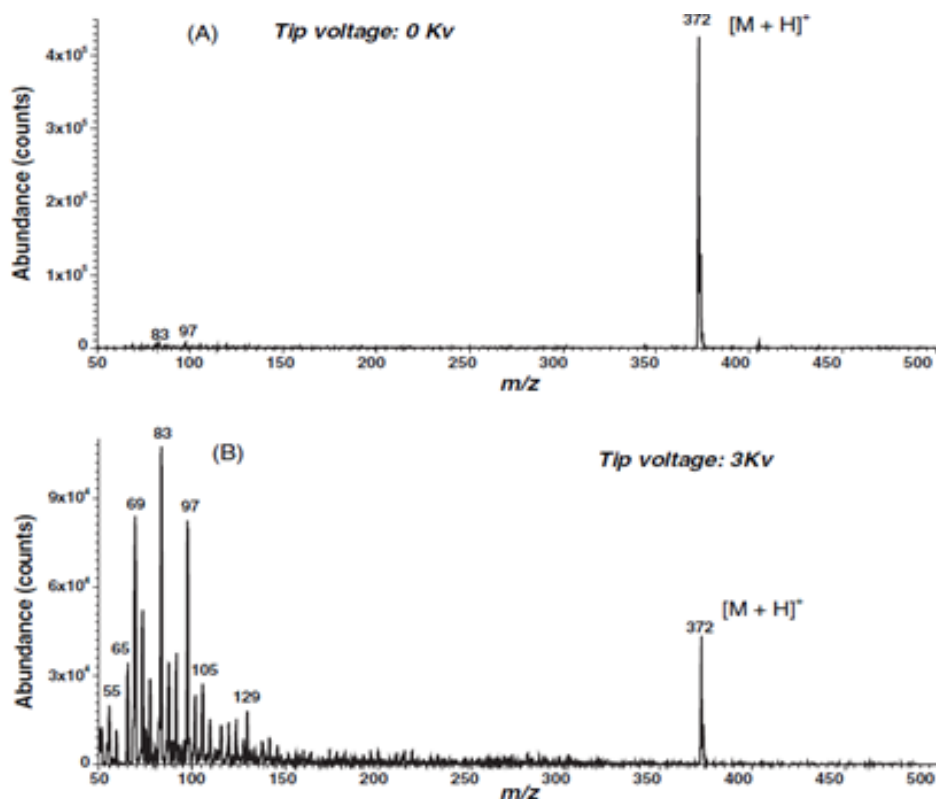
Fonte: DOMIN; CODY, 2015

A análise por EASI apresenta diversas vantagens (DOMIN; CODY, 2015):

- (a) A nebulização é feita apenas com nitrogênio ou até mesmo com ar ambiente.
- (b) A mudança de polaridade na ionização da amostra é realizada sem aplicação de altas voltagens com alternância de polaridades.
- (c) Permite uma melhora do sinal/ruído, já que há baixa concentração de carga nas gotículas geradas pelo eletrospray.
- (d) Não há degradação térmica.
- (e) EASI é muito útil quantitativamente uma vez que é uma técnica de ionização muito suave e por isso deixa a amostra mais intacta.

A ionização por EASI era chamada de DeSSI no início dos trabalhos de Eberlin (HARRIS et al., 2008). Já no trabalho de Haddad e colaboradores (2006), foi feita comparação entre as técnicas DeSSI, derivada da SSI, e DESI, derivada da ESI. No estudo, a aplicação de voltagem no capilar para gerar a atomização e ionização é necessária na DESI, mas não na DeSSI. A base da ionização na DeSSI, assim como na SSI, é a velocidade supersônica do spray e não a tensão aplicada ao longo do capilar. O resultado dessa diferença, é que uma maior abundância do íon molecular é observada em relação à própria ionização do solvente, no caso uma solução 1:1 de 0,01% de ácido fórmico em água/metanol. Neste estudo foram analisadas oito drogas (medicamentos) diferentes na apresentação de comprimidos. A figura 8 mostra o espectro nas duas diferentes técnicas do medicamento Nolvadex (citrato de tamoxifeno). Nota-se que o pico produzido em m/z 372 ($M + H^+$) é mais abundante em DeSSI que em DESI. Além disso, há vários picos demonstrando a fragmentação e ionização do solvente nebulizador: m/z 55 [$3H_2O + H^+$], m/z 65 [$2CH_3OH + H^+$], m/z 69 [$CH_3OH + 2H_2O + H^+$], m/z 83 [$2CH_3OH + H_2O + H^+$], m/z 97 [$3CH_3OH + H^+$], m/z 105 [$CH_3OH + 4H_2O + H^+$] e m/z 129 [$4CH_3OH + H^+$].

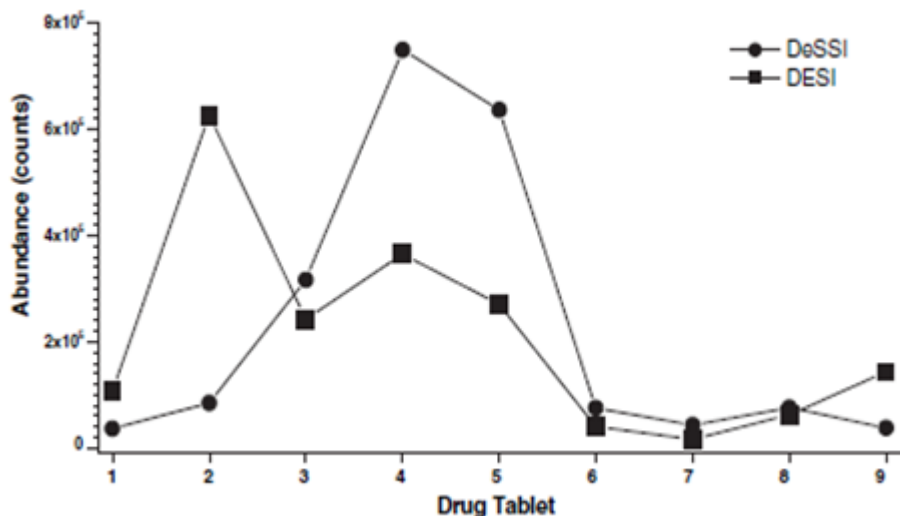
Figura 8 - Espectro de massas da ionização do medicamento Nolvadex no modo positivo com DeSSI (A) e DESI (B)



Fonte: HADDAD et al., 2006

Apesar da melhor resolução do pico íon molecular e da abundância tendendo a zero do solvente, a resposta não é a mesma para todas as drogas estudadas por Haddad e colaboradores (figura 9). A resposta da intensidade do pico, com as condições de pressão do gás nitrogênio e voltagem aplicada nos métodos DeSSI e DESI, depende da natureza e das propriedades físico-químicas das drogas (HADDAD et al., 2006). Porém, eles citam que uma similaridade de performance foi observada tanto na DeSSI quanto na DESI. A ionização por spray supersônico deixa o espectro mais resolvido para o íon molecular em estudo e possui uma propriedade de “facilitar a identificação por espectrometria de massa de componentes de baixa massa molar de comprimidos e contaminantes ou ambos” (HADDAD et al., 2006).

Figura 9 - Abundâncias das drogas com os métodos DeSSI e DESI. Os medicamentos foram numerados de 1 a 9



Fonte: HADDAD et al., 2006

Dois trabalhos interessantes foram publicados em 2007 e 2010 com estudos sobre a ionização por DESI e DESI/EASI, respectivamente. O primeiro foi um artigo de Ifa et al (2007). Este artigo foi baseado em experimentos realizados na perícia de tintas de dez diferentes tipos de canetas (classificadas de A a J, com 5 diferentes corantes ou pigmentos) em três diferentes marcas de papel (ver tabela 1). Os principais experimentos deste artigo que interessam à evolução da ionização ambiente foram a estabilidade do sinal do pico gerado pelo DESI e a geração de imagem por DESI.

Para o primeiro experimento, os pesquisadores fizeram quatro linhas com a caneta F escritas à mão. A seguir, um mesmo ponto de uma linha foi atingido 100 vezes pelo DESI e o sinal de ionização foi monitorado no cromatograma (eles chamaram de cronograma total de íon – TIC, em inglês). Um experimento semelhante foi feito, porém atingindo a marca de tinta no papel durante 30 minutos e monitorando também a estabilidade do sinal de DESI. O segundo experimento, talvez o mais interessante, consistiu em escrever à mão, com a caneta C, o número 1432. Após aguardar 2 horas para a secagem da tinta, uma modificação dos números 43 foi feita com a caneta E, transformando esse número

para 98, conforme se vê na figura 9. Posteriormente, esta área de modificação foi mapeada pelo DESI.

No caso do primeiro experimento, IFA e colaboradores (2007) não encontraram um sinal significativo do DESI quando uma pequena área foi bombardeada pelo spray. Ao contrário disso e provavelmente indesejado efeito foi o aparecimento do polímero usado como dispersante no pigmento do papel fotográfico utilizado, o polietilenoglicol (PEG 300). Outro efeito analisado foi a diminuição do sinal do pico na segunda parte do primeiro experimento em que os pigmentos são bombardeados por trinta minutos. Ao final desse tempo, porém, o sinal é estabilizado. Um ponto importante na análise do DESI com o método EASI foi a velocidade do fluxo do solvente no spray. Uma vazão de 1-3 $\mu\text{L}/\text{min}$. foi utilizada para a otimização da análise por DESI nesse experimento. Comparando-se com o EASI, a velocidade desse fluxo chega a 20 mL/min . nas análises (EBERLIN et al., 2010).

Tabela 1 - Marcas de canetas (classificadas de A a J) e respectivos pigmentos (AG, AV3, BB26, BB7 e SB2)

Pen	AG	BV3	BB26	BB7	SB2
A (Pilot Easy Touch)		✓		✓	
B (Bic Crystal)		✓	✓		
C (Bic Round Stic)		✓	✓		
D (Mainstays Ballpoint Pen)		✓	✓		
E (Zebra F301 Steel)	✓		✓		✓
F (Paper Mate Write Bros)		✓		✓	
G (Pentel RSVP)	✓	✓			
H (Paper Mate Eraser Mate)	✓			✓	
I (IB Wisconsin The Elite)		✓	✓	✓	
J (Staedtler Stick)		✓	✓		

^a Arylguanidines (AG), m/z 212, 240; Basic Violet 3 (BV3), m/z 372; Basic Blue 26 (BB26), m/z 470; Basic Blue 7 (BB7), m/z 478; Solvent Blue 2 (SB2), m/z 484.

Fonte: IFA et al., 2007

A ionização por DESI, porém, mostrou-se muito eficiente quando se tratou de formação de imagens. No segundo experimento do trabalho de IFA et al. (2007), os pesquisadores conseguiram separar as imagens formadas pelas posições no gráfico em 2 D dos picos do espectro formado por DESI. Há evidente alteração na imagem, mostrando que é plenamente possível fazer uma análise química espectroscópica em falsificação de documentos.

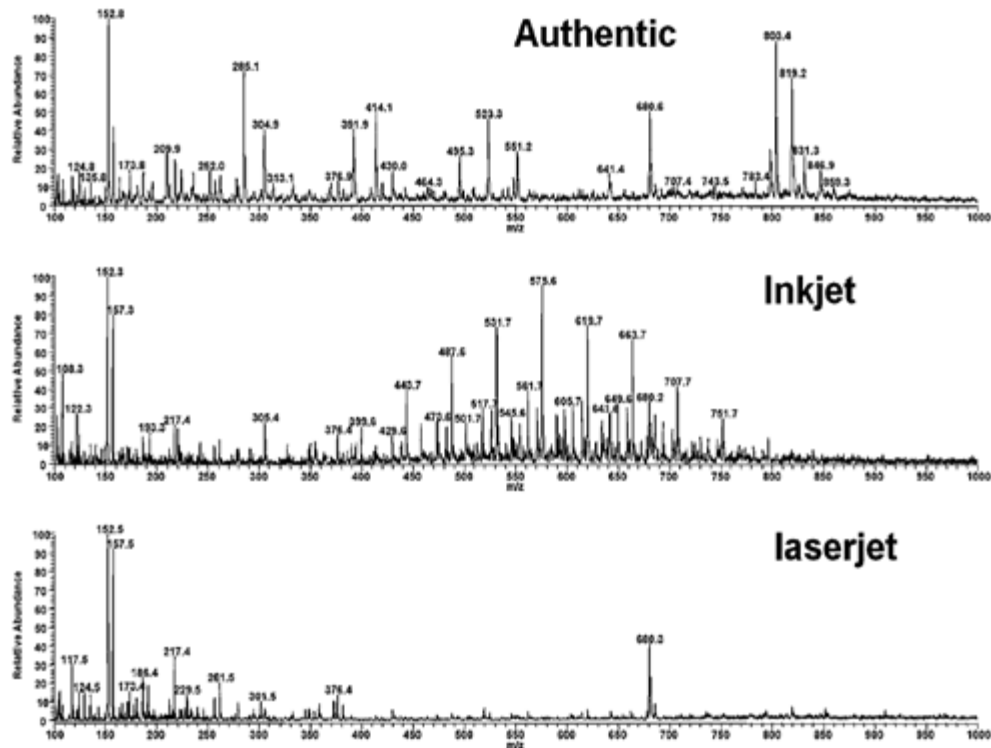
Porém, os pesquisadores encontraram uma limitação na formação de imagens em relação ao tempo (levaram até 3 horas e 09 minutos para geração de uma imagem de melhor resolução) (IFA et al., 2007). Outra limitação foi a corrida cromatográfica: como existem diferentes componentes nos pigmentos, uns mais hidrofílicos, outros mais hidrofóbicos, houve necessidade de várias corridas cromatográficas.

Outro trabalho baseado no método EASI-MS foi a análise de tintas utilizadas para impressão de cédulas de real, dólar e euro, tanto originais como falsificadas. Na cédula brasileira, o procedimento consistiu na análise de toda a superfície da nota, onde a maior parte dos picos na região mais baixa para valores de m/z no espectro era de contaminantes (EBERLIN et al., 2010). Um ponto importante deste trabalho é que a ionização feita por EASI não demonstrou picos referentes ao próprio papel da qual a nota é feita, como foi apresentado na análise do artigo de IFA et al (2007). Na análise também aparecem vários picos que não são característicos da identidade da nota verdadeira. São eles: o polímero plastificante da nota, os triglicérides deixados pela gordura das mãos, os contaminantes dihexadecil-metil-amônio, um sal de amina quaternário comumente encontrado em produtos de higiene pessoal, uma amina alifática e traços devido a detergente de laboratório. Para notas falsificadas, também são comumente encontrados picos referente à cocaína (m/z 304).

Os espectros obtidos por Eberlin e colaboradores (2010) proporcionaram a possibilidade de diagnosticar com confiabilidade as notas originais e falsificadas. Nas notas não originais, os principais componentes da tinta utilizada na falsificação na impressora

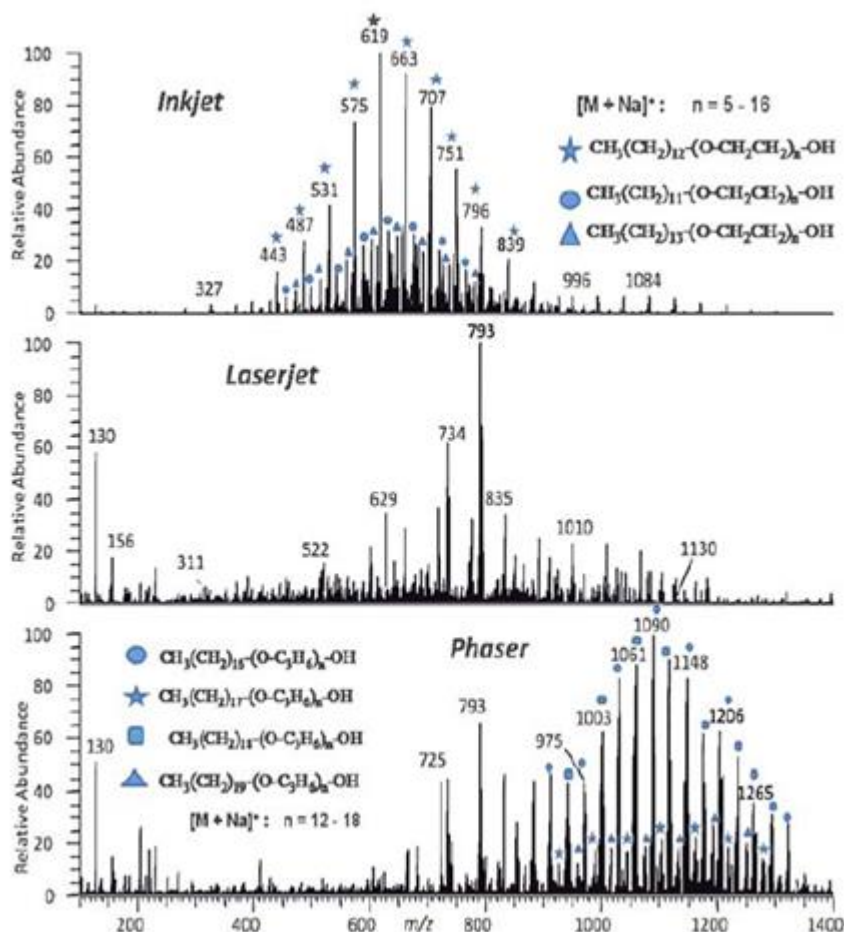
inkjet, os álcoois etoxilados, foram identificados em vários picos diferenciados por 44 unidades de m/z , tanto no EASI-MS, quanto no DESI-MS (figuras 10 e 11).

Figura 10 - Espectro por DESI-MS de nota autêntica de real e de duas notas falsificadas produzidas por impressoras inkjet e laserjet



Fonte: EBERLIN et al., 2010

Figura 11 - Espectro por EASI-MS de notas falsificadas de real mostrando os padrões de ionização dos álcoois componentes das tintas



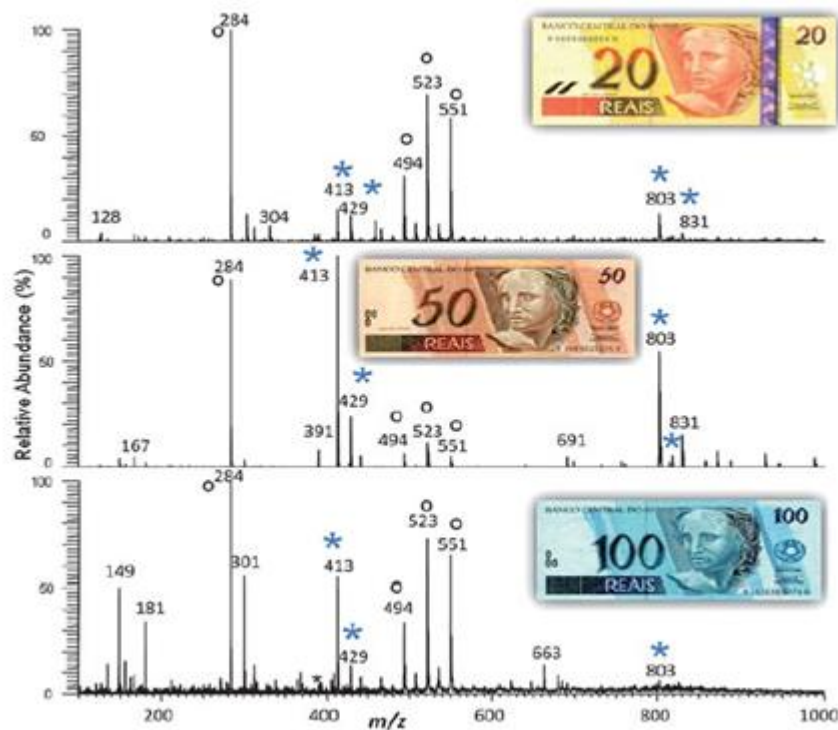
Fonte: EBERLIN et al., 2010

Os picos encontrados como sendo característicos da cédula original de real, foram bem separados por EASI-MS (figura 12). Os experimentos realizados neste trabalho também apresentaram os mesmos resultados, tanto no EASI quanto no DESI, mostrando os principais picos característicos das cédulas originais de real: (391, 413, 429, 803 e 819) m/z.

Ainda no trabalho de Eberlin e colaboradores (2010), as cédulas de dólar e euro foram analisadas pelos mesmos métodos do real. O padrão encontrado foi bem diferente e característico para cada moeda. Os picos característicos das notas de real estudadas, isto é, m/z 391, 413, 429, 803 e 819, são praticamente zero em abundância. Para o dólar,

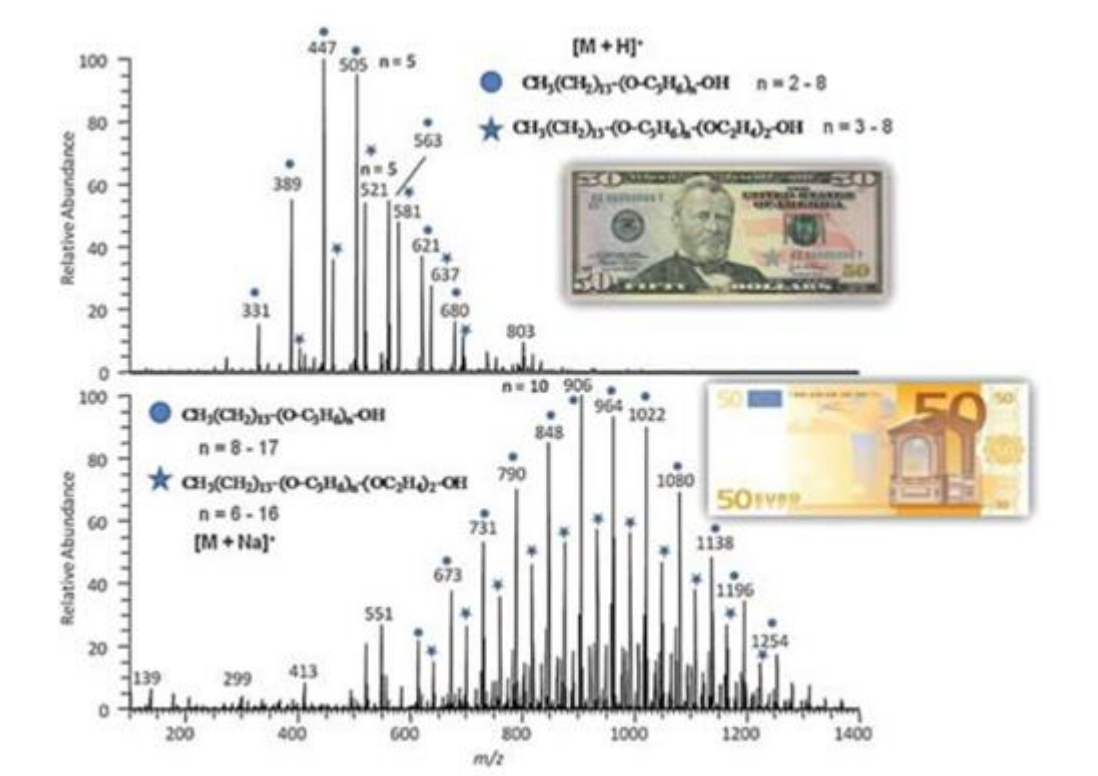
os picos concentram-se próximo de m/z 500 e para o euro, próximo de m/z 900 (figura 13).

Figura 12 - Espectro de notas originais de real utilizando-se EASI-MS



Fonte: EBERLIN et al., 2010

Figura 13 - Padrões característicos de EASI-MS do dólar e do euro



Fonte: EBERLIN et al., 2010

Em relação a todas as publicações envolvendo os métodos de ionização por EASI ou DESI, ou mesmo seus precursores, SSI e ESI, respectivamente, os autores concluíram que essas técnicas são robustas, diretas, não destrutivas e quase que instantâneas em alguns casos, o que significa um rol de vantagens para a ciência forense.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectrometria de massas permitiu uma revolução na química analítica, na bioquímica, na medicina e na farmacologia permitindo a análise de diversas moléculas de variados tamanhos, proteínas, anfetaminas, alcaloides, etc. A evolução dos métodos de

ionização foi de extrema importância para a espectrometria de massa atômica, ampliando o rol de análises do método e deixando-o mais robusto, simples e eficiente.

A ionização à pressão ambiente permitiu que vários métodos fossem desenvolvidos por meio dela e, assim, deixaram a química analítica bem mais simples e eficiente. O grande problema da espectrometria de massas, a atomização e ionização das moléculas, segundo diz o próprio autor de um dos livros mais lidos de análise instrumental, Douglas A. Skoog, o calcanhar de Aquiles da química analítica, foi ou ficou muito próximo de ser resolvido.

Os trabalhos focados na evolução das análises em química forense foram diversos na pesquisa bibliográfica (principalmente análise de autenticidade). Essas análises compreenderam perfume, bebidas alcoólicas, cédulas, drogas de abuso, medicamentos, combustíveis, pigmentos de tintas de canetas e impressoras como analitos. Os principais analitos discutidos aqui neste trabalho foram pigmentos e matérias primas utilizadas em cédulas de alguns países (tanto originais como falsificadas) e também de tintas de caneta e impressoras utilizadas em documentos. O principal método estudado foi a ionização denominada EASI, porém, a sua comparação com os outros métodos como o ESI, SSI e DESI foi inevitável, pois foi encontrada uma complementaridade entre eles.

As falsificações de documentos, cédulas, medicamentos e outros produtos tornam-se cada dia mais imperceptíveis até por imagem microscópica. O que se pode notar é que, com a evolução dos métodos analíticos, a química trouxe à ciência forense a possibilidade de não mais deixar que essas falsificações fossem tratadas como originais.

Com essas diversas técnicas de ionização à pressão ambiente foi possível ter a sensação de que as principais análises em química forense podem se tornar triviais em poucas décadas ou anos. Os testes realizados para diagnosticar a falsidade de documentos, medicamentos e cédulas são praticamente 100% exatos analiticamente.

REFERÊNCIAS

ALBERICI, Rosana M.; SIMAS, Rosineide C.; SOUZA, Vanderleia de; SÁ, Gilberto F. de; DARODA, Romeu J.; EBERLIN, Marcos N. **Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry**. *Analytica Chimica Acta*. v. 659, p. 15–22, 2010.

AMAD, M.H.; CECH, N.B.; JACKSON, G.S.; ENKE, C.G. **Importance of Gas-Phase Proton Affinities in Determining the ESI Response for Analytes and Solvents**. *J. Mass Spectrometry*. v. 35, p. 784-789, 2000.

BATAGLION, Giovana A.; SILVA Felipe M. A.; SANTOS Jandyson M.; MILENE T.; BARCIA, Helena T.; EBERLIN, Marcos N.; KOOLEN, Hector H. F. **Integrative Approach Using GC-MS and Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (EASI-MS) for Comprehensive Lipid Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa*) Oil**. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, v. 26, n.1, 2015.

BJÖRKMAN, Helena T.; HDLUND, Per-Olof; JACOBSSON, Sven P. **Sonic spray ionization interface for liquid chromatography-mass spectrometry**. *Analytica Chimica Acta*, v. 468, p. 263–274, 2002.

BRUINS, Andries P.; COVEY, Thomas R.; HENION, Jack D. **Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry**. *Analytical Chemistry*, v.59, n. 22, p. 2642–2646, 1987.

CHEN, H.; GAMEZ, G.; ZENOBI, R. **What Can We Learn from Ambient Ionization Techniques?** *Journal American Chemistry Society Mass Spectrometry*, v. 20, p. 1947-1963, 2009.

CHEN, Nelson G.; JUNG, Lee Lin; CHEN, Yi Wu; GILLING, Kent G.; OZDEMIR, A.; CHUNG, Hsuan Chen. **Novel Atmospheric Biomolecule Ionization Technologies**. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, S2:003, 2013.

CORREA, Deleon N.; SANTOS, Jandyson M.; EBERLIN, Livia S.; EBERLIN, Marcos N.; TEUNISSEN, Sebastiaan F. **Forensic Chemistry and Ambient Mass Spectrometry: A Perfect Couple Destined for a Happy Marriage?** *Analytical Chemistry*, v. 88, n. 5, p. 2515-2526, 2016.

COVEY, Thomas R.; THOMSON, Bruce A.; SCHNEIDER, Bradley B. **Atmospheric Pressure Ion Sources**. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 28, p. 870-897, 2009.

DINIZ, Maria Elisa R. **Uso da técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI) para o Estudo do Mecanismo de Reações Orgânicas e Avaliação do Perfil de Fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Belo Horizonte, 2011.

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

FRIAS, Célia F.; GRAMACHO, Sílvia A.; PINHEIRO, M. **Cromatografia gasosa-espectrometria de massas e derivatização assistida por micro-ondas na identificação de isômeros de glicose: uma prática para o ensino avançado em análise e caracterização de compostos orgânicos**. Departamento de Química, Universidade de Coimbra, 3004-535, Portugal, 2013.

GROSS, Jürgen H. **Mass Spectrometry (A text book)**. Ed. Springer: Germany, 2004.

GROSS, Michael L.; CHEN, G.; PRAMANIK, Birenda N. **Protein and Peptide Mass Spectrometry in Drug Discovery**. Wiley: Nova Jersey, 2012.

HADDAD, R.; SPARRATAN R.; EBERLIN, Marcos N. **Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 20, p. 2901–2905, 2006.

HADDAD, R. et al. **Perfume fingerprint by Easy Ambient Sonic-spray Ionization Mass Spectrometry: Nearly instantaneous Typification and Counterfeit detection**. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, v. 22, p. 3662-3666, 2008.

HARRIS, Glenn A.; NYADONG, L.; FERNANDEZ, Facundo M. **Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry**. *Analyst*, v. 133, p. 1297–1301, 2008.

HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. **Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric pressure Ionization Mass Spectrometry**. *Analytical Chemistry*, v. 66, p. 4557-4559, 1994.

HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; TAKADA, Y.; KOIZUMI, H. **Recent Progress in Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry**. *Trend in Analytical Chemistry*, v. 16, n. 1, 1997.

HOFFMANN, Edmond de; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry (Principles and Applications)**. 3. ed., 2007.

IFA, D. R.; GUMAELIUS, L. M.; EBERLIN, L. S.; MANIKE, N. E.; COOKS, R. G. **Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry**. *Analyst*, v. 132, p. 461–467, 2007.

LORDEIRO, Rogério A. **Construção de uma fonte EASI-MS (Easy Ambient Sonic-spray Ionization) para análise direta de superfícies e sua aplicação em amostras de interesse forense**. UFMG, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Belo Horizonte, 2011.

PIVETTA, Marcos. **Detetive molecular: nova técnica brasileira identifica adulterações em documentos e dinheiro falso. [Editorial]**. *Revista Pesquisa Fapesp*, ed. 177, novembro 2010.

ROMÃO, Wanderson. **Novas aplicações de espectrometria de massas em química forense**. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

ROMÃO, Wanderson et al. **Química Forense: Perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso**. *Quim. Nova*, v. 34, n. 10, p.1717-1728, 2011.

SKOOG, Douglas A. **Principles of Instrumental Analysis**. 6. ed., 2007.

AGRADECIMENTOS

À professora MSc. Carina Rau pelas contribuições ao conteúdo deste trabalho.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.