



UnB

**Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Extração de cafeína por Polímero Molecularmente
Impresso para *clean-up* de amostras de cationas
sintéticas**

IZABELLA FERNANDA FERREIRA DOMINGUES

Orientadora

Profa. Dra. Ana Cristi Basile Dias

Coorientadora

Dra. Fabiana Casarin

Brasília, DF.
2023



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Extração de cafeína por Polímero Molecularmente
Impresso para *clean-up* de amostras de cationas
sintéticas**

IZABELLA FERNANDA FERREIRA DOMINGUES

Orientadora

Profa. Dra. Ana Cristi Basile Dias

Coorientadora

Dra. Fabiana Casarin

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

BRASÍLIA, DF.

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas maravilhosas que fazem parte da minha vida. Aos meus pais, Cássia e Edi, por todo apoio, amor e dedicação e por me ensinarem a nunca desistir, essa vitória, com certeza, também é de vocês. Ao meu namorado e amigo Dênis por todo o incentivo, carinho e companheirismo, por todas as conversas na bancada e todos os cafés e por estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora Ana Cristi pela paciência, compreensão, por me guiar durante todo o processo e pelos conselhos valiosos que levarei para o resto da vida. À minha coorientadora Fabiana pelo apoio e orientações, pelos conselhos e conversas regadas a café e por me mostrar sempre um outro ponto de vista. Vocês tornaram esse trabalho possível e são minha inspiração nessa jornada profissional.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos (LDPQ) da UnB por disponibilizar o espaço e equipamentos necessários para a realização desse trabalho. À Erislene pela disponibilidade e ajuda sem a qual não teria conseguido realizar os estudos no HPLC.

À minha companheira de mestrado Juliana por toda ajuda e cumplicidade, pelas piadas e músicas e por muitas vezes ser a voz da razão. Às minhas amigas de laboratório Maria Vitória, Natália e Larissa por deixarem meus dias de trabalho mais alegres. A todos os integrantes do grupo AQQUA/LIAMA pelo acolhimento e disponibilidade.

Aos meus amigos Isabelle, Marianne, Lizandra, Eduardo, Caroline, Ana Elisa, Eric e Miguel pelas intermináveis videochamadas, encontros presenciais e virtuais, pelo incentivo, carinho e torcida e por tornar feliz e mais leve essa etapa da minha vida.

Ao perito Luciano Arantes e à Polícia Civil do Distrito Federal por tornarem possível a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários da Universidade de Brasília. Às instituições de fomento pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa jornada meu muito obrigada.

RESUMO

As catinonas sintéticas (CAT) são um grupo de novas substâncias psicoativas (NSP) que apresentam efeitos psicoativos similares à metanfetamina. Essas drogas são, em sua maioria, adulteradas com cafeína (CAF) com o intuito de aumentar a massa do produto e, dessa forma, gerar lucro. Nesse trabalho, um método extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) com HMIP foi desenvolvido para aplicação de um método de *clean-up* para extrair CAF de amostras de comprimidos de CAT apreendidos pela Polícia Civil do Distrito Federal. As condições da MISPE foram definidas por meio da aplicação de um planejamento fatorial completo de dois níveis e quatro fatores: (1) pH da amostra; (2) pH da solução de condicionamento; (3) solvente de condicionamento e (4) ordem de condicionamento. A partir dos resultados do planejamento observou-se que os fatores (1) e (2) no nível superior (pH 9) e os fatores (3) e (4) nos níveis inferiores (água pH 9 seguida de metanol) promoveram valores de retenção de CAF de 89%. O procedimento final da MISPE foi aplicado em três amostras de CAT e foram observadas retenção média de 74%. Para avaliar a seletividade do método, realizou-se a NISPE que apresentou taxa de retenção média de 58%, indicando que o método desenvolvido é seletivo à CAF. A MISPE também foi aplicada em uma amostra apreendida de comprimido CAF para avaliar outra matriz. Foi possível retirar 75%, em média, da CAF presente na amostra, o que indica que a MISPE pode ser aplicada em diferentes matrizes e pode ser utilizada para o *clean-up* de outras amostras de drogas que apresentem adulteração por CAF. O método desenvolvido aponta aspectos inovadores ao utilizar MIP para extrair o adulterante majoritário de amostras de comprimidos de CAT.

Palavras-chave: Catinonas sintéticas, NSP, CAF, preparo de amostra, quimiometria, planejamento de experimentos, MIP, MISPE.

ABSTRACT

Synthetic cathinones (CAT) are a group of new psychoactive substances that exhibit methamphetamine-like psychoactive effects. These drugs are mostly adulterated with caffeine (CAF) to increase the mass of the product and thus generate profit. In this work, a molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) method was developed to apply a clean-up method to extract CAF from samples of CAT tablets seized by the Civil Police of the Federal District. The MISPE conditions were defined by applying a full factorial design with two levels and four factors: (1) sample pH; (2) pH of the conditioning solution; (3) conditioning solvent and (4) conditioning order. Based on the results of the study, it was observed that factors (1) and (2) at the upper level (pH 9) and factors (3) and (4) at the lower levels (water pH 9 followed by methanol) promoted values of 89% CAF retention. The final MISPE procedure was applied to a three different samples of seized CAT tablets resulting in a mean retention of 74% of CAF. To assess the methods selectivity, the same procedure was conducted using NIP as solid phase which resulted in a mean retention of 58%, indicating that the MISPE is selective to CAF. The MISPE was also applied to a different drug sample containing CAF. It was possible to remove 75%, on average, of the CAF present in the tablet, which indicates that the MISPE can be applied in different matrices and can be used for the clean-up of other drug samples that present adulteration by CAF. The developed method points to innovative aspects when using MIP to extract the major adulterant from samples of CAT tablets.

Keywords: Synthetic cathinones, NPS, CAF, sample preparation, chemometrics, design of experiments, MIP, MISPE.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. CATINONAS SINTÉTICAS.....	2
2.2. CAFEÍNA.....	6
2.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	7
2.4. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIP)	9
2.5. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA.....	12
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. REAGENTES	15
4.2. UV-VIS	15
4.3. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	15
4.3.1. HPLC-UV	15
4.3.2. CG-MS.....	16
4.4. SÍNTESE DO HMIP DE CAF	16
4.5. ESTUDO DE ADSORÇÃO	18
4.6. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA MISPE.....	18
4.6.1. MONTAGEM DOS CARTUCHOS.....	18
4.6.2. MONTAGEM DO SISTEMA DA MISPE	19
4.6.3. PLANEJAMENTO FATORIAL.....	20
4.7. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE CATINONAS APREENDIDAS	22
4.8. APLICAÇÃO EM MATRIZ DISTINTA	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. ESTUDOS UV-VIS	24
5.1.1. ESTUDOS DE ADSORÇÃO	24
5.1.2. ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO.....	24
5.2. PLANEJAMENTO FATORIAL	27
5.3. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS APREENDIDAS DE CATINONAS	34
5.4. APLICAÇÃO EM MATRIZ DIFERENTE	39
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ACN – Acetonitrila
ALC – Agente de Ligação Cruzada
APTES – 3-aminopropiltriétoxissilano
DIP – Dipirona
CAF – Cafeína
CAT – Catinona sintética
PCDF – Polícia Civil do Distrito Federal
ESI – *Electrospray Ionization*
FI – Fator de Impressão
GC – *Gas Chromatography*
HMIP – *Hybrid Molecularly Imprinted Polymer*
HPLC – *High-performance liquid chromatography*
IV – Infravermelho
LC – *Liquid Chromatography*
MAA – Ácido metacrílico
MDMA – metileno-dioximetanfetamina
MET – Metanol
MF – Monômero Funcional
MIP – *Molecularly Imprinted Polymer*
MISPE – *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*
MM – Molécula Molde
MS – *Mass Spectrometry*
NIP – *Non Imprinted Polymer*
NSP – Nova Substância Psicoativa
ORF – Orfenadrina
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SPAL – Seção de Perícia e Análises Laboratoriais
SPE – *Solid Phase Extraction*
UV - Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores estudados no planejamento fatorial completo 2^4 e seus níveis. ...	20
Tabela 2. Matriz codificada de experimentos.....	21
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da capacidade adsotiva do HMIP (Q_{HMIP}), do NIP (Q_{NIP}) e fator de impressão (FI).....	24
Tabela 4. Tabela de experimentos codificada com resultados do planejamento fatorial realizado no UV-VIS.....	25
Tabela 5. Matriz codificada do planejamento fatorial com o valor médio das respostas.	29
Tabela 6. Matriz codificada planejamento 2^2	31
Tabela 7. Valores dos efeitos dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^2	32
Tabela 8. Componentes majoritários de cada amostra por ordem de aparecimento no cromatograma.	36
Tabela 9. Taxas de retenção médias \pm desvio padrão obtidas na MISPE e na NISPE para as amostras apreendidas.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da (A) CAT e seus (B) sítios de substituição.	5
Figura 2. Estrutura molecular da CAF.....	6
Figura 3. Esquema de um cartucho de extração em fase sólida.....	8
Figura 4. Esquema das principais etapas de SPE <i>off-line</i> . Em que 1=condicionamento, 2=carregamento, 3= lavagem e 4=eluição ³⁴	9
Figura 5. Esquema da Síntese do MIP em que MM = molécula molde, MFs = monômeros funcionais e ALC = agente de ligação cruzada.	10
Figura 6. Esquema da síntese do HMIP pelo processo radicalar proposto por Casarin (2020).....	17
Figura 7. Esquema de montagem do cartucho de extração da MISPE. (1) Colocação do Fritz inferior seguido da (2) membrana de filtração; (3) adição do HMIP de CAF e por fim (4) inserção do Fritz superior.	19
Figura 8. Sistema da MISPE. A) cartucho, B) tubo de Vitton e C) bomba peristáltica.	20
Figura 9. Espectro obtido na análise do metanol percolado pelo cartucho limpo com o valor de absorbância obtido no comprimento de onda de 272 nm, que é utilizado para quantificar a CAF.....	26
Figura 10. Cromatograma do metanol percolado pelo cartucho limpo.	27
Figura 11. Gráfico de Pareto da triagem dos fatores: (1) pH de carregamento; (2) pH de condicionamento; (3) solvente de condicionamento; (4) ordem de condicionamento; e (x*y) interação entre fatores.....	28
Figura 12. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2 ⁴ com replicata (n=2) dos fatores: (1) pH de carregamento; (2) pH de condicionamento; (3) solvente de condicionamento; (4) ordem de condicionamento; e (x*y) interação entre fatores.	30
Figura 13. Gráfico de Pareto do estudo fatorial 2 ² com replicata (n=2) dos fatores: (1) pH de carregamento; (2) pH de condicionamento; e (x*y) interação entre fatores.	33
Figura 14. Superfície de resposta para os fatores estudados.	34
Figura 15. Cromatogramas do CG-MS das amostras A, B e C com os tempos referentes à cada pico.	35
Figura 16. Espectros de massas referentes aos picos indicados na Figura 13.....	36
Figura 17. Cromatogramas obtidos no HPLC-UV das amostras A, B e C antes da extração (preto), após a MISPE (vermelho) e após a NISPE (azul) e os tempos de retenção de cada pico.	37
Figura 18. Interações entre CAF e o HMIP adaptado de Casarin, 2020 ¹¹	38
Figura 19. Cromatogramas da amostra e comprimido no HPLC-UV antes (preto) e após a aplicação da MISPE (vermelho) e NISPE (cinza).	40

1. INTRODUÇÃO

Catinonas sintéticas (CAT) fazem parte de uma classe de substâncias psicoativas que apresenta efeitos similares ao da cocaína, êxtase e anfetamina¹. São derivados sintéticos da catinona, um alcaloide anfetamínico presente nas folhas da planta *Catha edulis*, e são classificadas como drogas de designer ou Novas Substâncias Psicoativas (NSP)^{1,2}.

A falta de controle na síntese faz com que essas amostras não sejam puras, normalmente estão presentes outras substâncias como celulose, no caso de comprimidos, reagentes residuais e adulterantes. Dentre as substâncias utilizadas como adulterantes a mais presente em amostras de CAT é a cafeína (CAF). Por ser um pó branco inodoro estimulante, ela é comumente adicionada a substâncias anfetamínicas de modo a aumentar a massa e gerar lucro^{3,4}.

A presença desses adulterantes faz com que seja necessário o emprego de uma etapa de preparo de amostra de modo a deixar o analito mais disponível para sua determinação. Atualmente o preparo de amostra utilizado consiste na maceração do comprimido e posterior extração sólido-líquido utilizando metanol (MET), resultando na extração de CAT e CAF para a fase líquida. Dessa forma, os métodos mais empregados para a determinação dessas substâncias são baseados em cromatografias com detecção por espectrometria de massas⁵⁻⁸.

Porém, devido ao caráter ilícito da sua produção, surgem constantemente novos análogos de CAT cujos tempos de retenção e padrões de fragmentação não são conhecidos, tornando a sua determinação onerosa. Além disso, a grande quantidade de CAF presente pode coeluir e atrapalhar a identificação de novas CAT. Uma estratégia empregada atualmente é a extração de CAT das amostras por meio de extração líquido-líquido e purificação da amostra a partir de recristalização, porém, devido ao rápido surgimento de novos análogos, essa estratégia não é eficiente visto que cada análogo necessitaria de um procedimento específico, tornando o processo de preparo de amostra demorado e resultando num grande gasto de solventes orgânicos.

Nesse caso, o emprego de uma etapa de *clean-up* no preparo da amostra se mostra uma estratégia vantajosa visto que promoveria a extração do interferente majoritário da amostra, melhorando a relação sinal-ruído do detector. Uma técnica bastante utilizada para limpezas de amostra é a extração em fase sólida (SPE), que

consiste na extração do interferente por meio da percolação da amostra por um cartucho de extração^{9,10}.

Porém, as fases sólidas comerciais apresentam baixa seletividade, o que torna oneroso o desenvolvimento de um método de preparo de amostra. Além disso, os cartuchos de extração podem ser utilizados apenas uma vez, aumentando o custo do procedimento. Dessa forma, o emprego de polímeros molecularmente impressos (MIP) como fase sólida é uma forma de contornar este problema^{10,11}.

MIP são polímeros que possuem cavidades com sítios de interação específicos para extração de uma molécula de interesse. Esses sítios são formados a partir de um processo de polimerização que ocorre em torno de um complexo formado entre a molécula molde (MM) e um monômero funcional (MF) por meio de um agente de ligação cruzada (ALC).^{12,13} Ao fim da síntese o material é lavado para a retirada da MM deixando no material cavidades seletivas. Devido a sua alta seletividade e possibilidade de reutilização, o seu emprego como fase sólida facilita o desenvolvimento do método e diminui os custos do procedimento.

Mesmo com o emprego de MIP como fase sólida em SPE (MISPE – do inglês *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*) ainda se faz necessário o estudo de cada etapa envolvida no processo de extração para que esta seja o mais eficiente possível. Portanto é necessária a otimização de todo processo que pode ser feita de forma univariada ou multivariada. Devido a interdependência das etapas da SPE, a melhor alternativa é a otimização multivariada dos parâmetros para a determinação do ponto ótimo global, que pode ser realizado empregando ferramentas quimiométricas¹⁴⁻

16

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo geral desenvolver um método de *clean-up* baseado em MISPE para a extração de CAF em amostras apreendidas pela Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF) de CAT.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CATINONAS SINTÉTICAS

O termo Nova substância psicoativa (NSP) é utilizado para categorizar análogos sintéticos de drogas ilícitas já conhecidas¹⁷. Também conhecidas como *designer drugs* (drogas de designer), estas substâncias possuem estrutura química similar à de drogas já conhecidas: canabinóides, opióides e anfetaminas,

proporcionando os mesmos efeitos e apresentando pequenas diferenças estruturais suficientes para evadir medidas de controle aplicadas a substâncias já conhecidas e controladas^{1,17,18}.

Dentre esses compostos, as catinonas sintéticas (CAT) (Figura 1A) são o grupo mais prevalente de NSP. Análogas à catinona, um alcaloide anfetamínico encontrado naturalmente nas folhas de Khat (*Catha edulis*), tem o efeito psicoestimulante, similar ao da metanfetamina e metileno-dioximetanfetamina (MDMA)^{1,2,17,19}. A princípio foram sintetizadas com o intuito de uso terapêutico, sendo as primeiras a metcatinona e a mefedrona, descritas em 1929, e se popularizaram no início dos anos 2000 com a proibição das metanfetaminas¹⁹.

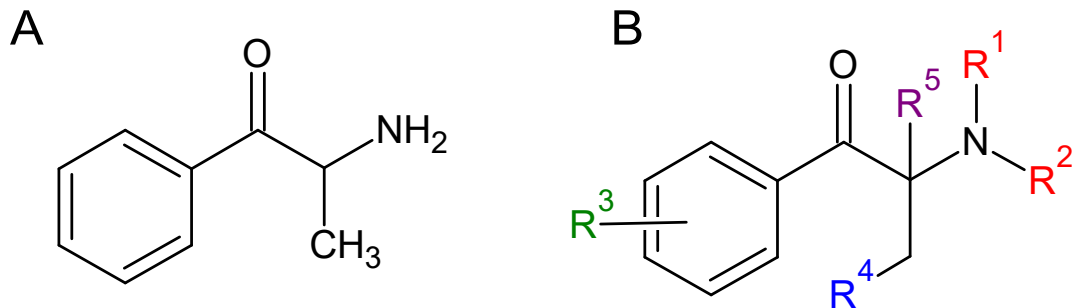


Figura 1. Estrutura química da (A) CAT e seus (B) sítios de substituição.

O consumo de CAT cresceu ainda mais em 2006 com o advento da internet, onde eram vendidas como “*bath salts*” (do inglês sais de banho), “fertilizante” e com o aviso “*not for human consumption*” de modo a driblar a legislação¹⁸. São vendidas em formato de pó, cristais, pílulas, comprimidos e selos, e normalmente, compostos de uma mistura de diferentes espécies análogas^{1,20}.

Devido ao número de sítios possíveis de substituição na sua estrutura química (Figura 1B), o número de novos compostos cresce rapidamente. Além disso, com o maior controle dos reagentes usados na síntese faz com que os laboratórios clandestinos busquem outras rotas sintéticas utilizando reagentes alternativos, resultando no surgimento de novos análogos^{1,21,22}.

Nesse contexto, é essencial uma fiscalização e classificação constante dessas drogas. Porém, as amostras apreendidas possuem matrizes complexas, muitas vezes contendo celulose, restos de síntese e adulterantes. O que torna o processo de caracterização de novas CATs extremamente trabalhoso. Dentre os

adulterantes citados na literatura, o mais prevalente nas amostras de CAT é a cafeína (CAF)^{3,4}.

2.2. CAFEÍNA

A CAF (Figura 2) é um alcaloide pertencente ao grupo das metilxantinas presente em diversas espécies de plantas que apresenta um efeito estimulante quando ingerido. É uma substância de fácil aquisição vastamente utilizada para melhorar atenção e performance física, sendo encontrada em fármacos, bebidas como café, refrigerantes, chás e suplementos^{4,11,23,24}.

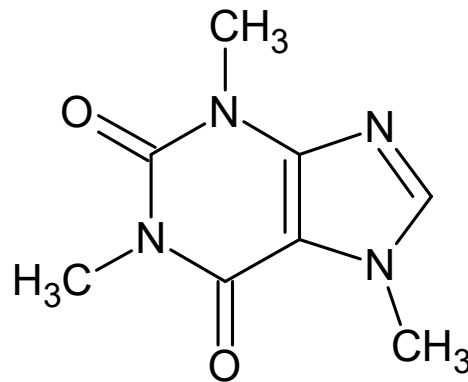


Figura 2. Estrutura molecular da CAF.

Por ser um composto legal, barato e de fácil aquisição com características físicas similares a drogas ilícitas (pó branco inodoro e insípido), é muito utilizado como adulterante, sendo adicionado às drogas para adicionar massa e gerar lucro. Além disso, em casos como a heroína, a adição da CAF facilita a administração, visto que a mistura diminui a temperatura de vaporização³. Ela é quase sempre adicionada a substâncias anfetamínicas, sendo constantemente encontrada em amostras de CAT, já que potencializa o seu efeito psicoativo^{3,4}.

Isso torna o processo de determinação e caracterização dessas amostras oneroso, devido à alta solubilidade da CAF em metanol (MET), solvente muito utilizado no preparo de amostras de CAT²⁵⁻²⁷. Durante esse procedimento, a CAF é extraída da matriz juntamente com o analito de interesse, isso devido à alta polaridade do MET e a sua capacidade de realizar interações do tipo ligação de hidrogênio com a CAF por ser um solvente polar prótico¹¹. Dessa forma é necessária a utilização de métodos de separação como cromatografia líquida (LC – do inglês *Liquid Chromatography*) e gasosa (GC – do inglês *Gas Chromatography*) acopladas a espectrômetros de massa (MS – do inglês *Mass Spectrometry*).

Essa abordagem é muito utilizada para a determinação de NSPs e a identificação das estruturas presentes é realizada analisando os padrões de

fragmentação obtidos junto aos tempos de retenção^{5,6,8}. Porém essa estratégia depende da comparação com espectros das bibliotecas ou da existência de um padrão analítico, o que é inviável no caso de substâncias ainda não catalogadas^{27,30}.

Outras estratégias aplicadas quando uma nova substância é identificada é a purificação da amostra por meio de recristalização e posterior análise por espectroscopia no infravermelho (IV) e no ultravioleta (UV)²⁸. Ou a separação dos compostos psicoativos por meio de extrações líquido-líquido consecutivas utilizando diferentes solventes orgânicos²⁹. Ambas as estratégias são trabalhosas, necessitando de muitas etapas e grande volume de solventes orgânicos.

Nesse contexto, o emprego de uma etapa de *clean-up* para retirar a CAF auxiliaria na análise e caracterização dessas amostras já que está presente em grande quantidade. A técnica de extração em fase sólida (SPE) é uma boa opção devido a sua seletividade, simplicidade e menor gasto de solventes orgânicos.

2.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Na SPE, a extração ocorre por meio das interações químicas entre o analito presente na solução da amostra e uma fase sólida de elevada área superficial. A extração se dá pela migração do composto de interesse contido na fase líquida para a fase sólida por meio de um processo de adsorção promovido pela interação química entre tal composto e sítios presentes na fase sólida³⁰. A natureza dessas interações depende da fase sólida utilizada e podem ser de caráter iônico, covalente, ligação de hidrogênio, entre outras. Elas garantem que o composto de interesse fique retido na fase sólida sendo, assim, extraídos da matriz.

Devido às suas vantagens sobre a extração líquido-líquido, tais como: menor consumo de solvente orgânico, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação, volumes reduzidos de resíduos tóxicos e melhoria em seletividade⁹, a SPE é uma boa alternativa para o preparo de amostras que apresentam matrizes complexas, como é o caso de comprimidos de CAT. Além disso, o seu emprego antes da análise cromatográfica impede que os interferentes coeluem com os analitos e reduzem a necessidade de limpezas constantes nas colunas, garantindo a estas uma maior durabilidade.

A SPE pode ser conduzida de maneira *on-line*, em que a SPE é acoplada a um método de análise, e *off-line*, em que o preparo da amostra e a análise são realizados separadamente, podendo ser aplicados diversos tipos de dispositivos de extração. O modo *off-line* é o mais utilizado devido a sua maior praticidade, já que a

SPE é uma técnica rápida e o modo *on-line* implica na construção do sistema. O dispositivo mais empregado na SPE é o cartucho de extração em forma de seringa.

Esses cartuchos (Figura 3) são formados por um tubo de polipropileno ou vidro preenchidos com uma fase sólida contida entre dois filtros de polietileno, aço ou politetrafluoretileno (PTFE). As fases sólidas convencionais são, geralmente, divididas em três grupos: sílica quimicamente ligada, materiais de carbono e materiais poliméricos. O tipo de sorvente e sua quantidade no cartucho dependem da matriz da amostra e da natureza química do composto de interesse a ser extraído^{9,31}.

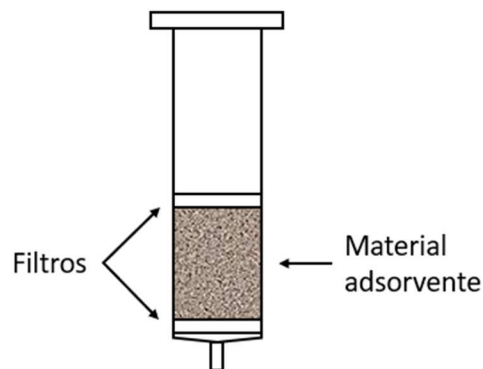


Figura 3. Esquema de um cartucho de extração em fase sólida.

O procedimento de SPE consiste em quatro etapas: condicionamento, carregamento, limpeza e eluição, representadas esquematicamente na Figura 4. No condicionamento, percola-se um solvente pela fase sólida, de modo que a área superficial disponível desta aumente e ative os sítios de interação, melhorando a sua performance como material adsorvente. Após o condicionamento, a amostra é percolada pela fase sólida de modo que as espécies presentes em solução que apresentarem maior afinidade com a fase sólida fiquem retidas nesta, sendo extraídas da matriz. Durante a lavagem, são removidas da fase sólida quaisquer compostos não desejados, para isso utiliza-se um solvente que interaja bem com essas espécies de modo que não ocorra a coeluição do analito. Por fim, promove-se a extração das espécies adsorvidas na fase sólida deixando-o disponível para posterior detecção^{9,30}.

Quando a SPE é utilizada para o *clean-up* de amostras, as etapas de condicionamento e carregamento são particularmente decisivas para que apenas os interferentes matriciais fiquem retidos na fase sólida. Muitas vezes a etapa de condicionamento é composta por duas fases: ativação e equilíbrio, em que, primeiramente são ativados os sítios de interação da fase sólida e em seguida é

realizada a preparação da fase sólida garantindo a migração e ancoragem efetiva das espécies de interesse.

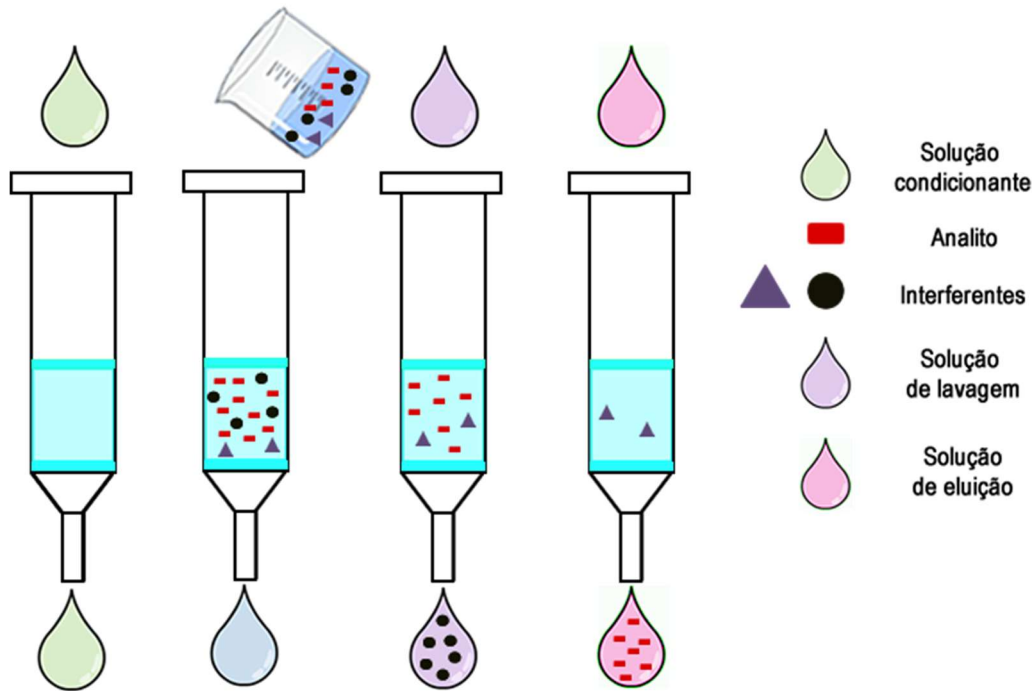


Figura 4. Esquema das principais etapas de SPE *off-line*. Em que 1=condicionamento, 2=carregamento, 3= lavagem e 4=eluição³⁴.

A aplicação da SPE para o preparo de amostras de CAT apreendidas não é muito comum, mas já foram estudadas a utilização de fases sólidas de troca iônica para extração de alguns análogos já conhecidos³². Porém, devido ao rápido surgimento de novas espécies de CAT, essa abordagem não está sendo eficiente.

Devido à baixa seletividade das fases comerciais disponíveis, o desenvolvimento do método baseado em SPE é, muitas vezes, oneroso e de alto custo. De modo a solucionar isso, SPE baseadas em fases sólidas como os MIP têm chamado a atenção dos pesquisadores devido a maior seletividade na separação do analito de interesse e possibilidade de reutilização^{11,33,34}. Assim, os MIP substituem as fases sólidas comuns tornando mais eficiente o desenvolvimento de métodos e diminuindo os custos^{13,35}.

2.4. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIP)

Os MIPs são materiais poliméricos que apresentam em sua matriz cavidades específicas com locais de alta afinidade e complementares em tamanho, dimensão e funcionalidade a um composto de interesse. O conceito de impressão molecular foi baseado no processo de formação de anticorpos *in vitro* proposto por Pauling³⁶. Em seus estudos, Pauling percebeu que o anticorpo era modelado ao redor do antígeno

mediante ligações seletivas. Nesse contexto, surgiu a ideia da síntese de um material sintético similar a esse processo antígeno-anticorpo, com o objetivo de formar cavidades específicas para uma molécula molde (MM) ^{11,13,37}.

MIPs apresentam sítios de interação seletivos à MM, que são formados durante a síntese por meio de um processo de impressão (Figura 5). Esse processo ocorre por meio da interação entre grupos funcionais presentes na MM com os grupos funcionais do monômero funcional (MF), seguida da polimerização feita por meio de um agente de ligação cruzada (ALC) ¹². Ao fim, a MM é retirada da matriz polimérica, resultando em um material resistente e poroso com sítios de ligação específicos para a MM.

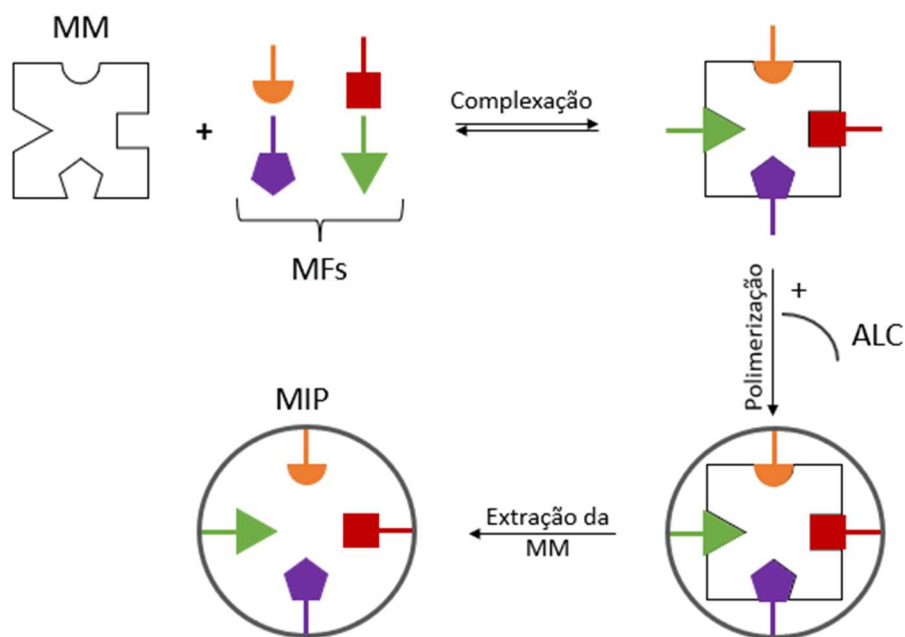


Figura 5. Esquema da Síntese do MIP em que MM = molécula molde, MFs = monômeros funcionais e ALC = agente de ligação cruzada.

Visto que materiais poliméricos, no geral, são porosos e possuem alta capacidade adsortiva, deve-se sintetizar um polímero controle NIP (do inglês *Non Imprinted Polymer*). Essa síntese é idêntica à do MIP, utilizando-se os mesmos MF e ALC, mas sem adição de MM, dessa maneira não ocorre o processo de impressão. A capacidade de reconhecimento molecular do MIP é avaliada em relação ao NIP e a razão entre a capacidade adsortiva do MIP e do NIP caracteriza o fator de impressão (FI). Dessa forma, quanto maior o FI mais seletivo o MIP em relação ao seu polímero controle.

Os sítios de interação específicos presentes no MIP garantem ao material uma alta seletividade à MM. A natureza química dessas interações – covalentes ou

não covalentes – são determinadas durante a síntese do MIP e dependem do MF utilizado. Para a sua aplicação em SPE é preferível que essas interações sejam feitas por meio de ligação de hidrogênio, que são fortes o suficiente para que ocorra o processo de adsorção, mas permitem a sua posterior dessorção durante a etapa de eluição. A natureza da matriz polimérica do MIP também influencia na sua aplicação, visto que o material deve apresentar compatibilidade com a matriz da amostra para que haja a interação e possibilite a migração do analito da fase líquida para a fase sólida^{9,34},

Os MIPs podem ser sintetizados por diferentes processos, dentre eles, se destacam os radicalares e sol-gel. Cada um desses processos envolve parâmetros físico-químicos diferenciados produzindo polímeros com propriedades distintas conforme sua aplicação. Nos processos radicalares, normalmente sintetiza-se MIPs orgânicos para matrizes onde o analito está diluído em um solvente orgânico. Esses polímeros apresentam uma distribuição de locais de interação mais homogênea e com pontos de ligação em grande parte idênticos^{11,37,38}.

Já o processo sol-gel resulta em polímeros inorgânicos utilizados para extração em matrizes aquosas. Em contraste com os polímeros orgânicos, os MIPs inorgânicos apresentam uma distribuição de locais de ligação mais heterogênea resultando em uma menor quantidade de sítios de interação. Isso faz com que ocorra uma saturação rápida desses MIPs diminuindo significativamente a sua capacidade adsorptiva e, conseqüentemente, seu fator de impressão^{11,37}.

De modo a contornar a limitação de aplicação baseada na natureza da matriz, uma abordagem inovadora é o desenvolvimento de uma fase sólida híbrida, orgânica-inorgânica. Este processo tem vantagens, pois geram fases sólidas adsorventes com alta afinidade com matrizes orgânicas e aquosas^{39,40}.

Para a síntese de polímeros híbridos molecularmente impresso (HMIP – do inglês *Hybrid Molecularly Imprinted Polymer*) é realizada uma etapa adicional que consiste na síntese do MF híbrido, dessa forma adiciona-se esqueletos de sílica à matriz do polímero garantindo a ele uma afinidade a matrizes orgânicas e aquosas^{39,40}. O resto da síntese ocorre como os MIPs inorgânicos e orgânicos, formando-se o complexo entre MF e MM seguido pela polimerização a partir do ALC.

Essa síntese pode ocorrer por diferentes métodos entre eles o método de bulk, precipitação e suspensão. A principal diferença entre esses três métodos é o grau de homogeneidade morfológica entre as partículas do MIP e o tamanho dessas partículas. Dentre elas, a síntese por suspensão resulta em partículas menores, o que

garante ao MIP uma maior área superficial, e um alto grau de homogeneidade, garantindo maior reprodutibilidade quando utilizado como fase sólida^{39,40}.

Existem estudos utilizando MIPs para extração de CAT em diferentes amostras, porém a síntese dos polímeros necessita da utilização de padrões analíticos puros de CAT como MM⁴¹. Além do alto custo e baixa disponibilidade desses padrões, seria necessário sempre desenvolver novos MIPs para cada análogo ou grupo de CAT que surgisse, o que torna esta opção pouco eficiente para preparo de amostras de comprimidos de CAT em um laboratório de análise forense.

Tendo em vista essa limitação e a necessidade de se determinar CAT, pode-se explorar o MIP como uma fase seletiva para a extração do adulterante CAF a fim de minimizar sua interferência na determinação de novas CAT. Assim, pode ser aplicado um procedimento de *clean-up* em SPE utilizando MIP sintetizado para CAF no preparo de amostra de comprimidos. O uso de MIP como fase sólida caracteriza a extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE – do inglês *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*)^{42,43}.

A presença de sítios específicos de interação presentes no MIP e possibilidade de dessorção da MM garante à MISPE uma maior seletividade e possibilidade de reutilização, ambas vantagens sobre SPE com fases sólidas comerciais. No entanto, para que MISPE seja o mais eficaz possível, é necessário que as suas etapas sejam estudadas e o seu resultado otimizado. Esta otimização pode ser feita de modo univariado, em que cada parâmetro é otimizado individualmente, ou multivariado, em que se estuda mais de um fator em diferentes níveis ao mesmo tempo.

2.5. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

No caso de estratégias como MISPE, cuja eficácia depende de vários parâmetros, a otimização multivariada é uma excelente opção, visto que desta forma pode-se obter uma grande quantidade de informação sobre o sistema realizando um número reduzido de experimentos.

Diversos trabalhos utilizam planejamento de experimentos para estudar a influência dos parâmetros da SPE de modo a desenvolver um procedimento que resulte nos maiores níveis de recuperação e de retenção possíveis^{14,44–46}. Essa estratégia é empregada devido ao grande número de fatores que influenciam essa técnica e a interdependência desses fatores. Desse modo, a aplicação dessa ferramenta quimiométrica permite que sejam determinadas as melhores condições a serem aplicadas no sistema de uma maneira eficiente. Isso é possível pois os

experimentos são planejados de forma que diferentes combinações de níveis para cada parâmetro, ou fator, estudado sejam avaliadas¹⁶.

Para a realização de um planejamento de experimentos, é necessário definir quais parâmetros do sistema serão estudados e qual a resposta que será avaliada. No caso da SPE, as etapas envolvidas são condicionamento, carregamento, lavagem e eluição que devem ser estudadas com o objetivo de obter um alto fator de retenção. Esses fatores são aplicados em diferentes níveis de modo a determinar qual a sua influência nesse resultado^{14,15}.

Tendo em vista aplicação da MISPE para o *clean-up* de amostras, os fatores de maior interesse são aqueles envolvidos nas etapas de condicionamento e carregamento, visto que o objetivo principal é a retirada do adulterante majoritário. Dessa forma, é possível realizar um planejamento fatorial, de modo a determinar quais os parâmetros aplicados nessas etapas que mais influenciam na retenção de CAF. A partir dessa informação pode-se realizar mais estudos e construir uma superfície de resposta, possibilitando o encontro do ponto ótimo global de um sistema^{14-16,47}.

No contexto deste trabalho, o estudo envolve apenas quatro fatores e, dessa forma, um planejamento completo de dois níveis pode ser aplicado^{14,15}. Nesse caso são escolhidos n fatores a serem avaliados em cada um dos dois níveis e são realizados, no mínimo, 2^n experimentos, de modo a avaliar todas as possíveis combinações entre os fatores estudados. Após a realização dos experimentos, por meio dos resultados, é possível avaliar se há, de fato, uma interação entre os fatores estudados e quais os fatores apresentam maior influência na resposta^{15,16}.

A partir desses estudos, têm-se como objetivo analisar quais os fatores e combinação de fatores que mais influenciam na retenção de CAF em amostras preparadas em MET. Desenvolvendo, dessa forma, um procedimento de MISPE para *clean-up* de amostras de comprimidos de CAT e que possa ser inserida na rotina de análises forenses da PCDF.

3. OBJETIVOS

Considerando o contexto apresentado, esse trabalho propõe a utilização de um HMIP de CAF como fase sólida para retirar CAF presente em amostras de CAT, tendo como objetivo geral o desenvolvimento de uma MISPE para *clean-up* de amostras de comprimidos de CAT apreendidos pela PCDF e como objetivos específicos:

- Determinar os fatores de maior influência e presentes nas etapas da MISPE por meio da aplicação de um planejamento fatorial completo de dois níveis;
- Otimizar o procedimento da MISPE para retirar CAF de soluções metanólicas;
- Aplicar o procedimento otimizado em amostras de comprimidos de CAT fornecidas pela PCDF.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

CAF e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich, grau P. A. Os solventes acetonitrila (ACN) e metanol (MET) foram adquiridos, respectivamente, da Merck e Supelco, ambos grau HPLC. Já o ácido clorídrico foi adquirido da Biograde. A água utilizada foi deionizada utilizando um sistema Milli-Q (Millipore, resistividade $\geq 18 \text{ cm}^{-1}$) de purificação.

4.2. UV-VIS

Foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS Agilent, modelo 8454, para a determinação de CAF durante as lavagens do HMIP e testes de adsorção. Para isso foi construída uma curva de calibração em metanol numa faixa de $0,5 - 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ analisando o valor de absorbância no comprimento de onda de 272 nm.

4.3. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.3.1. HPLC-UV

Durante os estudos de otimização de MISPE, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC – Shimadzu, LC-20AD Prominence) com detecção de arranjo de diodos (DAD) em 272 nm. As separações foram realizadas numa coluna de fase reversa C-18 (dimensões: $250 \times 4,6 \text{ mm}$, diâmetro de partícula de $5 \mu\text{m}$, Zorbax Eclipse Plus, Agilent). Este equipamento encontra-se no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos (LDPQ) do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

O método cromatográfico utilizado foi adaptado de Casarin (2020)¹¹, com alteração do controle de temperatura em 35°C , e volume de injeção de $100,0 \mu\text{L}$ empregando um gradiente binário com uma vazão de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de acordo com a seguinte programação: de 0 a 1 min 10% de MET e 90% de água, aumentando linearmente até 2 min para 40% de MET e 60% de água, proporção mantida até 10 min, nos dois últimos minutos as condições iniciais foram retomadas resultando num tempo total de 12 min. A curva de calibração foi feita em triplicata numa faixa de $0,05 - 6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CAF e os sinais analíticos obtidos a partir das áreas dos picos referentes à CAF no tempo de retenção de 8,6 min.

4.3.2. CG-MS

Durante os estudos de aplicação em amostra foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A acoplado a um espectrometro de massas 5975C (CG-MS) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A aquisição e análise dos dados foram realizados com o auxílio do *software Agilent MSD Chem-Station Data Analysis* (versão E.02.02.1431) e a deconvolução e aprimoração dos cromatogramas foi feito utilizando o *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System* (AMDIS) (versão 2.73 Build 149.31). Este equipamento encontra-se no Laboratório de Análises Forenses do Instituto de Criminalística da PCDF.

Foi utilizado o método de rotina para *screening* de amostras do laboratório de análises forenses que consiste no uso de uma coluna cromatográfica (J&W DB-1 *ms Ultra Inert analytical column*; 0.25 mm I.D., 0.25 μm , Agilent, 122-0132UI) de 30 m. A injeção foi feita numa temperatura de 280 °C, volume de injeção 1,0 μL , com split de 20:1 e fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, hélio como gás carreador. No início da corrida a temperatura do forno era 200 °C e foi aumentando no gradiente de 15 °C por minuto durante 1 min até ser atingida a temperatura de 300 °C, que foi mantida até o fim da corrida. A detecção foi feita utilizando um espectrômetro de massas, a temperatura de fonte foi de 28 °C, energia de ionização de 70 eV e quadupolo à temperatura de 150 °C. O tempo de cada corrida foi de 7,7 min e os tempos de retenção para CAF e CAT foram de 2,75 min e 3 min, respectivamente. Foram tiradas as medidas do branco antes de cada medida por meio da injeção de 1,0 μL de MET.

4.4. SÍNTESE DO HMIP DE CAF

O HMIP de CAF utilizado como fase sólida da MISPE foi sintetizado por meio do processo de suspensão descrito por Casarin (2020)¹¹. Primeiramente, foi feita a síntese do monômero funcional híbrido (APTES-MAA) por meio da mistura de 6,4 mmol de APTES com 8,1 mmol de MAA em um frasco vedado de 250 mL de borossilicato. Essa mistura foi levada a aquecimento em 60 °C sob agitação constante, em banho Dubnoff, por 24 h. Para a síntese do HMIP, foi solubilizado 1 mmol de CAF em 10 mL de clorofórmio e a essa solução foram adicionados 4 mmol de APTES-MAA. Essa mistura foi deixada em banho ultrassônico por 10 min e, posteriormente, deixada no escuro à uma temperatura de 4 °C por 2 horas para a formação do complexo MF-MM. Depois, foram adicionados à mistura 4,48 mmol de TEOS e 25 mmol de EDGMA, que agiram como agentes de ligação cruzada, e 0,3 mmol de iniciador radicalar AIBN.

Em seguida foram adicionados 66 mL de uma solução aquosa de PVA 0,1% e essa solução foi submetida à purga de N₂ por 5 minutos. Essa mistura foi então colocada em um reator de 500 mL sob agitação constante de 1000 rpm à uma temperatura de 60 °C por 24 h. Concomitantemente, o NIP foi sintetizado da mesma maneira. Ao fim do processo de polimerização, o polímero foi filtrado e colocado em um frasco de 250 mL de borossilicato com 200 mL de água deionizada, sob agitação constante e à 80 °C por 2 h para retirada total do PVA. Por fim, o MIP foi submetido a um processo exaustivo de remoção da CAF em que foram realizados em torno de 10 ciclos de lavagem com uma mistura de metanol/ácido acético (90:10) com aquecimento por volta de 40 °C por 1 h. Para remoção do excesso do ácido acético foram realizados mais alguns ciclos utilizando apenas metanol, durante estes últimos ciclos uma alíquota da solução de lavagem foi analisada no espectrofotômetro UV-VIS para garantir que toda a CAF tivesse sido removida.

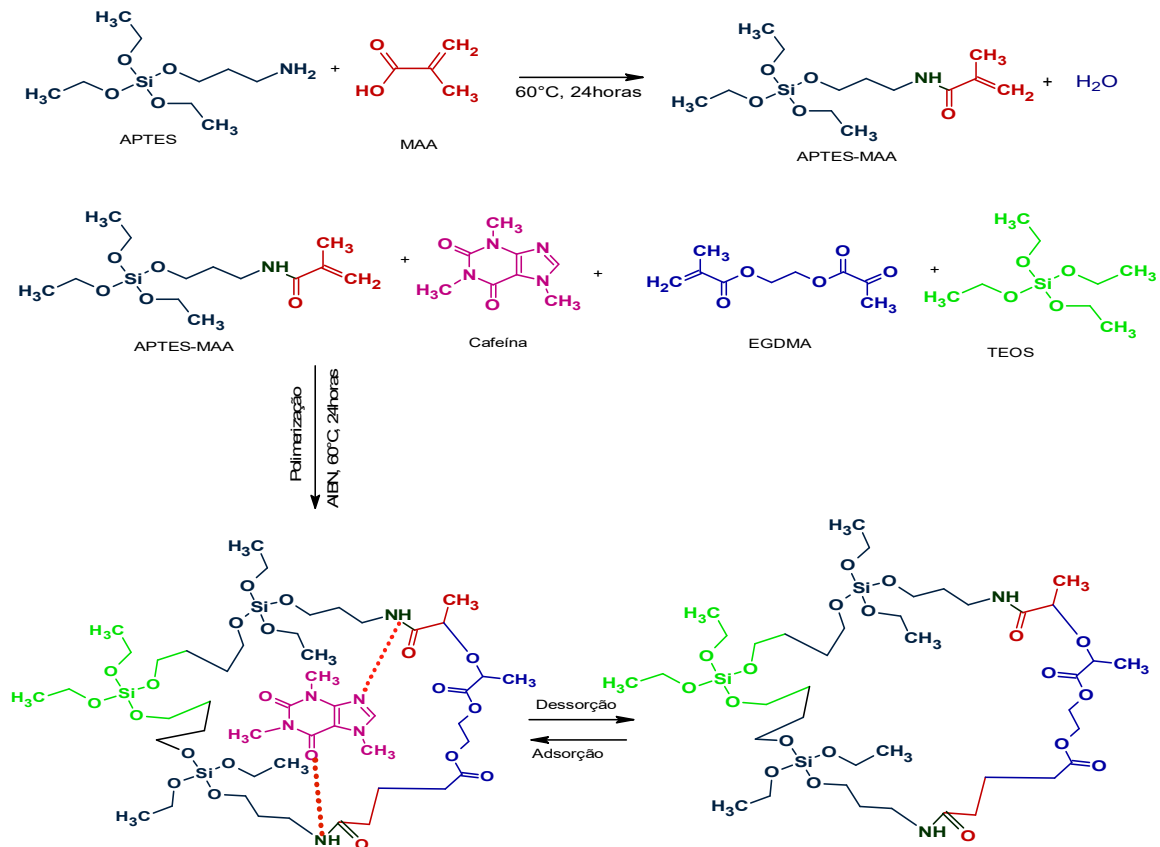


Figura 6. Esquema da síntese do HMIP pelo processo radicalar proposto por Casarin (2020).

4.5. ESTUDO DE ADSORÇÃO

Para avaliar a capacidade adsortiva do HMIP sintetizado, foram colocados 30 mg do polímero em um tubo Falcon de 15 mL, contendo 15 mL de uma solução aquosa de CAF $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Essa mistura foi deixada sob agitação em um homogeneizador hematológico (modelo SP 260H, SP Labor) durante 1 h. Os tubos então foram centrifugados à 40000 por 5 min utilizando uma centrífuga de bancada (modelo KC5, Kinddley), esse procedimento foi feito em triplicata. O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de um sistema de filtração Holder com membrana de filtração de $22\mu\text{m}$ e analisado no UV-VIS, a partir do resultado foi calculado a capacidade adsortiva do material por meio da Equação 1.

$$Q_e = \left[\frac{(C_i - C_f)v}{m} \right]$$

Equação 1. Capacidade adsortiva do HMIP. Em que C_i =concentração inicial, C_f =concentração final, v =volume de solução e m =massa de HMIP

Este procedimento foi realizado para o NIP e o fator de impressão foi calculado utilizando a Equação 2.

$$FI = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}}$$

Equação 2. Cálculo do fator de impressão. Em que Q_{MIP} = capacidade adsortiva do MIP e Q_{NIP} =capacidade adsortiva do NIP

4.6. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA MISPE

4.6.1. MONTAGEM DOS CARTUCHOS

Para a confecção dos cartuchos foram utilizadas seringas de polipropileno de 3,0 mL. Na parte inferior da seringa foi colocado um fritz de polipropileno ($0,22 \mu\text{m}$) seguido por uma membrana de filtração de PTFE ($0,22 \mu\text{m}$, Merck). Foram, então, adicionados 200 mg de HMIP, pesado diretamente no cartucho. Por fim, foi colocado um fritz em cima do HMIP de modo a comprimir o material (Figura 7).

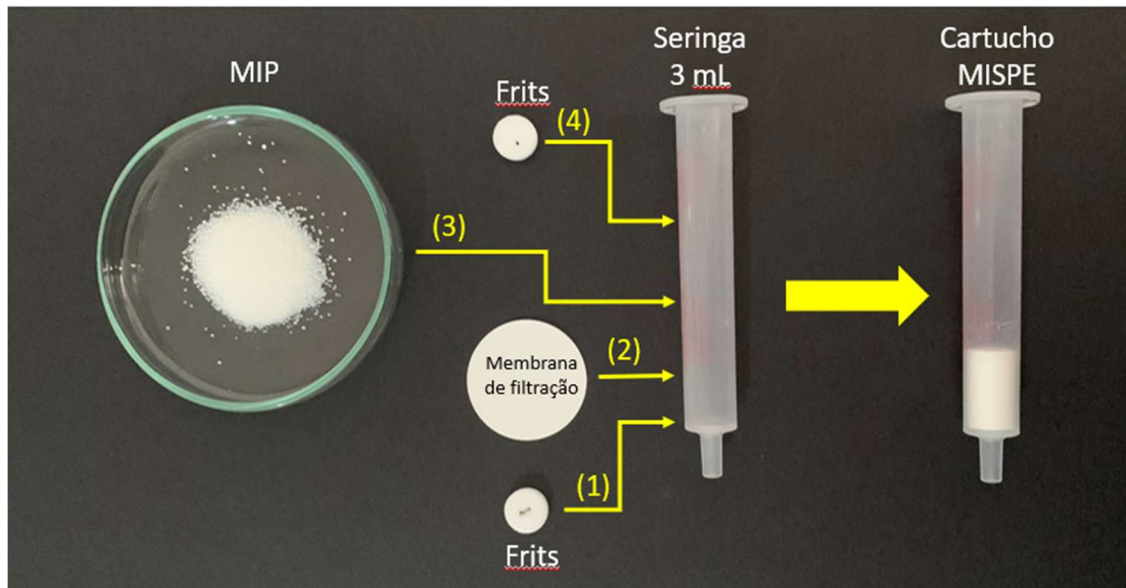


Figura 7. Esquema de montagem do cartucho de extração da MISPE. (1) Colocação do Frit inferior seguido da (2) membrana de filtração; (3) adição do HMIP de CAF e por fim (4) inserção do Frit superior.

4.6.2. MONTAGEM DO SISTEMA DA MISPE

No sistema MISPE, os cartuchos foram alocados em uma bomba peristáltica (modelo CP 78001-12, ISMATEC) com o auxílio de tubos de Vitton diâmetro interno (d. i.) 2,06 mm da Cole-Palmer Co. (Figura 8). Os cartuchos foram apoiados por meio de um suporte universal com auxílio de garras metálicas.

A vazão empregada para cada etapa foram: $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o condicionamento e $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o carregamento do cartucho. Essas vazões foram calculadas e definidas com base em estudos preliminares.

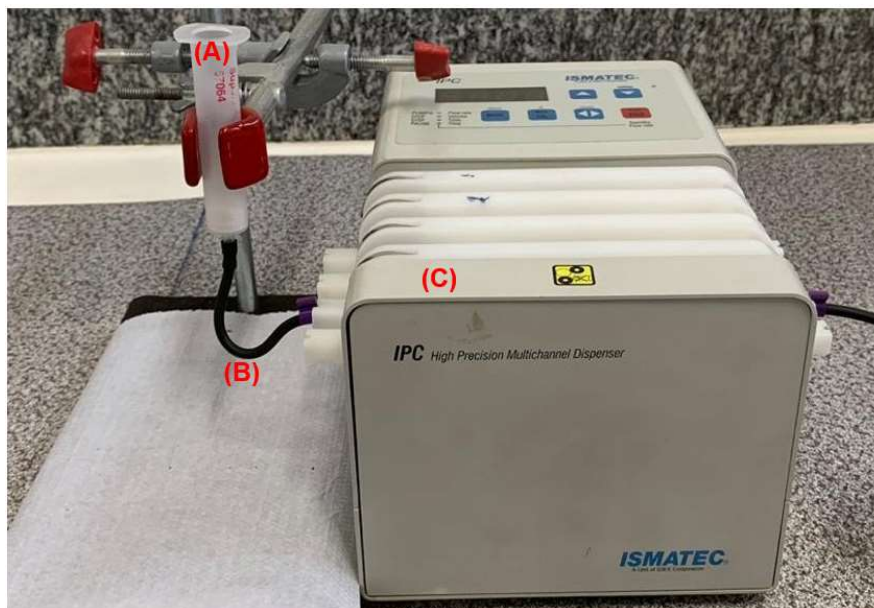


Figura 8. Sistema da MISPE. A) cartucho, B) tubo de Viton e C) bomba peristáltica.

4.6.3. PLANEJAMENTO FATORIAL

Para verificar as condições ideais para a extração de CAF foi utilizada a ferramenta de planejamento fatorial completo 2^4 para indicar os principais fatores e níveis que influenciam sua adsorção no HMIP durante a SPE.

Visto que o objetivo é a retenção da CAF na fase sólida, as etapas estudadas foram as de condicionamento e carregamento da amostra, em que os sítios do HMIP são ativados e as condições se tornam favoráveis para a migração do analito da fase líquida para a fase adsorvente, respectivamente.

Dessa forma, os fatores avaliados foram (1) pH da solução de carregamento (CAF $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em MET) (2) pH da solução de condicionamento (água deionizada) (3) tipo de solvente de condicionamento e (4) ordem de condicionamento. As respostas, quantidade de CAF presente no percolado, foram determinadas por HPLC-DAD utilizando o método descrito no tópico 4.3.1. Na Tabela 1 estão demonstrados os fatores e níveis experimentais considerados.

Tabela 1. Fatores estudados no planejamento fatorial completo 2^4 e seus níveis.

Fatores	Níveis	
	-1	1
1 pH da solução de carregamento	4	9
2 pH de condicionamento	4	9
3 Solvente de condicionamento	MET	ACN
4 Ordem de condicionamento	H ₂ O + Solvente	Solvente + H ₂ O

A solução de carregamento foi feita diluindo uma solução concentrada de CAF ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) em MET com auxílio de um balão volumétrico até a concentração de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O ajuste de pH foi realizado com gotas de solução $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de HCl ou NaOH ao MET. Devido ao uso de um solvente orgânico para esta solução, decidiu-se utilizar fitas de pH em vez do pHmetro para aferir o pH. A concentração de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para a solução de carregamento foi escolhida para os estudos de otimização levando em consideração a capacidade adsortiva (Q) do HMIP utilizado de modo a não saturar os cartuchos.

Para a etapa de condicionamento, que foi composta de uma etapa de equilíbrio e uma etapa de ativação, foram utilizadas soluções aquosas de HCl (pH 4) e NaOH (pH 9), também feitas a partir de soluções concentradas.

Após escolhidos os fatores e os níveis, foi montada a tabela codificada de experimentos (Tabela 2) a partir dos valores atribuídos na Tabela 1. Visto que se trata de um planejamento fatorial 2^4 , foram necessários 16 experimentos para avaliar as influências de cada fator no sistema.

Tabela 2. Matriz codificada de experimentos.

Experimento	Fatores			
	1	2	3	4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1

Esses experimentos foram realizados em duplicata e de maneira aleatória, de modo a diminuir a ocorrência de erros sistemáticos, com o seguinte procedimento: (i) adicionou-se 3,0 mL de solvente para equilíbrio da fase seguido de 3,0 mL de solvente para a ativação da fase (etapa de condicionamento); (ii) percolou-se 3,0 mL de solução

1,0 mg L⁻¹ de CAF com o pH ajustado (Tabela 1) que foi coletado em um tubo de ensaio e colocado em um pré concentrador para que o MET fosse completamente evaporado. Após a evaporação, foi adicionado 1,0 mL de água Milli-Q e a solução foi transferida para um vial âmbar para análise no HPLC. O condicionamento e carregamento do cartucho foram feitos utilizando vazões de 1,0 mL·min⁻¹ e 0,7 mL·min⁻¹, respectivamente. Após cada experimento, para a reutilização do cartucho, este foi lavado com 5,0 mL de MET a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹, em seguida centrifugado a uma velocidade de 4000 rpm por 10 minutos e, por fim, levado à estufa por 20 minutos à 80 °C para garantir a secagem total.

A concentração de CAF na fase líquida foi calculada a partir da área do seu respectivo pico no tempo de retenção de 8,6 min e esse valor foi aplicado na equação 1 para de obter a porcentagem de CAF extraída em cada experimento.

$$\frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \%$$

Equação 3. Cálculo de porcentagem de retenção de CAF. Em que Ci=concentração antes da MISPE e Cf=concentração depois da MISPE.

Para os estudos estatísticos, optou-se por utilizar a porcentagem extraída como resposta para que a interpretação dos resultados fosse mais intuitiva, sendo que quanto maior o valor da resposta, melhor o resultado. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado a partir da utilização do *software Statistica* versão 7.0.

4.7. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE CATINONAS APREENDIDAS

Esse estudo foi realizado no laboratório do Instituto de Criminalística do PCDF com comprimidos apreendidos que apresentavam um perfil de fragmentação condizente com diferentes catinonas. Foram disponibilizadas 3 amostras de diferentes aspectos e provenientes de diferentes apreensões realizadas no período de 2018 e 2020. Para o preparo dessas amostras foram pesados 100 mg de comprimido macerado em microtubos Eppendorf de 1,5 mL e, por fim, adicionado 1,0 mL de MET. A mistura foi agitada por 3 min à 3000 rpm no Vortex e colocado no banho ultrassônico por 10 min e, então, centrifugada por 3 min. Uma alíquota de 200,0 µL do sobrenadante foi adicionada à um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com MET pH 9, alcalinizado com uma solução 1 mol·L⁻¹ de hidróxido de sódio. Essas soluções foram percoladas pelo cartucho de MISPE previamente condicionado e foram

analisadas, antes e após a MISPE, no HPLC-UV e no CG-MS utilizando os métodos descritos no item 4.4.

De modo a avaliar a seletividade do método desenvolvido, o mesmo procedimento de SPE foi feito utilizando o NIP como fase sólida.

4.8. APLICAÇÃO EM MATRIZ DISTINTA

Para avaliar a aplicação da MISPE em diferentes matrizes foi feito um estudo aplicando a MISPE em uma amostra de comprimidos apreendidos pela PCDF em que havia sido identificada a presença de CAF. O preparo de amostra foi feito da mesma maneira que os comprimidos de catinonas indicado no item 4.6. Foi realizada, então, a extração da CAF aplicando o método da MISPE otimizado anteriormente e o percolado foi analisado no HPLC-UV de acordo com o método descrito no item 1.4. Esse procedimento foi realizado em triplicata e a recuperação foi calculada a partir da área do pico referente à CAF.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDOS UV-VIS

5.1.1. ESTUDOS DE ADSORÇÃO

De modo a determinar se o processo de impressão molecular foi efetivo durante a síntese realizada, foram feitos estudos de adsorção com HMIP e o NIP deixando-os com contato com uma solução de CAF $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ por 1h sob agitação constante. Após os testes o sobrenadante foi analisado no UV-VIS e com a concentração final foi calculada a capacidade adsortiva do HMIP e NIP e o fator de impressão, esses valores se encontram na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da capacidade adsotiva do HMIP (Q_{HMIP}), do NIP (Q_{NIP}) e fator de impressão (FI).

Q_{HMIP}	Q_{NIP}	FI
$2,87 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,15$	$2,17 \pm 0,24$

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o processo de foi efetivo, visto que o HMIP adsorve aproximadamente 2,2 vezes mais que o NIP. Os valores de capacidade adsortiva e fator de impressão são menores que os indicados no trabalho de Casarin (2020), porém isso é devido ao tempo em que o HMIP ficou em contato com a solução de CAF visto que o tempo necessário para o sistema entrar em equilíbrio é de 3h.

5.1.2. ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO

A princípio, de modo a tornar as análises mais simples para realizar o planejamento fatorial, decidiu-se utilizar o UV-VIS para obter as respostas para os experimentos realizados no planejamento fatorial. Dessa forma, a solução de carregamento foi analisada no UV-VIS após a passagem pelo cartucho condicionado e a concentração foi calculada utilizando a curva analítica descrita no item 4.2.

Porém, após a realização de todos os experimentos, foi observado que os taxas de retenção ficaram muito baixos e, em um dos casos, apresentou um valor negativo (Tabela 4).

Tabela 4. Tabela de experimentos codificada com resultados do planejamento fatorial realizado no UV-VIS.

Experimento	Fatores				Taxa de retenção (%)
	pH de carregamento	pH de condicionamento	Solvente	Ordem	
1	-1	-1	-1	-1	25,3
2	+1	-1	-1	-1	19,4
3	-1	+1	-1	-1	30,4
4	+1	+1	-1	-1	30,6
5	-1	-1	+1	-1	-3,7
6	+1	-1	+1	-1	9,0
7	-1	+1	+1	-1	16,2
8	+1	+1	+1	-1	4,3
9	-1	-1	-1	+1	18,8
10	+1	-1	-1	+1	24,6
11	-1	+1	-1	+1	22,9
12	+1	+1	-1	+1	20,2
13	-1	-1	+1	+1	12,6
14	+1	-1	+1	+1	19,7
15	-1	+1	+1	+1	21,2
16	+1	+1	+1	+1	22,2

Visto que o HMIP é naturalmente adsorvente e é específico para a CAF, decidiu-se investigar a possibilidade de lixiviação do cartucho. Assim, foi percolado 3,0 mL de metanol pelo cartucho limpo e analisado no UV-VIS. O resultado obtido indicou a presença de um composto que possui comprimento de onda de máxima absorção em 210 nm, com uma largura de banda que compreende um pouco o comprimento de onda da CAF em 272 nm (Figura 9). Isso pode ocasionar em um cálculo de concentração de CAF maior que o real, já que ela não é o único composto presente na amostra que absorve no comprimento de onda 272 nm.

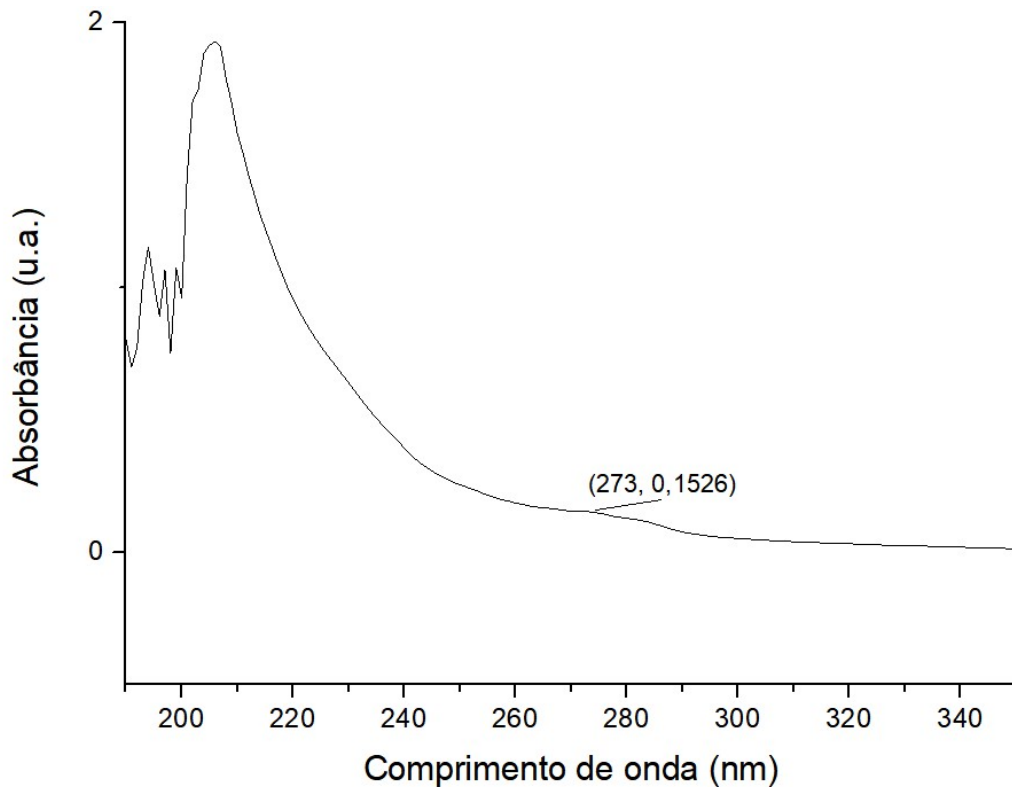


Figura 9. Espectro obtido na análise do metanol percolado pelo cartucho limpo com o valor de absorvância obtido no comprimento de onda de 272 nm, que é utilizado para quantificar a CAF.

O percolado foi também analisado no HPLC-UV utilizando o método descrito no item 4.3.1. A partir do cromatograma (Figura 10) foi possível confirmar que algum composto do MIP estava sendo extraído do cartucho durante a percolação da solução de carregamento. A presença desse composto resulta em um valor de concentração calculado de CAF maior que o real, visto que o valor de absorvância não seria referente apenas à CAF. Consequentemente, não seria possível calcular a taxa de retenção real do experimento, o que comprometeria o resultado do planejamento fatorial e quaisquer otimizações posteriores. Dessa forma, decidiu-se repetir os experimentos de planejamento fatorial utilizando o HPLC-UV para obter as respostas dos experimentos do planejamento fatorial.

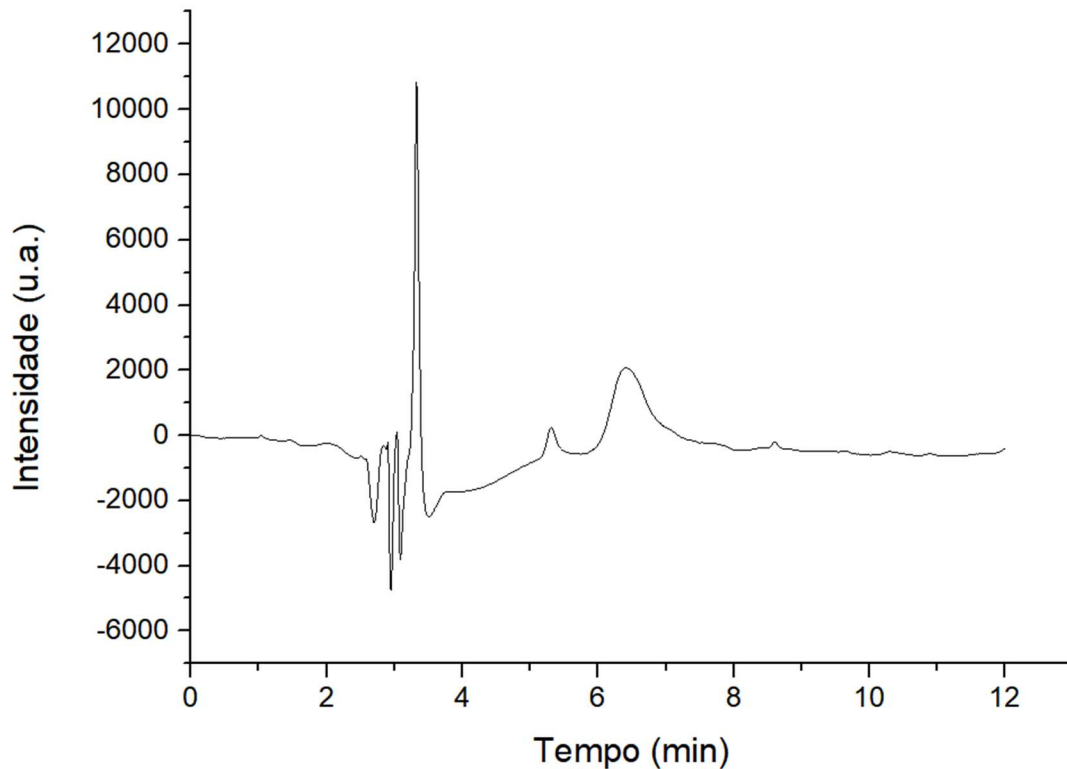


Figura 10. Cromatograma do metanol percolado pelo cartucho limpo.

5.2. PLANEJAMENTO FATORIAL

Os resultados da triagem (Figura 11) mostram que os fatores: (4) ordem do condicionamento e (1) pH de carregamento influenciaram significativamente a retenção de CAF no cartucho. A interação entre (1) e (4) também foi significativa, confirmando a necessidade da realização de uma otimização multivariada para o estudo da SPE, já que uma otimização univariada não seria capaz de considerar a interdependência dos fatores.

Pode-se observar também que, apesar de não ter sido considerado significativo, o fator (3), solvente de condicionamento, apresentou um valor de p próximo a 0,05, o que demonstra uma influência na resposta que deve ser investigada. Dessa forma, decidiu-se repetir os experimentos para conhecer melhor a relação entre os fatores significativos e a porcentagem de CAF extraída.

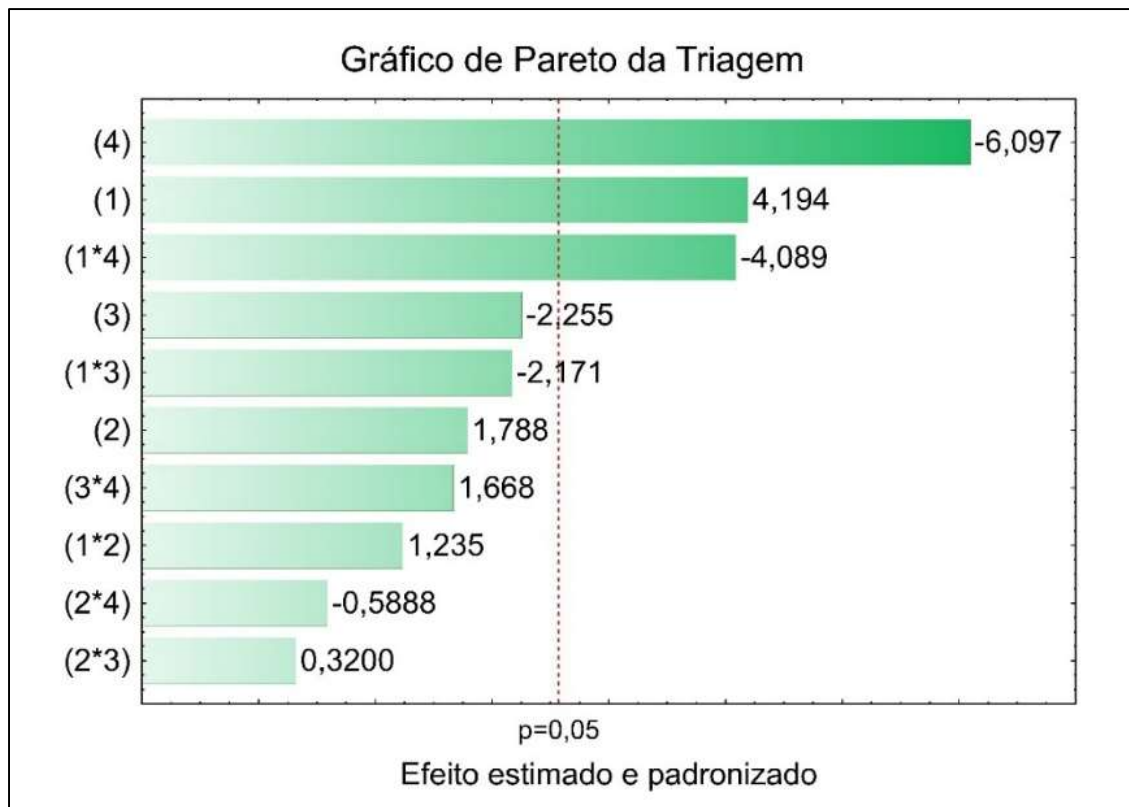


Figura 11. Gráfico de Pareto da triagem dos fatores: (1) pH de carregamento; (2) pH de condicionamento; (3) solvente de condicionamento; (4) ordem de condicionamento; e (x*y) interação entre fatores.

A matriz de experimentos codificada desse planejamento fatorial 2^4 completo junto com a média das respostas obtidas para cada um encontra-se na Tabela 5. Analisando os resultados obtidos, pode-se perceber o efeito causado pelas diferentes combinações dos fatores na resposta, com valores variando de 40 até 89%.

Tabela 5. Matriz codificada do planejamento fatorial com o valor médio das respostas.

Experimento	Fatores				Retenção média (%)
	pH de carregamento	pH de condicionamento	Solvente	Ordem	
1	-1	-1	-1	-1	53,5
2	+1	-1	-1	-1	82,0
3	-1	+1	-1	-1	52,2
4	+1	+1	-1	-1	88,8
5	-1	-1	+1	-1	49,6
6	+1	-1	+1	-1	54,4
7	-1	+1	+1	-1	51,9
8	+1	+1	+1	-1	76,1
9	-1	-1	-1	+1	41,1
10	+1	-1	-1	+1	45,8
11	-1	+1	-1	+1	49,1
12	+1	+1	-1	+1	51,5
13	-1	-1	+1	+1	47,9
14	+1	-1	+1	+1	40,9
15	-1	+1	+1	+1	44,6
16	+1	+1	+1	+1	44,9

Após a realização dos experimentos, foram calculados os efeitos de cada fator para um nível de 95% de confiança. A partir dessa análise, pode-se verificar que todos os fatores estudados apresentaram influência significativa na resposta assim como algumas interações secundárias. Com o gráfico de Pareto representado na Figura 12, é possível visualizar a influência de cada fator com relação aos outros fatores estudados.

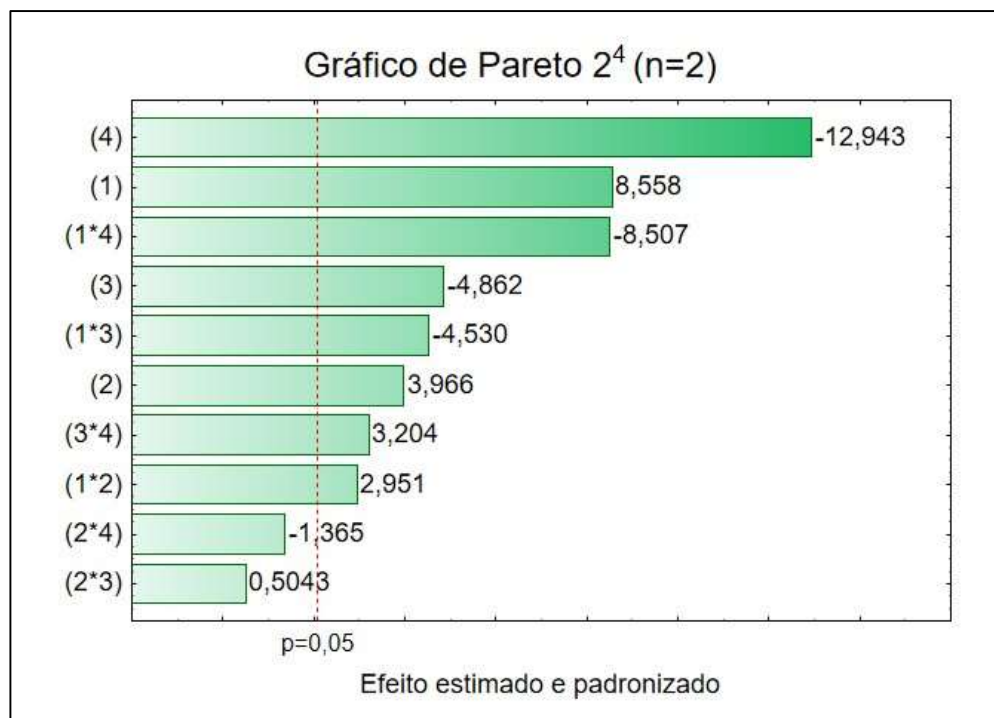


Figura 12. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2⁴ com replicata (n=2) dos fatores: (1) pH de carregamento; (2) pH de condicionamento; (3) solvente de condicionamento; (4) ordem de condicionamento; e (x*y) interação entre fatores.

Novamente os fatores que apresentaram maior efeito na resposta foram o (4), no nível baixo (-), e (1), no nível alto (+). Ou seja, utilização de MET na etapa de equilíbrio para o condicionamento do cartucho e pH 9 na solução de carregamento. A partir deste estudo também foi possível identificar a influência do fator (3), solvente, na resposta em seu nível baixo (-) e a sua interação binária com a ordem de condicionamento (34) no nível superior (+). Ainda se verificou que o fator (2), pH de condicionamento, apresentou uma influência no aumento da retenção de CAF no seu nível superior (+). Assim, analisando os dados, pode-se determinar que o procedimento que garante uma maior retenção de CAF no HMIP durante a SPE consiste no condicionamento do cartucho com 3,0 mL de água deionizada pH 9 seguido de 3,0 mL de MET e o carregamento com a solução de CAF em MET em pH 9.

A influência do pH de condicionamento e da natureza do solvente utilizado na retenção de CAF durante o procedimento da SPE se dá pelo fato de que o condicionamento ativa os sítios de interação, deslocando o equilíbrio para a adsorção da CAF pela fase sólida.

O pH da solução de carregamento está diretamente relacionado com a estrutura molecular de CAF e, conseqüentemente, com sua interação com as fases⁴⁸. Estudos de extração realizados por Vandepoosele *et. al.* (2021) demonstraram que o pH influencia diretamente na quantidade e seletividade da extração da CAF, concluindo que o meio alcalino torna a CAF mais propícia para interações do tipo ligação hidrogênio⁴⁹. Essa conclusão é corroborada por um estudo computacional feito por Wang *et. al.* (2022) que verifica que, em solução, a CAF existe como uma mistura de duas formas moleculares, protonada (HCAF⁺) e desprotonada (CAF)⁴⁸.

De acordo com Wang e colaboradores (2022)⁴⁸, essas duas formas se encontram em solução, em pH < 5 sendo predominante a forma HCAF⁺ e em pH > 5, a forma CAF. Porém, a partir do pH 8, observa-se em solução apenas a forma CAF, o que explica sua maior retenção no HMIP em pH 9. O meio alcalino na solução de carregamento faz com que toda a CAF presente esteja na sua forma desprotonada, o que a torna mais propícia para realizar ligações do tipo hidrogênio, tipo de interação esperada entre CAF e o HMIP. Isso condiz com o valor de pKa da CAF que é de 8,3, o que demonstra que em soluções de pH < 8 ela se encontra na sua forma neutra^{50,51}.

Diante dos resultados obtidos com a análise no planejamento fatorial 2⁴, os fatores quantitativos, (3) e (4), foram definidos e, para melhor entendimento de suas influências na resposta, decidiu-se realizar uma análise apenas desses fatores. Isso foi feito fixando o nível inferior nos fatores (3) solvente e (4) ordem de condicionamento e excluindo suas respectivas colunas na matriz codificada. Com isso, foram excluídos os experimentos em que esses fatores teriam sido analisados em seus níveis superiores. Esse procedimento resultou em uma nova matriz codificada consistindo apenas dos 4 primeiros experimentos presentes na Tabela 2 que representa uma matriz referente a um planejamento fatorial completo 2² (Tabela 6).

Tabela 6. Matriz codificada planejamento 2².

Experimento	Fatores		Retenção média (%)
	pH de carregamento	pH de condicionamento	
1	-1	-1	53,5
2	+1	-1	82,0
3	-1	+1	52,2
4	+1	+1	88,8

Foram analisados, então, apenas este conjunto de dados para verificar de forma mais aprofundada o efeito do pH nas etapas de condicionamento e carregamento na retenção de CAF. Novamente, foram calculados os efeitos de cada fator assim como a sua interação binária (12) (tabela 7).

Tabela 7. Valores dos efeitos dos fatores estudados no planejamento fatorial 2².

Fatores	Efeito	Desvio padrão	Nível p	R ²
Média/Interação	69,13	0,5199	0,000000	0,99602
(1) pH de carregamento	32,54	1,040	0,000006	
(2) pH de condicionamento	2,694	1,040	0,060593	
Interação 1 com 2	4,053	1,040	0,017564	

A partir dessa nova análise é possível constatar que o fator (1) pH de condicionamento no nível superior apresenta grande influência, confirmando o resultado da análise realizada no primeiro conjunto de dados. Esse resultado também era esperado visto que o pH alcalino influencia o deslocamento da CAF para a fase sólida como discutido anteriormente. Porém, contrário à análise anterior, a variável 2 não apresentou efeito significativo para um nível de 95% na retenção. Em contrapartida, a sua relação com o fator 1 foi significativa, mostrando que os dois fatores combinados em seus níveis superiores (ambas as soluções em pH 9) contribuíram para o aumento da retenção de CAF. Além disso, o seu valor de p, enquanto maior que 0,05, se apresenta muito próximo, a 0,06.

Por meio do gráfico de Pareto representado na figura 13, fica nítida a influência do pH de carregamento na retenção de CAF durante o procedimento da MISPE e a sua interação com o pH de condicionamento no nível positivo. Esses resultados indicam que o ajuste para o pH 9 na solução de condicionamento e de carregamento propiciam a retenção de CAF no cartucho. Isso pode ser devido à influência do pH alcalino no deslocamento do equilíbrio para a interação da CAF com o HMIP discutida na análise anterior.

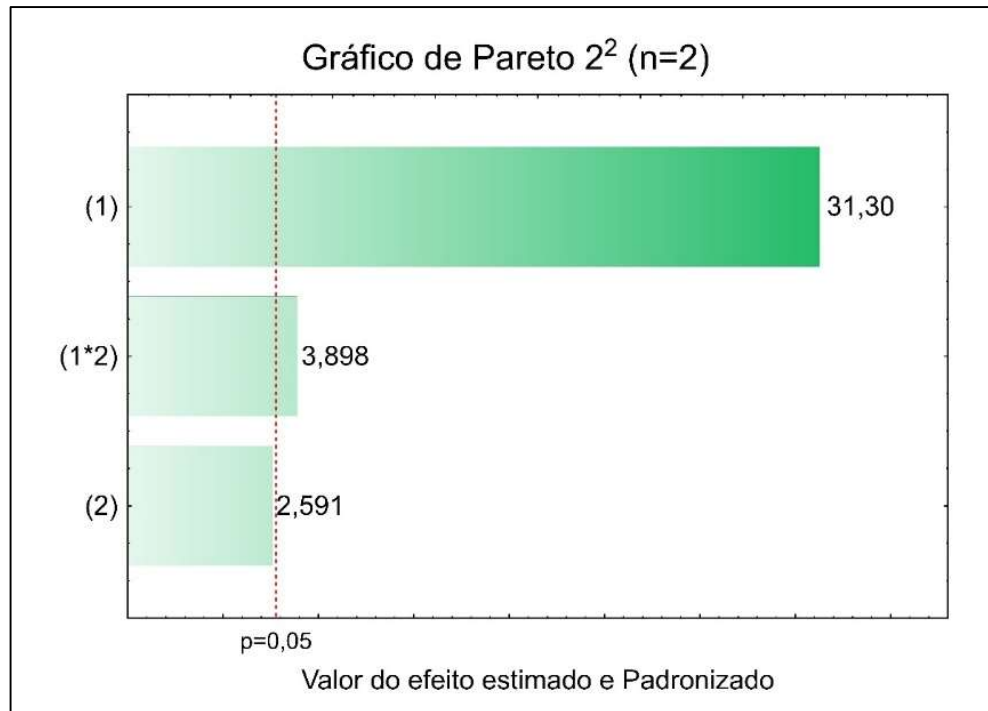


Figura 13. Gráfico de Pareto do estudo fatorial 2² com replicata (n=2) dos fatores: (1) pH de carregamento; (2) pH de condicionamento; e (x*y) interação entre fatores.

Visto que nesta análise todos os fatores estudados foram quantitativos, foi construído uma superfície de resposta (Figura 14), onde foi possível verificar que a resposta aumenta com o aumento dos níveis, tanto do fator 1 quanto do fator 2. Ou seja, quanto maior o pH das soluções de carregamento e condicionamento, maior a porcentagem de CAF retida no cartucho, corroborando os resultados da análise anterior. Observando a superfície, percebe-se que o ponto ótimo não foi atingido e este se encontra, provavelmente, em uma região de pH mais elevado.

Poderiam ser realizados outros estudos, como um planejamento evolucionário (EVOP) para refino dos resultados e otimização da MISPE, porém aumentar mais o pH das soluções poderia prejudicar a integridade do HMIP, visto que este apresenta dióxido de silício na sua matriz. Tendo essa limitação prática em vista e levando em consideração que foram alcançadas porcentagens de retenção satisfatórias para o objetivo do trabalho, foi decidido encerrar os estudos e definir como procedimento de MISPE: condicionamento do cartucho com água deionizada pH 9 seguida de MET e carregamento com solução de CAF em MET pH 9.

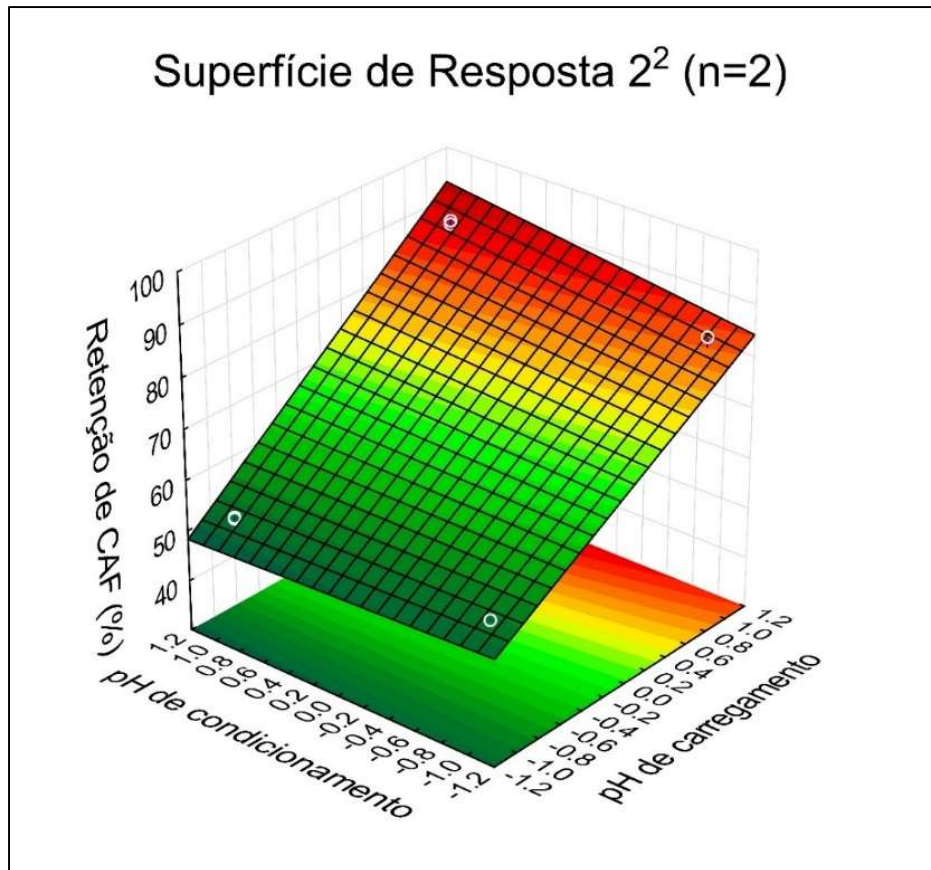


Figura 14. Superfície de resposta para os fatores estudados.

5.3. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS APREENDIDAS DE CATINONAS

As amostras foram primeiramente analisadas no CG-MS utilizando o método descrito no item 4.3.2 para que fosse determinada a sua composição e tivesse uma ideia da quantidade de CAF presente. Os cromatogramas obtidos para cada amostra

e espectros de massa referentes aos picos encontram-se nas Figuras 13 e 14 e composição de cada amostra encontra-se na Tabela 8.

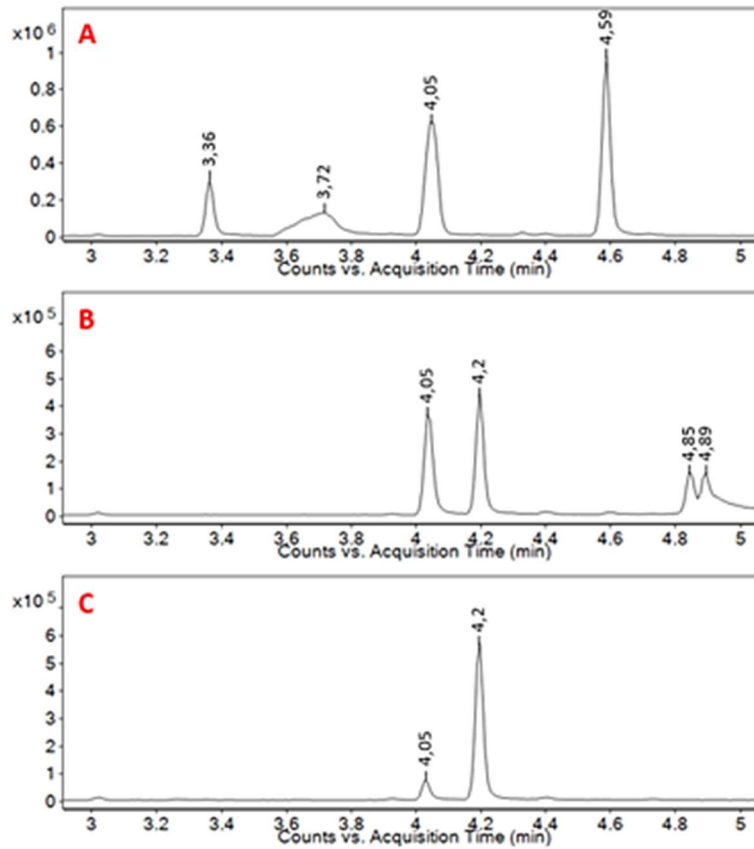


Figura 15. Cromatogramas do CG-MS das amostras A, B e C com os tempos referentes à cada pico.

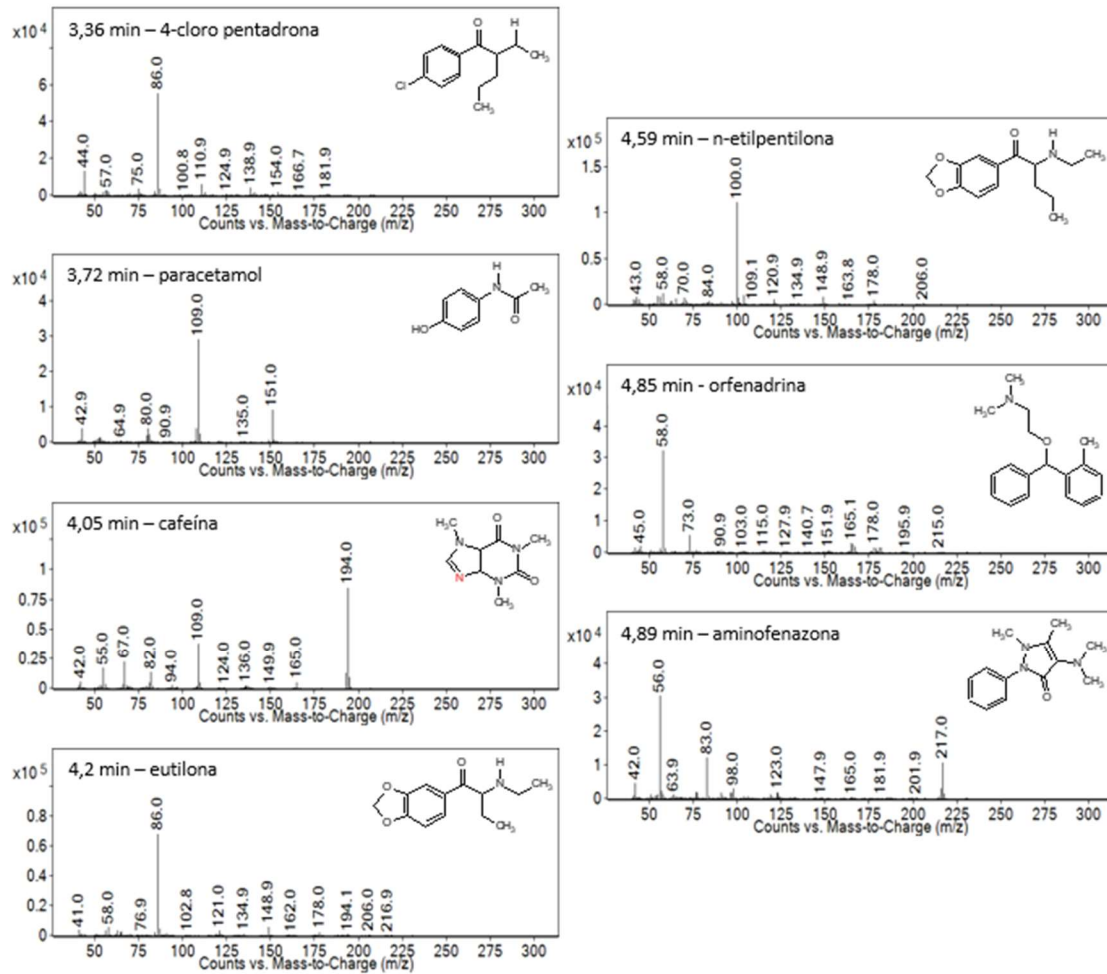


Figura 16. Espectros de massas referentes aos picos indicados na Figura 13.

Tabela 8. Componentes majoritários de cada amostra por ordem de aparecimento no cromatograma.

Amostras	Componentes majoritários
A	4-cloropentadrona, paracetamol, CAF, n-etilpentilona
B	CAF, eutilona, orfenadrina, aminopirina
C	CAF, eutilona

Por meio dos cromatogramas e espectros de massas, pode-se observar que as amostras apresentam diferentes composições tendo em comum a presença de CAF. A amostra A contém duas catinonas sintéticas distintas: a 4-cloro pentadrona

(3,36 min) e a n-etilpentilona (4,59 min), já as amostras B e C contêm eutilona (4,2 min).

Para determinar a quantidade de CAF que foi retirada das amostras após a aplicação da MISPE e da NISPE, estas foram analisadas utilizando o método de HPLC-UV indicado no item 4.3.1. A partir dos cromatogramas contidos na Figura 15, foi calculada a taxa de retenção de CAF por meio da área do pico com tempo de retenção de 8,6 min, esses valores médios de retenção encontram-se na Tabela 9.

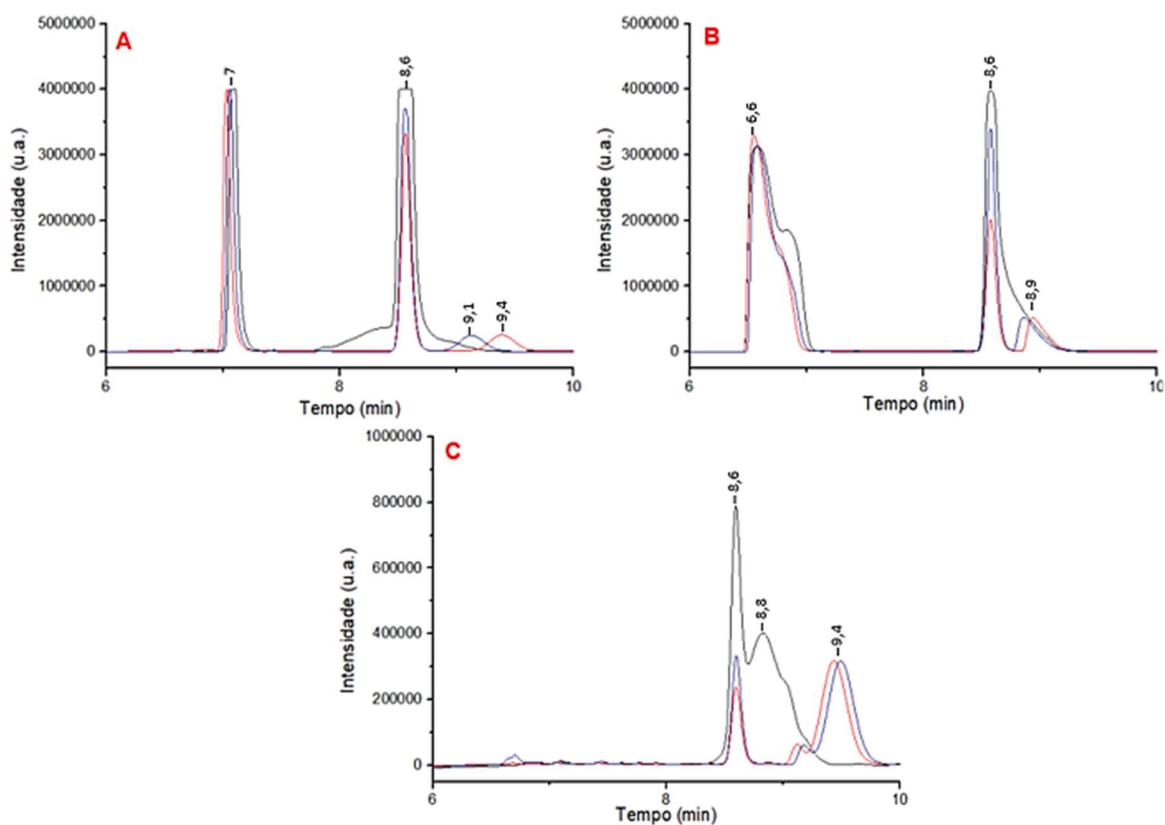


Figura 17. Cromatogramas obtidos no HPLC-UV das amostras A, B e C antes da extração (preto), após a MISPE (vermelho) e após a NISPE (azul) e os tempos de retenção de cada pico.

Tabela 9. Taxas de retenção médias \pm desvio padrão obtidas na MISPE e na NISPE para as amostras apreendidas.

Amostra	Taxa de retenção média (%)	
	MISPE	NISPE
1	65,01 \pm 0,03	56,95 \pm 2,23
2	74,21 \pm 0,25	53,17 \pm 1,31
3	83,54 \pm 0,35	65,14 \pm 5,04

Com relação aos cromatogramas da Figura 15 pode-se observar que, para todas as amostras, a MISPE apresentou uma diminuição maior do pico em 8,6 min em comparação com a NISPE, o que era esperado devido aos sítios de interação específicos à CAF presentes no HMIP. A partir dos resultados quantitativos apresentados na Tabela 6, observa-se que a MISPE apresentou valores altos de retenção, sendo capaz de reduzir em até 84% a quantidade de CAF na amostra 3. Pode-se aferir também que a taxa de retenção diminuiu com o aumento da complexidade da amostra.

Essa alta porcentagem de retenção pode ser devida à presença dos sítios interações específicas presentes na matriz do HMIP. Analisando o esquema de adsorção proposto por Casarin (2020)¹¹ contido na figura 16, pode-se observar que a CAF se liga ao HMIP por meio de interações químicas do tipo ligação de hidrogênio. O fato de essas interações serem dessa natureza também é o que permite a reutilização dos cartuchos, isso porque tais interações são fortes o suficiente para retirar a CAF do meio líquido, mas não fortes o suficiente para que possam ser quebradas e a CAF possa ser retirada da matriz.

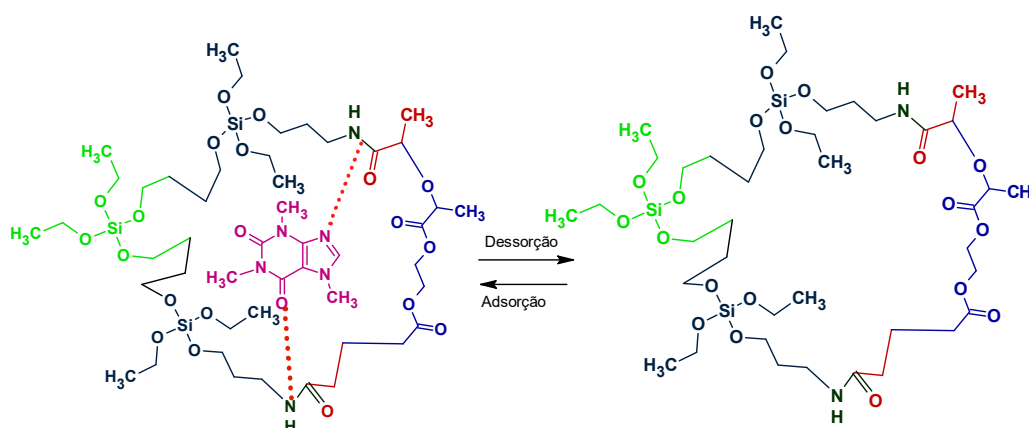


Figura 18. Interações entre CAF e o HMIP adaptado de Casarin, 2020¹¹.

No entanto, a NISPE também foi capaz de adsorver CAF, o que é esperado por se tratar de um material adsorvente, e o fator de impressão médio obtidos para essas amostras foi de 1,3. Esse valor de fator de impressão foi menor que o observado nos estudos de adsorção provavelmente devido ao menor tempo de interação entre a amostra e a fase sólida. Outra razão pode ser as condições aplicadas no cartucho que podem estar favorecendo mais a adsorção por meio de interações com sítios não específicos, o que pode ser confirmado pela diminuição do pico da CAT, que aparece logo após do pico da CAF, em todas as amostras que ocorreu aproximadamente na mesma proporção para a MISPE e para a NISPE.

Por meio desses resultados pode-se afirmar que o método proposto foi eficaz para o *clean-up* das amostras permitindo a redução da interferência de CAF na identificação de novas CAT. Além disso, ele apresentou um baixo coeficiente de variação, o que demonstra que os cartuchos utilizados são reprodutíveis e podem ser reutilizados sem grande perda de capacidade adsorvente. Isso permite que a MISPE possa ser realizada mais de uma vez, dependendo da complexidade da matriz, para que uma quantidade maior de CAF seja retirada.

Esses sítios de interação específicas do material em conjunto com as condições da MISPE resultaram em um procedimento capaz de retirar CAF em amostras com matriz extremamente complexa. Isso indica que a aplicação do planejamento fatorial no estudo desse sistema foi eficaz para o desenvolvimento de um procedimento de *clean-up*, visto que foi possível determinar as condições de condicionamento e carregamento do cartucho em que o processo de adsorção de CAF é favorecido.

5.4. APLICAÇÃO EM MATRIZ DIFERENTE

Visto que a CAF está presente como adulterante em outras drogas do tipo estimulante, decidiu-se estudar a sua aplicação em uma matriz diferente para investigar se o método poderia ser utilizado para o preparo de diferentes amostras. Para isso foi utilizado uma amostra de comprimido apreendido que apresentava CAF em sua composição. A taxa de retenção foi calculada assim como nas amostras de CAT, a partir dos cromatogramas obtidos no HPLC-UV (Figura 17)

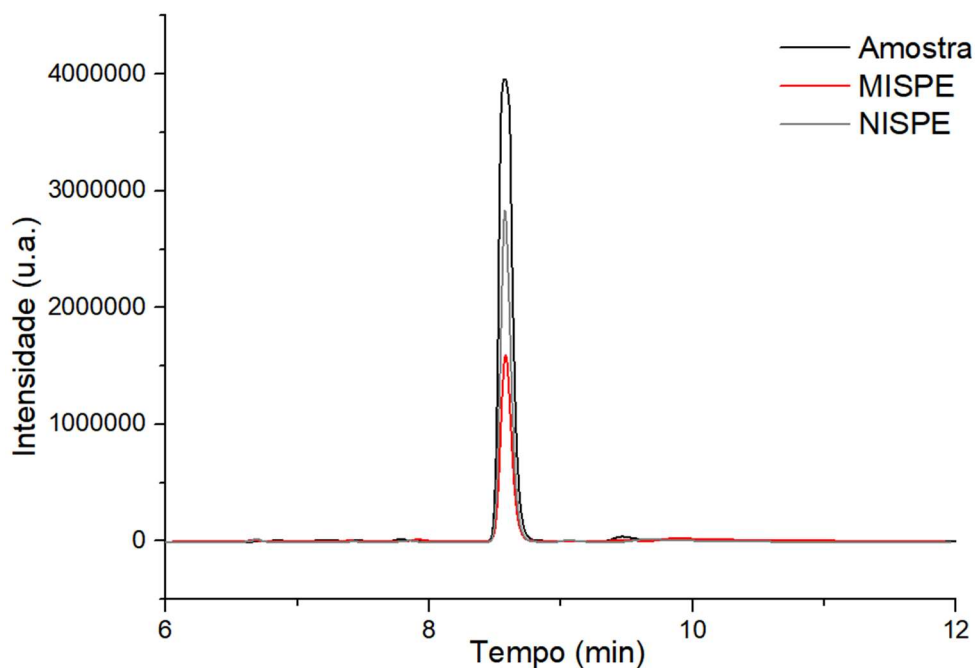


Figura 19. Cromatogramas da amostra e comprimido no HPLC-UV antes (preto) e após a aplicação da MISPE (vermelho) e NISPE (cinza).

A porcentagem de retenção obtida após aplicação da MISPE foi de 67% e da NISPE foi de 43%. Esses resultados confirmam o que foi discutido no item 5.3, indicando que o procedimento pode ser aplicado em diferentes tipos de matriz. Novamente a MISPE retirou mais CAF que NISPE, porém numa proporção que indica que o procedimento pode estar favorecendo mais as interações não específicas do que os sítios de ligação específicos. Entretanto, o resultado demonstra que a MISPE é mais seletiva à CAF devido aos pontos de ligação específicos presentes no HMIP utilizado. E, novamente, foi possível aplicar o procedimento mais de uma vez sem ocasionar na perda de amostra e sem grande perda da capacidade adsortiva do cartucho.

Os resultados obtidos mostram que o procedimento de *clean-up* pode ser aplicado em diferentes amostras. Indicando que a aplicação da MISPE não é restrita a amostras de CAT e, dessa forma, pode ser utilizado para o preparo de outras drogas que apresentem adulteração por CAF.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi desenvolvido um método de extração em fase sólida utilizando um HMIP de CAF por meio de planejamento de experimentos com o objetivo de extrair CAF de amostras de comprimidos de CAT apreendidos pela PCDF. Foi possível, por meio da realização de um planejamento fatorial completo, identificar quais fatores tiveram mais influência na extração da CAF. A otimização multivariada foi eficaz tendo em vista a existência de interdependência dos fatores estudados e, dessa forma, foi possível delimitar quais as melhores condições para a realização do método MISPE.

Dessa forma, a MISPE desenvolvida foi capaz de realizar um *clean-up* das amostras de CAT apreendidas utilizando um pequeno volume de solvente, o que é uma vantagem em comparação à extração líquido-líquido geralmente utilizada. Foi possível também realizar o procedimento mais de uma vez sem perda de material e reutilizar os cartuchos, diminuindo o custo do procedimento e conferindo uma vantagem à utilização de cartuchos comerciais.

O procedimento desenvolvido apresenta o potencial de ser inserido na rotina do Laboratório de Análises da PCDF visto que foi possível observar a diminuição da concentração de CAF no método utilizado para a identificação de novas drogas apreendidas.

Como perspectiva futura, pode-se realizar outros estudos de otimização utilizando como resposta também a taxa de retenção de CAT, de modo que melhore a seletividade do método favorecendo as interações específicas com a CAF.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valente, M. J.; Guedes De Pinho, P.; De Lourdes Bastos, M.; Carvalho, F.; Carvalho, M. ;*Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 15.
2. Khullar, V.; Jain, A.; Sattari, M. ;*J. Gen. Intern. Med.* **2014**, *29*, 1200.
3. Cole, C.; Jones, L.; McVeigh, J.; Kicman, A.; Syed, Q.; Bellis, M. ;*Drug Test. Anal.* **2011**, *3*, 89.
4. Prieto, J. P.; Galvalisi, M.; López-Hill, X.; Meikle, M. N.; Abin-Carriquiry, J. A.; Scorza, C. ;*Am. J. Addict.* **2015**, *24*, 475.
5. Kanai, K.; Takekawa, K.; Kumamoto, T.; Ishikawa, T.; Ohmori, T. ;*Forensic Toxicol.* **2008**, *26*, 6.
6. dos Santos, N. A.; Macrino, C. J.; Allochio Filho, J. F.; Gonçalves, F. F.; Almeida, C. M.; Agostini, F.; Guizolfi, T.; Moura, S.; Lacerda, V.; Filgueiras, P. R.; Ortiz, R. S.; Romão, W. ;*J. Mass Spectrom.* **2020**, *55*, 1.
7. Ozkantar, N.; Yilmaz, E.; Soylak, M.; Tuzen, M. ;*Food Chem.* **2020**, *321*, 126737.
8. Jankovics, P.; Váradi, A.; Tölgyesi, L.; Lohner, S.; Németh-Palotás, J.; Koszegi-Szalai, H. ;*Forensic Sci. Int.* **2011**, *210*, 213.
9. Jardim, I. C. S. F. In *Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos*; LTC: Rio de Janeiro, 2015; pp. 62–78.
10. Junior, C. S. N.; Borges, keyller B. In *Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos*; LTC: Rio de Janeiro, 2015; pp. 9–14.
11. Casarin, F. Desenvolvimento de fases sólidas molecularmente impressas para amostragem e extração de cafeína em matrizes de águas naturais, Universidade de Brasília, 2020.
12. Kubo, T.; Otsuka, K. ;*J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *130*, 68.
13. Szatkowska, P.; Koba, M.; Koslinski, P.; Szablewski, M. ;*Mini. Rev. Org. Chem.* **2013**, *10*, 400.

14. Leardi, R. ;*Anal. Chim. Acta* **2009**, 652, 161.
15. Neto, B. B.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S. *Como Fazer Experimentos: aplicações na ciência e na indústria*; 4th ed.; Bookman, 2010.
16. Oliveira, M. A. L. de; Porto, B. L. S.; Vaz, F. A. S.; Sato, R. T. In *Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos*; LTC: Rio de Janeiro, 2015; pp. 19–27.
17. Riley, A. L.; Nelson, K. H.; To, P.; López-Arnau, R.; Xu, P.; Wang, D.; Wang, Y.; Shen, H. wei; Kuhn, D. M.; Angoa-Perez, M.; Anneken, J. H.; Muskiewicz, D.; Hall, F. S. ;*Neurosci. Biobehav. Rev.* **2020**, 110, 150.
18. (ANVISA), A. N. de V. S.; ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária **2017**, 33.
19. German, C. L.; Fleckenstein, A. E.; Hanson, G. R. ;*Life Sci.* **2014**, 97, 2.
20. Pentilona, N. **2020**, 2020.
21. Gaspar, H.; Bronze, S.; Oliveira, C.; Victor, B. L.; Machuqueiro, M.; Pacheco, R.; Caldeira, M. J.; Santos, S. ;*Forensic Sci. Int.* **2018**, 290, 146.
22. United Nations office on drugs and crime *World Drug Report 2020 (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6)*.; 2020.
23. da Costa Silva, R. G.; Augusto, F. ;*J. Chromatogr. A* **2006**, 1114, 216.
24. Moein, M. M.; Javanbakht, M.; Karimi, M.; Akbari-Adergani, B. ;*Talanta* **2015**, 134, 340.
25. Ettore, F. J.; Arantes, L. C.; Salum, L. B.; Caldas, E. D. ;*J. Chromatogr. A* **2020**, 1634.
26. Rasanen, I.; Kyber, M.; Szilvay, I.; Rintatalo, J.; Ojanperä, I. ;*Forensic Sci. Int.* **2014**, 237, 119.
27. Gambaro, V.; Casagni, E.; Dell'Acqua, L.; Roda, G.; Tamborini, L.; Visconti, G. L.; Demartin, F. ;*Forensic Toxicol.* **2016**, 34, 174.
28. Machado, Y.; Coelho Neto, J.; Barbosa, P. E. N.; Lordeiro, R. A.; Alves, R. B. ;*Forensic Sci. Int.* **2017**, 275, 302.

29. Cheng, J. Y. K.; Chan, M. F.; Chan, T. W.; Hung, M. Y. ;*Forensic Sci. Int.* **2006**, 87.
30. Borges, K. B.; Pereira, A. C.; Mano, V. In *Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos*; LTC: Rio de Janeiro, 2015; pp. 1–8.
31. Dourado, C. S.; Dr^a, P.; Cristi, A.; Dias, B. Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises por injeção sequencial Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises, Universidade de Brasília, 2016.
32. Zarejousheghani, M.; Schrader, S.; Möder, M.; Lorenz, P.; Borsdorf, H. ;*J. Chromatogr. A* **2015**, 1411, 23.
33. SPIVAK, D. ;*Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 1779.
34. Santos, M. G.; Figueiredo, E. C. In *Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos*; LTC: Rio de Janeiro, 2015; pp. 88–95.
35. Zhao, S.; Yang, X.; Zhao, H.; Dong, A.; Wang, J.; Zhang, M.; Huang, W. ;*Talanta* **2015**, 144, 717.
36. Pauling, L. *A Theory of the Formation of Antibodies* 2643 [Contribution from the Gates A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies*]; 1940.
37. Dourado, C. S. ;*Tese Doutorado, Univ. Brasília* **2019**.
38. Braga, L. R.; Rosa, A. A.; Dias, A. C. B. ;*Anal. Methods* **2014**, 6, 4029.
39. Dourado, C. S.; Casarin, F.; Braga, J. W. B.; Machado, F.; Dias, A. C. B. ;*J. Polym. Res.* **2021**, 28, 1.
40. Casarin, F.; Dourado, C. S.; Sousa, L. S.; Grassi, M. T.; Dias, A. C. B. ;*J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, 32, 1789.
41. Ferreira, J. B.; de Jesus Macrino, C.; Dinali, L. A. F.; Filho, J. F. A.; Silva, C. F.; Borges, K. B.; Romão, W. ;*Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, 413, 6013.
42. Tamayo, F. G.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A. ;*J. Chromatogr. A* **2007**, 1152, 32.
43. Ricardo Teixeira Tarley, C.; Antonio Cajamarca Suquila, F.; Casarin, J.; Celso

- Gonçalves Junior, A.; Gava Segatelli, M. ;*Food Chem.* **2021**, *334*, 127345.
44. Decaestecker, T. N.; Lambert, W. E.; Van Peteghem, C. H.; Deforce, D.; Van Bocxlaer, J. F. ;*J. Chromatogr. A* **2004**, *1056*, 57.
45. Marrubini, G.; Dugheri, S.; Cappelli, G.; Arcangeli, G.; Mucci, N.; Appelblad, P.; Melzi, C.; Speltini, A. ;*Anal. Chim. Acta* **2020**, *1119*, 77.
46. Dourado, C. S.; Domingues, I. F. F.; de Oliveira Magalhães, L.; Casarin, F.; Ribeiro, M. L.; Braga, J. W. B.; Dias, A. C. B. ;*Food Chem.* **2022**, *367*.
47. Filho, E. R. P. *Planejamento fatorial em química*; 1st ed.; EdUfSCar: São Carlos, 2015.
48. Wang, X.; Zhang, H.; Wei, Y.; Bao, L.; Liu, S.; Yuan, S.; Yuan, S. ;*Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2022**, *644*, 128864.
49. Vandepoosele, A.; Draye, M.; Piot, C.; Chatel, G. ;*Clean Technol.* **2021**, *3*, 335.
50. Francoeur, M.; Ferino-Pérez, A.; Yacou, C.; Jean-Marius, C.; Emmanuel, E.; Chérémond, Y.; Jauregui-Haza, U.; Gaspard, S. ;*J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9*.
51. Quesada, H. B.; de Araújo, T. P.; Cusioli, L. F.; de Barros, M. A. S. D.; Gomes, R. G.; Bergamasco, R. ;*Chem. Eng. Res. Des.* **2022**, *184*, 1.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE
DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 03 de julho de 2023.

Assinatura do/a discente:  _____

Programa: Programa de Pós-graduação em Química _____

Nome completo: Izabella Fernanda Ferreira Domingues _____

Título do Trabalho: Extração de cafeína por Polímero Molecularmente

Impresso para clean-up de amostras de catinonas sintéticas _____

Nível: (X) Mestrado () Doutorado

Orientador/a: Ana Cristi Basile Dias _____