

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química

Cálita Elis Schweigert

**Aplicação da espectrometria de massa de alta resolução na triagem de 2897
compostos em leite materno**

Porto Alegre
2023

Cálita Elis Schweigert

**Aplicação da espectrometria de massa de alta resolução na triagem de 2897
compostos em leite materno**

Trabalho de conclusão de curso como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Química do Instituto de Química
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul.

Orientador
Dr. Alexsandro Dallegrave

Coorientadora
Profa. Dra. Carla Sirtori

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Schweigert, Cálita Elis

Aplicação da espectrometria de massa de alta resolução na triagem de 2897 compostos em leite materno / Cálita Elis Schweigert. -- 2023.

70 f.

Orientador: Alessandro Dallegrave.

Coorientadora: Carla Sirtori.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Bacharelado em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. UHPLC-QTOF MS. 2. base de dados. 3. triagem. 4. identificação. 5. leite materno. I. Dallegrave, Alessandro, orient. II. Sirtori, Carla, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cálita Elis Schweigert

Aplicação da espectrometria de massa de alta resolução na triagem de 2897 compostos em leite materno

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharelado em Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Alessandro Dallegrave

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Sirtori

Aprovada em: Porto Alegre, 29 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Alessandro Dallegrave - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Nome e titulação do orientador

Instituição do orientador

Dra. Carla Sirtori - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Nome e titulação da coorientador

Instituição da coorientador

Dra. Raquel Wielens Becker - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Nome e titulação do membro da banca

Instituição do membro da banca

Dra. Jessie Sobieski da Costa - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Nome e titulação do membro da banca

Instituição do membro da banca

A meus pais dedico essa conquista, pois sem o apoio de vocês com certeza eu não chegaria tão longe. Muito obrigada por todo empenho e dedicação na busca de me conceder as melhores oportunidades na vida, vocês conseguiram! Sua filha está se formando em uma das melhores universidades do país.

Agradeço a Deus pela saúde, a meus pai Ilton Schweigert que sempre buscou me dar os melhores conselhos, minha mãe Teresinha Schneider Schweigert por ser um exemplo de mulher forte, trabalhadora que me ensinou a não desistir dos nossos sonhos!

Meu muito obrigado ao meu amor Leonardo Oliveira dos Santos, meu parceiro, minha dupla de vida e de aula que inúmeras vezes teve que me acordar sábado de manhã me convencendo carinhosamente que tínhamos que ir pra aula por mais gelada que fosse a manhã, por me ensinar a ser perseverante mesmo nos momentos mais difíceis, por estar do meu lado nos momentos bons e nos que não são tão bons também.

Agradeço ao professor Leonel Correa Junior que me mostrou como a química é encantadora ainda no ensino médio, me incentivando a conhecer melhor essa área incrível da ciência. A professora Glaucia Endres que no técnico me apoiou e me ensinou a ser uma excelente analítica, com todas suas dicas e disciplina.

Meus agradecimentos a todos que fazem ou já fizeram parte do GMAPS por me acompanharem em toda caminhada na graduação não só academicamente, mas também psico e emocionalmente, vocês foram muito importantes pra mim! Obrigada a Dra. Elizabeth Cuervo Lumbaque que me recebeu no início da graduação compartilhando seus conhecimentos e trabalho comigo, a Dra. Raquel Wielens Becker por dedicar seu tempo a me instruir inúmeras vezes me apoiando e me aconselhando. Agradeço em especial a professora Dra. Carla Sirtori me acolheu no grupo se tornando referência de professora dedicada, empenhada com a produção acadêmica, e também com seus alunos.

Agradeço de coração ao meu orientador Dr. Alessandro Dallegrove por compartilhar seus conhecimentos de espectrometria de massas, mas não só isso, por ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

Meu muito obrigada a todos que contribuíram com minha jornada de desenvolvimento, nunca vou esquecer vocês.

Aqui se encerra um ciclo e ter a companhia de vocês ao longo dele o tornou mais especial e essa gratidão é difícil transformar em palavras.

RESUMO

A amamentação com leite materno nos primeiros meses de vida do recém-nascido é fundamental para o desenvolvimento dele, pois é a base de sua alimentação, é por meio desse que o recém-nascido recebe os nutrientes necessários para o seu crescimento. Sabendo da importância do aleitamento materno torna-se essencial estudarmos como o leite materno é afetado pelos hábitos da mãe, tendo em vista a enorme quantidade de compostos químicos que fazem parte da rotina da sociedade atual, que vai desde medicamentos de uso esporádico como de uso contínuo podendo ser controlados ou não, além de agrotóxicos e até compostos industriais. Nesse trabalho, foi utilizada a técnica de cromatografia a líquido de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução com analisador de massa híbrido quadrupolo/tempo de voo (do inglês, UHPLC-QTOF MS) para realizar a triagem de diferentes compostos químicos no leite materno. Foram analisadas amostras de 50 diferentes mães que participaram do estudo IVAPSA (Impacto de Diferentes Ambientes Intrauterinos e Perinatais no Crescimento e Desenvolvimento Infantil nos Primeiros Seis Meses de Vida) que foi realizado em três hospitais públicos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Este estudo realizou a triagem de 2897 compostos, e a aplicação da metodologia proposta permitiu evidenciar a presença, como suspeitos, de 20 compostos em modo de ionização positivo dentre eles fármacos e metabólitos de fármacos, compostos industriais e naturais. Também foi confeccionado um procedimento operacional padrão digital para auxiliar e facilitar o tratamento de dados mediante o uso de UHPLC-QTOF MS.

Palavras-chave: UHPLC-QTOF MS; base de dados; triagem; identificação; leite materno.

ABSTRACT

Breastfeeding with breast milk in the first months of a newborn's life is essential for its development, as it is the basis of its nutrition, it is through this that the newborn receives the nutrients necessary for its growth. Knowing the importance of breastfeeding, it becomes essential to study how breast milk is affected by the mother's habits, in view of the enormous amount of chemical compounds that are part of the routine of today's society, ranging from sporadic and can be controlled or not, in addition to pesticides and even industrial compounds. In this work, the ultra-performance liquid chromatography technique coupled with high-resolution mass spectrometry with a hybrid quadrupole/time-of-flight mass analyzer (UHPLC-QTOF MS) was used to screen different chemical compounds in the breast milk. Samples from 50 different mothers who participated in the IVAPSA study (Impact of Different Intrauterine and Perinatal Environments on Child Growth and Development in the First Six Months of Life) which was carried out in three public hospitals in the city of Porto Alegre, Rio Grande do South, were analyzed. Brazil. This study carried out the screening of 2897 compounds, and the application of the proposed methodology allowed to evidence the presence, as suspects, of 20 compounds in positive ionization mode, among them drugs and drug metabolites, industrial and natural compounds. A digital standard operating procedure was also created to help and facilitate data processing through the use of UHPLC-QTOF MS.

Keywords: UHPLC-QTOF MS; data base; screening; identification; breast milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Corte longitudinal do equipamento QTOF-MS indicando a fonte ESI, o quadrupolo e seus modos de operação (MS, MS/MS e *bbCID*), a célula de colisão e seus modos de operação (MS, MS/MS e *bbCID*) e por fim o TOF. 17
- Figura 2 - Resultados obtidos via software *Compass Isotopo Pattern* para o analito cafeína, demonstrando o *m/z* correspondente ao modo de ionização positivo. 28
- Figura 3 - Principais Informações que devem ser fornecidas para o processamento de dados empregando o software QuantAnalysis, dos quais se destacam o nome (do inglês *name*) do composto, o *m/z* e o tempo de retenção (do inglês *Retention time*) em min. 29
- Figura 4 – *Print* do software QuantAnalysis após o processamento do método do desenvolvido, apresentando o analito escolhido (acetaminofeno) o pico que foi integrado em cada amostra, a área do pico integrado, o tempo de retenção suspeito correspondente a este pico e o espectro de massa referente ao mesmo. 32
- Figura 5 – Figura 5 – *Print* do software QuantAnalysis para o composto acetaminofeno com as áreas de picos revisados pelo analista, destacadas em azul. 33
- Figura 6 – Cromatograma do acetaminofeno na amostra 1042. 34
- Figura 7 – Na parte superior consta o espectro de massas em baixa energia e na parte inferior o *bbCID* do acetaminofeno na amostra 1042. 35
- Figura 8 – Fragmentos característicos do acetaminofeno retirados do MassBank para o sistema LC-ESI-QTOF; MS2; utilizando CE: 30 eV; R=35000; [M+H]⁺ 35
- Figura 9 – Na ordem em que aparecem, cromatograma de íon extraído para o íon fórmula do acetaminofeno (*m/z* 152.0706) seguido pelos cromatogramas de íons extraídos dos fragmentos mais intensos (*m/z* 134.0599 e *m/z* 110.0602). 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>bbCID</i>	<i>broadband collision induced dissociation</i>
ESI	ionização por eletrospray (do inglês <i>Eletronspray Ionization</i>)
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução (do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
IQ	Instituto de Química
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MS	Espectrometria de massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
POPd	Procedimento operacional padrão digital
ppm	Partes por milhão
QqQ	Triplo quadrupolo (do inglês <i>Triple Quadrupole</i>)
QTOF	Quadrupolo - tempo de voo (do inglês <i>Quadrupole – Time Of Flight</i>)
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro (do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>)
RDB	Equivalente em duplas ligações (do inglês <i>Ring Double Bonds</i>)
TOF	Tempo de Voo (do inglês <i>Time Of Flight</i>)
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UHPLC	Cromatografia a líquido de ultraeficiência (do inglês <i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i>)
UHPLC-QTOF MS	Cromatografia a líquido de ultraeficiência acoplada ao espectrômetro de massa híbrido quadrupolo e tempo de voo (do inglês <i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography - quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>)
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância (do inglês <i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 LEITE MATERNO	15
3.2 UHPLC-QTOF MS.....	16
3.3 APLICAÇÃO DE TRIAGEM MEDIANTE O USO DE UHPLC-QTOF MS	17
3.4 ANÁLISES RETROSPECTIVAS	19
3.5 PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO E BANCO DE ESPECTROS DE MASSAS.....	19
3.6 METABÓLITOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	20
3.7 COMPOSTOS SINTÉTICOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	20
3.7.1 Marcadores de tabagismo	21
3.8 COMPOSTOS NATURAIS	21
3.8.1 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs):	22
3.8.2 Ácidos graxos trans	22
3.8.3 Aminoácidos essenciais	22
3.8.4 Vitaminas	23
3.8.5 Xantinas	23
3.8.5.1 Cafeína.....	24
3.8.5.2 Teobromina	24
3.8.5.3 Teofilina.....	25
4 METODOLOGIA	26
4.1 PREPARO DE AMOSTRAS.....	26
4.2 ANÁLISE INSTRUMENTAL: UHPLC-QTOF MS.....	26
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
4.4 ELABORAÇÃO DA BASE DE DADOS ESPECIALMENTE CONSTRUÍDA	28
4.5 AUTOMAÇÃO NO PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	29
4.6 ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DIGITAL (POPD) PARA PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	30
5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	31
5.1 DESENVOLVIMENTO DA BASE DE DADOS	31

5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	31
5.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS SUSPEITOS.....	34
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE A – ESQUEMA DO PREPARO DE AMOSTRA REALIZADO UTILIZANDO A METODOLOGIA QUECHERS.....	45
APÊNDICE B – BASE DE DADOS COM AS PRINCIPAIS INFORMAÇÕES DOS 80 ANALITOS MONITORADOS EM LEITE MATERNO	46
APÊNDICE C — CÁLCULO DE RDB/ REGRA DA LIGAÇÃO DUPLA/ DEFICIÊNCIA DE HIDROGÊNIO (IDH).....	48
APÊNDICE D – DADOS DOS 20 COMPOSTOS SUSPEITOS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O leite materno é a base da alimentação dos recém-nascidos e é por meio dele que estes recebem os nutrientes necessários para o seu crescimento sendo assim fundamental para o desenvolvimento dos mesmos. É o principal alimento nos primeiros seis meses de vida, tendo sua importância amplamente reconhecida pela comunidade médica e científica devido aos inúmeros benefícios que proporciona ao desenvolvimento físico, cognitivo e imunológico da criança.

Além de ser uma fonte de nutrientes essenciais para o bebê, fornecendo uma combinação perfeita de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais, todos na proporção adequada para atender às necessidades nutricionais específicas do lactente em cada fase do crescimento a composição do leite materno está diretamente relacionada à alimentação da mãe. A mulher que amamenta deve ter uma dieta equilibrada e saudável, rica em nutrientes, como cálcio, ferro, zinco, vitaminas A, C, D e E, entre outros, a fim de garantir a produção de um leite materno de composição adequada ao lactante. A ingestão insuficiente desses nutrientes pode afetar negativamente a quantidade e a qualidade do leite produzido.

Com isso, é de extrema importância estudar como o leite materno é afetado pelos hábitos da mãe, tendo em vista a enorme quantidade compostos químicos que fazem parte da rotina da sociedade, dentre estes, podemos citar: medicamentos, agrotóxicos e demais compostos industriais. Assim, a triagem destes compostos no leite materno é de suma importância, sendo o objeto de estudo do presente trabalho.

A técnica instrumental de cromatografia a líquido de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução com analisador de massa híbrido quadrupolo/tempo de voo (do inglês, UHPLC-QTOF MS) é uma das ferramentas mais modernas e indicadas para viabilizar a identificação de compostos através de triagem, em amostras complexas como o leite materno. Essa técnica permite a análise precisa de compostos em misturas complexas e proporciona informações sobre a massa exata dos compostos e de seus íons fragmentos além de informações sobre o perfil isotópico e potencial fórmula molecular associada ao analito de interesse e de seus íons fragmento. Tais dados provêm o analista com informações extremamente relevantes que podem possibilitar a identificação dos compostos presentes, através

do tratamento dos resultados obtidos com o auxílio de base de dados e softwares específicos.

Uma base de dados é uma coleção digital que contém informações detalhadas sobre uma ampla variedade de compostos químicos. Estas informações são cruciais para identificar as substâncias em amostras complexas quando analisadas usando o sistema UHPLC-QTOF MS. Tendo em vista a vasta gama de possíveis compostos presentes na amostra, o uso de uma base de dados extensa, seguido de sua automação via softwares específicos, se torna uma metodologia eficiente e segura para analisar amostras de leite materno.

O software TargetAnalysis compara os dados obtidos experimentalmente (massa exata, padrões de fragmentação, etc.) com a base de dados utilizada como referencial. Assim, o software permite identificar a presença de íons com a relação de m/z (massa/carga) exata (tolerância de 5 ppm de erro), com a base de dados, então o software sugere a identificação do analito mediante uma possível fórmula, além do RDB e usando como critérios valores de erros de massa abaixo de 5 ppm. A confirmação pode ser reforçada pelos dados de fragmentação associados sempre com o tempo de retenção. Nesse contexto para confirmar um analito via triagem é obrigatório dispor de seu padrão analítico.

O emprego de uma triagem auxilia o analista a ter uma ideia dos potenciais analitos presentes na amostra. Com isso, ela guia o desenvolvimento de métodos dirigidos e focados na quantificação.

Por fim, a correlação dos hábitos maternos, com a composição e qualidade do leite, destacando a presença ou não de compostos químicos sintéticos, é de suma importância e tem proporcionado avanços significativos na pesquisa sobre a exposição de bebês a diferentes substâncias através da amamentação. Essa abordagem analítica pode ser aplicada em estudos de monitoramento da presença de medicamentos, contaminantes emergente de interesse e até mesmo drogas ilícitas no leite materno, ajudando a compreender melhor os potenciais riscos à saúde infantil e auxiliando na formulação de políticas de saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é utilizar a espectrometria de massa de alta resolução para analisar, na forma de triagem, agrotóxicos, fármacos e compostos industriais em leite materno.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização de uma base de dados especialmente construída contendo agrotóxicos, fármacos e compostos industriais a partir de bases de dados públicas.
- Aplicação da base de dados especialmente construída, na triagem de uma ampla gama de analitos, em amostras de leite materno.
- Elaboração de um procedimento operacional padrão digital (POPd) para padronizar e viabilizar a triagem mediante uso de UHPLC-QTOF MS empregando o processamento de dados focado na triagem.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITE MATERNO

Considerado a principal fonte de nutrição nos primeiros meses de vida, o leite materno, este é amplamente reconhecido como o alimento ideal para promover o desenvolvimento infantil. O leite materno é composto por uma complexa mistura de nutrientes, substâncias bioativas e componentes imunológicos que são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e proteção do bebê, dentre elas: proteínas, gorduras, carboidratos, além de vitaminas e minerais, dos quais se destacam as vitaminas A e D, ferro e cálcio fundamentais no crescimento infantil. Através do aleitamento, o recém-nascido tem acesso a anticorpos e imunoglobulinas, responsáveis por fortalecer o sistema imunológico do bebê, protegendo contra possíveis infecções (HORTA; VICTORA; ORGANIZATION 2013; SECTION ON BREASTFEEDING, 2005).

O ato do aleitamento, não é apenas necessário por fornecer os nutrientes adequados aos recém-nascidos, como também é fator responsável por aumentar o vínculo emocional da mãe com o bebê, fornecendo maior qualidade de vida e facilitando o desenvolvimento cognitivo do recém-nascido (CLARK *et al.*, 2006; HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015; PEÑACOBÁ; CATALA, 2019).

Cabe destacar que o ato da sucção durante a amamentação contribui para o desenvolvimento adequado da cavidade oral, palato e oclusão dentária (CLARK *et al.*, 2006). Apesar da existência de substitutos artificiais, nenhum deles se equipara aos benefícios do leite materno, tornando-o a escolha preferencial para a nutrição dos lactentes, além de ser a fonte natural e acessível de nutrição, o que contribui para a sustentabilidade e economia familiar.

Evidenciando essas razões, as organizações da área da saúde, tais como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), incentivam a amamentação exclusiva nos primeiros seis meses de vida do bebê (DOS SANTOS *et al.*, 2018; ORGANIZATION; UNICEF, 2003).

3.2 UHPLC-QTOF MS

A cromatografia a líquido de ultraeficiência, é um método utilizado para separar os componentes de uma amostra com base na polaridade de cada composto e sua afinidade com a fase estacionária e fase móvel, resultando em diferentes tempos de retenção e permitindo a separação em constituintes individuais (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011).

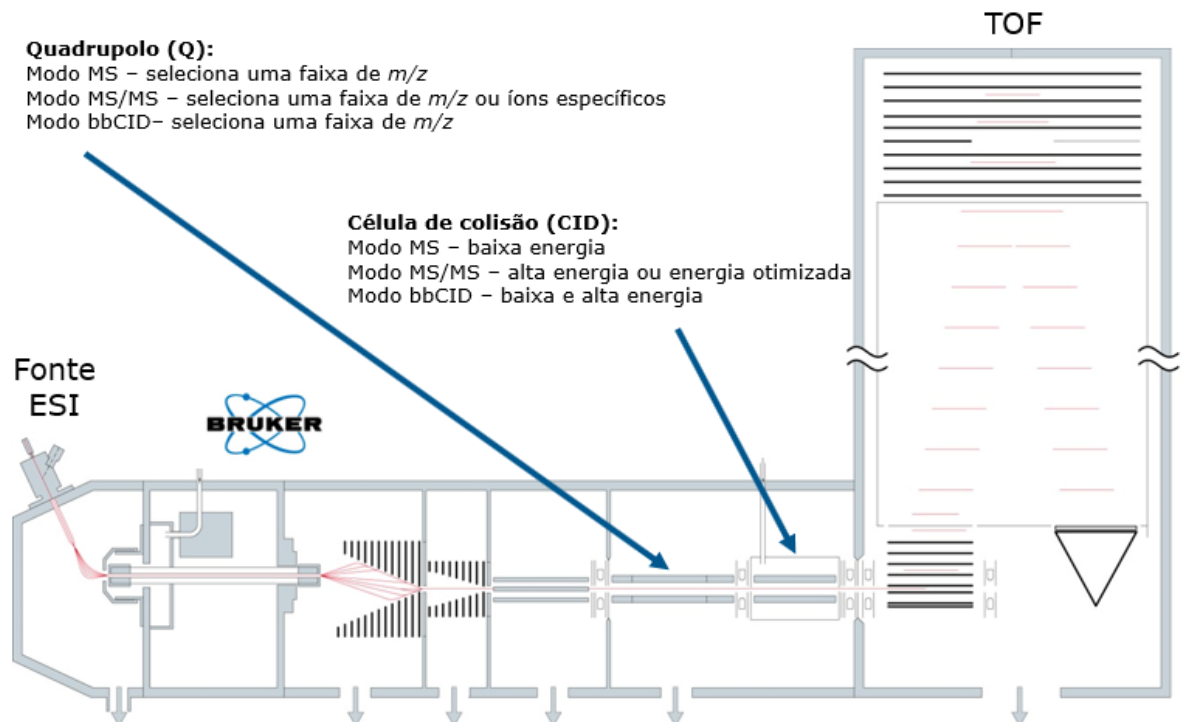
O que difere a cromatografia a líquido de ultraeficiência da cromatografia convencional é o seu sistema de bombas que toleram altas pressões e são capazes de operar com colunas cromatográficas com partículas de fase estacionárias menores que 3 μm , dimensões reduzidas em relação às convencionais. Essas colunas são operadas em altas pressões por meio de equipamentos especializados, trazendo vantagens como análises mais rápidas, maior resolução e sensibilidade além da economia de fase móvel (BOIX *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

A análise por espectrometria de massa (MS) aumenta a sensibilidade e especificidade da análise, fornecendo informações estruturais detalhadas por meio dos modos de aquisição de dados. A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) é especialmente útil na identificação de compostos desconhecidos, pois permite e facilita a busca seletiva com base na massa exata dos íons moleculares e fragmentos, assim como fornece informações sobre o perfil isotópico. Além disso, possibilita análises qualitativas e quantitativas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O sistema híbrido QTOF (quadrupolo - tempo de voo) substitui o terceiro quadrupolo do analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ) por um analisador de tempo de voo (TOF); permitindo análises em modo MS e MS/MS com exatidão de massa, informação que o sistema QqQ não é capaz de gerar. No modo MS, uma faixa de massa/carga ou íons selecionados são direcionados sem fragmentação para o TOF, que os separa com base na relação m/z . No modo MS/MS, íons precursores ou uma faixa de m/z são fragmentados na célula de colisão e os fragmentos são separados pelo TOF (TUZIMSKI; SHERMA, 2015). No modo de operação *dd*CID, os modos MS e MS/MS ocorrem praticamente de forma simultânea. Na célula de colisão são empregadas baixas energias para aquisição do modo MS e altas energias para aquisição do modo MS/MS. Este modo de operação é capaz de fornecer informações

dos íons moleculares e de seus fragmentos na mesma análise. Na Figura 1 é possível observar os três modos de aquisição.

Figura 1 - Corte longitudinal do equipamento QTOF-MS indicando a fonte ESI, o quadrupolo e seus modos de operação (MS, MS/MS e *bbCID*), a célula de colisão e seus modos de operação (MS, MS/MS e *bbCID*) e por fim o TOF.



Fonte: adaptada da Bruker.com. (2023)

O sistema UHPLC-QTOF MS apresenta alta capacidade de triagem devido à separação aprimorada fornecida pelo UHPLC e à sensibilidade, resolução e exatidão de massa proporcionadas pelo analisador QTOF. Essa combinação é especialmente eficaz para a análise de amostras complexas, como é o caso do leite materno (FERRER; THURMAN, 2009).

3.3 APLICAÇÃO DE TRIAGEM MEDIANTE O USO DE UHPLC-QTOF MS

O emprego de metodologia de triagem na pesquisa envolvendo a identificação de compostos em amostras complexas geralmente é aplicada afim de obter os resultados de cunho qualitativo (há ou não há) de maneira mais rápida, barata e

prática, em geral, como etapa prévia à análise quantitativa. Geralmente os métodos de triagem utilizam sistemas de alta resolução como o TOF-MS e Orbitrap, ambos acoplados a sistemas cromatográficos. Na metodologia de triagem de compostos-alvo é necessário o uso de um banco de dados que contenham, pelo menos, o nome, a fórmula molecular e a massa exata de cada composto-alvo “buscado” na(s) amostra(s). Podendo ainda conter informações adicionais, como fragmentos, e tempo de retenção se houver padrão analítico disponível. Cabe destacar que o tempo de retenção é um parâmetro crucial para confirmar a presença dos compostos alvo.

A característica distintiva desta abordagem de triagem de suspeitos, em comparação com a análise de compostos alvo, é a não necessidade de ter padrões analíticos disponíveis previamente. Isso permite que a escolha dos analitos a serem investigados ocorra após a execução da triagem. Por outro lado, existe também a triagem de compostos desconhecidos. Nesse caso muitas vezes não se dispõe de quaisquer informações dos analitos e seus respectivos fragmentos (perfil de fragmentação) a serem buscados. Assim, fica inviabilizado, pelo menos em parte, o uso de bases de dados especialmente construídas nesse contexto. Nessa situação de triagem de desconhecidos, o desempenho cromatográfico, ou seja, a eficiência da separação prévia à análise de massas é essencial. Os compostos desconhecidos são “buscados” pico a pico no Cromatograma de Íons Totais e na sequência, no espectro de massas MS (com energia mais baixa) e, finalmente, o íon molecular e seus respectivos fragmentos são observados no espectro de massas obtido com energia mais alta (ou inclusive usando um intervalo crescente de energia para promover assim a fragmentação do íon molecular e obter um espectro de massas onde o perfil de fragmentação seja evidenciado. Ambos os espectros de massa são obtidos em uma única etapa na análise (BADE, 2016).

De posse dos dados obtidos, softwares avançados possibilitam identificar as respostas que correspondem aos critérios estabelecidos e selecionados pelo analista, permitindo assim classificar tais compostos como suspeitos. A checagem dos compostos em questão é realizada considerando a massa exata do íon molecular, além dos seus fragmentos específicos, ambos com margens de erro inferiores a 5 ppm, o RDB (equivalente em duplas ligações) e, se houver, a correspondência do padrão isotópico, a qual pode ampliar a confiabilidade da identificação de suspeitos (BADE, 2016).

3.4 ANÁLISES RETROSPECTIVAS

As análises retrospectivas usando UHPLC-QTOF MS permitem examinar e interpretar novamente dados coletados/analizados anteriormente, identificando compostos que não eram o objetivo principal no início da pesquisa, ou ainda, identificar compostos empregados em uma pesquisa com objetivos diferentes. Esta estratégia é altamente benéfica, devido à riqueza de informações nos dados coletados, que facilmente incluem detalhes sobre analitos que não foram foco de interesse em uma primeira análise (CARDOSO *et al.*, 2020).

Dessa forma, as análises retrospectivas em UHPLC-QTOF MS permitem que os pesquisadores maximizem as informações intrínsecas das amostras e, conseqüentemente, o valor dos dados adquiridos, fornecendo flexibilidade para investigar, confirmar (se houver aquisição posterior e padrão analítico) e qualificar uma ampla gama de compostos, mesmo após a análise de triagem inicial. Esta capacidade é uma das razões pelas quais as técnicas de espectrometria de massas de alta resolução, como o QTOF MS, são tão valiosas em diversas áreas de conhecimento (CARDOSO *et al.*, 2020).

3.5 PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO E BANCO DE ESPECTROS DE MASSAS

O perfil de fragmentação, também conhecido como espectro de fragmentação ou padrão de fragmentação, refere-se ao conjunto específico de íons produzidos quando uma molécula é quebrada ou fragmentada durante a análise por espectrometria de massas. A estrutura química de uma molécula e o sistema de ionização/fragmentação influenciam seu perfil de fragmentação. Analisando os íons gerados e suas proporções no espectro de massa de fragmentação, é possível discernir detalhes significativos sobre a “construção” da molécula em questão (BADE, 2016). De forma simplificada, pode-se pensar que os fragmentos corresponderiam às peças de um quebra-cabeça, enquanto a molécula do analito ionizada (íon molecular) corresponderia ao quebra-cabeça montado.

O banco de espectro ou biblioteca de espectros de massas é um repositório digital que reúne espectros de massas de moléculas identificadas previamente. Muitos destes bancos ou bibliotecas de espectros de massa são virtuais e públicos, com

acesso aberto e livre a qualquer usuário em qualquer local do mundo. Em cada registro dessa biblioteca, há detalhes sobre um composto em particular, englobando seu espectro de massas (seja um espectro de íons totais ou um perfil de fragmentação MS/MS), sua estrutura química, em alguns casos, informações sobre a origem ou o método usado para obter o espectro de massas. O que possibilita a comparação de um espectro de massas desconhecido com os espectros do banco, em que se pode identificar o composto com base em uma correspondência de espectro. Uma análise automatizada via softwares modernos pode comparar automaticamente muitos espectros de amostras, permitindo a identificação rápida de compostos em amostras complexas. Mesmo com a identificação automatizada há necessidade de uma verificação de resultados manualmente e individualmente para cada analito realizadas por um especialista, que verificará todos os parâmetros de checagem para a identificação dos analitos, conforme já citados anteriormente.

3.6 METABÓLITOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os metabólitos podem ser de origem endógena (produzidos dentro do corpo) ou exógena (derivados da transformação de substâncias que entram no corpo) (ROGAN; RAGAN, 2003). A identificação e quantificação de metabólitos em amostras biológicas fornecem informações valiosas sobre o funcionamento metabólico do organismo, a resposta a medicamentos ou a presença de doenças. O estudo dos metabólitos é crucial para entender o destino de compostos químicos sintéticos no corpo, e que consequências podem trazer ao indivíduo exposto a tal contaminação.

3.7 COMPOSTOS SINTÉTICOS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Compostos sintéticos são moléculas que não são produzidas naturalmente, são produzidos por meio de processos químicos em laboratório ou em escala industrial, que não são encontrados naturalmente em organismos vivos. Estes compostos podem entrar no corpo humano ou de animais por diversas vias, incluindo ingestão, inalação ou absorção dérmica. Por exemplo, drogas sintéticas, medicamentos, agrotóxicos e poluentes industriais (ABRAHAMS, 2002).

A detecção e quantificação de compostos sintéticos em amostras biológicas (como sangue, urina ou leite materno) são essenciais para entender a exposição, metabolismo, potencial de toxicidade e efeitos farmacológicos dessas substâncias no organismo. Por exemplo, crianças expostas a ftalatos por meio do leite materno podem apresentar alterações de crescimento e desenvolvimento, e aumentar a predisposição a alergias (ADENUGA *et al.*, 2020).

3.7.1 Marcadores de tabagismo

Os marcadores químicos de tabagismo são compostos que indicam a exposição ao tabaco, seja pela ativa inalação da fumaça do cigarro ou pela exposição passiva ao ambiente com fumaça. A detecção desses marcadores no corpo pode ajudar a confirmar o consumo de tabaco ou a exposição à sua fumaça. Eles são de grande importância em estudos epidemiológicos, pesquisas sobre os efeitos do tabagismo na saúde. O tabaco contém milhares de componentes químicos, e muitos deles podem ser transferidos para o leite materno, expondo o bebê a essas substâncias. O principal marcador de tabagismo é a cotinina (NAPIERALA *et al.*, 2016).

Cotinina: é o principal metabólito da nicotina e é considerada uma medida mais estável da exposição ao tabaco. No leite materno, a cotinina é um indicador confiável da exposição ao tabaco. Assim como a hidroxicotinina, a cotinina também pode ter uma concentração maior no leite do que no plasma (LAMBERS; CLARK, 1996).

3.8 COMPOSTOS NATURAIS

O leite materno é uma combinação complexa de nutrientes, substâncias bioativas e componentes imunológicos que são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e proteção do bebê. Cabe destacar que a diversidade na composição do mesmo desta ligada à dieta e ao estado nutricional da mãe (HORTA; VICTORA; ORGANIZATION, 2013; SECTION ON BREASTFEEDING, 2005).

É importante observar que o leite materno é um alimento altamente adaptativo. Além de fornecer nutrição, ele também oferece imunidade e outros benefícios para o

bebê, adaptando-se às necessidades do bebê e às condições ambientais. Dentre estes compostos, destacam-se os ácidos graxos, poli-insaturados (PUFAs), os ácidos graxos trans, os aminoácidos essenciais e as vitaminas (KEIKHA *et al.*, 2017).

3.8.1 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs):

Ácido linoleico (LA) (ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienóico) é um ácido graxo insaturado ômega-6 com 18 carbonos e duas insaturações. Faz parte dos ácidos graxos essenciais, o que significa que não podem ser sintetizados pelo corpo humano e, portanto, devem ser obtidos por meio da dieta (GIBSON; KNEEBONE, 1981).

Ácido araquidônico (AA) (ácido (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14,-tetraenóico) e ácido docosahexaenóico (sigla em inglês DHA), (Ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico) são ácidos graxos cruciais para o desenvolvimento neural e da retina no bebê (CARLSON, 2001).

3.8.2 Ácidos graxos trans

Palmitoleil etanolamida (PEA) é uma substância que pertence à classe das acilamidas e é naturalmente produzida no corpo como resposta a diferentes estímulos, como inflamação ou dor. Os estudos sobre PEA têm mostrado que este analito tem propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Devido a isso, a PEA é usada em alguns suplementos e medicamentos para tratar a dor e a inflamação (LAMBERT *et al.*, 2002).

3.8.3 Aminoácidos essenciais

Fenilalanina (ácido 2-amino-3-fenil-propanoico) é um dos aminoácidos essenciais ao ser humano, ou seja, não pode ser sintetizado pelo organismo humano e tem de ser adquirido através da dieta, pode ser encontrada no aspartame, um adoçante, substituto do açúcar e muito utilizado em bebidas, principalmente refrigerantes (KROGER; MEISTER; KAVA, 2006).

3.8.4 Vitaminas

Naturalmente há muitas vitaminas e minerais essenciais presentes no leite materno para o desenvolvimento do bebê. A vitamina B3 (incluindo a nicotinamida) é uma das vitaminas presentes no leite materno (DROR; ALLEN, 2018).

Nicotinamida, também conhecida como niacinamida, é uma das duas principais formas da vitamina B3 (a outra é o ácido nicotínico). A vitamina B3 é essencial para a saúde do corpo e tem um papel fundamental no metabolismo celular (SAUVE, 2008).

A mãe que tenha uma dieta equilibrada e saudável provavelmente fornecerá ao seu bebê a quantidade adequada de vitamina B3 através do leite materno. No entanto, em alguns casos, a suplementação pode ser recomendada para mães que apresentem deficiência dessa vitamina (ABE *et al.*, 2016).

3.8.5 Xantinas

As xantinas são um grupo de alcaloides que compreendem algumas das substâncias mais conhecidas e consumidas mundialmente, como a cafeína, a teofilina e a teobromina. Elas possuem atuação principalmente como estimulantes do sistema nervoso central. Após a ingestão, as xantinas são rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal e distribuídas pelo corpo. Elas podem ser encontradas em diversos fluidos biológicos, como sangue, urina e saliva (DEPAULA; FARAH, 2019).

Destaca-se que as xantinas podem ser transferidas para o leite materno após a ingestão pela mãe. O grau de transferência e a concentração dessas substâncias no leite materno dependem de vários fatores, incluindo a quantidade consumida, a frequência de consumo, o metabolismo da mãe e a composição do leite. Ao ser excretada no leite materno em pequenas quantidades, a ingestão excessiva de cafeína pela mãe pode levar a concentrações mais altas no leite, o que pode causar irritabilidade ou insônia no bebê (FRÍGULS *et al.*, 2010).

Por conseguinte, é recomendado que as mães lactantes limitem ou modifiquem a ingestão de produtos que contêm xantinas, principalmente cafeína, para evitar possíveis efeitos adversos ao bebê (FRÍGULS *et al.*, 2010). Nesse contexto, o estudo das xantinas é de interesse tanto do ponto de vista clínico quanto de pesquisa, dada

sua ampla presença em nossa dieta e medicamentos, bem como seus efeitos significativos no corpo humano, em especial para os recém-nascidos.

3.8.5.1 Cafeína

Dado o consumo generalizado de cafeína em muitas culturas, entender seus efeitos potenciais na saúde fetal e nos desfechos infantis é essencial. Essencialmente a cafeína, ou 1,3,7-trimetilxantina, faz parte do grupo das xantinas, encontrada em grãos de café, folhas de chá, sementes de cacau, guaraná e outras plantas, de forma natural, ou também sintetizada, e adicionada a bebidas, suplementos e medicamentos. A cafeína atua como estimulante no sistema nervoso central, aumentando o estado de alerta, reduzindo a fadiga e melhorando o desempenho cognitivo (ABALO, 2021; VAN DAM; HU; WILLETT, 2020).

Diferentes pesquisas têm investigado o efeito da ingestão da cafeína nos seres humanos em diferentes estágios de desenvolvimento/idades. Destaca-se o estudo com pares mãe-filho, estratificados em cinco grupos (mulheres diabéticas, mulheres hipertensas, mães fumantes, mães de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional e controles), que revelou uma relação entre o consumo de cafeína pelas mães durante a gravidez e a espessura das dobras cutâneas dos bebês com três meses de idade, especialmente nos grupos de mães diabéticas e do grupo controle. Esses resultados sugerem que o consumo de cafeína durante a gravidez pode afetar as dimensões corporais da criança (DE MEDEIROS *et al.*, 2017).

3.8.5.2 Teobromina

A teobromina (3,7-dimetilxantina) é um composto primariamente presente no cacau e produtos derivados, como o chocolate. Outras plantas, incluindo chás, café, guaraná e certos tipos de nozes, também contêm este composto, mas em quantidades menores. A teobromina, além de ser reconhecida como um ingrediente alimentar e metabólito vegetal, antagoniza os receptores de adenosina. Seus efeitos são mais brandos se comparados à cafeína, mas ainda assim desempenha funções como broncodilatador, vasodilatador e diurético (FREDHOLM, 2011).

3.8.5.3 Teofilina

A teofilina (1,3-dimetilxantina) é um alcaloide pertencente à família das metilxantinas, presente em variedades como chá verde, chá preto, café, cacau e erva-mate. Este composto, renomado por sua capacidade broncodilatadora, é frequentemente empregado para tratar condições como asma e obstruções pulmonares. Ela também exerce efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central. A terapia com teofilina demanda um monitoramento rigoroso via exames sanguíneos, tanto para determinar a dosagem adequada quanto para verificar a qualidade dos medicamentos que a contêm. A trajetória da teofilina no campo medicinal é extensa, contando com mais de oito décadas de aplicação clínica global (CRAPNELL; BANKS, 2021).

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo de amostra foi realizado utilizando a metodologia QuEChERS, e foi realizado pela Ms. Júlia Delgado da Fonseca seguindo o protocolo adaptado de Jian Du *et. al.* (2017), (vide Apêndice A) (DU *et al.*, 2017) .

4.2 ANÁLISE INSTRUMENTAL: UHPLC-QTOF MS

Foi empregado um cromatógrafo a líquido do modelo *Nexera 2* da *Shimadzu* acoplado a analisador de massa híbrido: quadrupolo e tempo de voo da *Bruker Daltonics*, modelo *Impact II*, disponível no Laboratório de Técnicas Cromatográficas acopladas a Espectrometria de Massa da Central Analítica do IQ - UFRGS.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica *Kinetex EVOC18* (2,1 mm x 100 mm x 1,7µm) da *Phenomenex*, com a temperatura da coluna ajustada para 40°C. As fases móveis compostas por acetonitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e H₂O acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (B), a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹. O programa de eluição gradiente foi: 0 min, 98% B; 2 minutos, 80% B; 4 minutos, 50% B; 8 minutos, 30% B; 12 minutos, 15% B; 12,5 minutos, 2% B; 16 minutos, 2% B; 17 minutos, 98% B; 20 minutos, 98% B. O volume de injeção de amostra foi de 5 µL.

As condições de análises no espectrômetro de massa foram as seguintes: tensões 500 e 4000 V, pressão no nebulizador de 4 bar de gás N₂, fluxo de gás N₂ de 10 L min⁻¹ e temperatura da fonte de 200°C. O espectrômetro de massas estava equipado com o sistema de ionização por eletrospray (*ESI*), operando no modo de ionização positivo e operou no modo de aquisição *broadband collision induced dissociation (bbCID)* e registrou espectros com razão *m/z* entre 50 – 1500 Da a uma taxa de varredura de 2 Hz. Neste modo de aquisição de dados são registrados dados de MS de baixa e alta energia (essa em uma rampa), simultaneamente. As energias de colisão foram de 4 eV para aquisição dos espectros de MS e, uma rampa desde 4 eV até 25 eV, para obtenção dos espectros de MS com alta energia. Além disso, a calibração do espectrômetro de massa foi realizada a partir da injeção de uma solução

de formiato de sódio 10 mM numa mistura de água/isopropanol (1:1) no início de cada análise cromatográfica.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A fim de realizar a análise de triagem dos possíveis compostos presentes no leite materno foi inicialmente elaborada uma base de dados especialmente construída contendo dados de massa exata de um total de 2897 compostos, dentre eles compostos naturais, fármacos, agrotóxicos e outros compostos industriais.

Por sua vez, foram selecionadas 5 amostras aleatoriamente, correspondendo a 10% do número total de amostras de leite materno, para que estas fossem processadas no software TargetAnalysis. Esse tratamento teve como finalidade validar a base de dados desenvolvida, mediante a identificação de compostos suspeitos.

Ao passo que as amostras selecionadas foram processadas no software TargetAnalysis se fez uma lista dos “potenciais” compostos que supostamente estariam presentes na base de dados empregada; fazendo assim o comparativo entre os dados da amostra e os dados oriundos da base de dados que incluía inicialmente o nome, m/z e fórmula molecular dos analitos.

Com o resultado do processamento, foram selecionados 80 compostos suspeitos com as maiores áreas de pico e massa exata abaixo de 5 ppm e perfil isotópico com $mSigma$ abaixo de 50. Para estes 80 compostos se fez uma análise no software QuantAnalysis utilizando os tempos de retenção informados no processamento pelo software TargetAnalysis. Este processamento no QuantAnalysis foi realizado para encontrar as amostras que continham os suspeitos em maior área, para facilitar a identificação dos fragmentos e perfil isotópico. Neste trabalho, optou-se pela utilização do QuantAnalysis devido ao alto número de amostras. Seria inviável o processamento das 50 amostras via TargetAnalysis.

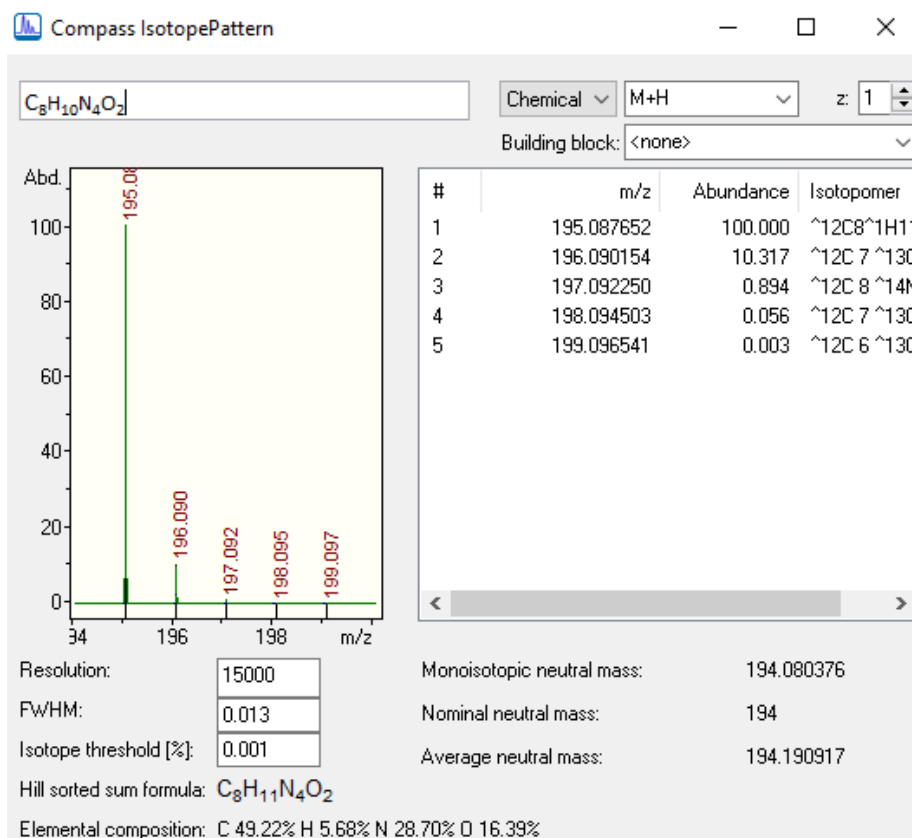
Para facilitar o entendimento do passo a passo de etapas empregado o processamento de dados via TargetAnalysis, se fez um procedimento operacional padrão digital (POPd), presente na seção 4.7. Este POPd será útil para a aplicação do software TargetAnalysis.

4.4 ELABORAÇÃO DA BASE DE DADOS ESPECIALMENTE CONSTRUÍDA

A partir dos resultados obtidos com a análise inicial das 5 amostras selecionadas, criou-se uma base de dados especialmente construída, levando em consideração os potenciais compostos suspeitos encontrados. Além desses analitos, foram adicionados à base de dados especialmente construída alguns fármacos e metabólitos que poderiam estar presentes (informação oportunizada pelos pesquisadores que colaboraram com essa pesquisa fornecendo as amostras para estudo). Assim, foi criada uma planilha com as seguintes informações: fórmula molecular, nome, massa exata do analito e tempo de retenção suspeito.

Com o intuito de conhecer a massa exata do íon analisado em modo de ionização positivo $[M+H]^+$, foi utilizado o software Compass IsotopePattern. O tempo de retenção suspeito do analito foi obtido na análise inicial além de informações relacionadas com a fórmula molecular do analito e seu nome.

Figura 2 – Resultados obtidos via software Compass Isotope Pattern para o analito cafeína, demonstrando o m/z correspondente ao modo de ionização positivo.



Fonte: a autora (2023).

4.5 AUTOMAÇÃO NO PROCESSAMENTO DOS DADOS

Usando o software QuantAnalysis, conhecendo o tempo de retenção suspeito a partir da análise no TargetAnalysis, buscou-se por 80 compostos presentes na base de dados especialmente construída. Esse software identifica se há algum sinal com as informações adicionadas no método, ou seja, identifica a existência da determinada m/z na janela do tempo de retenção suspeito que foi informado em dito método, e fornece o espectro de massas do respectivo pico, informando também a área do mesmo. Esse procedimento foi realizado separadamente para cada um dos compostos presentes no método.

Figura 3 - Principais Informações que devem ser fornecidas para o processamento de dados empregando o software QuantAnalysis, dos quais se destacam o nome (do inglês *name*) do composto, o m/z e o tempo de retenção (do inglês *Retention time*) em min.

The screenshot shows the 'Target Compounds' dialog box in the QuantAnalysis software. The dialog has a title bar with a close button. Inside, there is a list of target compounds: 4_FAA, 4HIDROXI ANTIPRININA, 8_HIDROXIQUINOLINA, AB PINOCA METABOLITO F6, ACETOMINOFEN (highlighted in blue), and ACETONINFEN SULFATO. To the right of the list are three buttons: 'Add', 'Change', and 'Delete'. Below the list, there are several input fields: 'Name:' with 'ACETOMINOFEN', 'CAS No.:', 'Chrom.:' with 'EIC 152.0706 ±All', 'ISTD:' with '<None>', 'Retention time [min]:' with '1.91', 'Window (min):' with '1', and 'Concentration units:'. To the right of these fields is a 'Standard conc.' section with a grid icon, a red 'X', and up/down arrows. At the bottom right, there is a note: 'Note: Entry must be: "Cal.Level";"Conc."'.

Fonte: a autora (2023).

4.6 ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DIGITAL (POPd) PARA PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Foi elaborado um procedimento operacional padrão digital (POPd) sobre o processamento de dados obtidos por meio do sistema UHPLC-QTOF MS, explicando e exemplificando como o mesmo deve ser realizado pelo analista. Esse POPd é o produto final deste estudo e está disponível em: https://drive.google.com/file/d/16R4tnIOYGRYjYAXI5ChkjOPB5A4nWowR/view?usp=drive_link para futuros usuários externos à Universidade e, também, internos que venham a realizar análises no sistema UHPLC-QTOF MS da Central Analítica do IQ-UFRGS.

5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DA BASE DE DADOS

A triagem automatizada dos 2897 compostos foi feita usando o TargetAnalysis. A base de dados otimizada foi criada a partir da análise inicial, da qual foram obtidas informações como: área do pico cromatográfico utilizada para selecionar os suspeitos de maior área (total de 80 compostos), massa exata e perfil isotópico dos mesmos, e o tempo de retenção suspeito para cada composto suspeito.

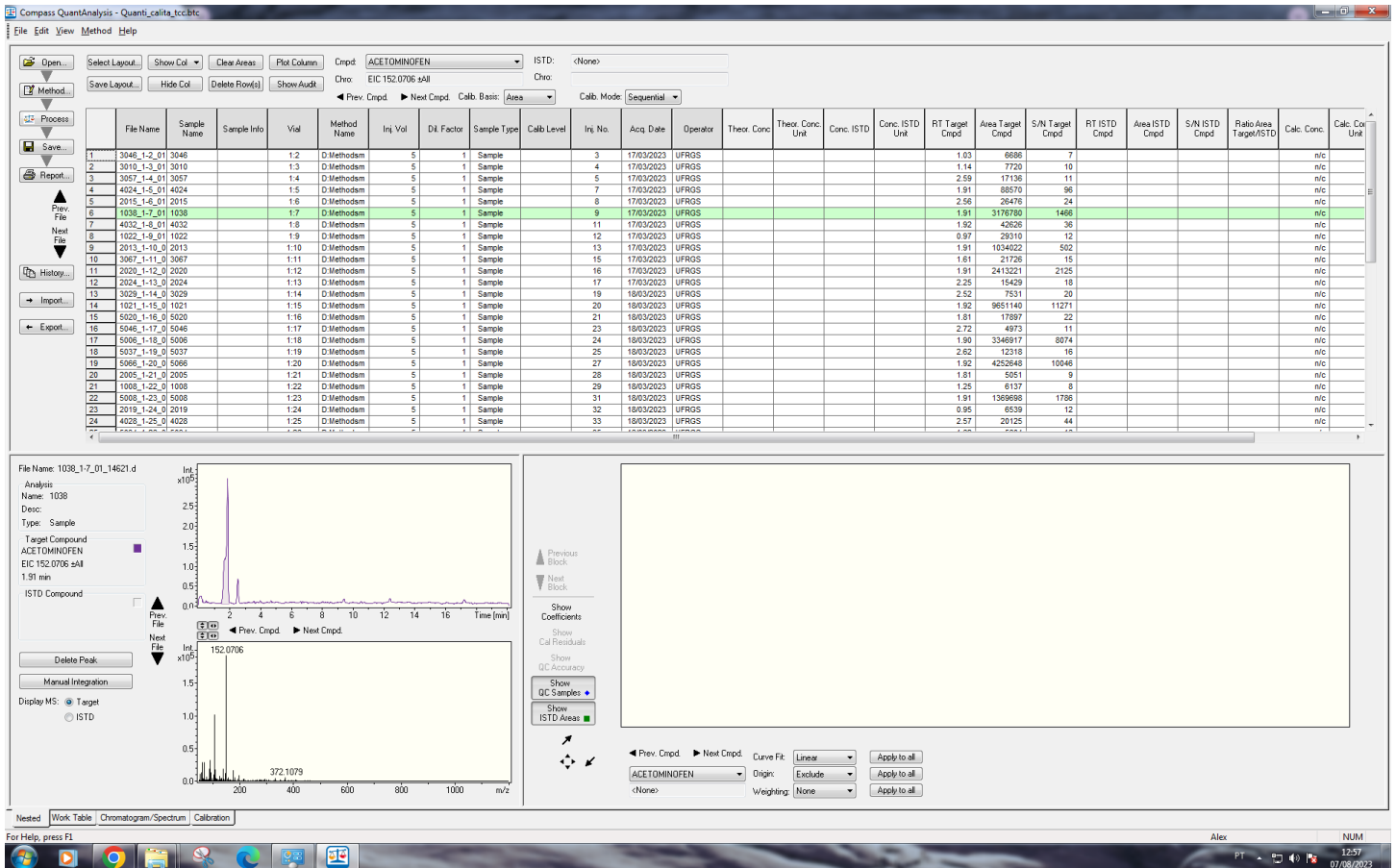
Nessa base de dados encontram-se fármacos, alguns de seus metabólitos, xantinas, compostos naturais e industriais. Os resultados obtidos podem ser vistos no Apêndice B.

5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Através da base de dados pronta e processada no TargetAnalysis utilizou-se o software QuantAnalysis. O QuantAnalysis foi fundamental para o processamento das 50 amostras. Como resultado, obteve-se os casos “potencialmente” positivos para os suspeitos e as áreas de pico dos suspeitos para as 50 amostras.

Este processamento no QuantAnalysis foi totalmente automatizado. Após o processamento, o *layout* do software pode ser visualizado na Figura 4 (a seguir), mostrando o analito escolhido, o pico que foi integrado em cada amostra, a área do pico integrado, o tempo de retenção suspeito correspondente a este pico e o espectro de massa referente ao mesmo.

Figura 4 – *Print* do software QuantAnalysis após o processamento do método do desenvolvido, apresentando o analito escolhido (acetaminofeno) o pico que foi integrado em cada amostra, a área do pico integrado, o tempo de retenção suspeito correspondente a este pico e o espectro de massa referente ao mesmo.



Fonte: a autora (2023).

Muito embora essa etapa da análise seja automatizada, é importante que um analista revise os dados gerados como “potencialmente” positivos. Assim, esses dados devem ser avaliados pelo analista individualmente para incluir, descartar ou simplesmente melhorar a integração de área dos picos e verificação de concordância dos demais parâmetros. O resultado pode ser observado no exemplo do acetaminofeno (Figura 5).

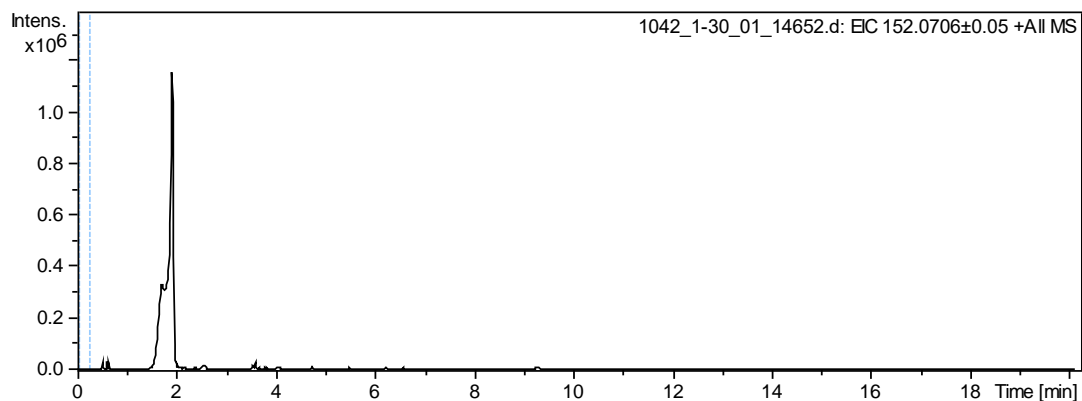
suspeito, sendo assim, facilitando a identificação através da massa exata, perfil isotópico e fragmentos.

5.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS SUSPEITOS

Cada composto encontrado pelo QuantAnalysis foi revisado no software DataAnalysis. Essa revisão se deu da seguinte maneira: identificou-se a amostra que tinha a maior área do pico em questão, posteriormente abriu-se a amostra selecionada no DataAnalysis.

No DataAnalysis, foi realizada a calibração das massas e, realizado o *extract ion* do analito suspeito. Com base no *Extracted Ion Chromatogram* foi avaliada a presença do íon molecular e dos fragmentos no espectro de massas obtido via *bbCID*. Na Figura 6 temos o cromatograma do acetaminofeno, também conhecido como paracetamol.

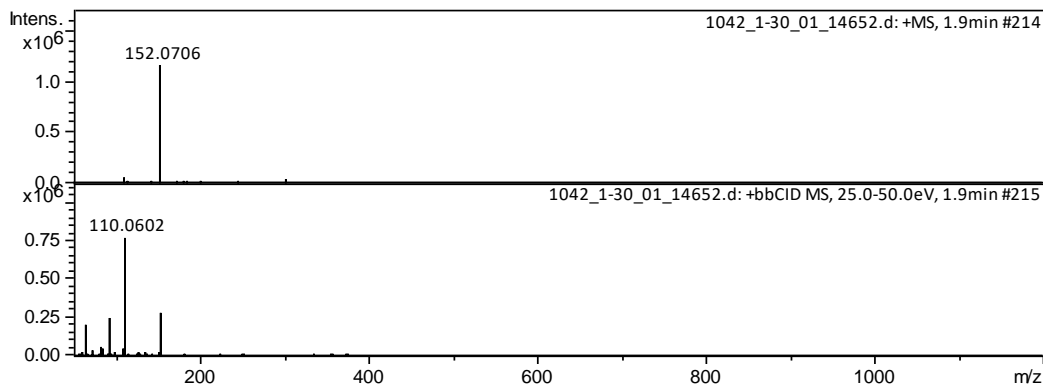
Figura 6 – Cromatograma do acetaminofeno na amostra 1042.



Fonte: a autora (2023).

Na Figura 7 temos o espectro de massas de baixa energia e o *bbCID* do analito acetaminofeno. Através do *bbCID*, é possível realizar a procura dos fragmentos que correspondem ao paracetamol.

Figura 7 – Na parte superior consta o espectro de massas em baixa energia e na parte inferior o *bbCID* do acetaminofeno na amostra 1042.



Fonte: a autora (2023).

Esses fragmentos podem ser associados ao acetaminofeno através de bancos de dados de espectrometria de massa, on line e gratuitos, como o MassBank (MASSBANK | DATABASE | SEARCH, [s. d.]).

No caso do acetaminofeno, os fragmentos característicos observados no banco de dados do MassBank estão descritos na Figura 8. Importante destacar que a busca nesses bancos de dados também pode ser feita selecionando os analisadores específicos nos quais os espectros de massas foram adquiridos.

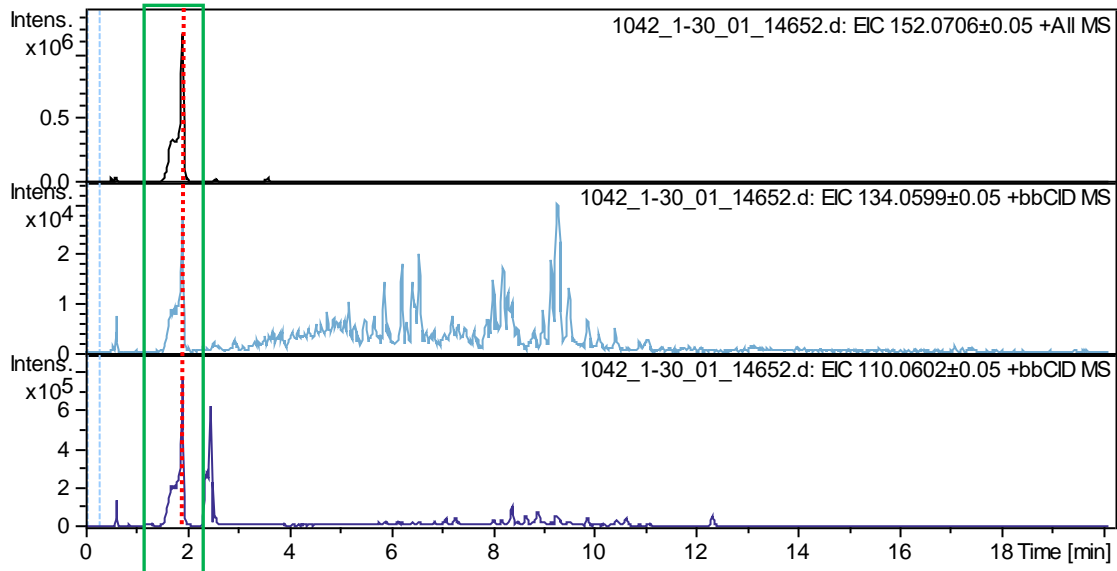
Figura 8 – Fragmentos característicos do acetaminofeno retirados do MassBank para o sistema LC-ESI-QTOF; MS2; utilizando CE: 30 eV; R=35000; [M+H]⁺

```
PK$SPLASH: splash10-0udi-0900000000-4838c7050bb5899e6718
PK$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)
109.0512 C6H7NO+ 1 109.0522 -9.47
110.0593 C6H8NO+ 1 110.06 -6.88
134.0587 C8H8NO+ 1 134.06 -9.69
135.0626 C7[13]CH8NO+ 1 135.0639 -10.2
152.0691 C8H10NO2+ 1 152.0706 -9.98
153.0725 C7[13]CH10NO2+ 1 153.0745 -12.89
```

Fonte: a autora (2023).

Assim, para cada analito foram escolhidos 3 fragmentos, mais intensos, para que os mesmos fossem buscados no *extract ion chromatogram*. Ditos fragmentos devem, obrigatoriamente, apresentar o mesmo tR e perfil de pico que o íon molecular ao qual estão associados. Um exemplo pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Na ordem em que aparecem, cromatograma de íon extraído para o íon fórmula do acetaminofeno (m/z 152.0706) seguido pelos cromatogramas de íons extraídos dos fragmentos mais intensos (m/z 134.0599 e m/z 110.0602).



Fonte: a autora (2023).

Na Tabela 1 encontram-se os principais parâmetros para confirmação de um analito “suspeito”, são eles: erro na exatidão de massa abaixo de 5 ppm, mSigma (se houver), RDB e íon fórmula condizente com o esperado.

Tabela 1 – Tabela com os principais parâmetros de confirmação de analito suspeito.

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
110,0602	C ₆ H ₈ NO	110,0600	-1,3	0,7	3,5	even	ok
134,0599	C ₈ H ₈ NO	134,0600	1,3	205,3	5,5	even	ok
152,0705	C ₈ H ₁₀ NO ₂	152,0706	0,7	3,5	4,5	even	ok

Fonte: a autora (2023).

Na primeira coluna da Tabela 1 temos o m/z medido na amostra, na segunda o íon fórmula respectivo, ou seja, a fórmula molecular correspondente aquela m/z . Na terceira a m/z teórica, na quarta coluna temos o erro em ppm, o qual tem como limite aceitável 5 ppm. O mSigma da quinta coluna indica a relação entre o perfil isotópico teórico e o perfil isotópico experimental, valores abaixo de 50 são considerados

excelentes. A sexta coluna representa o RDB (índice de deficiência de hidrogênio). Para maiores detalhes sobre o RDB vide Apêndice C.

Pode-se observar que a lógica da fragmentação quando se verificam os íons fórmulas. Quando é o íon fórmula do próprio acetaminofeno temos $C_8H_{10}NO_2$, com a quebra na câmara de colisão fragmentam-se formando C_8H_8NO , ou seja, perdendo 2 hidrogênios, e um oxigênio, provavelmente na forma de uma molécula de água. Quando observado o outro fragmento tem-se C_6H_8NO , uma possível explicação é que o fragmento 134.0599 Da com a energia recebida, ao perder 2 carbonos.

Feitas essas observações do tempo de retenção dos fragmentos em relação ao íon fórmula do composto em análise e sendo esses compatíveis com os do banco de espectros de massa podemos confirmar o analito caso tenhamos o padrão analítico do mesmo. No caso de analitos “suspeitos” apenas o tempo de retenção não é confirmado por meio de padrão analítico.

Utilizando o método descrito acima verificaram-se cerca de 80 compostos selecionados na análise inicial sendo 20 compostos classificados como suspeitos oriundos de 5 conjuntos. Esses conjuntos são: fármacos e metabólitos, marcadores de tabagismo, xantinas, compostos naturais, compostos sintéticos e/ou industriais. Os dados cromatogramas, espectro de massas com fragmentos e perfis isotópicos dos 20 compostos suspeitos encontram-se no Apêndice D. Na Tabela 2 estão representados os 20 suspeitos e seus devidos grupos.

Tabela 2 –Tabela de analitos suspeitos com seus grupos de compostos correspondentes.

Nome	Grupo
ACETAMINOFENO	Fármaco
FENOZONA	Fármaco
NORFLUOXETINA	Metabólito
4-AAA	Metabólito
4-FAA	Metabólito
4-AA	Metabólito
HIDROXICOTININA	Marcadores de Tabaco
COTININA	Marcadores de Tabaco
CAFEÍNA	Xantinas
TEOFILINA	Xantinas
TEOBROMINA	Xantinas
BIS (2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP)	Compostos Industriais
DIBUTILFTALATO (DBP)	Compostos Industriais
ISOFORONA	Compostos Industriais
ÁCIDO LINOLEICO (LA)	Compostos Naturais
ÁCIDO DOCOSAEXANOICO (DHA)	Compostos Naturais
ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA)	Compostos Naturais
FENILALANINA	Compostos Naturais
NICOTINAMIDA (B3)	Compostos Naturais
PALMITOILETANOLAMIDA (PEA)	Compostos Naturais

Fonte: a autora (2023).

Por sua vez, a análise das amostras de leite materno foi realizada e indicou os dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Relação dos compostos suspeitos em cada amostra de leite materno.

Mãe	ACETAMINOFENO	FENOZONA	NORFLUOXETINA	4_AAA	4_FAA	4_AA	HIDROXICOTININA	COTININA	CAFEINA	TEOFLINA	TEOBROMINA	DEHP	DBP	ISOFORONA	ÁCIDO LINOLEICO	ÁCIDO DOCOSAEXANOICO	ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA)	FENILALANINA	NICOTINAMIDA (B3)	PALMITOILETANOLAMIDA (PEA)	
3046																					
3010							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3057									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4024	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2015				✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1038	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4032	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1022									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2013	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3067							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2020	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2024									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3029							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1021	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5020									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5046									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5006	✓	✓		✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5037		✓		✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5066	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2005							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1008									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5008	✓	✓		✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2019								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4028									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5034									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1006	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2007									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3027	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1042	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2009									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3044									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4010									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4031									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3038							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5035									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1023	✓	✓		✓					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4004	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4033	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3056							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1029	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4013									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4002								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3004							✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2004	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1050									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5026									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2017									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1053			✓						✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5018	✓								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4056									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Fonte: a autora (2023).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fazendo uso da espectrometria de massa de alta resolução foi possível analisar amostras de leite materno e detectar a presença de 20 compostos suspeitos. Para tanto, uma base de dados com 80 compostos, dentre os mesmos constam fármacos e metabólitos, marcadores de tabagismo, xantinas, compostos naturais, compostos sintéticos e/ou industriais, foi especialmente construída e aplicada de forma automatizada usando o QuantAnalysis para essa finalidade. Finalmente, foi elaborado um procedimento operacional padrão digital (POPd) detalhando o processamento dos dados focado na triagem de analitos suspeitos.

Como perspectiva para este trabalho pode ser feita uma análise de um “mix” de solução de padrões dos compostos suspeitos, sob as mesmas condições de análise do método descrito na seção 4.2 para então poder confirmar a presença dos mesmos nas amostras, por meio da confirmação do tempo de retenção suspeito.

REFERÊNCIAS

- ABALO, R. Coffee and Caffeine Consumption for Human Health. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2918, 2021.
- ABE, S. K. *et al.* Supplementation with multiple micronutrients for breastfeeding women for improving outcomes for the mother and baby. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2016, n. 2, 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD010647.pub2>. Acesso em: 21 ago. 2023.
- ABRAHAMSON, P. W. Soils: their implications to human health. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 291, n. 1–3, p. 1–32, 2002.
- ADENUGA, A. A. *et al.* Biomonitoring of phthalate esters in breast-milk and urine samples as biomarkers for neonates' exposure, using modified quechers method with agricultural biochar as dispersive solid-phase extraction absorbent. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 152, p. 104277, 2020.
- ARIAS-BORRERO, A. *et al.* Iodine deficiency disturbs the metabolic profile and elemental composition of human breast milk. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 371, p. 131329, 2022.
- BADE, R. T. D. N. Advanced analytical tools for the investigation of licit and illicit drug residues in water. [s. l.], 2016. Disponível em: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:f5a6959>. Acesso em: 20 ago. 2023.
- BOIX, C. *et al.* Investigating the presence of omeprazole in waters by liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry: degradation experiments. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 1091–1100, 2013.
- CARDOSO, R. M. *et al.* Economically feasible strategy for confirmation of pharmaceuticals in hospital effluent using screening analysis. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 12, n. 38, p. 4691–4697, 2020.
- CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. **Seminars in Neonatology**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 437–449, 2001.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, [s. l.], v. 31, p. 623–636, 2008.
- CLARK, K. M. *et al.* Breast-feeding and mental and motor development at 5½ years. **Ambulatory Pediatrics**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 65–71, 2006.
- CRAPNELL, R. D.; BANKS, C. E. Electroanalytical overview: The electroanalytical detection of theophylline. **Talanta Open**, [s. l.], v. 3, p. 100037, 2021.

DE MEDEIROS, T. S. *et al.* Caffeine Intake During Pregnancy in Different Intrauterine Environments and its Association with Infant Anthropometric Measurements at 3 and 6 Months of Age. **Maternal and Child Health Journal**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1297–1307, 2017.

DEPAULA, J.; FARAH, A. Caffeine Consumption through Coffee: Content in the Beverage, Metabolism, Health Benefits and Risks. **Beverages**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 37, 2019.

DOS SANTOS, M. C. S. *et al.* Cadernos de atenção básica: saúde da criança, aleitamento materno e alimentação complementar. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 280, 2018.

DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Vitamin B-12 in Human Milk: A Systematic Review. **Advances in Nutrition**, [s. l.], v. 9, p. 358S-366S, 2018.

DU, J. *et al.* Pesticides in human milk of Western Australian women and their influence on infant growth outcomes: A cross-sectional study. **Chemosphere**, [s. l.], v. 167, p. 247–254, 2017.

FERRER, I.; THURMAN, E. M. **Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry: Principles, Tools, and Applications for Accurate Mass Analysis**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2009.

FREDHOLM, B. B. **Methylxanthines**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. (Handbook of Experimental Pharmacology). v. 200 *E-book*. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13443-2>. Acesso em: 20 ago. 2023.

FRÍGULS, B. *et al.* A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 397, n. 3, p. 1157–1179, 2010.

GIBSON, R. A.; KNEEBONE, G. M. Fatty acid composition of human colostrum and mature breast milk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 252–257, 1981.

HERNÁNDEZ, F. *et al.* Retrospective LC-QTOF-MS analysis searching for pharmaceutical metabolites in urban wastewater. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 34, n. 24, p. 3517–3526, 2011.

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatrica**, [s. l.], v. 104, n. S467, p. 14–19, 2015.

HORTA, B. L.; VICTORA, C. G.; ORGANIZATION, W. H. **Short-term effects of breastfeeding: a systematic review on the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality**. [S. l.]: World Health Organization, 2013. *E-book*. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95585>. Acesso em: 19 ago. 2023.

KEIKHA, M. *et al.* Macro- and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review. **Breastfeeding Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 517–527, 2017.

KRAUSOVÁ, M. *et al.* Understanding the Chemical Exposome During Fetal Development and Early Childhood: A Review. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 517–540, 2023.

KROGER, M.; MEISTER, K.; KAVA, R. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 35–47, 2006.

LAMBERS, D. S.; CLARK, K. E. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. **Seminars in Perinatology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 115–126, 1996.

LAMBERT, D. *et al.* The Palmitoylethanolamide Family: A New Class of Anti-Inflammatory Agents?. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 663–674, 2002.

MASSBANK | DATABASE | SEARCH. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/Search>. Acesso em: 20 ago. 2023.

NAPIERALA, M. *et al.* Tobacco smoking and breastfeeding: Effect on the lactation process, breast milk composition and infant development. A critical review. **Environmental Research**, [s. l.], v. 151, p. 321–338, 2016.

ORGANIZATION, W. H. **Global Strategy for Infant and Young Child Feeding**. [S. l.]: World Health Organization, 2003.

ORGANIZATION, W. H.; UNICEF. **Global strategy for infant and young child feeding**. [S. l.]: World Health Organization, 2003.

PEÑACOBÁ, C.; CATALA, P. Associations between breastfeeding and mother–infant relationships: a systematic review. **Breastfeeding Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 616–629, 2019.

QIN, C. *et al.* Advancement of omics techniques for chemical profile analysis and authentication of milk. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 127, p. 114–128, 2022.

ROGAN, W. J.; RAGAN, N. B. Evidence of Effects of Environmental Chemicals on the Endocrine System in Children. **Pediatrics**, [s. l.], v. 112, n. Supplement_1, p. 247–252, 2003.

SAUVE, A. A. NAD⁺ and Vitamin B₃: From Metabolism to Therapies. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 324, n. 3, p. 883–893, 2008.

SECTION ON BREASTFEEDING. Breastfeeding and the Use of Human Milk. **Pediatrics**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 496–506, 2005.

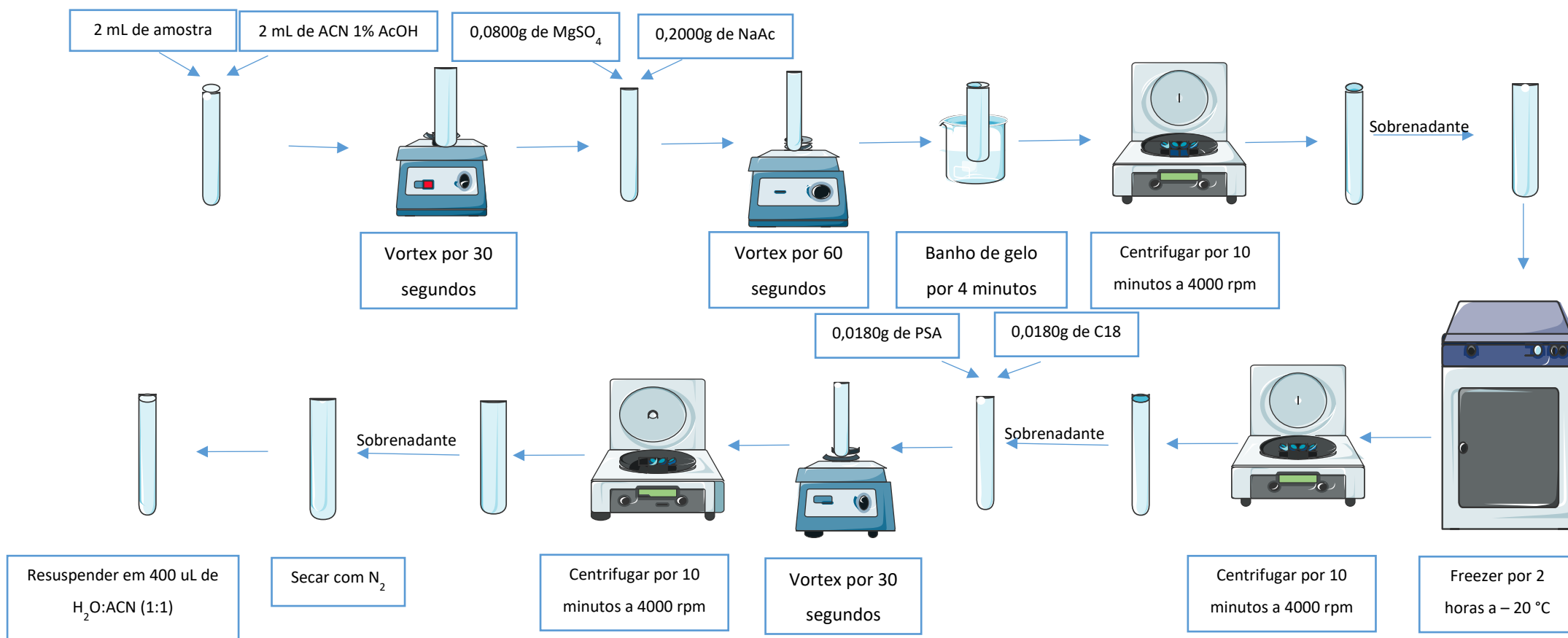
SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2011.

TUZIMSKI, T.; SHERMA, J. **High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis**. [S. l.]: CRC Press, 2015.

VAN DAM, R. M.; HU, F. B.; WILLETT, W. C. Coffee, Caffeine, and Health. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 383, n. 4, p. 369–378, 2020.

WIELENS BECKER, R. *et al.* Investigation of pharmaceuticals and their metabolites in Brazilian hospital wastewater by LC-QTOF MS screening combined with a preliminary exposure and in silico risk assessment. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 699, p. 134218, 2020.

APÊNDICE A – ESQUEMA DO PREPARO DE AMOSTRA REALIZADO UTILIZANDO A METODOLOGIA QuEChERS



**APÊNDICE B – BASE DE DADOS COM AS PRINCIPAIS INFORMAÇÕES DOS
80 ANALITOS MONITORADOS EM LEITE MATERNO**

t_R * - Tempo de retenção suspeito

Nome	Fórmula Molecular	Massa calculada m/z	t_R * (min)
FEXOFENADINA	C ₃₂ H ₃₉ NO ₄	502,295185	5,52
VARDENAFILA	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	489,227851	4,7
BUPRENORINA	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	468,310835	5,01
V_E_R_1	C ₂₇ H ₄₀ O ₄	429,299936	9,31
SINVASTATINA	C ₂₃ H ₃₈ O ₅	395,279201	9,81
BIS (2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	391,284286	12,71
SRZ_31277_T6FB	C ₁₇ H ₃₃ N ₅ O ₅	388,255446	2,7
HU_210	C ₂₅ H ₃₈ O ₃	387,289372	8,36
IROCAPREOATO DE TESTOSTERONA	C ₂₅ H ₃₈ O ₃	387,289372	8,82
V_E_R_2	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	387,252986	5,83
V_E_R_3	C ₂₇ H ₄₄ O	385,346492	14,23
PIRIMIDIFENO	C ₂₀ H ₂₈ ClN ₃ O ₂	378,194281	9,74
TAMOXIFENO	C ₂₆ H ₂₉ NO	372,232191	2,65
LANSOPRAZOL	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	370,083159	0,59
BISACODIL	C ₂₂ H ₁₉ NO ₄	362,138685	3,81
PREDNISOLONA	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	361,20095	3,89
PREGNANETRIOL	C ₂₁ H ₃₆ O ₃	337,273721	8,15
CP_47_497_C8	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	333,278807	10,46
HDB_PINACA	C ₁₈ H ₂₈ N ₄ O ₂	333,228503	6,81
ÁCIDO DOCOSAEXANOICO (DHA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	329,247507	9,18
NADOLOL	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	310,201285	3,28
ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	305,247507	9,11
METENOLONA	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	303,231857	8,49
PALMITOILETANOLAMIDA (PEA)	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	298,274056	9,45
NORFLUOXETINA	C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO	296,125675	3,7
LAUROCAPRAM	C ₁₈ H ₃₅ NO	282,2791	9,15
ÁCIDO LINOLEICO (LA)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281,2475	9,47
V_E_R_4	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	280,239682	8,57
DIBUTILFTALATO (DBP)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	279,159086	6,83
BOLANDIOL	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	277,216207	6,31
IMAZAPYR	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃	262,118618	5,0
FERINZONA	C ₁₅ H ₁₈ N ₄	255,160423	4,6
IBUPROFENO met 1 - chydroxyibuprofen	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	255,1227	-
FENITOÍNA	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253,097154	2,9
4_ACO_DMT_PRILACETIN	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	247,144104	2,23
4_AAA	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	246,123703	2,52

PIRIMICARB	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	239,150252	2,06
4_FAA	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	232,108053	2,49
SULFATO DE ACETAMINOFENO	C ₈ H ₉ NO ₅ S	232,02742	2,57
BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	229,122306	7,89
IBUPROFENO met 1 - carboxybuprofen	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	223,1329	-
PROPOXUR	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	210,11247	2,64
NORDIAZEPAM F1	C ₁₄ H ₁₁ N ₂	208,0995	6,05
IBUPROFENO	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	207,137956	4,64
V_E_R_5	C ₁₂ H ₁₃ O ₃	206,093746	6,99
4HIDROXI ANTIPRININA	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,097154	1,85
4_AA	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	204,113139	2,52
CIMOXANIL	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	199,082567	0,64
CAFÉINA	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	195,087652	2,5
THC_COOH	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	193,122306	4,71
HIDROXICOTININA	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂	193,097154	0,61
TRICICLAZOL	C ₉ H ₇ N ₃ S	190,043345	4,77
FENOZONA	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	189,102239	2,96
APRONALIDA	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₂	185,128454	1,94
HHMA	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	182,117555	3,03
TEOFILINA	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	181,072002	2,1
TEOBROMINA	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	181,072002	1,9
COTININA	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	177,102239	0,62
INDOLE	C ₁₀ H ₉ NO ₂	176,070605	3,5
GABAPENTINA	C ₉ H ₁₇ NO ₂	172,133205	2,89
METILXANTINA	C ₆ H ₆ N ₄ O ₂	167,056352	1,63
FENILALANINA	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166,086255	1,36
COCAETILENO F5	C ₈ H ₆ O	157,476778	4,51
V_E_R_6	C ₈ H ₈ O ₃	153,054621	2,98
ACETAMINOFENO	C ₈ H ₉ NO ₂	152,070605	1,91
CARVONA	C ₁₀ H ₁₄ O	151,111742	9,42
NAPQI	C ₈ H ₇ NO ₂	150,054955	2,2
HIDROXIQUINOLINA	C ₉ H ₇ NO	146,06004	2,66
ISOFORONA	C ₉ H ₁₄ O	139,111742	4,08
V_E_R_7	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	139,050204	0,64
BENZOTIAZOL	C ₇ H ₅ NS	136,021547	13,3
NICOTINAMIDA (B3)	C ₆ H ₆ N ₂ O	123,055289	0,64
HODROZINEMELICA	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	113,034554	0,64
17 ALFA METABOLITO MESTRANOL	C ₇ H ₆ O	107,049141	4,45
HALOFENOZOIDE	C ₇ H ₅ O	106,041316	2,51
COLINA	C ₅ H ₁₄ NO	105,114816	0,5
NOROCAINA	C ₇ H ₄ O	105,033491	2,53
COCAETILENO F3	C ₇ H ₄ O	105,033491	3,37
TERBUFOS 103	C ₅ H ₁₁ S	104,065423	2,05
AB PINOCA METABOLITO F6	C ₄ H ₉ N	72,080776	3,19

APÊNDICE C — CÁLCULO DE RDB/ REGRA DA LIGAÇÃO DUPLA/ DEFICIÊNCIA DE HIDROGÊNIO (IDH)

Fórmula:

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [\sum n^{\circ} \text{átomo} (\text{valência} \text{átomo} - 2)]$$

Exemplos:

a) Omarigliptin: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [17(4-2) + 20(1-2) + 2(1-2) + 4(3-2) + 3(2-2) + 1(2-2)]$$

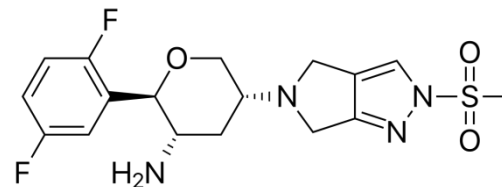
$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [17 \cdot 2 + 20 \cdot (-1) + 2 \cdot (-1) + 4 \cdot 1 + 3 \cdot 0 + 1 \cdot 0]$$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [34 + (-20) + (-2) + 4]$$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [38 + (-22)]$$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [16]$$

$$\text{IDH} = 1 + 8 = 9$$

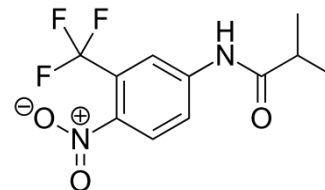


No DataAnalysis (modo positivo)

Massa medida <i>m/z</i>	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada <i>m/z</i>	Erro(ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
399,1300	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	399,1297	-0,8	6,2	8,5	even	ok

b) Flutamida: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [11(4-2) + 11(1-2) + 3(1-2) + 2(3-2) + 3(2-2)]$$



$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [11 \cdot 2 + 11 \cdot (-1) + 3 \cdot (-1) + 2 \cdot 1 + 3 \cdot 0]$$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [22 + -11 + -3 + 2]$$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [24 + -14]$$

$$\text{IDH} = 1 + 1/2 [10]$$

$$\text{IDH} = 1 + 5 = 6$$

No DataAnalysis (modo negativo)

Massa calculada <i>m/z</i>	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada <i>m/z</i>	Erro(ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
275,0646	C ₁₁ H ₁₀ F ₃ N ₂ O ₃	275,0649	1,1	9,7	6,5	even	ok

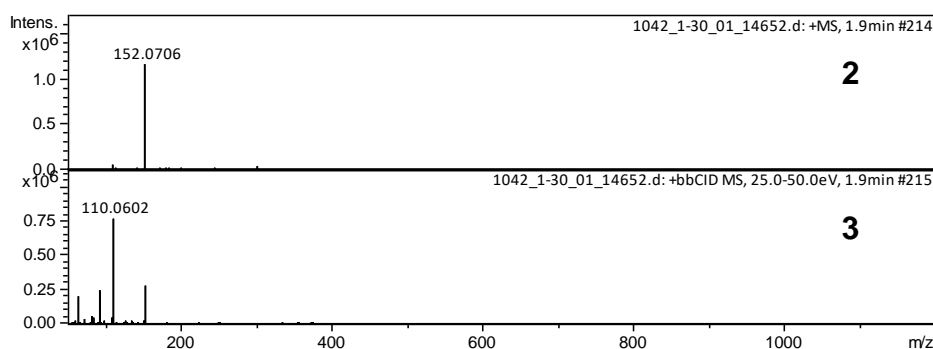
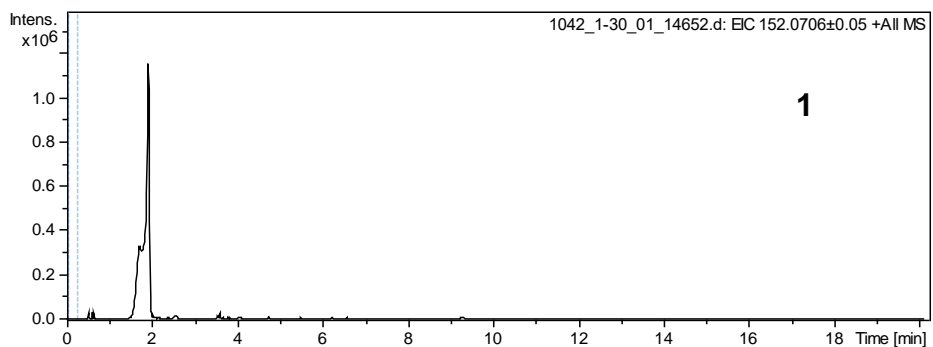
OBSERVAÇÕES

- No modo positivo diminui-se 0,5 do valor total do RDB da molécula desejada, devido ao fato de que 1 unidades de IDH correspondem a 2 hidrogênios perdidos.
- No modo negativo soma-se 0,5 do valor total do RDB da molécula desejada, devido ao fato de que 1 unidades de IDH correspondem a 2 hidrogênios perdidos.
- Com isso, temos que:
 - No modo positivo deve ser subtraída 0,5 unidades de IDH do valor de IDH da calculado, pois quando adiciona-se 1 H a mais a deficiência de hidrogênio será menor.
 - No modo negativo deve ser somada 0,5 unidades de IDH de IDH da calculada por, pois quando retira-se 1 hidrogênio a deficiência será maior.

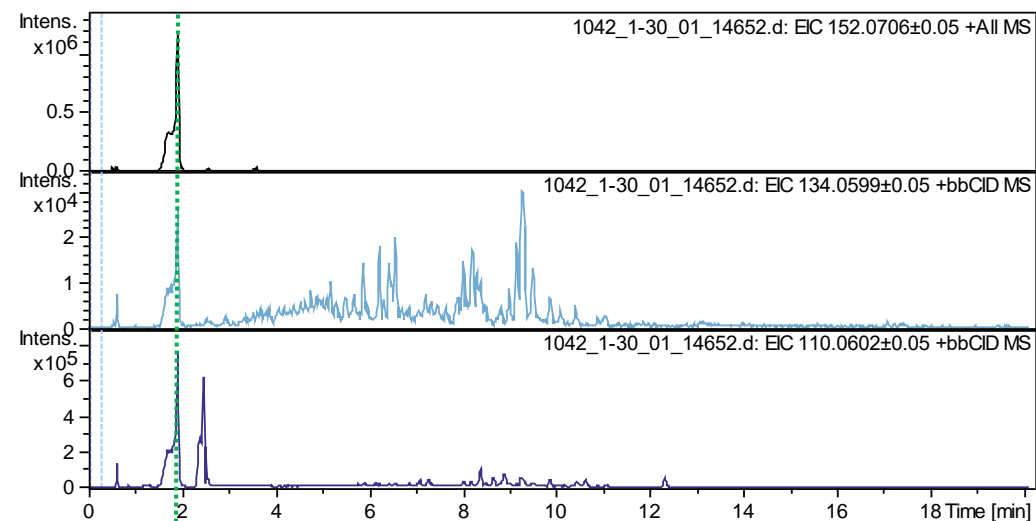
APÊNDICE D – DADOS DOS 20 COMPOSTOS SUSPEITOS

AMOSTRA: 1042 MODO POSITIVO tR: 1,9
 COMPOSTO: Acetaminofeno Fórmula: C₈H₉NO₂ m/z: 152,0706

Legenda: 1 – Cromatograma de Íons Totais; 2 – Espectro de massa; 3 – *bb*CID
 4 – Fragmentos do MassBank; 5 – Cromatograma dos íons extraídos para os fragmentos com maior intensidade que coincidiam com as informações do item 5;
 6 – Tabela; 7 – Perfil isotópico do íon fórmula; 8 – Perfil isotópico teórico



5



6

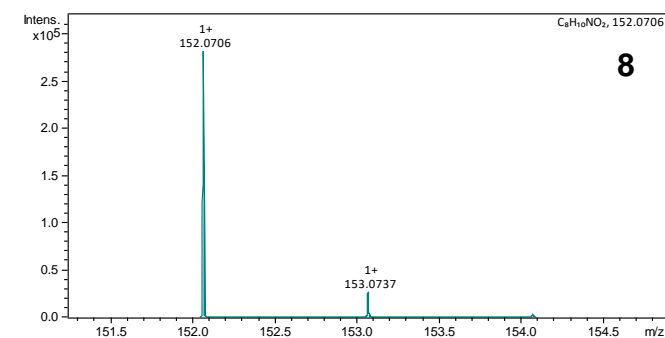
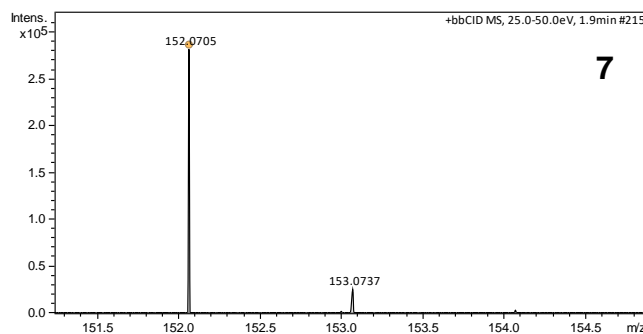
Massa medida <i>m/z</i>	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada <i>m/z</i>	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
110,0602	C ₆ H ₈ NO	110,0600	-1,3	0,7	3,5	<i>even</i>	ok
134,0599	C ₈ H ₈ NO	134,0600	1,3	205,3	5,5	<i>even</i>	ok
152,0705	C ₈ H ₁₀ NO ₂	152,0706	0,7	3,5	4,5	<i>even</i>	ok

4

PK\$SPLASH: [splash10-0udi-0900000000-4838c7050bb5899e6718](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1042)

PK\$ANNOTATION: *m/z* tentative_formula formula_count mass error (ppm)

109.0512 C₆H₇NO⁺ 1 109.0522 -9.47
 110.0593 C₆H₈NO⁺ 1 110.06 -6.88
 134.0587 C₈H₈NO⁺ 1 134.06 -9.69
 135.0626 C₇[13]CH₈NO⁺ 1 135.0639 -10.2
 152.0691 C₈H₁₀NO₂⁺ 1 152.0706 -9.98
 153.0725 C₇[13]CH₁₀NO₂⁺ 1 153.0745 -12.89



AMOSTRA: 5037

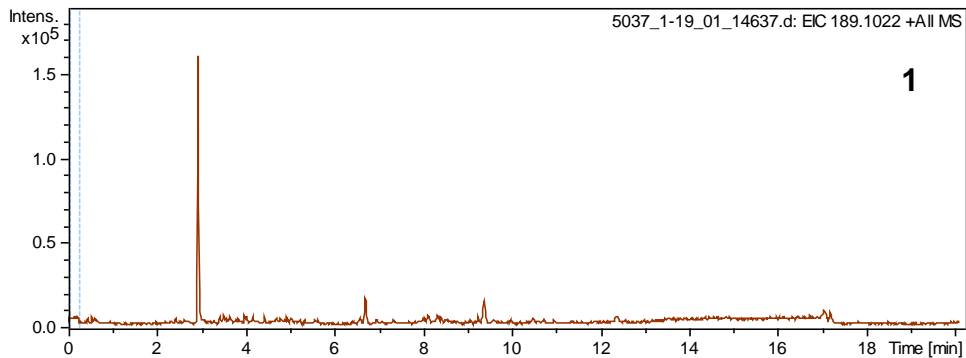
MODO POSITIVO

tR: 2,96

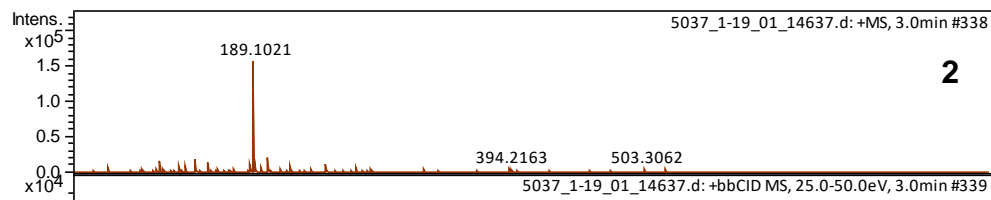
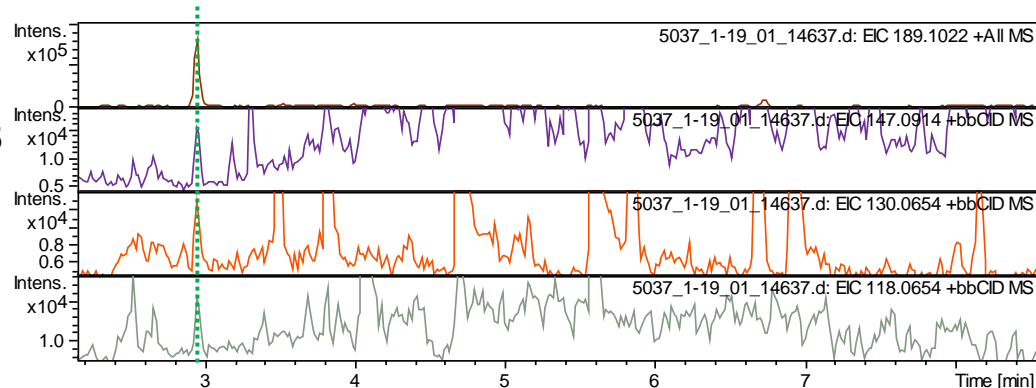
COMPOSTO: FENOZONA Fórmula: C₁₁H₁₂N₂O

m/z: 189,10239

51

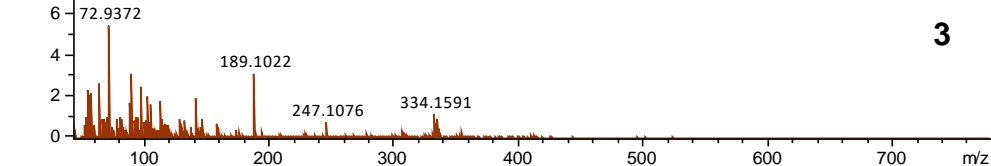


5



2

6



3

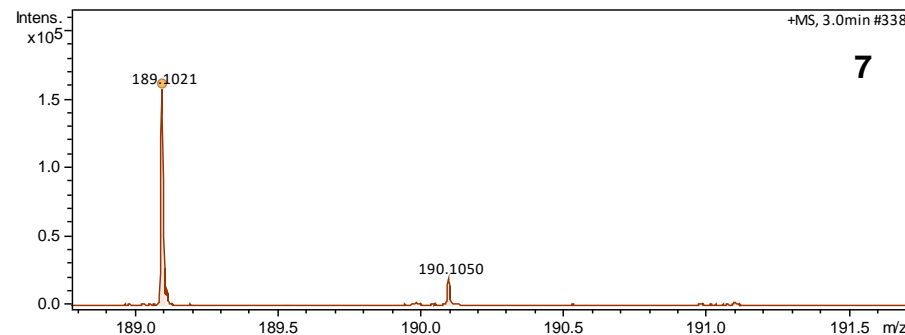
Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
118,0654	C ₈ H ₈ N	118,0651	-2,5	559,4	5,5	even	ok
130,0654	C ₉ H ₈ N	130,0651	-2,2	583,6	6,5	even	ok
147,0914	C ₉ H ₁₁ N ₂	147,0917	1,9	46	5,5	even	ok
189,1021	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O	189,1022	1	4,8	6,5	even	ok

PKSANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)

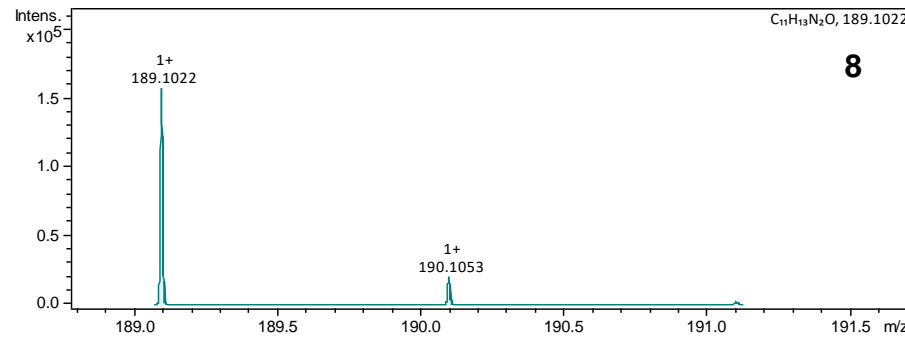
115.0537 C9H7+ 1 115.0542 -4.68
 116.0573 C8[13]CH7+ 1 116.0581 -7.43
 117.0567 C8H7N+ 1 117.0573 -5.31
 117.0676 C9H9+ 1 117.0699 -19.1
 118.0638 C8H8N+ 1 118.0651 -11.3
 119.0711 C8H9N+ 1 119.073 -15.37
 120.0798 C8H10N+ 1 120.0808 -7.95
 121.0759 C7H9N2+ 1 121.076 -1.07
 121.0833 C7[13]CH10N+ 1 121.0847 -11.45
 127.0532 C10H7+ 1 127.0542 -8.03
 128.0484 C9H6N+ 1 128.0495 -8.76
 129.0561 C9H7N+ 1 129.0573 -9.34
 130.064 C9H8N+ 1 130.0651 -8.87
 131.0595 C8H7N2+ 1 131.0604 -7.03
 132.0428 C8H6NO+ 1 132.0444 -11.99
 132.0667 C8H8N2+ 1 132.0682 -11.01
 132.0777 C9H10N+ 1 132.0808 -23.66
 133.0503 C8H7NO+ 1 133.0522 -14.57
 133.0732 C8H9N2+ 1 133.076 -21.58
 134.0457 C7H6N2O+ 1 134.0475 -13
 134.0955 C9H12N+ 1 134.0964 -6.64
 135.0524 C6[13]CH6N2O+ 1 135.0514 7.68
 142.0633 C10H8N+ 1 142.0651 -12.68
 143.0713 C10H9N+ 1 143.073 -11.86
 144.0795 C10H10N+ 1 144.0808 -8.65
 145.0747 C9H9N2+ 1 145.076 -9.25

146.0585 C9H8NO+ 1 146.06 -10.3
 146.0822 C9H10N2+ 1 146.0838 -11.6
 147.09 C9H11N2+ 1 147.0917 -11.09
 148.0738 C9H10NO+ 1 148.0757 -12.92
 148.0935 C8[13]CH11N2+ 1 148.0956 -13.93
 149.0684 C8H9N2O+ 1 149.0709 -16.96
 155.0587 C10H7N2+ 1 155.0604 -10.65
 156.0424 C10H6NO+ 1 156.0444 -12.9
 156.0653 C10H8N2+ 1 156.0682 -18.9
 157.0514 C10H7NO+ 1 157.0522 -5.02
 158.0448 C9H6N2O+ 1 158.0475 -16.89
 158.0576 C10H8NO+ 1 158.06 -15.21
 159.0538 C9H7N2O+ 1 159.0553 -9.32
 159.091 C10H11N2+ 1 159.0917 -3.99
 160.0573 C8[13]CH7N2O+ 1 160.0592 -11.62
 160.0981 C10H12N2+ 1 160.0995 -8.96
 161.106 C10H13N2+ 1 161.1073 -8.36
 171.0904 C11H11N2+ 1 171.0917 -7.53
 172.0751 C11H10NO+ 1 172.0757 -3.55
 172.0969 C11H12N2+ 1 172.0995 -15.09
 173.0693 C10H9N2O+ 1 173.0709 -9.35
 174.0768 C10H10N2O+ 1 174.0788 -11.53
 175.0795 C9[13]CH10N2O+ 1 175.0827 -18.15
 189.1005 C11H13N2O+ 1 189.1022 -9.11
 190.1042 C10[13]CH13N2O+ 1 190.1061 -10.46

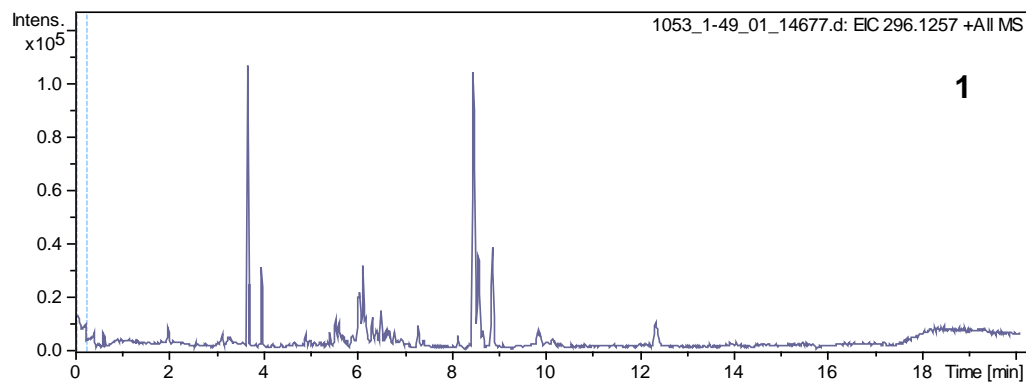
4



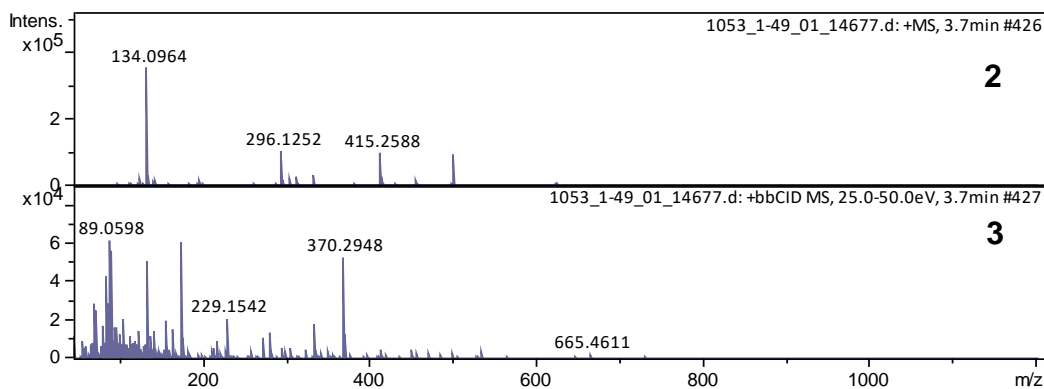
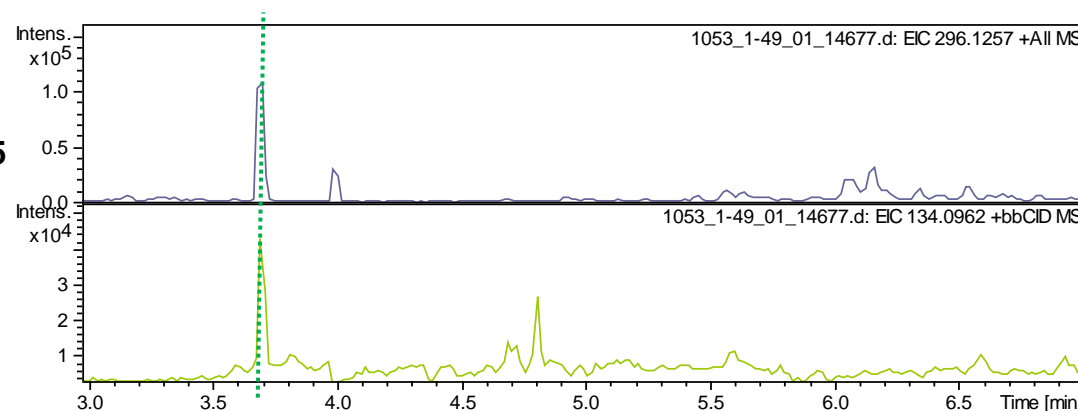
7



8



5

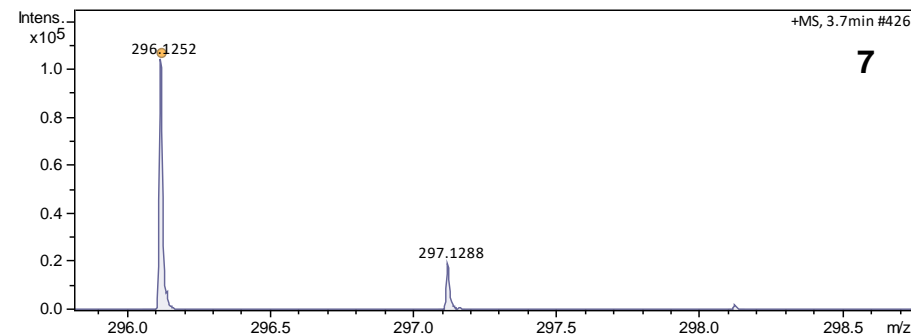


6

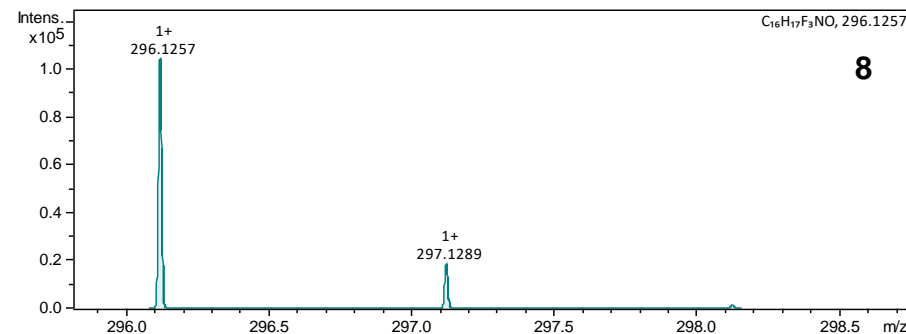
Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
134,0962	C ₉ H ₁₂ N	134,0964	1,4	3	4,5	even	ok
296,1252	C ₁₆ H ₁₇ F ₃ NO	296,1257	1,5	3,4	7,5	even	ok

4

PK\$SPLASH: [splash10-001i-0930000000-12529dbdb377b88c4733](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Norfluraxone)
 PK\$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)
 134.0952 C9H12N+ 2 134.0964 -9.09
 135.0988 C4H14F3O+ 2 135.0991 -2.47
 203.0909 C10H12F3N+ 2 203.0916 -3.48
 296.1254 C16H17F3NO+ 1 296.1257 -0.87



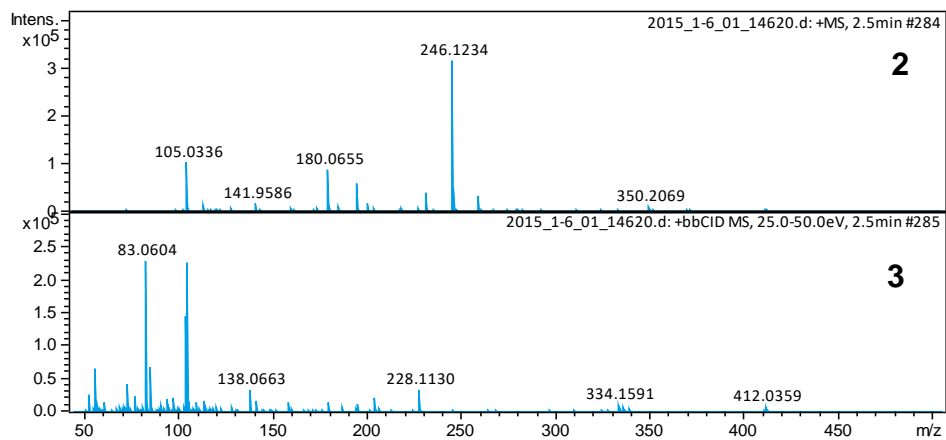
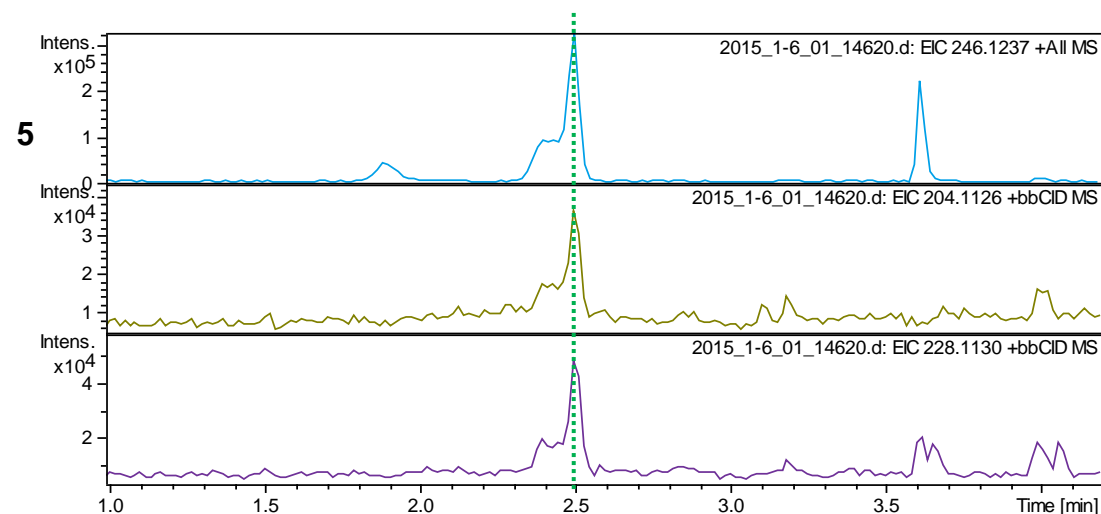
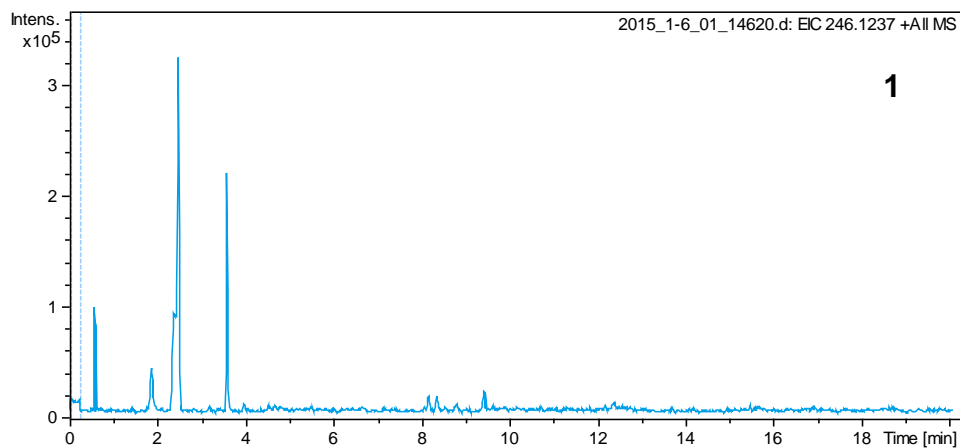
7



8

AMOSTRA: 2015 MODO POSITIVO tR: 2,52
 COMPOSTO: 4_AAA Fórmula: C₁₃H₁₅N₃O₂ m/z: 246,123703

53

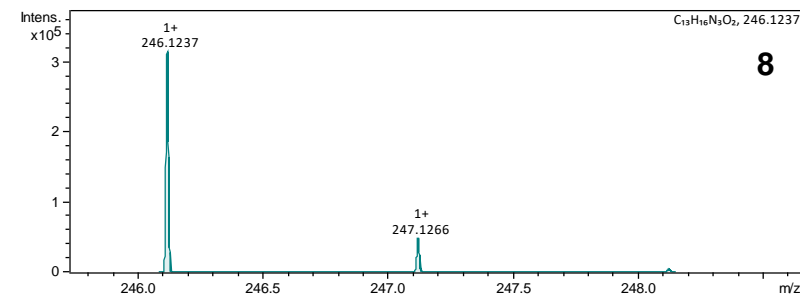
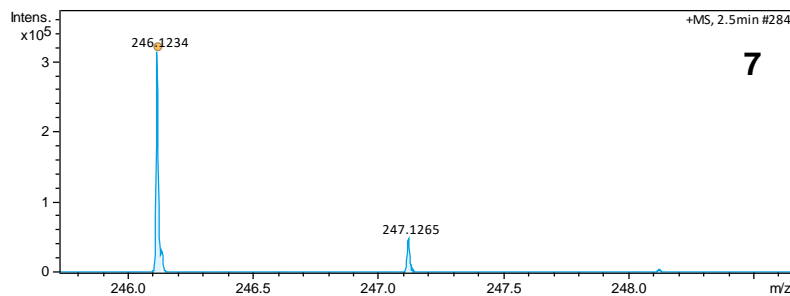


6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
204,1126	C ₁₁ H ₁₄ N ₃ O	204,1131	2,4	1,1	6,5	even	ok
228,113	C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O	228,1131	0,8	18,2	8,5	even	ok
246,1234	C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₂	246,1237	1,1	0,6	7,5	even	ok

4

145.0753 C9H9N2+ 1 145.076 -4.82
 159.0905 C10H11N2+ 1 159.0917 -7.63
 160.094 C9[13]CH11N2+ 1 160.0947 -4.37
 172.0617 C10H8N2O+ 1 172.0631 -8.24
 186.0777 C11H10N2O+ 1 186.0788 -5.53
 187.0857 C11H11N2O+ 1 187.0866 -4.51
 188.0883 C10[13]CH11N2O+ 1 188.0896 -6.91
 189.0887 C10H11N3O+ 2 189.0897 -4.93
 204.1124 C11H14N3O+ 2 204.1131 -3.41
 205.1153 C10[13]CH14N3O+ 1 205.116 -3.41
 228.1127 C13H14N3O+ 1 228.1131 -2.01
 229.1155 C12[13]CH14N3O+ 1 229.117 -6.64
 230.1193 C12H14N4O+ 2 230.1162 13.25
 246.123 C13H16N3O2+ 1 246.1237 -2.96

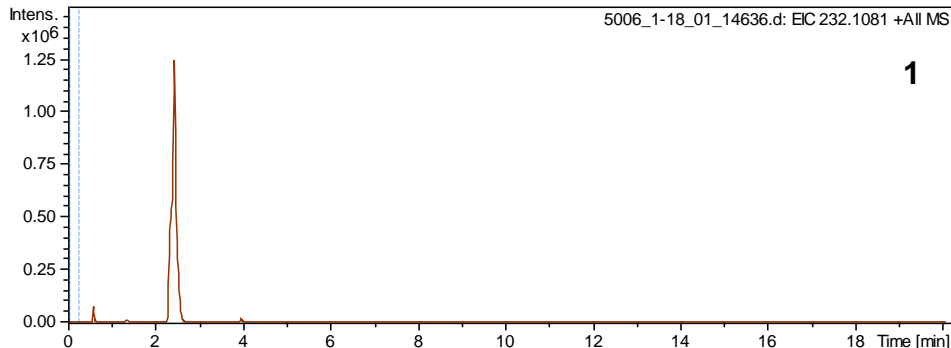


AMOSTRA: 5006
COMPOSTO: 4_FAA

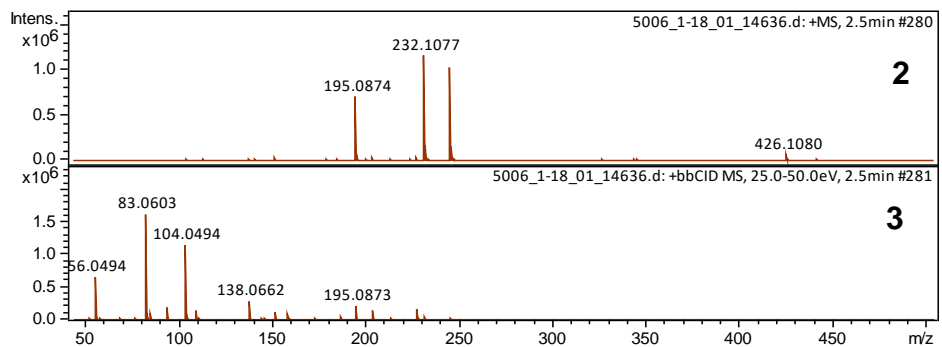
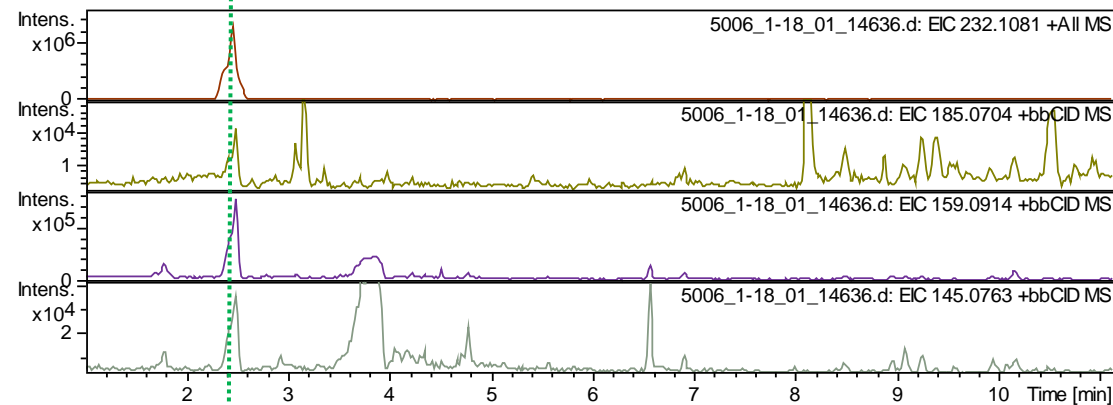
MODO POSITIVO
Fórmula: C₁₂H₁₃N₃O₂

tR: 2,49
m/z: 232,108053

54



5



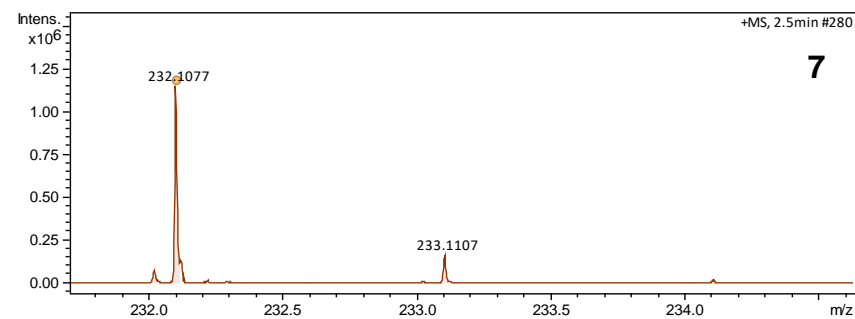
6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
145,0763	C ₉ H ₉ N ₂	145,076	-2	n.a.	6,5	even	ok
159,0914	C ₁₀ H ₁₁ N ₂	159,0917	1,6	3,6	6,5	even	ok
185,0704	C ₁₁ H ₉ N ₂ O	185,0709	2,7	353,2	8,5	even	ok
232,1077	C ₁₂ H ₁₄ N ₃ O ₂	232,1081	1,6	3,6	7,5	even	ok

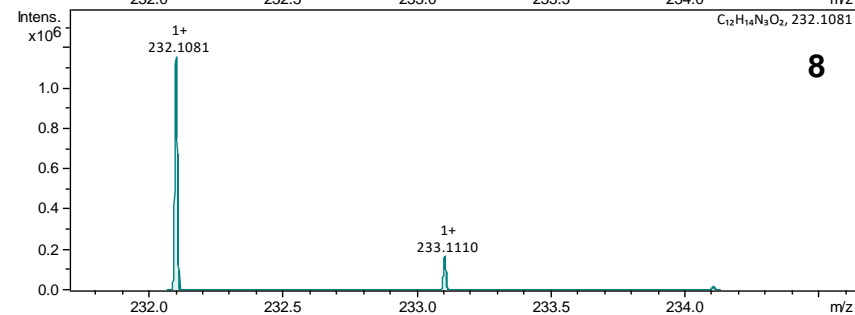
4

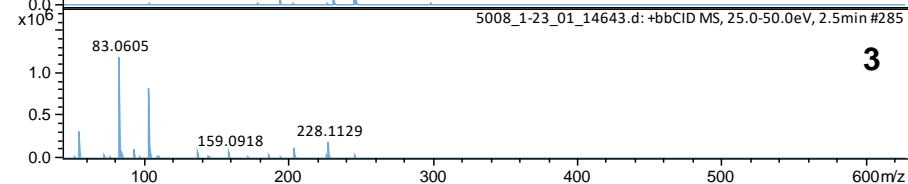
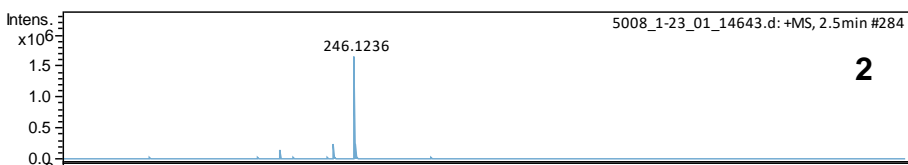
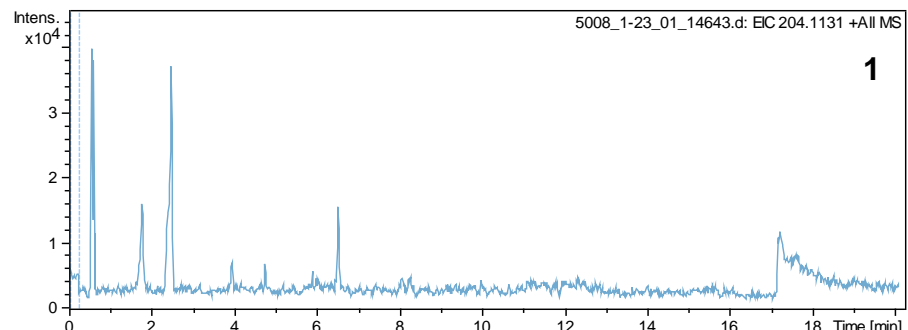
PK\$SPLASH: splash10-003s-0900000000-ae1e35066092462b6ff5
PK\$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)

115.0532	C9H7+	1	115.0542	-9.04
117.0566	C8H7N+	1	117.0573	-6.36
118.0639	C8H8N+	1	118.0651	-10.54
119.0598	C7H7N2+	1	119.0604	-5.09
128.0486	C9H6N+	1	128.0495	-6.91
129.0517	C4H7N3O2+	1	129.0533	-12.59
130.0641	C9H8N+	1	130.0651	-7.78
131.0622	C8H7N2+	1	131.0604	13.63
132.0448	C8H6NO+	1	132.0444	3.04
132.0795	C9H10N+	1	132.0808	-9.47
133.078	C8H9N2+	1	133.076	14.83
142.0637	C10H8N+	2	142.0651	-10.3
143.0595	C9H7N2+	1	143.0604	-5.95
144.068	C9H8N2+	1	144.0682	-1.25
144.0795	C10H10N+	2	144.0808	-8.7
145.0754	C9H9N2+	1	145.076	-4.09
146.0586	C9H8NO+	1	146.06	-9.92
146.0804	C4H10N4O2+	2	146.0798	4.19
147.055	C8H7N2O+	1	147.0553	-2.05
155.0603	C10H7N2+	1	155.0604	-0.19
157.0715	C5H9N4O2+	2	157.072	-3.51
158.0594	C10H8NO+	1	158.06	-4.34
158.0814	C10H10N2+	1	158.0838	-15.51
159.052	C4H7N4O3+	2	159.0513	4.47
159.091	C10H11N2+	1	159.0917	-4.5
160.0865	C9H10N3+	2	160.0869	-2.61
169.0755	C11H9N2+	1	169.076	-2.82
170.0683	C10H8N3+	1	170.0713	-17.32
171.0549	C10H7N2O+	1	171.0553	-2.42
171.0793	C10H9N3+	2	171.0791	1.26
172.0616	C10H8N2O+	1	172.0631	-8.92
173.0702	C10H9N2O+	1	173.0709	-4.25
185.071	C11H9N2O+	1	185.0709	0.17
187.0856	C11H11N2O+	1	187.0866	-5.49
188.0801	C10H10N3O+	2	188.0818	-9.07
189.0881	C10H11N3O+	2	189.0897	-8.18



8

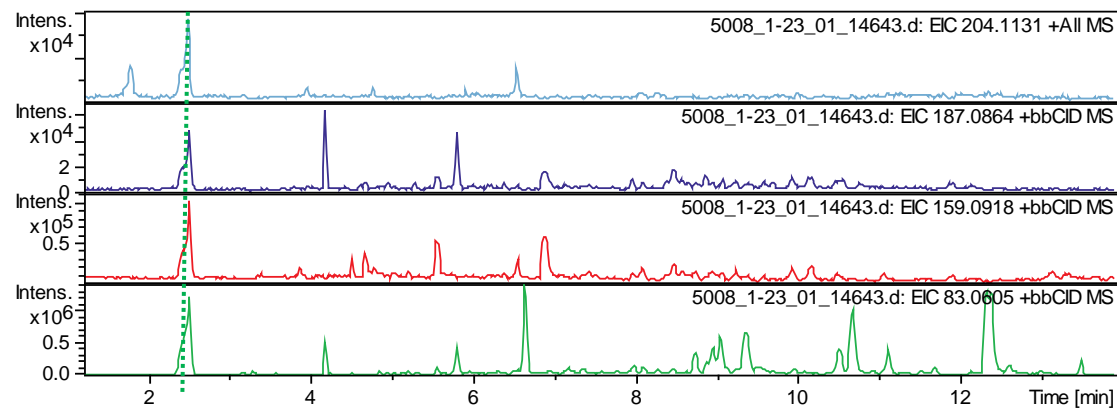




PKSSPLASH: splash10_0xdi-2790000000-1b883o048b67defe2f21

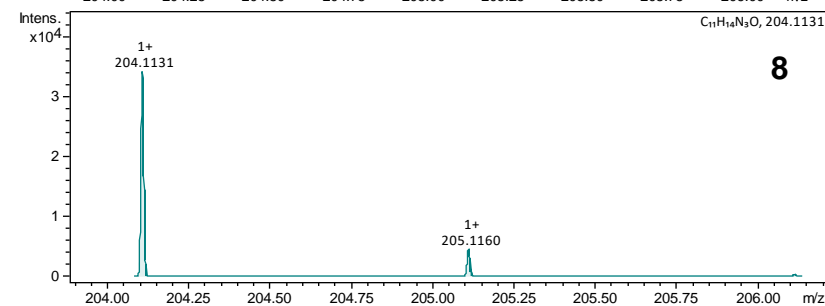
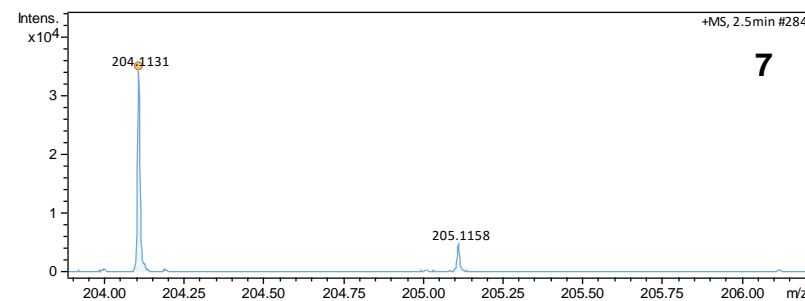
PKSNUM	PKSPEAK	m/z	int.	rel.int.
56.0472	43.0	9		
56.05316	109.0	23		
59.06171	21.0	4		
77.04212	21.0	4		
83.06045	318.0	68		
84.06784	32.0	7		
85.03109	43.0	9		
85.07784	313.0	66		
94.05814	62.0	13		
94.06646	510.0	108		
103.05553	19.0	4		
104.04541	96.0	20		
104.05483	20.0	4		
106.06436	20.0	4		
111.05502	137.0	29		
111.0642	51.0	11		
114.72256	19.0	4		
118.06172	56.0	12		
119.05824	20.0	4		
120.04276	17.0	4		
120.06966	22.0	5		
122.05319	20.0	4		
128.04294	23.0	5		
128.05246	176.0	37		
129.04778	17.0	4		
130.06166	52.0	11		
130.06778	19.0	4		
132.0497	23.0	5		
132.07971	116.0	25		
133.07582	20.0	4		
136.49525	30.0	6		
140.04741	21.0	4		
144.05115	19.0	4		
144.0726	18.0	4		
145.07661	192.0	41		
146.05542	66.0	14		
146.06482	135.0	29		
146.25038	27.0	6		
147.05928	20.0	4		
151.51178	52.0	11		
155.05894	20.0	4		
157.05411	48.0	10		
158.06161	141.0	30		
158.08354	20.0	4		
159.08699	499.0	106		
159.09589	402.0	85		
160.09047	114.0	24		
161.06134	17.0	4		
169.06581	20.0	4		
169.07597	23.0	5		
169.08466	47.0	10		
170.06987	18.0	4		
171.05283	29.0	6		
173.07202	162.0	34		
174.06709	17.0	4		
175.07336	30.0	6		
177.10294	30.0	6		
177.11751	22.0	5		
187.08202	369.0	78		
187.0909	345.0	73		
188.086	22.0	5		
188.09669	29.0	6		
189.08005	17.0	4		
189.09019	148.0	31		
190.09746	19.0	4		
191.09459	27.0	6		
196.30536	23.0	5		
199.26155	17.0	4		
203.06407	18.0	4		
203.09746	18.0	4		
204.11259	4703.0	999		
204.14972	50.0	11		
204.16269	33.0	7		

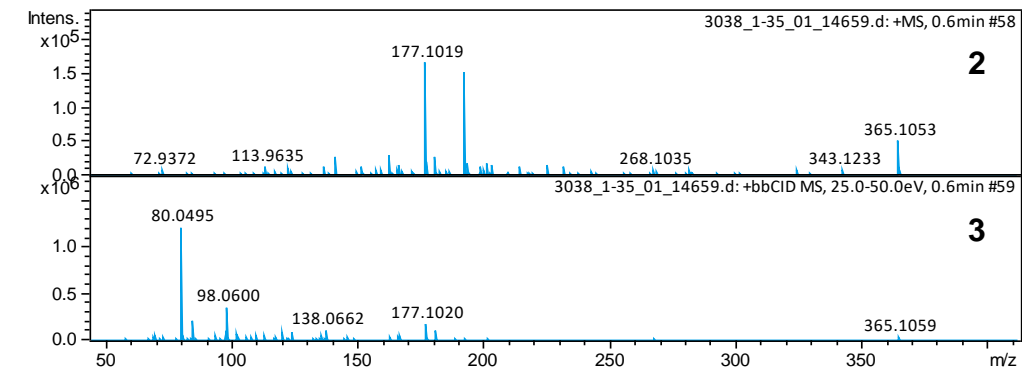
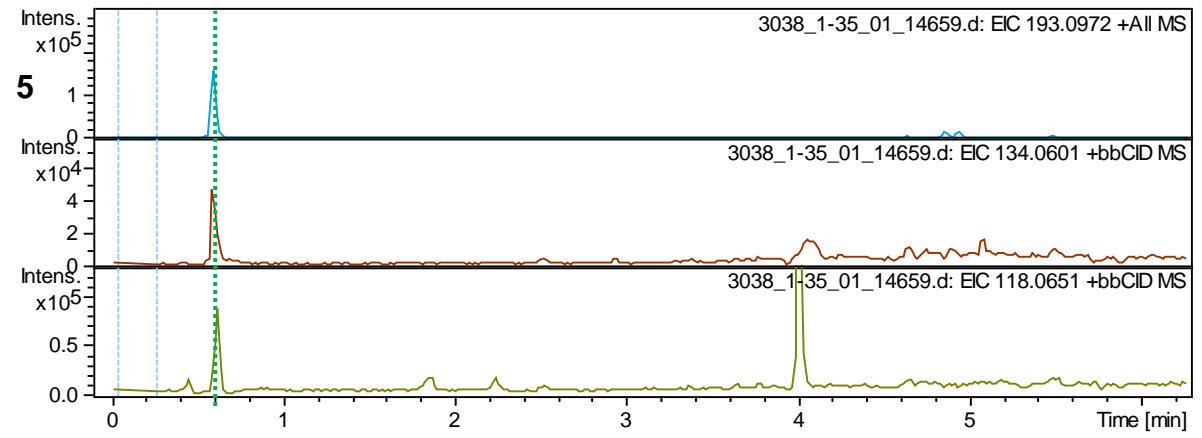
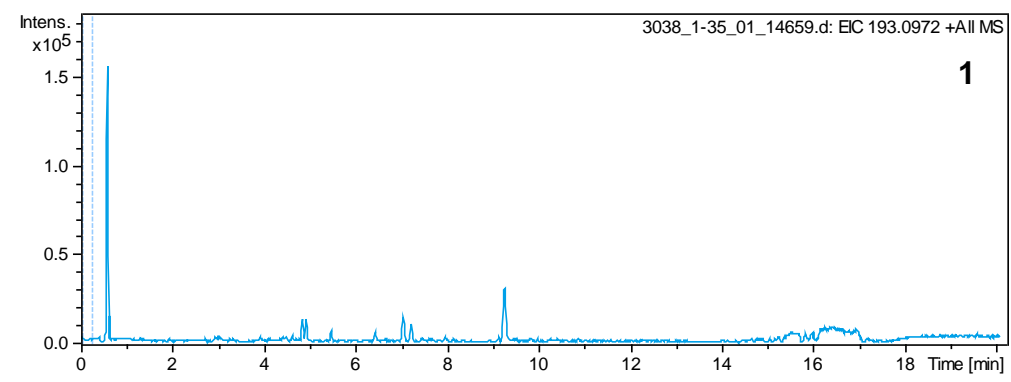
5



6

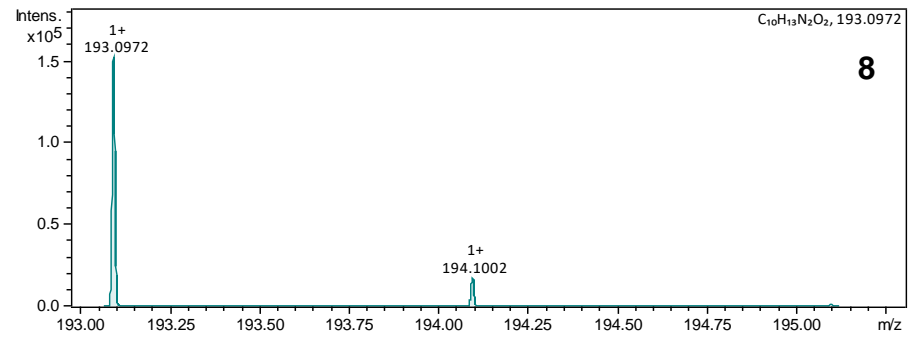
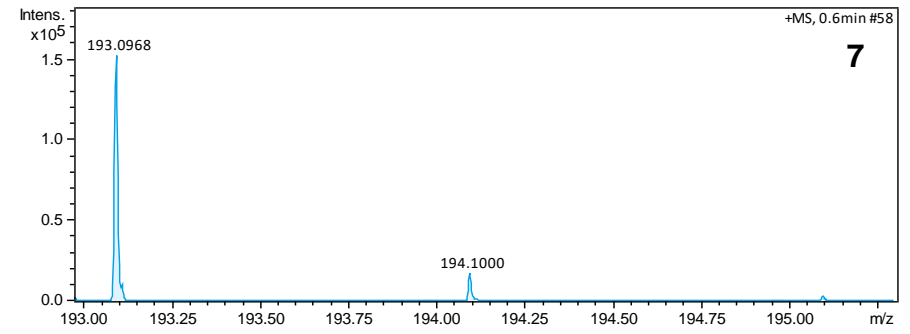
Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
83,0605	C ₄ H ₇ N ₂	83,0604	-2,1	1,7	2,5	even	ok
159,0918	C ₁₀ H ₁₁ N ₂	159,0917	-0,8	3,6	6,5	even	ok
187,0864	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O	187,0866	1,1	145,3	7,5	even	ok
204,1131	C ₁₁ H ₁₄ N ₃ O	204,1131	0,3	7	6,5	even	ok





6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
118,0651	C ₈ H ₈ N	118,0651	0,6	650,2	5,5	even	ok
134,0601	C ₈ H ₈ NO	134,06	-0,6	681,5	5,5	even	ok
193,0968	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₂	193,0972	1,8	6,6	5,5	even	ok



4

PK\$SPLASH: splash10-0159-0900000000-db9e3da8516d8c40b1a9

PK\$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)

117.0571 C8H7N+ 1 117.0573 -1.77

118.0648 C8H8N+ 1 118.0651 -2.9

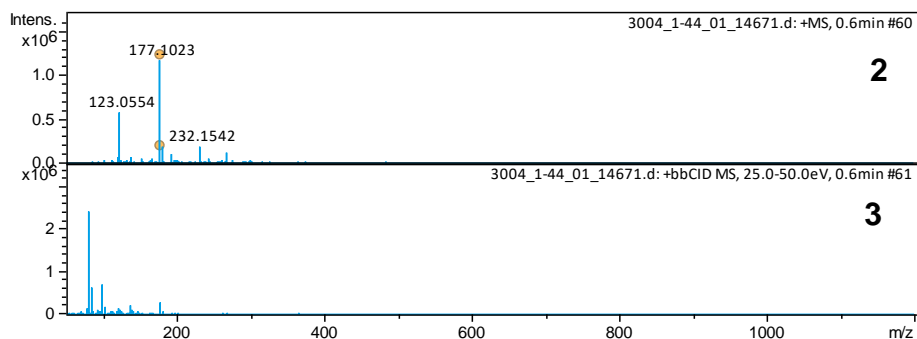
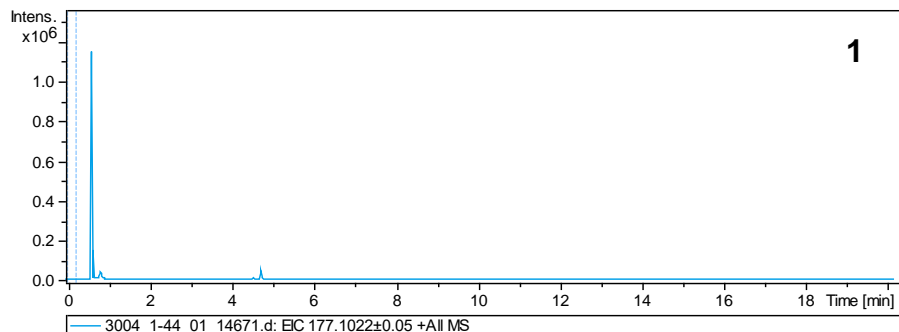
131.059 C8H7N2+ 1 131.0604 -10.36

133.0759 C8H9N2+ 1 133.076 -0.73

134.058 C8H8NO+ 1 134.06 -15.54

AMOSTRA: 3004
 COMPOSTO: COTININA

MODO POSITIVO tR: 0,6
 Fórmula: C₁₀H₁₂N₂O m/z: 177,1022

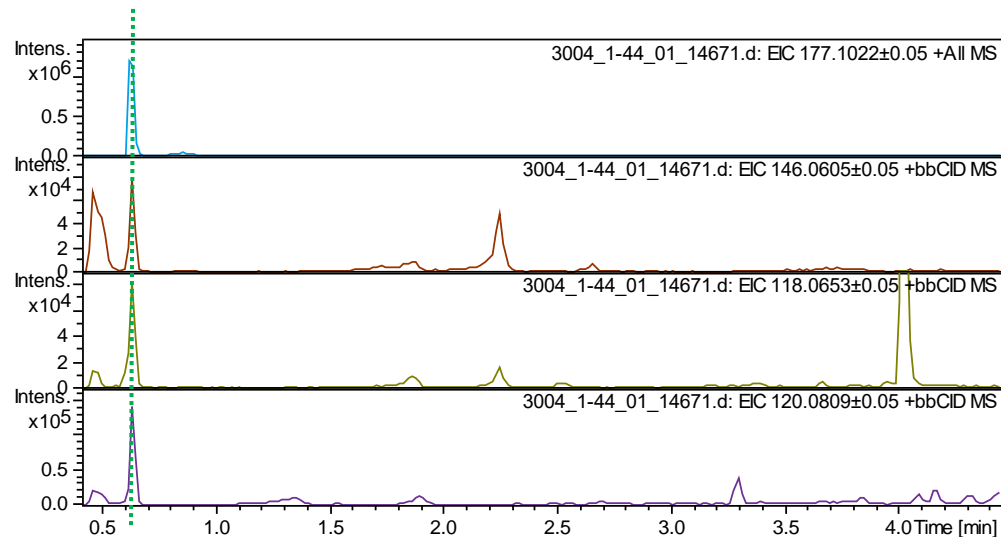


4

PK\$SPLASH: splash10-004i-0900000000-ec572d94cf151fcc911b
 PK\$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)

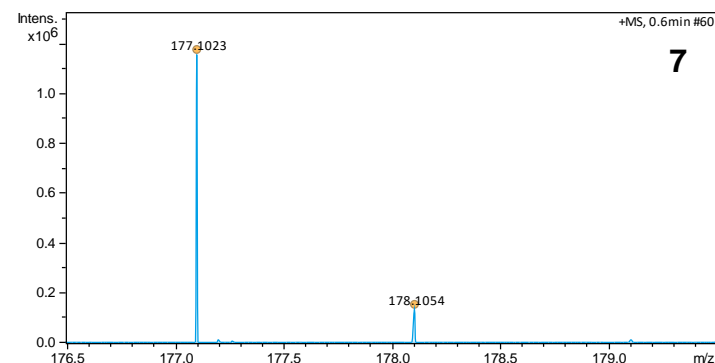
117.0563	C ₈ H ₇ N ⁺	1	117.0573	-8.21
118.0643	C ₈ H ₈ N ⁺	1	118.0651	-7.04
119.0684	C ₇ [¹³]CH ₈ N ⁺	1	119.069	-5.52
120.08	C ₈ H ₁₀ N ⁺	1	120.0808	-6.75
121.0826	C ₇ [¹³]CH ₁₀ N ⁺	1	121.0847	-17.14
122.0819	C ₇ H ₁₀ N ₂ ⁺	1	122.0838	-15.85
128.0487	C ₉ H ₆ N ⁺	1	128.0495	-5.83
130.0643	C ₉ H ₈ N ⁺	1	130.0651	-6.59
131.059	C ₈ H ₇ N ₂ ⁺	1	131.0604	-10.37
132.0794	C ₉ H ₁₀ N ⁺	1	132.0808	-10.33
133.0744	C ₈ H ₉ N ₂ ⁺	1	133.076	-12.52
134.0455	C ₇ H ₆ N ₂ O ⁺	1	134.0475	-14.73
134.0585	C ₈ H ₈ N ₂ O ⁺	1	134.06	-11.49
135.0908	C ₈ H ₁₁ N ₂ ⁺	1	135.0917	-6.6
143.0583	C ₉ H ₇ N ₂ ⁺	1	143.0604	-14.28
144.0668	C ₉ H ₈ N ₂ ⁺	1	144.0682	-10.05
145.0516	C ₉ H ₇ N ₂ O ⁺	1	145.0522	-4.14
145.0738	C ₉ H ₉ N ₂ ⁺	1	145.076	-15.08
146.0587	C ₉ H ₈ N ₂ O ⁺	1	146.06	-9.23
147.0625	C ₈ [¹³]CH ₈ N ₂ O ⁺	1	147.0639	-9.92
148.0741	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ⁺	1	148.0757	-11.03
149.0695	C ₈ H ₉ N ₂ O ⁺	1	149.0709	-9.82
149.1066	C ₉ H ₁₃ N ₂ ⁺	1	149.1073	-4.9
150.0726	C ₇ [¹³]CH ₉ N ₂ O ⁺	1	150.0748	-14.91
159.0905	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ ⁺	1	159.0917	-7.29
160.0739	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ⁺	1	160.0757	-11.05
162.0766	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ⁺	1	162.0788	-13.1
177.1011	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ⁺	1	177.1022	-6.38
178.1038	C ₉ [¹³]CH ₁₃ N ₂ O ⁺	1	178.1061	-13.39

5

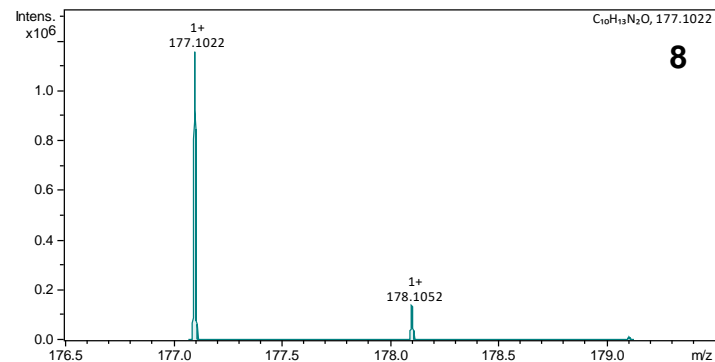


6

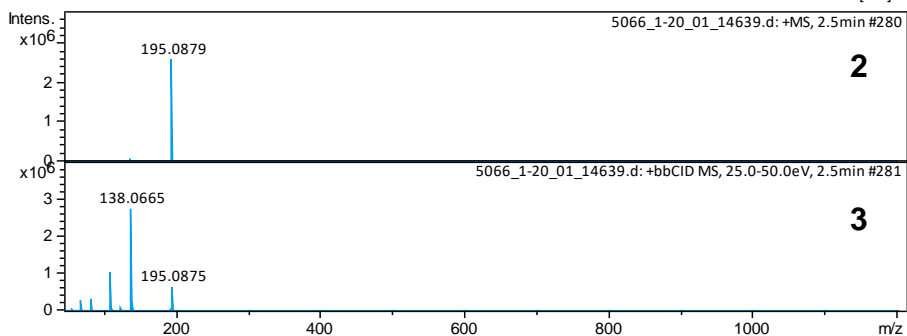
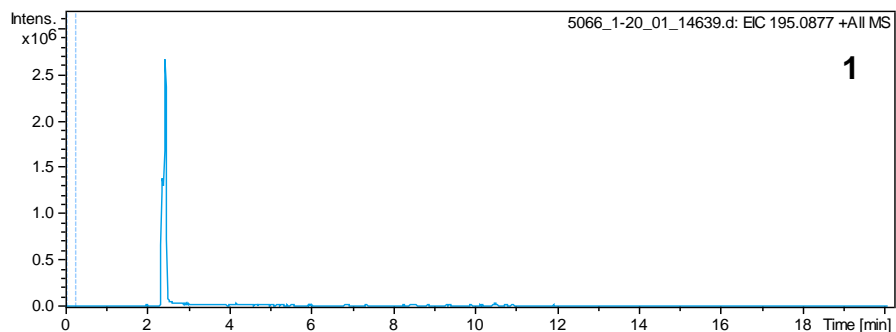
Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
118,0653	C ₈ H ₈ N	118,0651	-1,2	619,4	5,5	even	ok
120,0809	C ₈ H ₁₀ N	120,0808	-1,2	27,3	4,5	even	ok
146,0605	C ₉ H ₈ NO	146,0600	-2,9	32,9	6,5	even	ok
177,1021	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O	177,1022	0,5	0,9	5,5	even	ok



7



8



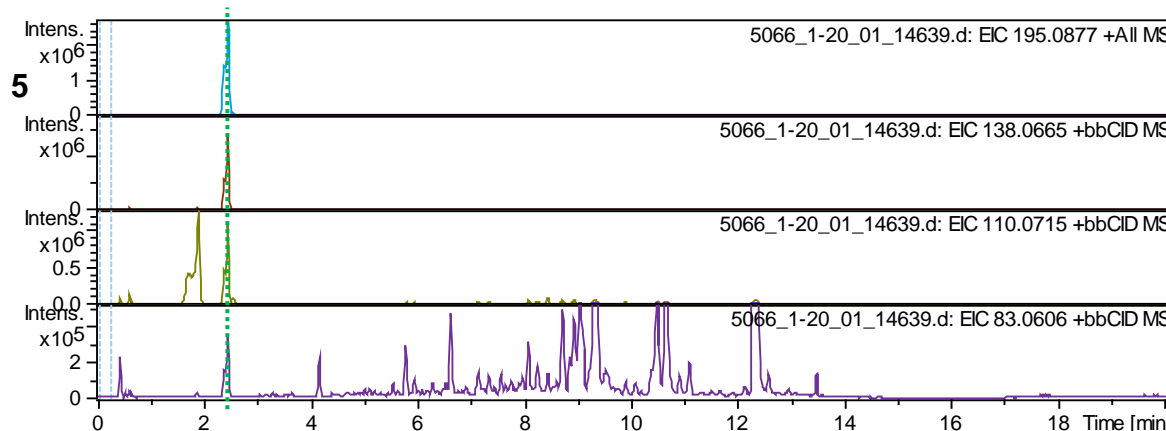
4

PK\$SPLASH: [splash10-01w0-0900000000-88cd919e5f37c53adf12](#)

PK\$NUM_PEAK: 18

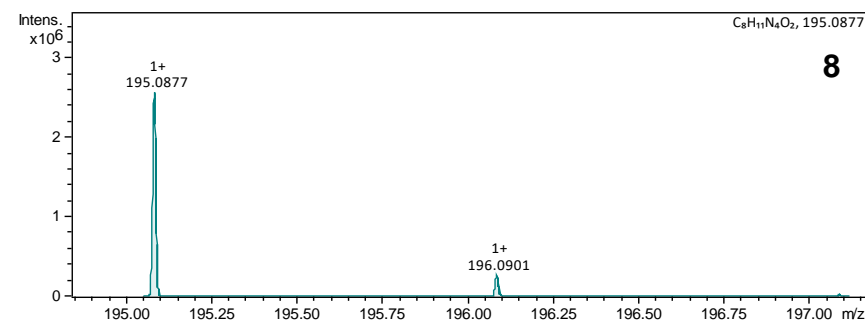
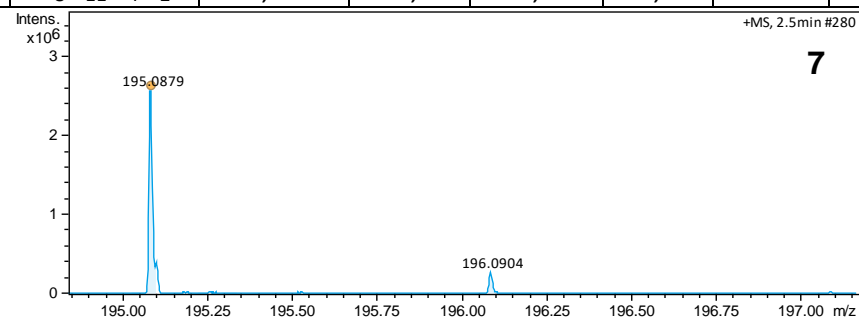
PK\$PEAK: m/z int. rel.int.

81.041900 177.647060 13
 82.050500 136.000000 10
 83.058700 1757.411700 132
 97.037000 174.352940 13
 108.054700 282.352940 21
 109.040000 1957.647100 148
 110.071400 6929.647000 522
 111.056600 597.411740 45
 111.074700 345.411770 26
 123.042900 11804.235000 889
 124.045400 643.764710 49
 135.067100 262.823520 20
 136.050500 345.411770 26
 138.066300 13257.647000 999
 139.069300 859.294130 65
 151.061400 140.000000 11
 154.060800 182.352940 14
 195.086700 413.411770 31



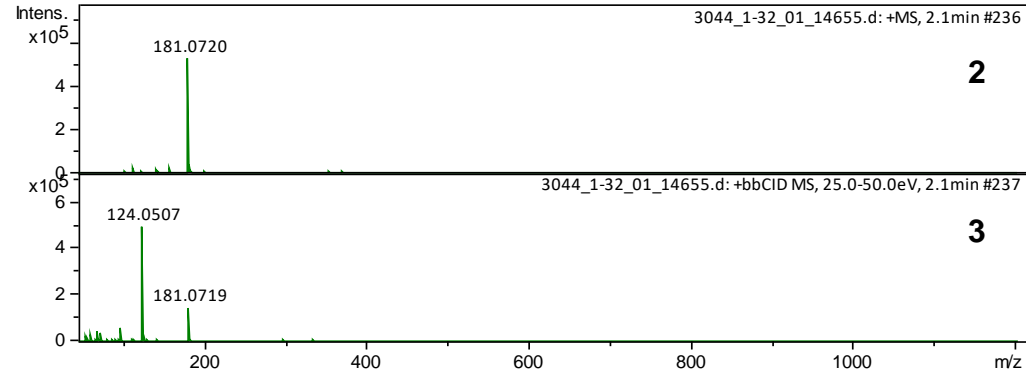
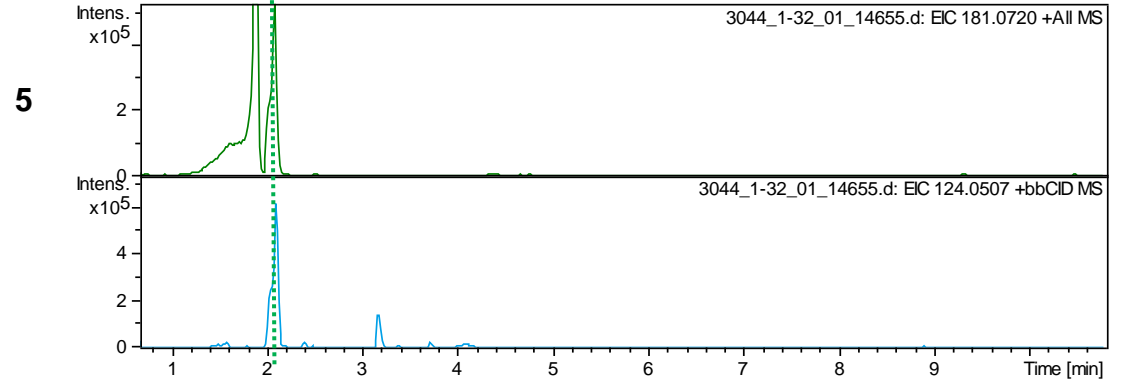
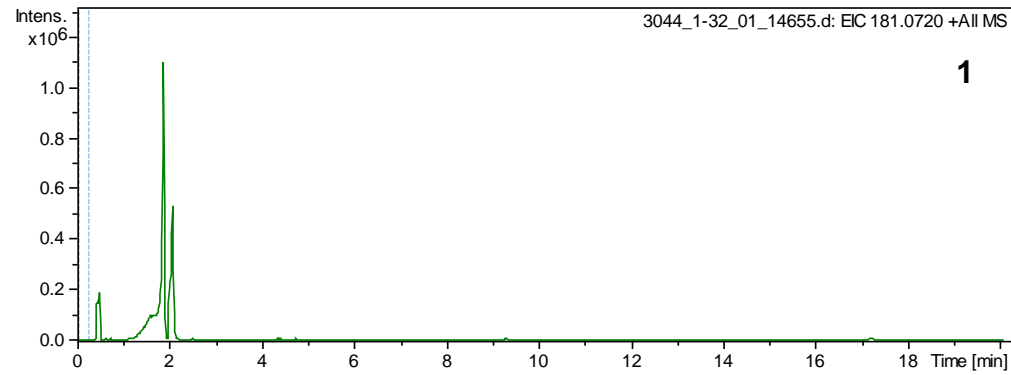
6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
83,0606	C ₄ H ₇ N ₂	83,0604	-2,6	6,7	2,5	even	ok
110,0715	C ₅ H ₈ N ₃	110,0713	-2,1	4,4	3,5	even	ok
138,0665	C ₆ H ₈ N ₃ O	138,0662	-2	3,3	4,5	even	ok
195,0879	C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₂	195,0877	-1,3	1,5	5,5	even	ok



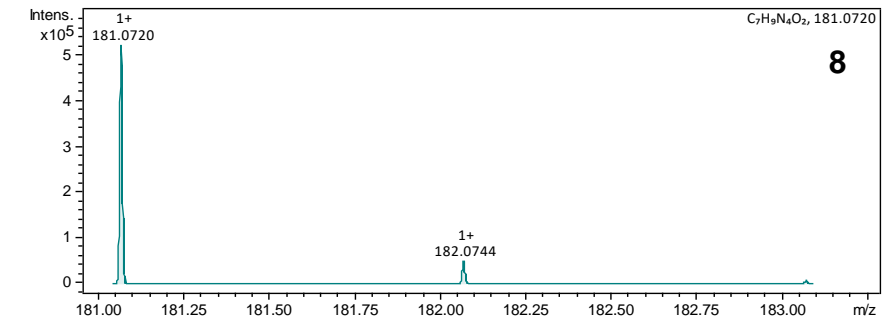
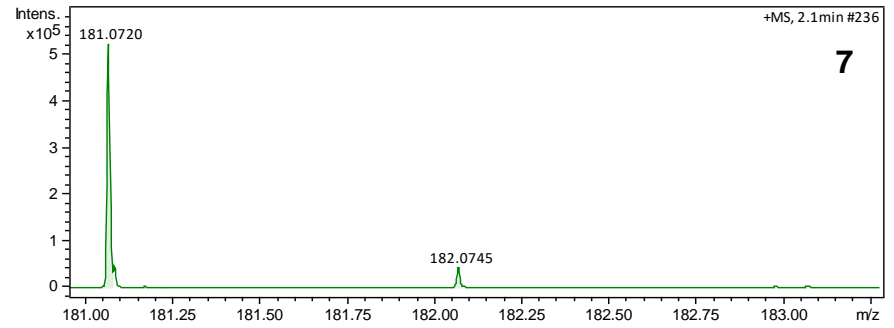
7

8

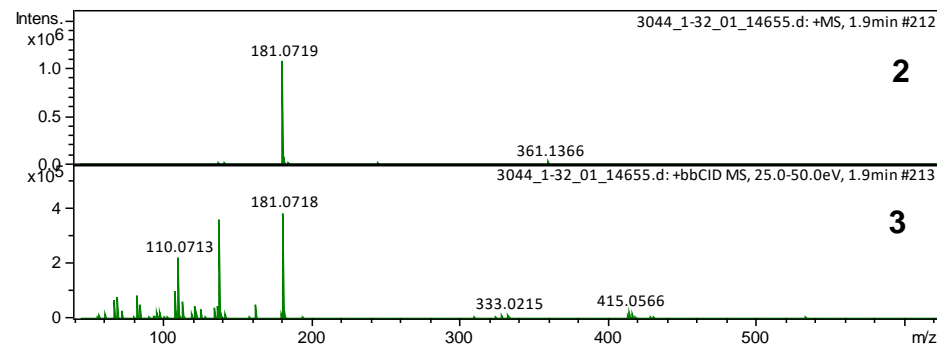
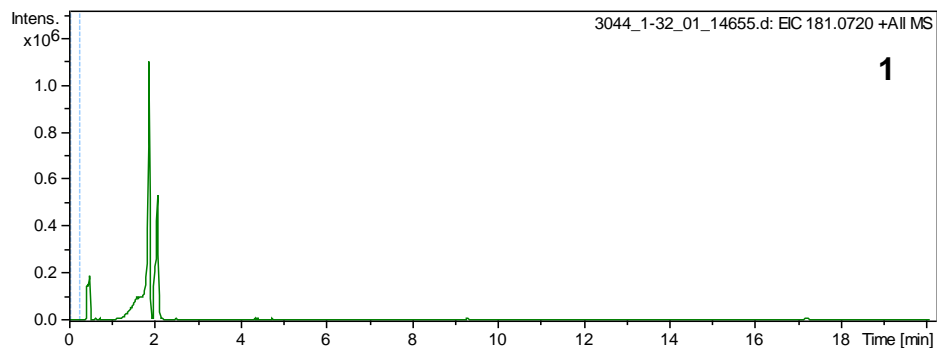


6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
124,0507	C ₅ H ₆ N ₃ O	124,0505	-1,2	3,2	4,5	even	ok
181,072	C ₇ H ₉ N ₄ O ₂	181,072	0,2	5,5	5,5	even	ok

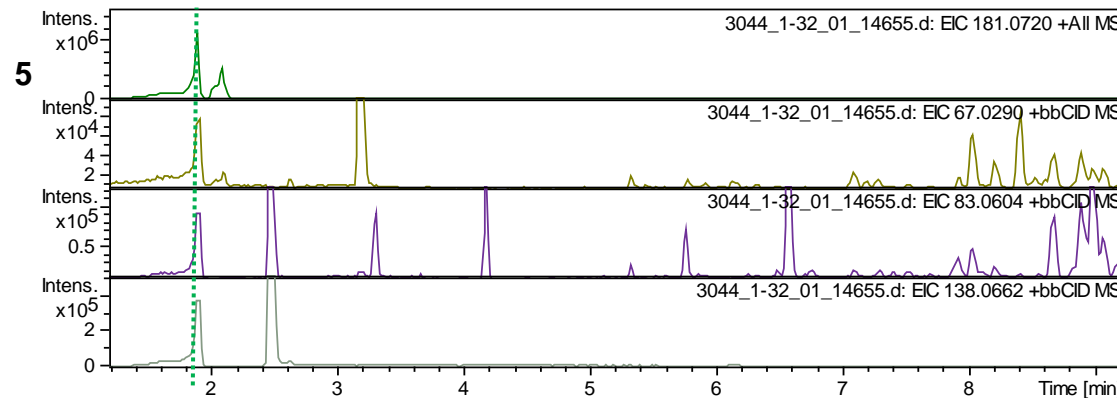


4 PK\$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)
 124.0497 C₅H₆N₃O+ 2 124.0505 -6.8



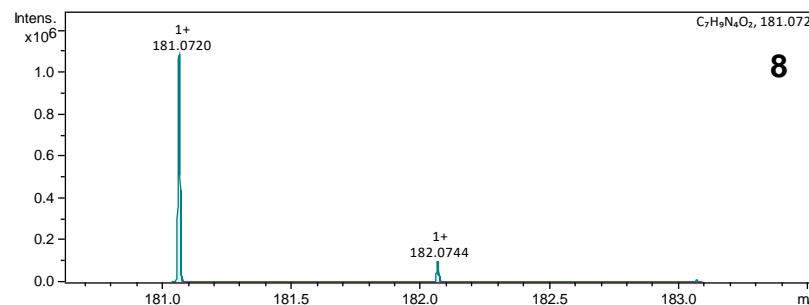
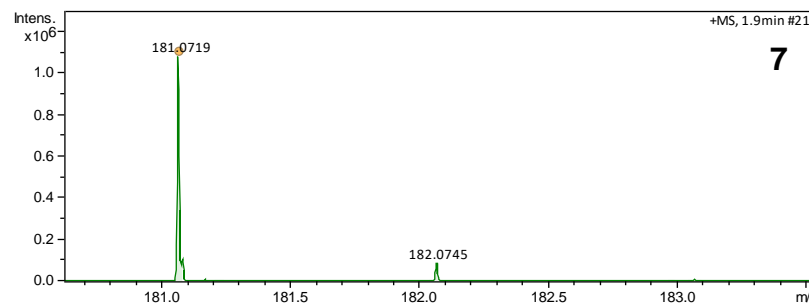
PK\$SPLASH: [splash10-014i-9200000000-3e4c74d70eb361d592a2](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3e4c74d70eb361d592a2)

PK\$NUM_PEAK: 27
 PK\$PEAK: m/z int. rel.int.
 54.0306 402.508 40
 56.0487 555.602 56
 66.0227 677.926 68
 67.0283 10000 999
 68.0357 3772.575 377
 69.0442 3266.722 326
 70.0298 134.448 13
 79.0286 699.666 70
 80.0327 141.472 14
 81.0411 1250 125
 82.0503 343.395 34
 83.0605 1710.702 171
 85.0387 113.712 11
 93.032 796.99 80
 94.0406 952.341 95
 95.0481 1370.401 137
 96.0553 131.187 13
 107.0354 654.013 65
 108.0567 1267.559 127
 109.0395 214.13 21
 110.0723 453.261 45
 120.0437 301.254 30
 121.0514 325.084 32
 122.0584 2777.592 277
 123.0422 1397.993 140
 135.0695 142.391 14
 148.0387 304.933 30



6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
67,029	C ₃ H ₃ N ₂	67,0291	1,1	7,9	3,5	even	ok
83,0604	C ₄ H ₇ N ₂	83,0604	0,2	18,5	2,5	even	ok
138,0662	C ₆ H ₈ N ₃ O	138,0662	-0,4	5,9	4,5	even	ok
181,0719	C ₇ H ₉ N ₄ O ₂	181,072	0,8	7,8	5,5	even	ok



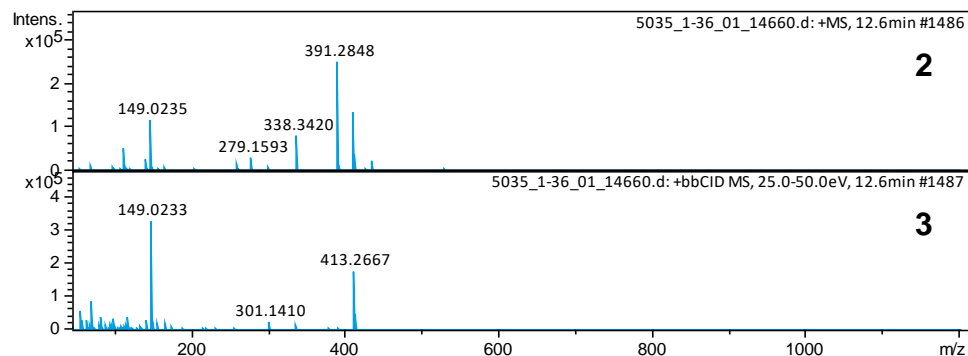
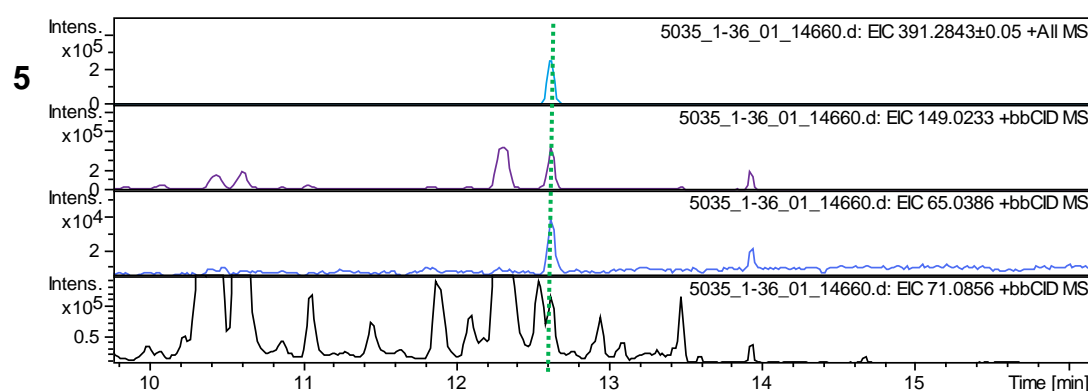
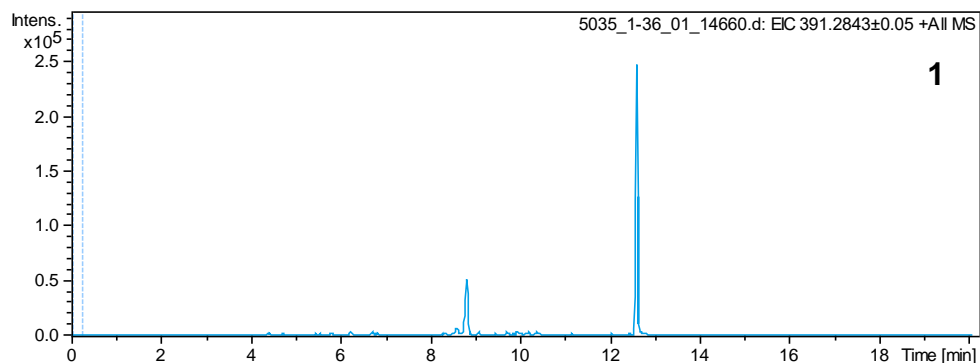
4

5

6

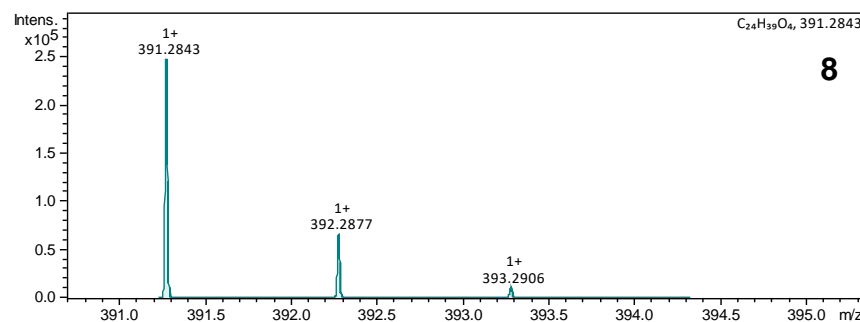
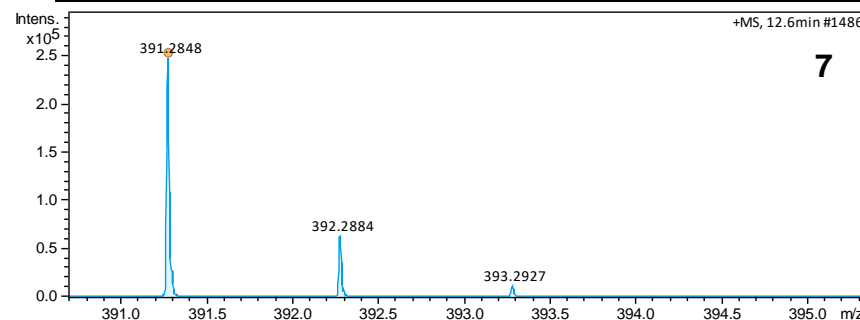
7

8



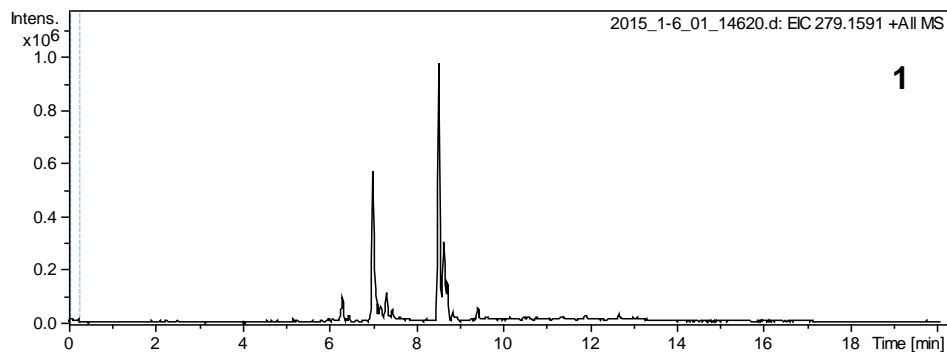
6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
65,0386	C ₅ H ₅	65,0386	0,1	135,6	3,5	even	ok
71,0856	C ₅ H ₁₁	71,0855	-0,5	0,9	0,5	even	ok
149,0233	C ₈ H ₅ O ₃	149,0233	-0,1	1,2	6,5	even	ok
391,2848	C ₂₄ H ₃₉ O ₄	391,2843	-1,3	8	5,5	even	ok

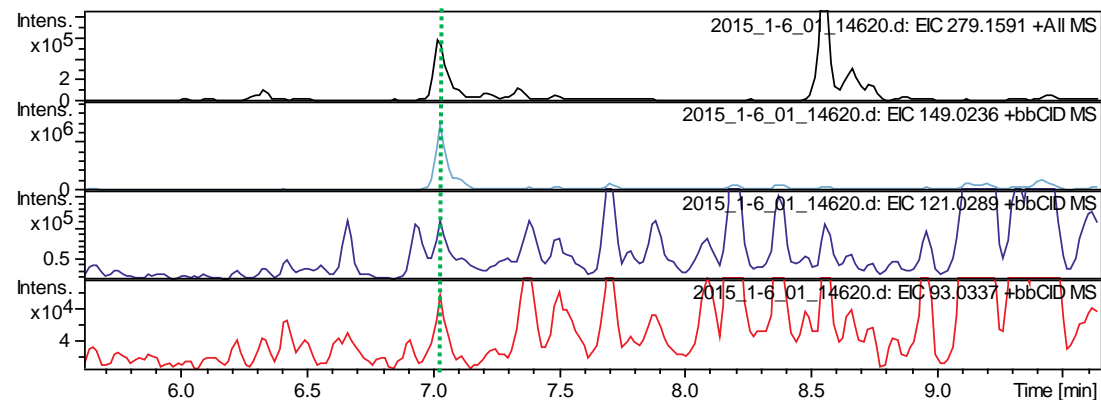


4 PK\$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)

57.0703 C4H9+ 1 57.0699 7.67
 65.0391 C5H5+ 1 65.0386 7.67
 71.0866 C5H11+ 1 71.0855 14.43
 93.0337 C6H5O+ 1 93.0335 2.32
 121.0285 C7H5O2+ 1 121.0284 0.62
 149.0233 C8H5O3+ 1 149.0233 -0.24

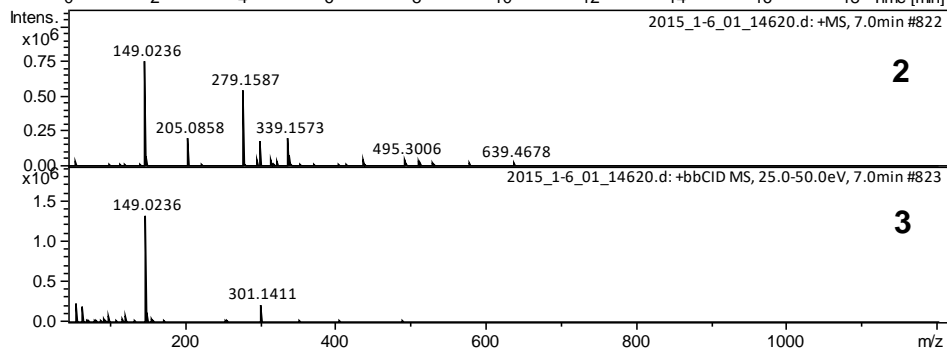


5



6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
93,0337	C ₆ H ₅ O	93,0335	-1,8	11,5	4,5	even	ok
121,0289	C ₇ H ₅ O ₂	121,0284	-4,2	4,1	5,5	even	ok
149,0236	C ₈ H ₅ O ₃	149,0233	-2,1	0,8	6,5	even	ok
279,1587	C ₁₆ H ₂₃ O ₄	279,1591	1,2	5,3	5,5	even	ok



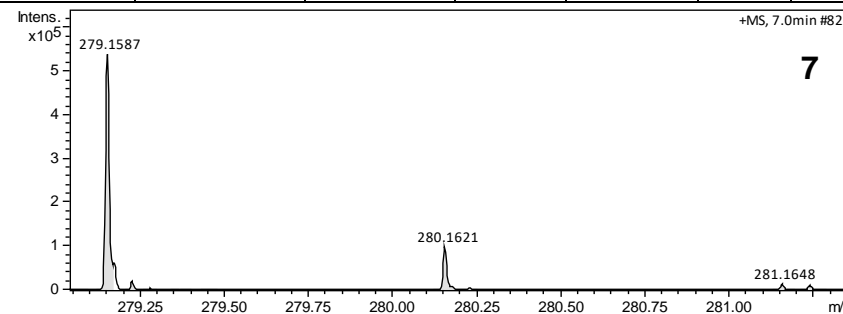
4

PK\$SPLASH: [splash10-0002-0900000000-d8baa517a8d379e2cd72](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dibutylphthalate)

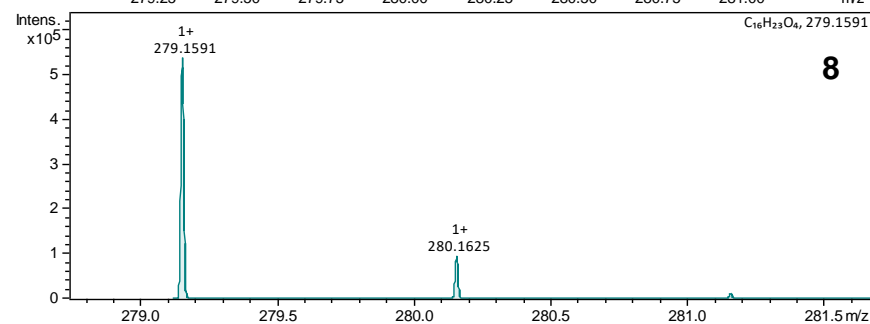
PK\$NUM_PEAK: 11

PK\$PEAK: m/z int. rel.int.

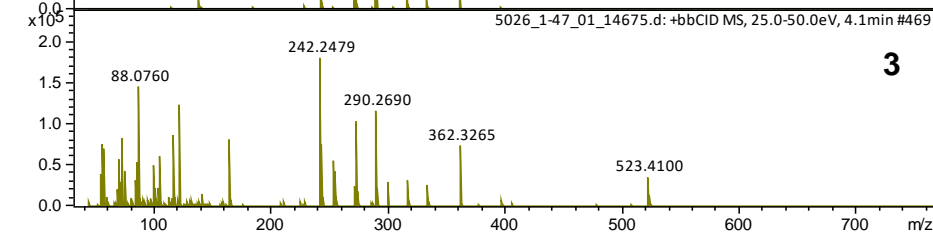
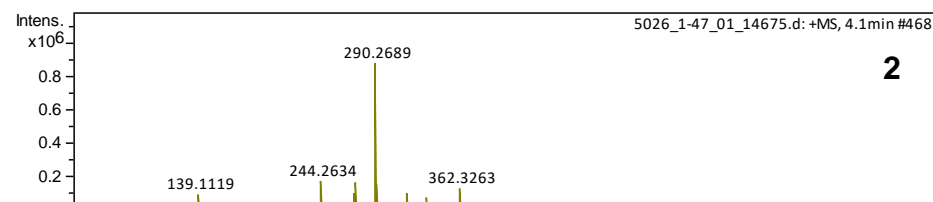
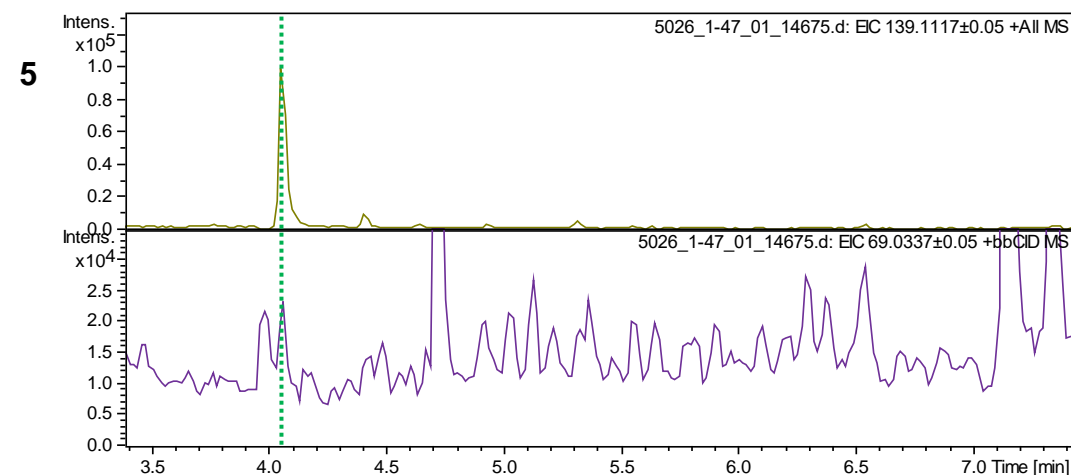
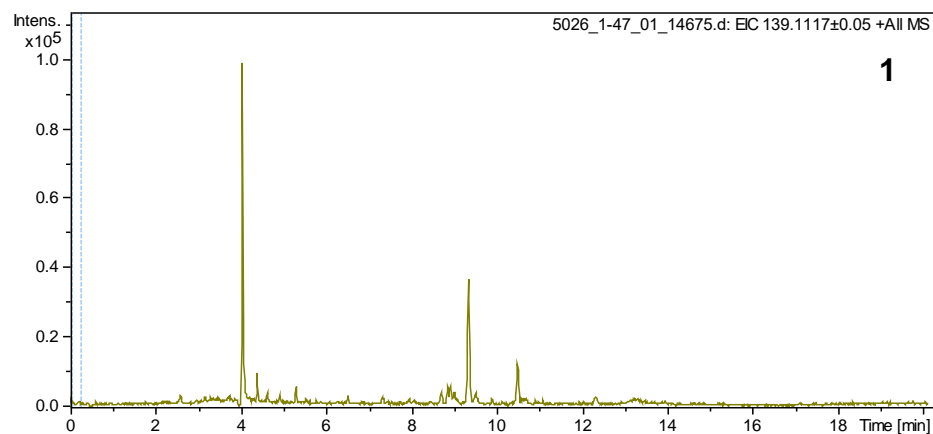
- 80.025 9988 5
- 93.0329 238304 133
- 94.0365 11474 6
- 111.0439 38362 21
- 121.0285 701302 392
- 121.0388 158688 88
- 122.032 44420 24
- 149.0236 1785866 999
- 150.0271 149956 83
- 151.0282 10780 6
- 167.0336 2864 1



7

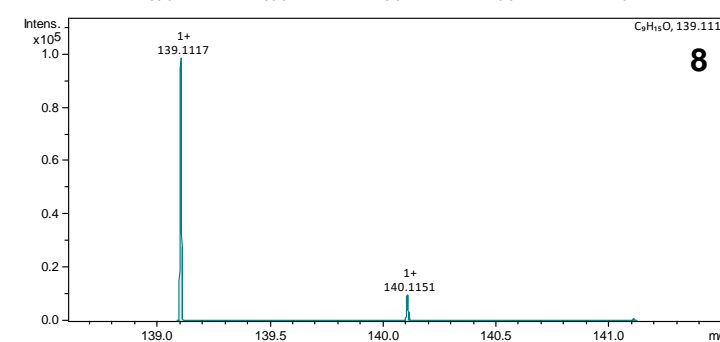
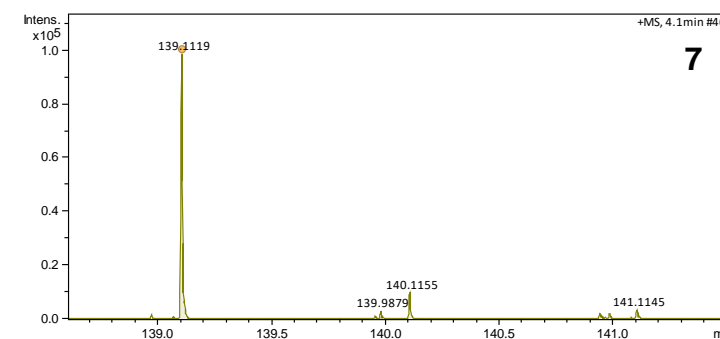


8

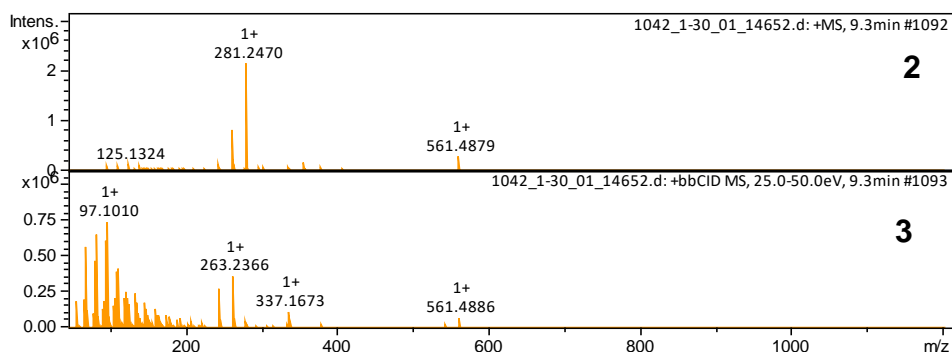
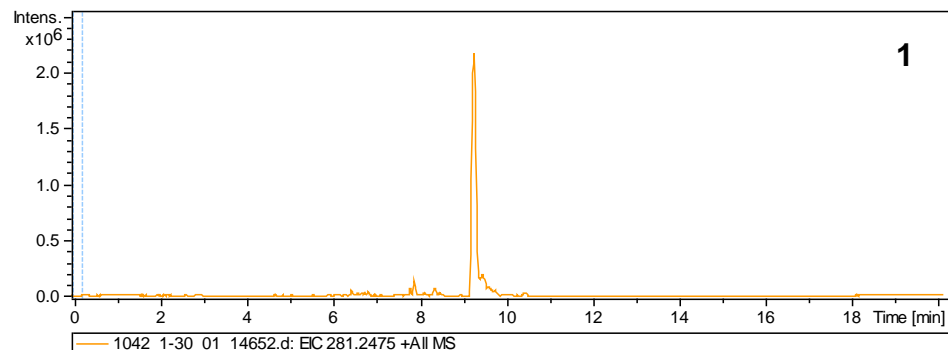


6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
69,0337	C ₄ H ₅ O	69,0335	-2.3	2,4	2,5	even	ok
139,1119	C ₉ H ₁₅ O	139,1117	-1.4	14,9	2,5	even	ok



4 PK\$SPLASH: [splash10-00kr-5900000000-b4a9c98d729630e56dea](#)
 PK\$ANNOTATION: m/z tentative_formula formula_count mass error(ppm)
 69.0329 C4H5O+ 1 69.0335 -8.87
 139.1105 C9H15O+ 1 139.1117 -8.6



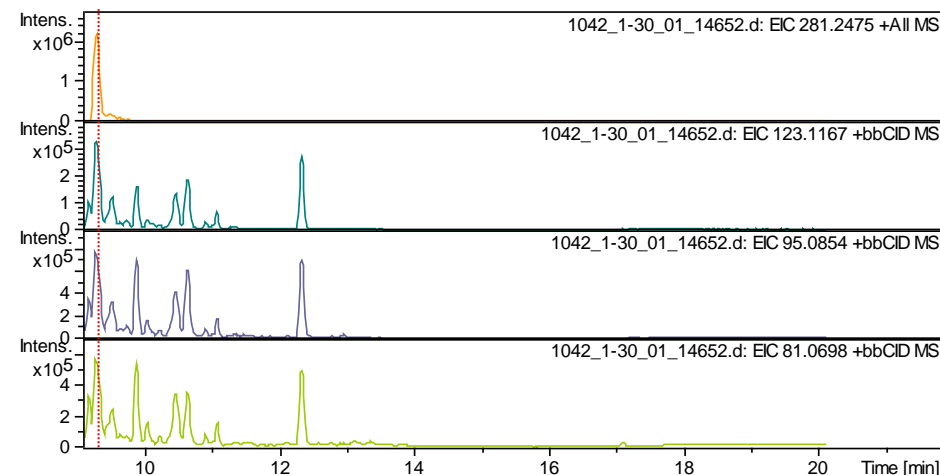
PK\$SPLASH: splash10-001i-9000000000-59416a5aad3f4a07f1ff

PK\$NUM_PEAK: 22
 PK\$PEAK: m/z int. rel.int.

4

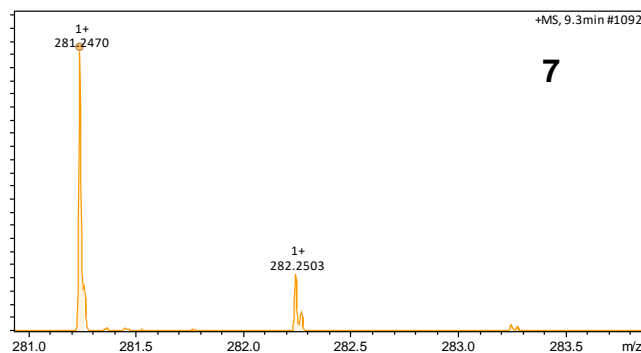
55.0174 40 27
 57.0698 108 74
 59.0486 88 60
 68.0576 70 48
 72.0439 48 33
 72.0802 56 38
 77.038 94 65
 81.0694 1444 999
 83.049 142 98
 83.0854 660 456
 84.0926 68 47
 87.0437 38 26
 88.0748 44 30
 92.0575 98 67
 93.0697 394 272
 95.0851 770 532
 97.1007 164 113
 108.0899 44 30
 123.118 86 59
 149.0233 108 74
 151.1469 40 27
 160.0762 42 29

5

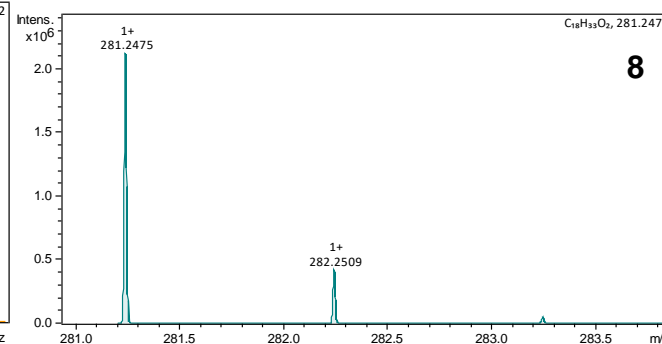


6

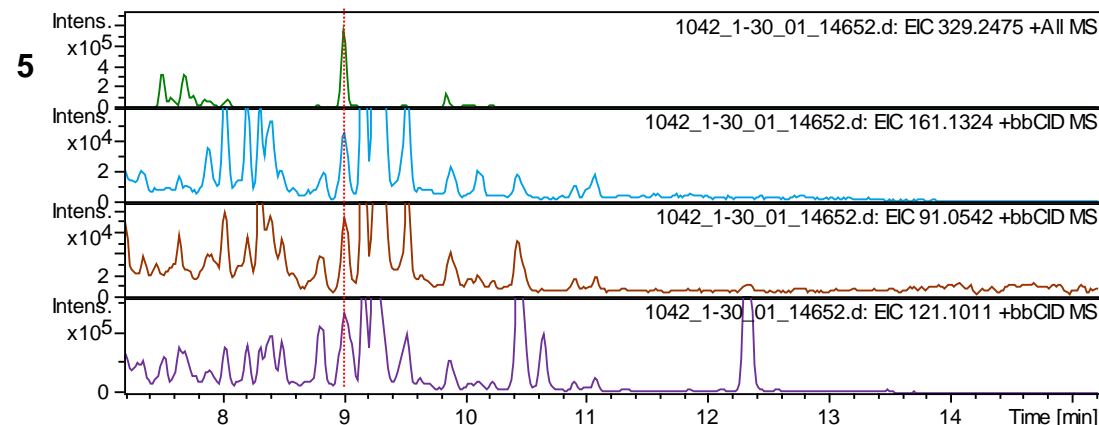
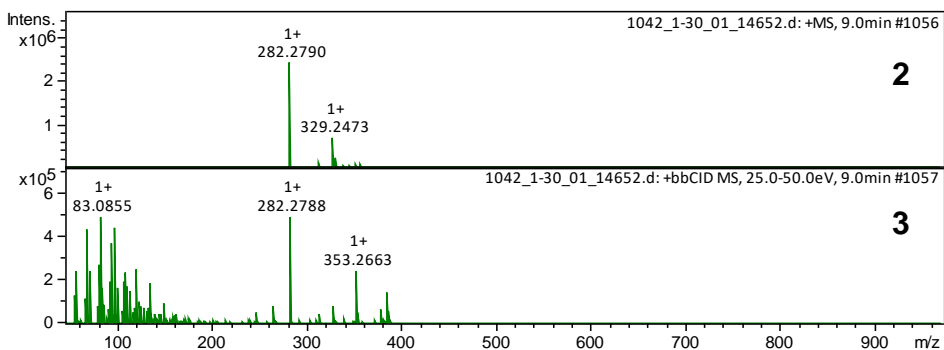
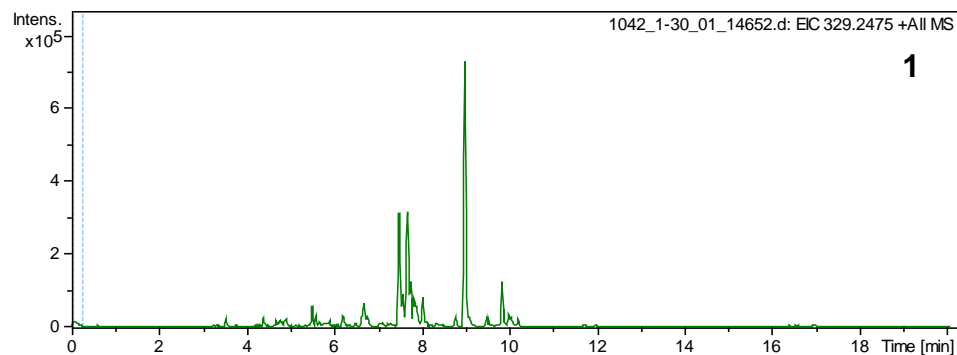
Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
81,069834	C ₆ H ₉	81,06988	0,5	599,1	2,5	even	ok
95,085376	C ₇ H ₁₁	95,08553	1,6	585,9	2,5	even	ok
123,116689	C ₉ H ₁₅	123,1168	1,1	466,7	2,5	even	ok
281,247017	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281,2475	1,7	4,2	2,5	even	ok



7



8

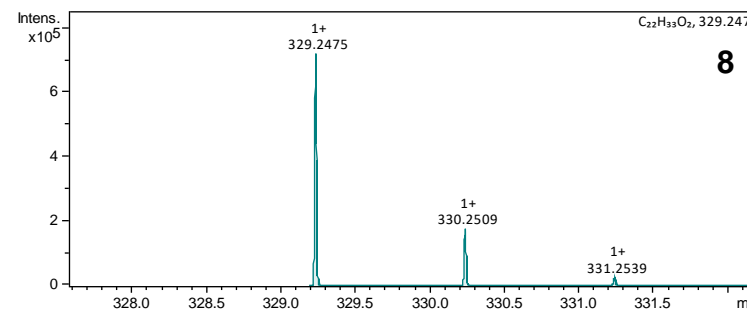
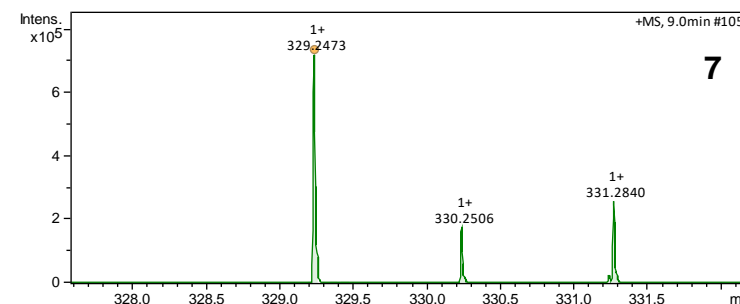


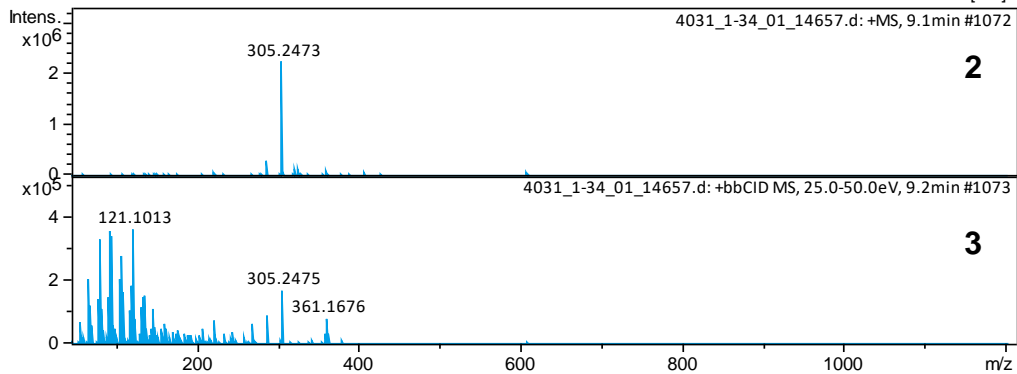
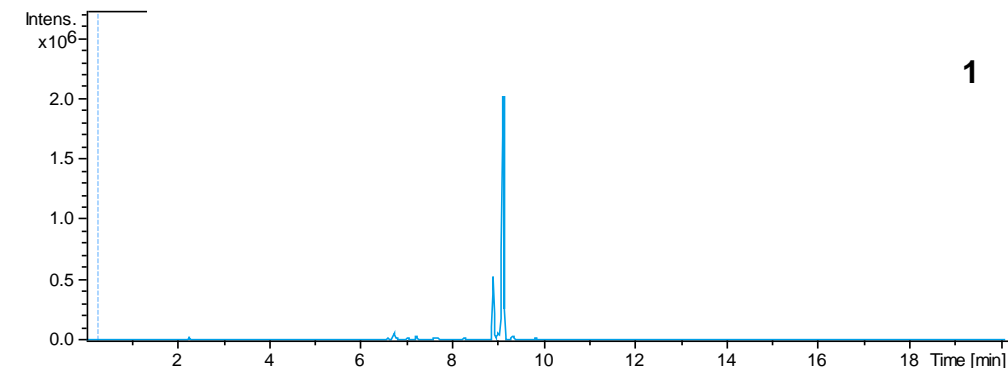
6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
91,054204	C ₇ H ₇	91,05423	0,3	684,6	4,5	even	ok
121,101124	C ₉ H ₁₃	121,1012	0,4	230,4	3,5	even	ok
161,13236	C ₁₂ H ₁₇	161,1325	0,7	595,8	4,5	even	ok
329,247467	C ₂₂ H ₃₃ O ₂	329,2475	0,1	3,8	6,5	even	ok

4

```
PKSSPLASH: splash10-0016-9610000000-d64-c0550d58860e01916
PKSNUM_PEAK: 49
PKSPEAK: m/z int. relint.
66.0427 44 36
67.0536 1198 999
79.0634 38 31
81.0696 840 700
85.0287 48 40
86.0964 36 30
91.0537 856 713
92.0582 50 41
93.0696 560 466
95.0856 278 231
105.042 48 40
105.0701 138 115
107.086 284 236
109.0644 132 110
111.0808 48 40
113.0592 40 33
117.0662 120 100
119.1552 130 108
121.1003 238 198
129.0698 82 68
135.0767 44 36
138.1133 48 40
141.0688 58 48
145.1025 168 140
147.1159 188 156
151.1436 92 76
157.1018 104 86
158.106 40 33
161.1314 144 120
167.0856 44 36
171.1153 62 51
173.1421 64 53
175.1493 36 30
181.1021 36 30
185.134 40 33
187.1479 102 85
188.1508 36 30
189.1615 42 35
199.1485 56 46
200.0471 46 38
200.1508 38 31
201.1628 56 46
209.0248 40 33
212.1527 70 58
223.1493 78 65
225.126 46 38
227.1773 52 43
229.1598 44 36
245.0027 36 30
```

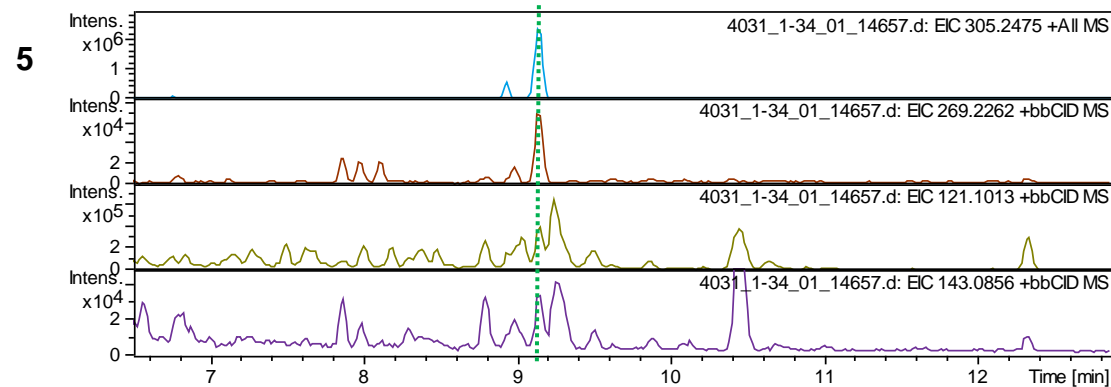




4

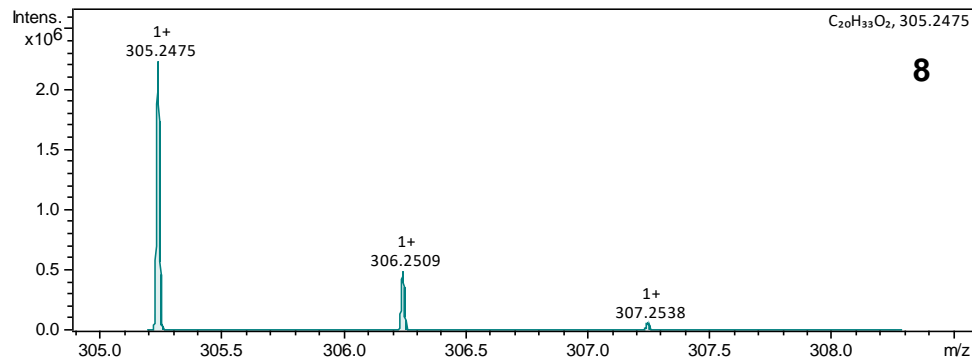
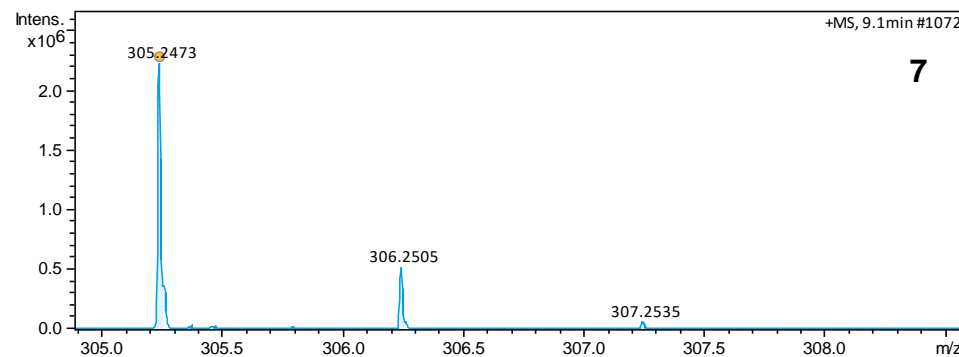
PKSSPLASH: [splash10-0a4i-0923000000-d4848f65cd99df3b6c34](#)
 PKSNUM_PEAK: 42
 PKSPeAK: m/z int. relint.

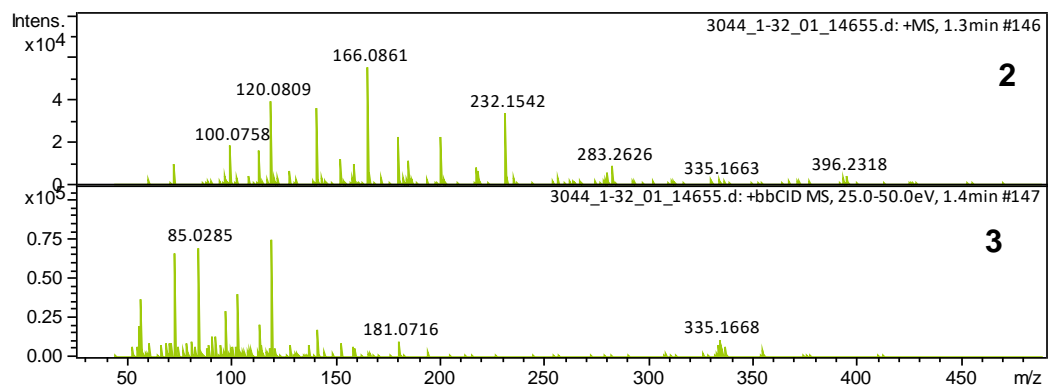
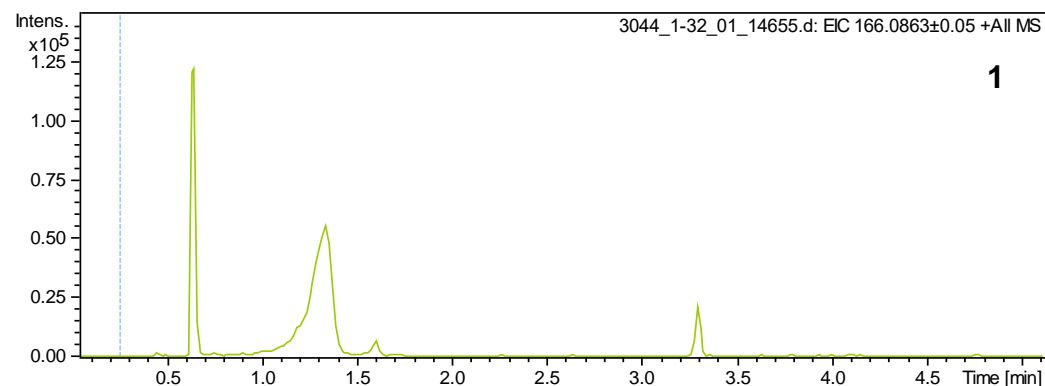
m/z	int.	relint.
85.06532	25.0	71
93.07117	21.0	59
95.08776	19.0	54
97.06357	16.0	45
107.0831	39.0	110
108.09058	20.0	57
109.05962	19.0	54
109.10251	32.0	91
114.10063	18.0	51
117.07004	21.0	59
119.08845	18.0	51
121.10457	111.0	314
123.07922	26.0	74
123.11597	44.0	125
127.07479	17.0	48
127.10496	16.0	45
135.11742	45.0	127
143.08623	54.0	153
147.11607	19.0	54
151.10551	86.0	243
151.15454	24.0	68
159.11642	20.0	57
161.13362	24.0	68
161.14005	39.0	110
163.13716	17.0	48
163.15562	16.0	45
165.12354	24.0	68
175.14938	18.0	51
181.12167	17.0	48
181.15329	38.0	108
181.16867	41.0	116
207.13895	28.0	79
209.15475	19.0	54
221.15723	21.0	59
227.17448	17.0	48
231.17365	54.0	153
245.2464	21.0	59
269.22794	46.0	130
287.237	38.0	108
288.24368	20.0	57
304.19617	18.0	51
305.24918	353.0	999



6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
121,1013	C ₉ H ₁₃	121,1012	-0,8	122,8	3,5	even	ok
143,0856	C ₁₁ H ₁₁	143,0855	-0,4	628,4	6,5	even	ok
269,2262	C ₂₀ H ₂₉	269,2264	0,5	5,5	6,5	even	ok
305,2475	C ₂₀ H ₃₃ O ₂	305,2475	0,1	1,3	4,5	even	ok



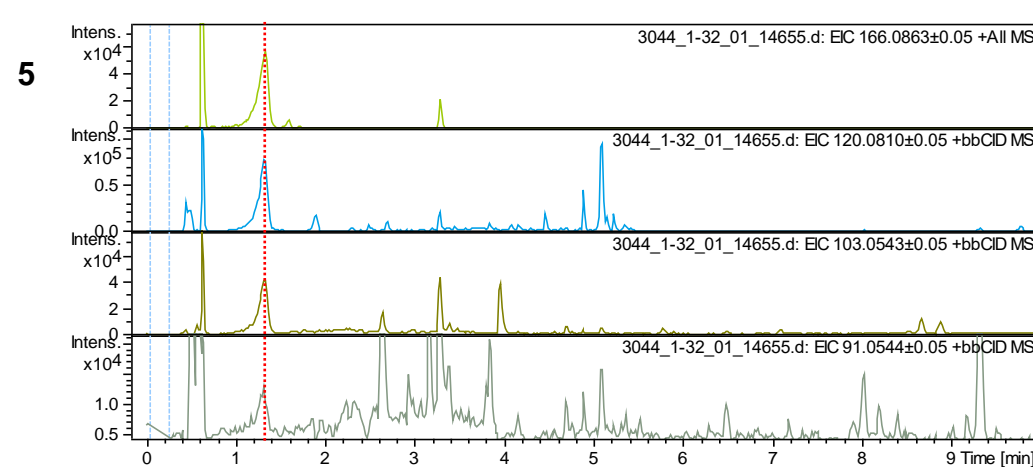


PK\$SPLASH: [splash10-0udi-2900000000-2865cb7faeed8764cb4](#)

PK\$NUM_PEAK: 17

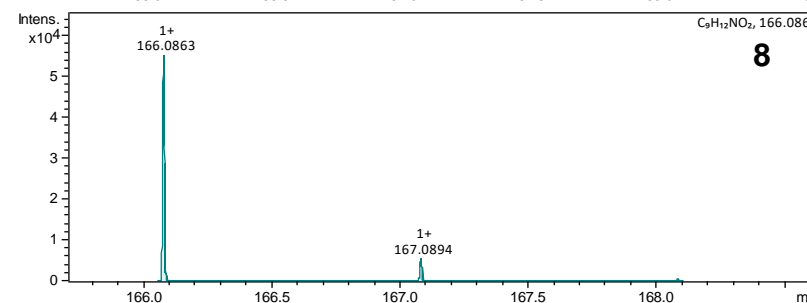
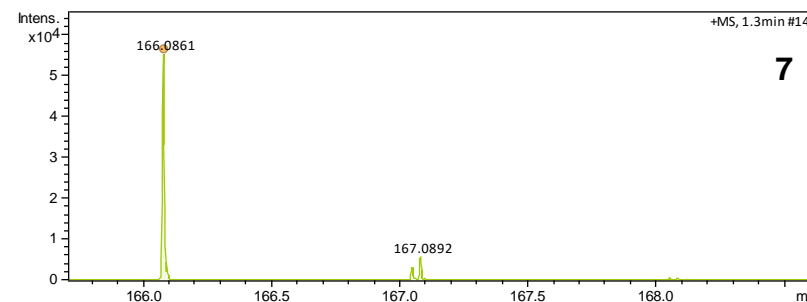
PK\$PEAK: m/z int. rel.int.

64.929	69.905	5
65.039	34.661	2
77.038	1835.433	182
79.054	900.313	89
80.051	57.817	4
91.055	996.869	98
93.070	670.502	66
95.051	260.103	25
102.047	318.066	30
103.056	10000.000	999
104.058	126.702	11
105.049	182.771	17
107.051	73.837	6
118.067	225.297	21
119.073	190.199	18
120.083	3411.636	340
121.085	52.428	4



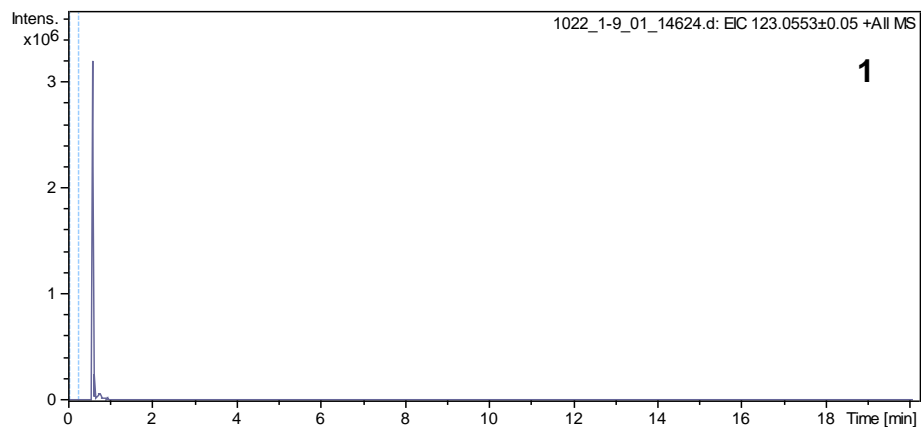
6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N- Rule
91,0544	C ₇ H ₇	91,0542	-1,6	591,3	4,5	even	ok
103,0543	C ₈ H ₇	103,0542	-0,9	20,6	5,5	even	ok
120,081	C ₈ H ₁₀ N	120,0808	-1,5	6,2	4,5	even	ok
166,0861	C ₉ H ₁₂ NO ₂	166,0863	0,8	1,7	4,5	even	ok

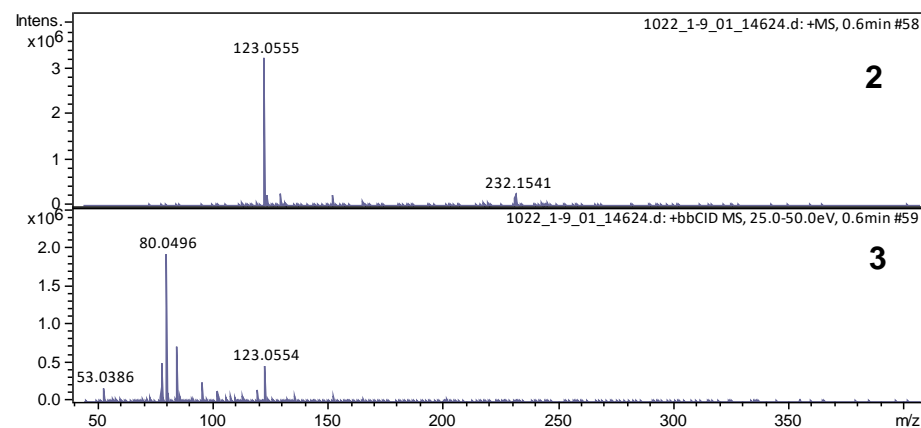
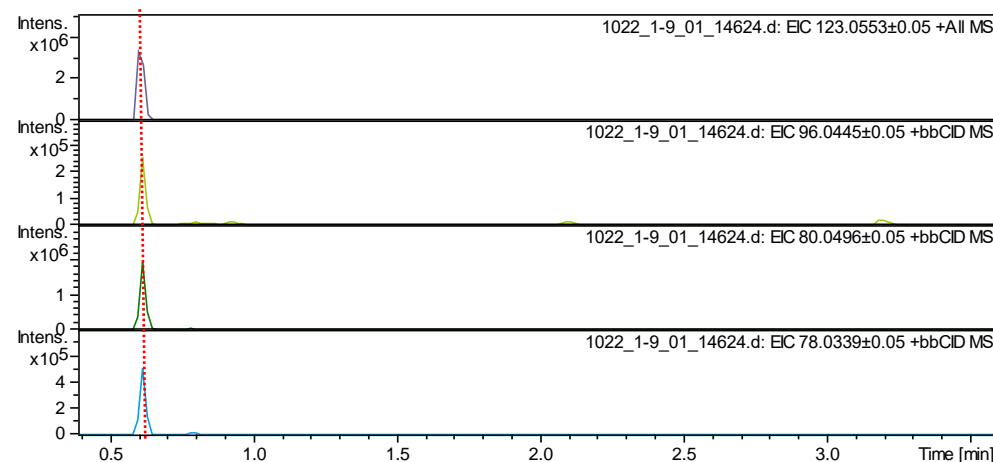


AMOSTRA: 1022 MODO POSITIVO tR: 0,64
 COMPOSTO: NICOTINAMIDA B3 Fórmula: C₆H₆N₂O m/z: 123,055289

68



5

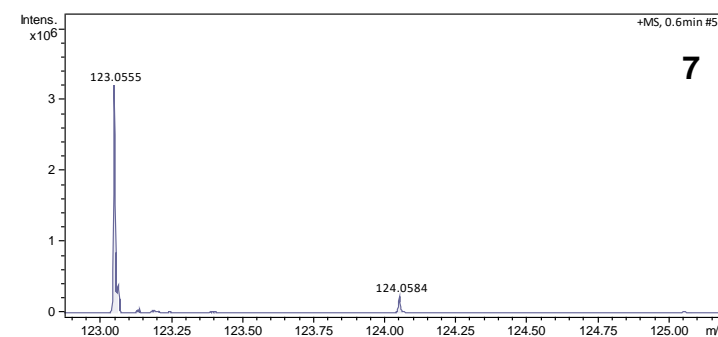


6

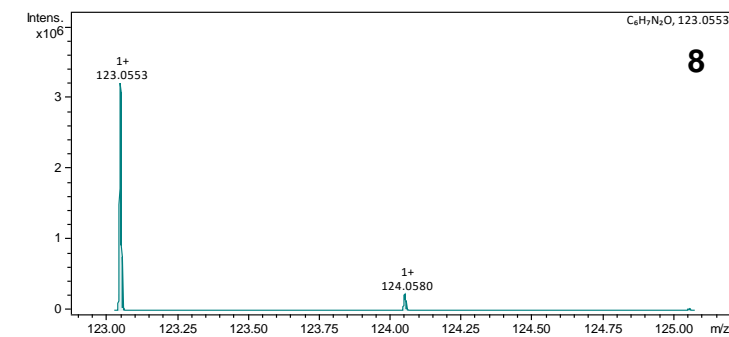
Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	Erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
78,0339	C ₅ H ₄ N	78,0338	-1,4	716,7	4,5	even	ok
80,0496	C ₅ H ₆ N	80,0495	-1,9	2,8	3,5	even	ok
96,0445	C ₅ H ₆ NO	96,0444	-0,9	4,5	3,5	even	ok
123,0555	C ₆ H ₇ N ₂ O	123,0553	-1,3	2,2	4,5	even	ok

4

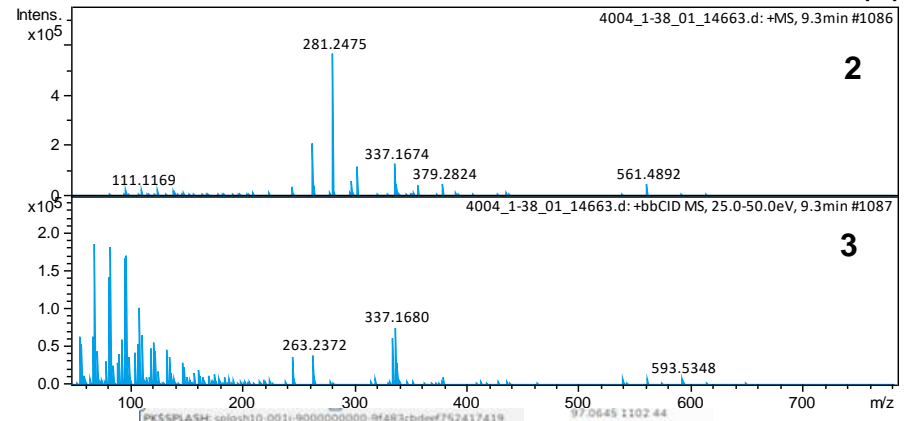
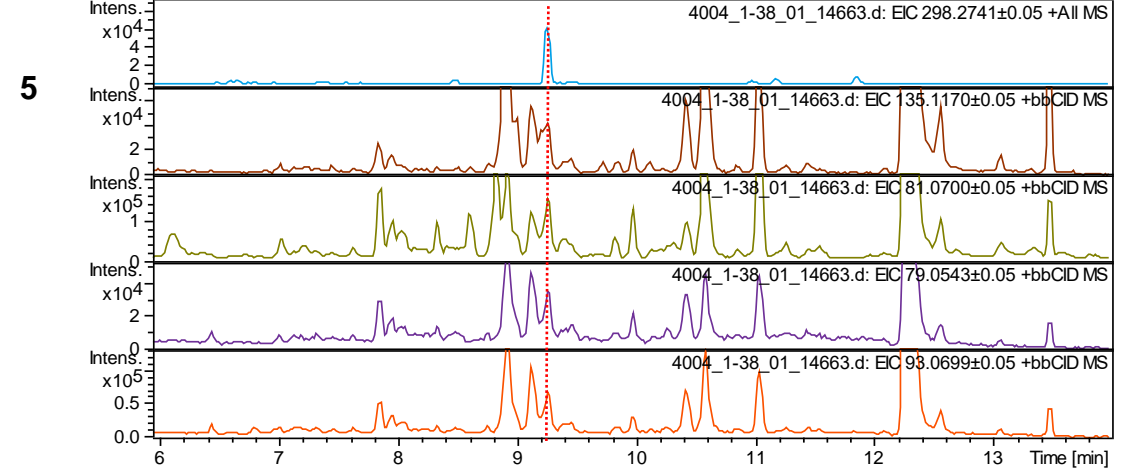
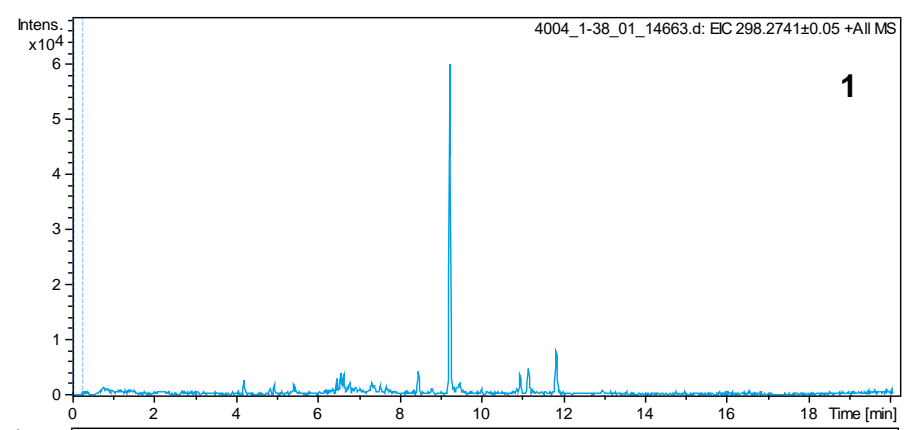
PK\$SPLASH: [splash10-001i-9100000000-edb6a77c0dfdcdbacc5d](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotinamide)
 PK\$NUM_PEAK: 5
 PK\$PEAK: m/z int. rel.int.
 78.0342 79.51 365
 79.0417 11.48 53
 80.0498 217.8 999
 96.0446 23.67 109
 123.0558 57.02 262



7



8



6

Massa medida m/z	Ion Fórmula [M+H] ⁺	Massa calculada m/z	Erro (ppm)	mSigma	RDB	e ⁻ Conf	N-Rule
79,0543	C ₆ H ₇	79,0542	-1,5	729,4	3,5	even	ok
81,07	C ₆ H ₉	81,0699	-1,9	589,9	2,5	even	ok
93,0699	C ₇ H ₉	93,0699	-0,1	683,6	3,5	even	ok
135,117	C ₁₀ H ₁₅	135,1168	-0,9	252,9	3,5	even	ok
298,2740	C ₁₈ H ₃₆ NO ₂	298,2741	0,1	5,8	1,5	even	ok

4

```

PKSSPLASH: g[glash]10_0011:9000000000:9fz83:ct[ref]F52417439
PKSNUM_PEAK: 69
PKSPEAK: m/z int. rel.int.
47.1792 56 2 99.0436 344 13
48.2685 66 2 99.0834 90 3
50.0965 70 2 99.0804 136 5
57.0323 558 22 105.0451 336 13
58.1924 38 1 105.0703 352 14
59.0478 88 3 107.0854 1614 64
59.0937 42 1 109.0649 74 2
60.2323 64 2 109.1005 984 39
61.0028 54 2 110.105 88 3
61.0637 86 3 119.0573 74 2
70.0281 2114 84 120.0577 46 1
71.0483 808 32 121.1005 780 31
73.0279 320 12 127.0737 46 1
73.0651 180 7 135.1175 368 14
77.0382 718 28 136.1198 52 2
79.0536 20204 812 147.1157 54 2
81.0893 24852 999 150.1362 68 2
82.0647 104 4 151.1489 42 1
83.0484 914 36 154.1223 54 2
83.0851 18254 733 155.0811 40 1
85.0522 456 18 161.132 42 1
85.0651 250 10 175.1457 42 1
86.0695 220 8 183.1032 108 4
86.1539 36 1 196.0166 58 2
88.0394 128 5 214.2171 70 2
91.0537 1930 77 238.2143 56 2
92.037 88 3 243.0057 68 2
93.0697 10660 428 252.2679 52 2
93.9932 40 1 280.2163 86 3
94.0733 352 14 280.2637 1020 41
95.0476 502 20 281.2488 138 5
95.0851 8862 356 281.268 138 5
96.0893 644 25 282.2891 40 1
    
```

