

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JHONYS MACHADO DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICOS SIMPLES,
PORTÁTEIS E DE BAIXO CUSTO PARA APLICAÇÕES EM ANÁLISES
FORENSES**

UBERLÂNDIA – MG

2019

JHONYS MACHADO DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICOS SIMPLES,
PORTÁTEIS E DE BAIXO CUSTO PARA APLICAÇÕES EM ANÁLISES
FORENSES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munõz

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Uberlândia – MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F866d
2019 Freitas, Jhonys Machado de, 1989-
Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, portáteis e de
baixo custo para aplicações em análises forenses [recurso eletrônico] /
Jhonys Machado de Freitas. - 2019.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.

Coorientador: Rodrigo Alejandro Abarza Munõz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Química.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.317>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Toxicologia forense. 3. Voltametria. 4. Química
analítica. I. Richter, Eduardo Mathias, 1965- (Orient.). II. Abarza
Munõz, Rodrigo Alejandro, 1980- (Coorient.). III. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do
Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 92/PPQUI.

DATA: 18/02/2019

DISCENTE: Jhonys Machado de Freitas

MATRÍCULA: 11513QMI002

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, portáteis e de baixo custo para aplicações em análises forenses.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

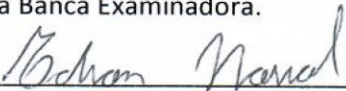
LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

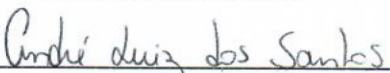
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de métodos analíticos com características portáteis visando à identificação de falsificações em produtos farmacêuticos e drogas lícitas.

Às quatorze horas do dia dezoito de fevereiro do ano de dois mil e dezenove, no(a) Sala 224, Bloco 1K, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Edson Nossol, da(o) do Instituto de Química da UFU, André Luiz dos Santos, da Universidade Federal de Uberlândia, Wallans Torres Pio dos Santos, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Bruno Campos Janegitz, da Universidade Federal de São Carlos e Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e a provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

mantido.

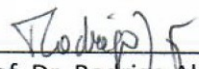
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 60 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 35 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Edson Nossol


Prof. Dr. André Luiz dos Santos


Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos


Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz


Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

FREITAS, J. M. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, portáteis e de baixo custo para aplicações em análises forenses. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo A. A. Munoz
Julgamento:

Instituição: IQ/UFU
Assinatura:

Prof. Dr. André Luiz dos Santos
Julgamento:

Instituição: FACIP/UFU
Assinatura:

Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
Julgamento:

Instituição: DCNME/UFSCar
Assinatura:

Prof. Dr. Edson Nossol
Julgamento:

Instituição: IQ/UFU
Assinatura:

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos
Julgamento

Instituição: FCBS/UFVJM
Assinatura:

*Dedico à minha mãe, Vânia, e minha avó, Marlene,
por todo o amor, suporte, carinho, paciência e
dedicação durante todas as etapas da minha formação.*

*À minha irmã, Dany, pelo amor e por sempre acreditar em mim
Aos professores, Eduardo e Rodrigo, por toda a paciência e ensinamentos.*

AGRADECIMENTOS

- ★ *Primeiro a Deus por todas as bênçãos concedidas.*
- ★ *À minha querida família, minha mãe, minha avó Marlene, meu avô Vivaldo (in memoriam), meu padrasto Gilmar, minha irmã Dany e meu cunhado Bruno, que são a base para tudo.*
- ★ *Ao meu orientador, Prof. Eduardo M. Richter, pela orientação, paciência, incentivo confiança e exemplo de pessoa e profissional.*
- ★ *Ao Prof. Rodrigo A. A. Munoz, pelo apoio, incentivos e conversas durante todo o trabalho e especialmente no último ano.*
- ★ *Ao meu amigo Thi, pela amizade, apoio, conversas, risadas e presença constante em todos os momentos.*
- ★ *Ao amigo e companheiro Pablo e minha família “postiça”, minha sogra Márcia, meu sogro Jefferson e minhas cunhadas Núbia e Thayla, por todos os momentos de descontração.*
- ★ *Aos amigos especiais e de longa data, Alysson, Pâmela, que sempre trazem alegria e apoio nas horas difíceis.*
- ★ *Aos amigos do NUPE, pela amizade e momentos de descontração, ajuda e discussões: Ana, André, Diego, Rafael, Sara, Guilherme, Igor, Dianderson e Afonso. E em especial aos amigos do “XUPE” pelas risadas, descontração, farras e atendimento técnico e psicológico gratuito, Xéssica, Xaquiel, Xúlia Cristina, Xichelle Miranda, Xavid, Xablo, Xalice, Xéberson, Xuiz André, Xílvia, Xiana e Xian.*
- ★ *Ao Prof. Alex, pela amizade, ensinamentos e conversas descontraídas.*
- ★ *Aos professores do IQ-UFU que auxiliaram em toda a minha formação.*
- ★ *Aos técnicos e secretários do IQ-UFU e das coordenações pela ajuda sempre que necessário.*
- ★ *Aos membros da banca pela aceitação e contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.*
- ★ *À CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.*
- ★ *Ao IQ-UFU pelo espaço físico concedido.*

“No extremo verdor dos anos presumimos muito de nós, e nada, ou quase nada, nos parece escabroso ou impossível. Mas o tempo, que é bom mestre, vem diminuir tamanha confiança, deixando-nos apenas a que é indispensável a todo o homem, e dissipando a outra, a confiança páfida e cega. Com o tempo, adquire a reflexão o seu império, e eu incluo no tempo a condição do estudo, sem o qual o espírito fica em perpétua infância.”

Machado de Assis

RESUMO

FREITAS, J. M. **Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, portáteis e de baixo custo para aplicações em análises forenses**. 2019. 119f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2019

Neste trabalho foi demonstrado o emprego de técnicas eletroquímicas no desenvolvimento de métodos de análise simples, de baixo custo e com características portáteis aplicados à Química Forense. As técnicas de Voltametria de Onda Quadrada (SWV, do inglês, *Square Wave Voltammetry*) e Amperometria de Múltiplos (MPA, do inglês, *Multiple Pulse Amperometry*) foram utilizadas em associação com o sistema de análise por injeção em batelada (BIA, do inglês, *Batch Injection Analysis*) para determinação de cocaína e “screening” de adulterantes mais comuns (caféina, fenacetina, benzocaína, lidocaína, procaína, paracetamol e levamisol) como processo de triagem em amostras apreendidas, além de sibutramina e efedrina em suplementos alimentares e fitoterápicos. Nos métodos propostos neste trabalho, as amostras necessitam somente uma etapa de dissolução no eletrólito suporte antes da injeção na célula BIA. Uma varredura empregando SWV é então realizada na amostra injetada que é eletroquimicamente oxidada em um eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE, do inglês, *Boron-doped Diamond Electrode*), resultando em um perfil voltamétrico único. Utilizando as condições experimentais otimizadas, uma faixa linear de 6 a 30 mg L⁻¹, foi obtida para cocaína, com um limite de detecção de 0,27 mg L⁻¹. SWV e BDDE também foram empregados para determinação da presença de adulterantes, tais como, sibutramina e efedrina em amostras dopadas de medicamentos e/ou suplementos alimentares naturais, utilizados com intuito de emagrecimento. A detecção da sibutramina foi possível mesmo em amostras de grande complexidade como multivitamínicos. Estudos mostraram uma resposta linear de 5 a 50 mg L⁻¹ e limite de detecção de 0,08 mg L⁻¹ para sibutramina. O método SWV desenvolvido para sibutramina também foi facilmente adaptável ao sistema BIA. O estudo para determinação de efedrina em suplementos alimentares, fitoterápicos e urina foi realizado empregando um sistema BIA-SWV. Uma faixa linear de 5 a 40 mg L⁻¹ com limite de detecção de 0,13 mg L⁻¹ foram alcançados para efedrina. O uso dos protocolos de triagem ou “screening” desenvolvidos neste trabalho se mostraram ferramentas promissoras para aplicações em análises forenses criminais e aplicadas ao esporte. Adicionalmente métodos de quantificação foram descritos para as espécies de interesse em diferentes tipos de amostra.

Palavras-chave: Química Forense. Voltametria de Onda Quadrada. Análise por injeção em batelada. Triagem. Amostras apreendidas. Suplementos alimentares.

ABSTRACT

FREITAS, J. M. **Development of simple, portable and low cost electroanalytical methods for applications in forensic analysis.** 2019. 119f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2019

In this work it was demonstrated the use of electrochemical techniques in the development of simple, low cost and portable analytical methods applied to Forensic Chemistry. The Square Wave Voltammetry (SWV) and Multiple Pulse Amperometry (MPA) techniques were used in association with the Batch Injection Analysis (BIA) system for cocaine determination and screening process of the most common adulterants (caffeine, phenacetin, benzocaine, lidocaine, procaine, paracetamol and levamisole) in seized samples, in addition to sibutramine and ephedrine in food supplements and herbal supplements. In the methods proposed in this work, the samples require only one step of dissolution in the supporting electrolyte prior to injection into the BIA cell. A SWV scanning is then performed on the injected sample which is electrochemically oxidized on a boron doped diamond electrode (BDDE), resulting in a unique voltammetric profile. Using optimized experimental conditions, a linear range of 6 to 30 mg L⁻¹ was obtained for cocaine, with a detection limit of 0.27 mg L⁻¹. The accuracy of the method was evaluated comparing results obtained by gas chromatography. SWV and BDDE were also used to determine the presence of adulterants, such as, sibutramine and ephedrine in spiked samples and/or natural dietary supplements used for weight loss purposes. The detection and screening of sibutramine was possible even in highly complex samples such as multivitamins. Studies have shown a linear response for sibutramine from 5 to 50 mg L⁻¹ and a detection limit of 0.08 mg L⁻¹. The SWV method developed for sibutramine was also easily adaptable to the BIA system. The study for the determination of ephedrine in dietary, herbal supplements and urine was carried out using a BIA-SWV system. A linear range of 5 to 40 mg L⁻¹ with detection limit of 0.13 mg L⁻¹ was achieved for ephedrine in 0.1 mol L⁻¹ acetic acid / acetate buffer, pH 4.75. The use of the screening protocols developed in this work have shown to be promising and interesting tools for applications in criminal and sports forensic analysis. Additionally, quantification methods were described for the species of interest in different samples.

Keywords: Forensic Chemistry. Square Wave Voltammetry. batch injection analysis. Screening. Seized samples. Food supplements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas moleculares da cocaína e dos adulterantes mais comuns encontrados em amostras apreendidas.	24
Figura 2. Estruturas moleculares da sibutramina e da efedrina.	28
Figura 3. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro. Fonte: Adaptado de [132].	32
Figura 4. Código QR para rápido acesso à vídeo no YouTube.com® para visualização do funcionamento de uma célula BIA.	33
Figura 5. Esquema de posicionamento do eletrodo de BDD e a placa metálica. (B) Vista frontal da célula estacionária utilizada. (C) Vista superior da célula utilizada, mostrando o posicionamento do eletrodo no fundo da célula. Adaptado de: [149].	42
Figura 6. (A) Imagem frontal da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem superior da célula BIA. Fonte: (A) Adaptado de [97]; (B) Próprio autor.	43
Figura 7. Esquema de injeção no sistema BIA. (A) Sistema BIA montado com pipeta eletrônica. (B) Sistema de agitação. (C) Esquemas mostrando as etapas da injeção, mostrando o instante antes da injeção (1), durante a injeção e a análise (2) e após a dispersão da alíquota injetada (3).	44
Figura 8. Foto de um sistema BIA portátil. (A) Microcomputador para aquisição e tratamento dos dados. (B) Mini-potenciostato portátil. (C) Sistema BIA. Fonte: Próprio autor.	45
Figura 9. Efeito do pH nos (A) potenciais de pico e (B) correntes anódica para 0,5 mmol L ⁻¹ de cocaína (■), cafeína (●), benzocaína (▼), procaína (◆) e fenacetina (▲), obtidos com CV usando eletrodo de BDD em soluções tampão BR de diferentes pHs (2,0 a 12,0). (C) Voltamogramas obtidos para cocaína e demais adulterantes em pH = 6. Parâmetros CV: Velocidade de varredura: 50mV s ⁻¹ ; Step: 5mV.	47
Figura 10. Solubilidade da cocaína em função do pH da solução.	48
Figura 11. Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (—) e na presença de 150 mg L ⁻¹ de cocaína utilizando GCE e BDD (---) como eletrodos de trabalho em meio de H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ , incremento de potencial: 5 mV.	49
Figura 12. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para cocaína 20 mg L ⁻¹ , em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial (B) Relação entre potencial de pico (E _p) e a frequência (f) de aplicação de pulso. Eletrólito: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; a = 50 mV; ΔEs = 2 mV.	51

Figura 13. (A) Relação entre corrente de pico (I_p) e a raiz da frequência ($f^{1/2}$). (B) Relação entre potencial de pico (E_p) e o logaritmo da frequência de aplicação de pulso ($\log f$). Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} ; $a = 50$ mV; $\Delta E_s = 2$ mV.	52
Figura 14. Esquema sugerido para mecanismo de oxidação da cocaína em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}	53
Figura 15. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 20 mg L^{-1} em função da variação nos valores de amplitude de pulso de potencial aplicados. (B) Relação entre corrente de pico e amplitude de pulsos. $f = 50$ s^{-1} , $\Delta E_s = 2$ mV.	53
Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para cocaína 20 mg L^{-1} em função da variação no incremento de potencial. (B) Relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação do incremento de varredura (ΔE). $f = 50$ s^{-1} , $a = 50$ mV.	54
Figura 17. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 20 mg L^{-1} de cocaína (COC), lidocaína (LID), cafeína (CAF), fenacetina (FEN) e paracetamol (PAR). Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} ; Frequência: 60 s^{-1} ; Amplitude: 40 mV; Incremento: 6 mV. Resultados apresentados com correção da linha de base.	55
Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 20 mg L^{-1} de cocaína (COC), procaína (PRO), benzocaína (BEN) e levamisol (LEV). Demais parâmetros: Ver Figura 17.	56
Figura 19. Variação da corrente de oxidação para 20 mg L^{-1} de cocaína em função do volume injetado. Velocidade de injeção: 100 μL s^{-1} . Demais parâmetros: Ver Figura 17.	58
Figura 20. Variação da corrente de oxidação para 20 mg L^{-1} de cocaína em função da velocidade de injeção. Volume de injeção: 100 μL . Demais parâmetros: Ver Figura 17.	58
Figura 21. Relação entre corrente de pico (I_p) e aumento da concentração de cocaína. Volume injetado: 150 μL ; Velocidade de injeção: 153 μL s^{-1} ; $f = 60$ s^{-1} ; $a = 40$ mV; $\Delta = 6$ mV.	59
Figura 22. Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções sucessivas de uma solução contendo (A) 30 mg L^{-1} ou (B) 6 mg L^{-1} de cocaína. Condições experimentais: Ver Figura 21.	60
Figura 23. Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções em diferentes dias de uma solução contendo 20 mg L^{-1} de cocaína. Condições experimentais: Ver Figura 21.	61
Figura 24. (A) Voltamogramas de SWV obtidos a partir de soluções contendo uma concentração fixa de cocaína (20 mg L^{-1}) sem (linha preta) e com a adição de concentrações crescentes de lidocaína, cafeína, fenacetina e paracetamol (2 – 40 mg L^{-1} / cada). (B) Relação entre a queda da proporção de cocaína e a corrente de pico. Condições experimentais: Ver Figura 21.	62
Figura 25. Voltamogramas de SWV obtidos para injeções de 150 μL de amostras de cocaína apreendidas (Tabela 2). Condições experimentais: Ver Figura 21.	63

Figura 26. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de amostra apreendida sem e com adição de concentrações crescentes de cocaína, fenacetina e cafeína; e respectivas curvas de calibração. Condições experimentais: Ver Figura 21.....	64
Figura 27. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo 20 mg L^{-1} de COC, FEN e CAF e de uma mistura contendo todos os compostos. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms. Volume injetado: $150 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $153 \mu\text{L s}^{-1}$	67
Figura 28. Amperogramas obtidos após injeções de amostras apreendidas adequadamente diluídas em eletrólito suporte. Demais condições: Ver Figura 27.....	68
Figura 29. (A) e (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR ($\text{pH } 2 - 7$) sem (linha preta) e com 50 mg L^{-1} de SIB (linhas coloridas). (C) Voltamogramas cíclicos obtidos em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sem (linha preta) e com 50 mg L^{-1} de SIB (linha vermelha). (D) Relação entre potencial de pico e pH para oxidação da SIB (■) Primeiro processo anódico, (●) segundo processo anódico. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} , incremento de potencial: 5 mV	71
Figura 30. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para 50 mg L^{-1} de SIB em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em função da variação da velocidade de varredura. (B) Variação do E_p com a velocidade de varredura.....	72
Figura 31. (B) Relação entre I_p e a raiz quadrada da velocidade de varredura com respectiva equação linear.....	73
Figura 32. (A) Relação entre o logaritmo da corrente de pico ($\log I_p$) com o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). (B) Relação entre o logaritmo natural da corrente de pico ($\ln I_p$) com a diferença entre o potencial de pico e o potencial formal ($E_p - E^{\circ}$).....	74
Figura 33. Esquema sugerido para o mecanismo de oxidação da SIB em meio ácido.	75
Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para SIB 50 mg L^{-1} , em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial (B) Relação entre corrente de pico (I_p) e a frequência (f) de aplicação de pulso. Eletrólito: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	76
Figura 35. (A) Relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação da amplitude (a). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$. (B) Relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação do incremento de varredura (ΔE). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$	77
Figura 36. Relação entre a corrente de pico e concentrações crescentes de SIB. Condições experimentais: Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 40 \text{ mV}$; $\Delta = 6 \text{ mV}$	78
Figura 37. Resultados obtidos por SWV para medidas sucessivas de uma solução contendo (A) 50 mg L^{-1} ou (B) 5 mg L^{-1} de SIB. Condições experimentais: Ver Figura 36.	79

Figura 38. Voltamogramas de onda quadrada de soluções contendo amostras reais adequadamente diluídas em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes (A) e após (B) adição de 1 % de SIB (m/m). Composição das amostras: Ver Tabela 3. Demais parâmetros experimentais: Ver Figura 36.	80
Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para quatro soluções de amostras dopadas, antes e após quatro adições de padrão de SIB para (A) Garcínia; (B) Quitosana; (C) Spirulina; e (D) Suplemento de cafeína, com as respectivas curvas de calibração. Condições experimentais: Ver Figura 36.	82
Figura 40. Voltamogramas obtidos para quatro amostras antes (linhas pretas) e após (linhas coloridas) dopagem com duas concentrações diferentes de SIB, 5 e 10 mg L^{-1} para garcínia, quitosana e Spirulina e 25 e 50 mg L^{-1} para suplemento de cafeína. Condições experimentais: volume de injeção: $150 \text{ }\mu\text{L}$; velocidade de injeção: $153 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$; f : 60 s^{-1} ; a : 40 mV ; ΔE : 6 mV	84
Figura 41. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 2 – 7) sem (linha preta) e com (linhas coloridas) a presença de 100 mg L^{-1} de EFD. (B) Relação entre potencial (■) e corrente (●) de pico e pH para oxidação da EFD. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} , incremento de potencial: 5 mV	85
Figura 42. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para 100 mg L^{-1} de EFD em tampão HAc/Ac^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em função da variação da velocidade de varredura. (B) Variação do I_p com a velocidade de varredura.	86
Figura 43. (A) Relação entre o logaritmo da corrente de pico ($\log I_p$) com o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). (B) Relação entre o potencial de pico (E_p) com o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$), para 100 mg L^{-1} de EFD em tampão HAc/Ac^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. .	87
Figura 44. Relações entre corrente de pico e variação (A) da amplitude (B) frequência de aplicação de pulso e (C) incremento de potencial. Concentração de EFD: 20 mg L^{-1} . Eletrólito: Tampão HAc/Ac^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	88
Figura 45. Variação da corrente de oxidação para 40 mg L^{-1} de EFD em função do volume injetado no sistema BIA. Velocidade de injeção: $78 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$. Parâmetros SWV: $a = 70 \text{ mV}$; $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão HAc/Ac^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 4,75.....	90
Figura 46. Variação da corrente de oxidação para 40 mg L^{-1} de EFD em função da velocidade de injeção. Volume de injeção: $120 \text{ }\mu\text{L}$. Demais parâmetros: Ver Figura 45.	90
Figura 47. Relação entre corrente de pico (I_p) e aumento da concentração de EFD. Volume injetado: $120 \text{ }\mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $164 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$; $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 70 \text{ mV}$; $\Delta = 6 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão HAc/Ac^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 4,75.	91

Figura 48. (A) Voltamogramas sobrepostos obtidos por BIA-SWV para 15 injeções consecutivas de uma solução contendo 40 mg L ⁻¹ ou 5 mg L ⁻¹ de EFD. (B) Correntes de pico obtidas para as injeções sucessivas. Condições experimentais: Ver Figura 47.....	92
Figura 49. Voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir de soluções contendo misturas de SIB e EFD 10 mg L ⁻¹ cada nas condições otimizadas para (A) SIB (Ver Figura 36, pág. 78) e (B) EFD (Ver Figura 47, pág 91).....	93
Figura 50. Voltamogramas de onda quadrada de soluções contendo amostras reais adequadamente diluídas em tampão HAc/Ac ⁻ 0,1 mol L ⁻¹ antes (A) e após (B) adição de 1 % de EFD (m/m). Composição das amostras: Ver Tabela 4 (pág. 39). Demais parâmetros experimentais: Ver Figura 47.	94
Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada de soluções contendo urina sintética diluída em tampão HAc/Ac ⁻ 0,2 mol L ⁻¹ antes (---) e após (–) fortificação com duas concentrações diferentes de EFD. Concentração final de EFD: 5 e 10 mg L ⁻¹ . Demais parâmetros experimentais: Ver Figura 47.	95
Figura 52. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para seis soluções de amostras dopadas, antes e após cinco adições de padrão de EFD para (A) Chá verde; (B) Garcinia composta; (C) Garcinia; (D) Lipo Diet; (E) Suplemento de cafeína e (F) Spirulina, com as respectivas curvas de calibração. Condições experimentais: Ver Figura 47.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes usados no presente estudo e respectivas especificações	35
Tabela 2. Composição química das amostras de cocaína apreendidas utilizadas	37
Tabela 3. Características e composições declaradas pelos fabricantes de amostras utilizadas no estudo de adulteração com sibutramina.....	38
Tabela 4. Características e composição declara de amostras utilizadas para identificação de alterações por efedrina.....	39
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos para a determinação de FEN, CAF e COC em duas amostras apreendidas usando o método desenvolvido BIA-SWV e GC-FID.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a – Amplitude de aplicação do pulso de potencial

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDD – Diamante dopado com boro, do inglês, “*Boron-doped diamond*”

BEN – Benzocaína

BIA – Análise por injeção em batelada, do inglês, “*Batch injectiton analysis*”

BR – Tampão Britton-Robbinson

CAF – Cafeína

CV – Voltametria cíclica, do inglês “*Cyclic voltammetry*”

COC – Cocaína

DDR – Dose diária recomendada

EFD – Efedrina

E_p – Potencial de pico

f – Frequência de aplicação do pulso de potencial

FC – Fator de correção

FDA – *Food and Drug Administration*

FEN – Fenacetina

FIA – Análise por injeção em fluxo, do inglês, “*Flow injection analysis*”

FID - Detecção por ionização em chama, do inglês, “*Flame ionization detection*”

GC – Cromatografia gasosa, do inglês, “*Gas chromatography*”

GCE – Eletrodo de carbono vítreo, do inglês “*Glassy carbon electrode*”

I_p – Corrente de pico

IMC – índice de massa corporal

LD – Limite de detecção

LEV – Levamisol

LID – Lidocaína

LQ – Limite de quantificação

MPA – Amperometria de múltiplos pulsos, do inglês “*Multiple pulse amperommetry*”

PAD – Detecção por amperometria pulsada, do inglês, “*pulsed amperometry detection*”

PAR – Paracetamol

PRO – Procaína

rpm – Rotação por minuto

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês, “*Relative standard deviation*”

S – Inclinação da curva de calibração

s_B – Desvio padrão do branco

SIB – Sibutramina

SWV – Voltametria de onda quadrada, do inglês, “*Square wave voltammetry*”

UNODC – Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime, do inglês, “*United Nations Office on Drugs and Crime*”

WADA – Agência Mundial Antidoping, do inglês “*World Anti-Doping Agency*”

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês, “*World Health Organization*”

Ø – Diâmetro

v – Velocidade de varredura

α – Coeficiente de transferência de elétrons

ΔE_s – Incremento de potencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Preâmbulo	20
1.2. Drogas de Abuso - Cocaína.....	21
1.2.1. Análises químicas de cocaína.....	22
1.3. Suplementos alimentares e fitoterápicos utilizados para emagrecimento	25
1.3.1. Adulterantes em suplementos alimentares e fitoterápicos.....	26
1.4. Técnicas eletroquímicas	28
1.5. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).....	30
1.6. Análise por Injeção em Batelada (BIA)	31
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivos gerais.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1. Reagentes e soluções.....	35
3.2. Amostras	36
3.3. Instrumentação	40
3.3.1. Medidas eletroquímicas.....	40
3.3.2. Eletrodos.....	40
3.3.3. Célula Eletroquímica para medidas estacionárias	41
3.3.4. Sistema BIA	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. Considerações iniciais	46
4.2. Parte 1: Triagem e quantificação de cocaína e adulterantes em amostras apreendidas.....	46
4.2.1. Comportamento eletroquímico da cocaína.....	46
4.2.2. Otimização dos parâmetros de SWV e estudo do mecanismo de oxidação da cocaína	50
4.2.3. Comportamento eletroquímico da cocaína e adulterantes por SWV.....	55
4.2.4. Determinação simultânea de cocaína e adulterantes por BIA SWV	57
4.2.5. Faixa linear	59
4.2.6. Repetibilidade e reprodutibilidade	60
4.2.7. Estudo da interferência dos adulterantes na detecção de cocaína por BIA-SWV	61
4.2.8. Triagem de amostras de cocaína apreendidas empregando BIA-SWV	63
4.2.9. Quantificação simultânea de cocaína e adulterantes em amostras apreendidas	64
4.2.10. Uso de amperometria de múltiplos pulsos (MPA) para triagem de amostras de cocaína apreendidas	65
4.2.11. Conclusões parciais	69
4.3. Detecção e <i>screening</i> de sibutramina em suplementos alimentares e fitoterápicos	71

4.3.1.	Comportamento eletroquímico da sibutramina	71
4.3.2.	Estudo e otimização dos parâmetros de SWV	75
4.3.3.	Faixa linear	78
4.3.4.	Repetibilidade e reprodutibilidade	79
4.3.5.	Detecção de sibutramina em suplementos alimentares	79
4.3.6.	Quantificação de sibutramina em amostras de suplementos alimentares	81
4.3.7.	Aplicação do método SWV desenvolvido acoplado ao sistema BIA para triagens rápidas e sequenciais.	83
4.3.8.	Conclusões parciais	85
4.4.	Detecção de efedrina empregando BIA-SWV	85
4.4.1.	Comportamento eletroquímico da efedrina	85
4.4.2.	Estudo e otimização dos parâmetros de SWV	88
4.4.3.	Otimização dos parâmetros para o sistema BIA	89
4.4.4.	Faixa linear	91
4.4.5.	Repetibilidade e reprodutibilidade	92
4.4.6.	Testes de interferência	93
4.4.7.	Detecção de efedrina em suplementos alimentares, fitoterápicos e urina sintética	94
4.4.8.	Quantificação de efedrina em amostras de suplementos alimentares	96
5.	CONCLUSÕES GERAIS	98
6.	PERSPECTIVAS	100
7.	REFERÊNCIAS	101
8.	ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO	118
8.1.	Publicação de artigos em revistas científicas relacionados à tese de doutorado	118
8.2.	Outras publicações de artigos em revistas científicas	118
8.3.	Outras atividades	119

1. INTRODUÇÃO

1.1. Preâmbulo

A análise de substâncias como drogas lícitas e ilícitas, venenos, explosivos, resíduos de armas de fogo e outras em diferentes tipos de amostras, faz parte da química forense que tem um papel de destaque nas ciências forenses [1]. A química forense pode ser definida como química analítica aplicada [2] com o objetivo de produção de provas e evidências de interesse jurídico, lançando mão de diferentes métodos de análise existentes, sejam esses clássicos ou instrumentais, tais como, cromatografia, espectrometria de massas, espectroscopia, microscopia, eletroquímica (potenciometria), entre outras [3]. A escolha do procedimento analítico vai depender de alguns fatores, como a adequação do método ao objetivo da análise (execução no laboratório ou em campo, tempo necessário, quantidade de amostra, etc.), a seletividade, sensibilidade, precisão, a disponibilidade de recursos e principalmente a infraestrutura do laboratório.

Análise de drogas de abuso são de grande interesse para a química forense, pois esse tipo de análise além de permitir a identificação dos principais componentes da droga, possibilitando sua caracterização, também pode ser utilizada para a identificação de substâncias remanescentes do processo de fabricação ou refino [4]. Determinação da pureza ou presença de adulterantes fornecem aspectos químicos e dados que permitem a identificação de rotas de tráfico e origem da produção [5]. Neste sentido, projetos como o PeQui (Perfil Químico) foram desenvolvidos pela polícia federal em parceria com universidades permitindo a identificação do “DNA” das drogas apreendidas no Brasil e possibilitando a identificação de rotas de tráfico e locais de produção [6].

Alterações e falsificações de medicamentos ou suplementos, termos regulatórios de uso de substâncias controladas e dopagem no esporte são também, frequentemente, objeto de interesse e estudo na química forense. Neste campo, faz-se uso de diferentes técnicas analíticas para a identificação de substâncias químicas que podem estar relacionadas a riscos à saúde, danos à vida e até mesmo óbito, tendo como objeto de análise diversas amostras como água, alimentos, medicamentos ou drogas envolvidas em casos legais [7]. Falsificações de medicamentos incluem doses diferentes das especificadas, princípios ativos ausentes ou presença de princípios ativos diferentes dos declarados. Suplementos alimentares também são alvos de falsificações ou adulterações frequentes, sendo que a adição de substâncias não

declaradas tem como objetivo principal o aumento de eficácia e consequente aumento de vendas e lucros.

Nesse contexto, a Química Forense desempenha um papel essencial em diversas áreas, como materialização de crimes, planejamentos operacionais, subsídios para ações policiais e judiciais, além de ser uma ferramenta muito importante contra fraudes, falsificações, adulterações, etc. [8].

1.2. Drogas de Abuso - Cocaína

O uso de drogas é uma prática do homem realizada desde a antiguidade em diferentes contextos culturais, terapêuticos ou em rituais religiosos com a finalidade de transcendência. Atualmente, o uso de drogas ou substâncias psicoativas está mais relacionado com a busca de prazer, alívio e fuga de situações cotidianas como problemas sociais, físicos e psíquicos, por esse motivo essa prática está presente em todas as classes sociais, o que resulta em muitos dos grandes problemas políticos, econômicos, de saúde e sociais da sociedade contemporânea [9].

Segundo dados do “*World Drug Report*” de 2017 da UNODC (escritório das Nações Unidas que trata de crimes e drogas) [10], pelo menos 250 milhões de pessoas, aproximadamente 5% da população global adulta, usaram drogas pelo menos uma vez em 2015, e pelo menos 29,5 milhões de usuários têm problemas com seu uso. Ainda segundo a UNODC, grande redução da qualidade de vida vem sendo observada na última década entre os usuários, principalmente de opioides e cocaína (COC). Também foi observado um aumento da produção, tráfico e uma expansão generalizada do comércio de cocaína em todo o planeta, com grande aumento de transações pela internet. Segundo estimativas, a produção total de cocaína pura, em 2015, chegou a 1.125 toneladas.

Um aumento na quantidade de cocaína apreendida a nível mundial também foi relatado, com valores recordes de 864 toneladas apreendidas em 2015, um aumento de 32% em relação a 2014. Um total de 153 países reportaram apreensões de cocaína no período de 2010 a 2015, sugerindo que o tráfico de cocaína é um problema global, destacando-se a América do Sul, onde a produção e o consumo crescente acontecem em um ritmo maior. O Brasil além de ser um grande mercado consumidor, é também uma grande rota para o tráfico mundial [10].

1.2.1. Análises químicas de cocaína

Os dados anteriores mostram como o uso de cocaína tem aumentado nos últimos anos e como isso vai se tornando um problema crescente para a sociedade. Devido a políticas públicas e operações policiais é observado um aumento nas apreensões de cocaína e para o prosseguimento do processo criminal, como materialização de provas e julgamento dos envolvidos, a análise do material apreendido se faz necessária. Nesse contexto, o uso e desenvolvimento de métodos analíticos mais baratos e portáteis é de fundamental importância.

A análise de cocaína apreendida, geralmente, é feita em duas etapas, o exame preliminar ou exame de constatação que é uma espécie de triagem ou “*screening*” utilizando o termo em inglês. Esse tipo de análise requer testes rápidos, de fácil operação e com características portáteis para serem realizados em exames de campo levando à constatação imediata de que o material apreendido é realmente cocaína. Após o resultado positivo na análise preliminar, o material apreendido é então encaminhado para a análise definitiva, onde testes realizados em laboratórios especializados indicarão de forma mais exata a composição desse material [8].

Existem diversos tipos de métodos analíticos que podem ser usados em análises preliminares. Os mais comumente utilizados são os testes de odor, solubilidade, microcristal, etc. [11]. Imunoensaios baseados em reações enzimáticas também são comuns [12], bem como testes de cor, como o teste de Scott e alguns “*spot tests*” colorimétricos [13]. Entretanto, a grande maioria destes testes são pouco seletivos e suscetíveis a um grande número de interferências, levando a resultados falso-positivos. Testes de cor como o teste de Scott, por exemplo, podem ter a interferência de um grande número de compostos quimicamente semelhantes à cocaína (aminas terciárias ou sais de amônio quaternário), por exemplo, fármacos não controlados, anestésicos, etc. Esses compostos estão muitas vezes presentes no material apreendido como adulterantes e/ou diluentes. Testes de imunoensaios são muito susceptíveis a erros causados por matrizes biológicas, como também matrizes presentes em alimentos e medicamentos [12].

Devido à falta de especificidade dos métodos rotineiramente utilizados em análises preliminares, estudos em modificações desses testes e desenvolvimento de novos são constantemente realizados, visando melhoras em seletividade, além de atender as características desejáveis neste tipo de análise (simplicidade, rapidez, portabilidade e baixo-custo). Devido a estas limitações, testes definitivos devem ser realizados em sequência para que esses resultados

corrobores, ou não, com os testes preliminares. Dentre as técnicas utilizadas em análises definitivas, a cromatografia, a espectroscopia, espectrometria de massas ou de mobilidade iônica e eletroforese capilar vêm tendo grande destaque [14,15]. Estas técnicas possuem um alto desempenho analítico e são técnicas robustas que possibilitam a identificação de uma grande variedade de drogas, as limitações ficam por conta do alto custo, complexidade e no fato de que nem todas substâncias proibidas ou controladas podem ser analisadas nas condições que a técnica exige, por exemplo, substâncias que sofrem degradação em análises utilizando um cromatógrafo gasoso, ou no caso de misturas de compostos com grupos funcionais observados na mesma região de interesse em uma análise por infravermelho [8].

Neste contexto, o uso de técnicas eletroanalíticas em análises preliminares, que além de simples, de baixo custo e portáteis, podem proporcionar um aumento na confiabilidade dos resultados de análise obtidos no local da apreensão. Com isto, documentos como o Auto de Prisão em Flagrante (APF), que contém as informações advindas da situação de flagrante, podem ser homologados, garantindo a constatação de que se trata, realmente, de flagrante, garantindo à polícia as providências cabíveis, como prisões cautelares de acordo com a lei.

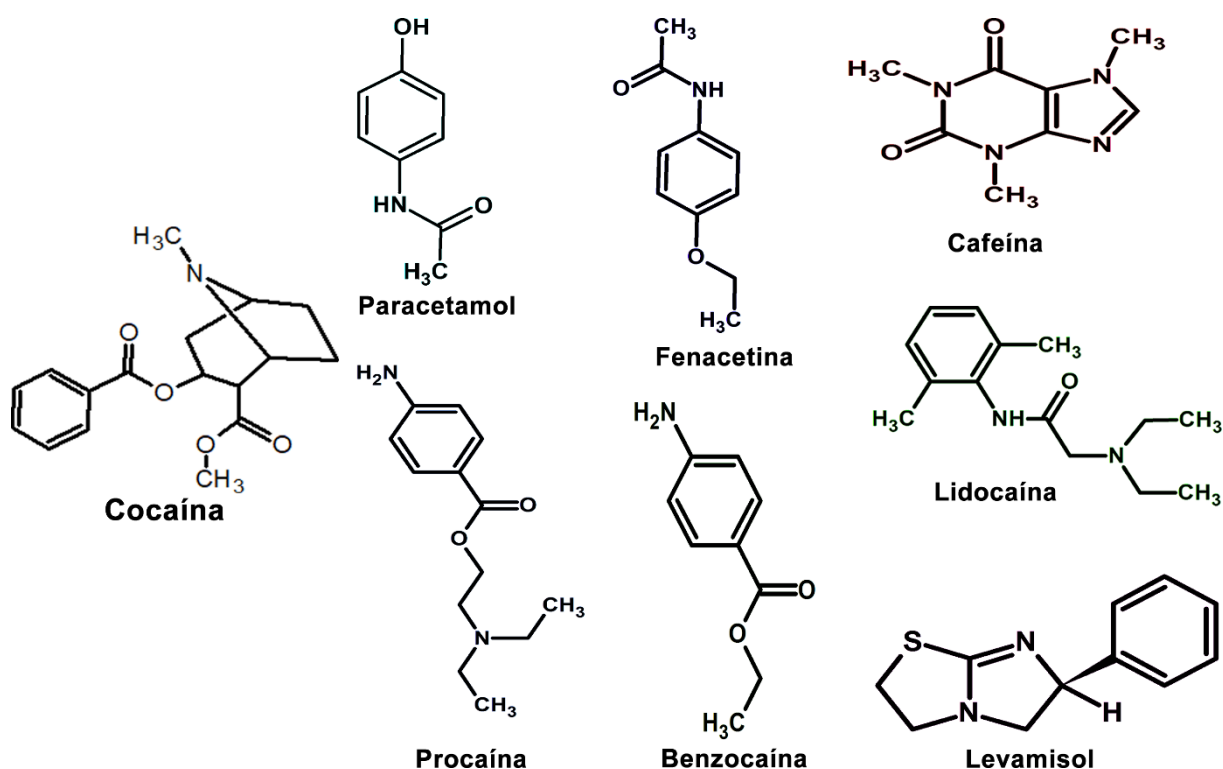
Outro aspecto muito importante na análise de drogas de abuso apreendidas, em especial a cocaína, é traçar o perfil químico do material apreendido. Através deste perfil, que é intrínseco de cada amostra (uma impressão digital), diversas informações podem ser obtidas, como origem da droga, relações entre fornecedores, traficantes e usuários, assim como as redes de tráfico e distribuição. O perfil químico de uma amostra consiste em conhecer os constituintes presentes além da droga em si. Esses constituintes podem ser: (i) componentes naturais, como materiais de origem vegetal provenientes da manufatura da droga; (ii) subprodutos, que são substâncias geradas durante a produção, armazenamento ou transporte; (iii) diluentes, que são substâncias sem efeito ativo adicionadas à droga original para o aumento de volume e consequente aumento de lucro para os traficantes e; (iv) os adulterantes que possuem efeito farmacológico e visam potencializar ou mimetizar os efeitos da droga [8,16].

1.2.1.1. Análises de adulterantes de cocaína em processos de triagem

Traficantes de drogas usam diversos modos de aumentar o lucro com as vendas de cocaína, sendo que a adição de diluentes e adulterantes é uma prática extremamente comum [17,18]. Dentre os diluentes mais comuns estão os ácidos bórico e benzoico, diversos tipos de açúcar como D-sorbitol, mio-inositol, maltose, amido, etc. Já entre os adulterantes mais

comumente encontrados em amostras apreendidas estão analgésicos como fenacetina (FEN) e paracetamol (PAR), estimulantes do sistema nervoso central como cafeína (CAF) e levamisol (LEV) e fármacos com propriedades anestésicas como benzocaína (BEN), lidocaína (LID) e procaina (PRO) [6,19–26]. A Figura 1 apresenta as estruturas moleculares da cocaína e dos principais adulterantes comumente encontrados em amostras de cocaína apreendidas.

Figura 1. Estruturas moleculares da cocaína e dos adulterantes mais comuns encontrados em amostras apreendidas.



Os métodos analíticos mais utilizados para análise qualitativa ou quantitativa de adulterantes em amostras de cocaína são aqueles que utilizam técnicas espectroscópicas [27] ou cromatográficas [24,28]. Estas técnicas são poderosas em termos analíticos, apresentando excelentes resultados em diferentes tipos de análise de adulterantes em amostras de cocaína, mas geralmente envolvem instrumentação de alto custo e também apresentam dificuldades para o uso em campo (portabilidade). Entretanto, estudos empregando espectrometria de massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*) e espectroscopia no infravermelho (IR, do inglês, *Infrared*) de forma portátil foram apresentados recentemente para análise de cocaína e adulterantes, Wagli *et al*, apresentaram um sistema portátil envolvendo extração líquido-líquido com detecção IR para determinação de cocaína em saliva [29]. Santos *et al* demonstraram o uso de cromatografia em papel para screening das amostras contendo cocaína e diferentes adulterantes

(lidocaína e levamisol) com subsequente quantificação empregando modelos obtidos por MS [30]. Em outro trabalho de Lawton *et al*, foi demonstrada a validação analítica para métodos empregando MS de forma portátil para diferentes tipos de substâncias de interesse forense, como cocaína [31].

Técnicas eletroquímicas apresentam uma alternativa de menor custo, boa sensibilidade, portabilidade e possibilitam a análise com etapas simples de preparo de amostras, inclusive com a presença de material particulado [32,33], e têm sido bastante empregadas nos últimos anos. Uma revisão publicada recentemente [34], descreve vários métodos eletroquímicos com características portáteis que foram desenvolvidos para análise de cocaína. Contudo, somente uma pequena quantidade de trabalhos é encontrada na literatura empregando técnicas eletroquímicas que unem portabilidade e análise de adulterantes. Dos métodos que analisam cocaína na presença de adulterantes podemos destacar Salles *et al*, que realizaram análises de fenacetina usando um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com polímero molecularmente impresso [35]. Diferentes estratégias de modificação de eletrodos foram realizadas por Asturias-Arribas e colaboradores para a produção de um biossensor com citocromo P450 em eletrodos impressos [36,37]. Também são encontrados várias outras estratégias para detecção seletiva de cocaína utilizando diferentes modificações da superfície eletródica [26,32,38–42]. O uso de eletrodos sem modificação também é relatado em estudos pioneiros de detecção eletroquímica de cocaína em amostras apreendidas [43,44]. Recentemente um estudo demonstrou um método portátil para a detecção de diferentes adulterantes em amostras de cocaína apreendidas utilizando eletrodo impresso de carbono não modificado [23].

1.3. Suplementos alimentares e fitoterápicos utilizados para emagrecimento

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade no mundo triplicou desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso, destes, aproximadamente 650 milhões eram obesos. A obesidade é considerada uma epidemia pela OMS, sendo que a maioria das pessoas vivem em países onde a obesidade e o sobrepeso matam mais que o baixo peso ($IMC < 18,5$) [45]. Em busca de melhorar a qualidade de vida e também por fins estéticos, um grande número de pessoas recorre ao uso de medicamentos anorexígenos (inibidores de apetite), como sibutramina, femproporex, anfepramona, ou estimulantes do sistema nervoso central que agem como termogênicos como a cafeína, efedrina, etc. Em geral,

esse tipo de medicamentos possui efeitos colaterais danosos à saúde e, portanto, seu uso é constantemente revisto pelas agências de saúde governamentais [46–48].

Suplementos alimentares e/ou fitoterápicos para emagrecimento são utilizados como meios alternativos ao uso de medicamentos sintéticos, com a concepção errônea de que não oferecem riscos à saúde ou que causam menos ou até mesmo não possuem efeitos colaterais. Estes suplementos tanto podem trazer naturalmente efeitos colaterais como também são frequentemente alvos de falsificações e adulterações com a adição de substâncias sintéticas não declaradas no rótulo (fraudes) com a intenção de aumentar sua eficácia e competitividade no mercado [49–54]. Assim, com o livre comércio e a grande popularidade desse tipo de medicamento, o uso de métodos analíticos capazes de detectar rapidamente (triagem ou “screening”) e/ou quantificar possíveis adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento é de fundamental importância.

1.3.1. Adulterantes em suplementos alimentares e fitoterápicos

Sibutramina é uma droga anorexígena pertencente aos inibidores seletivos de recaptação de serotonina que age diretamente na supressão do apetite. Inicialmente indicada para tratamento de pessoas obesas com índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 30 kg/m² [55], teve seu uso não recomendado a partir de 2010 pelas agências nacionais de saúde europeia e americana devido ao seu risco potencial de causar infartos [47,48]. Sibutramina também aparece na lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping (WADA, do inglês *World Anti-Doping Agency*) [56]. No Brasil, o uso da sibutramina é regulamentado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) sendo permitido seu uso com a dose diária recomendada (DDR) de 15 mg/dia e a quantidade de medicamento por receituário deve ser de, no máximo, para 60 (sessenta) dias de tratamento [57].

O acesso facilitado aos suplementos ou medicamentos fitoterápicos (não são necessários receituários) e a emergente busca por esse tipo de tratamento tem chamado atenção para esse mercado, a cada dia surgem novas e diferentes formulações que prometem emagrecimento sem efeitos indesejáveis. Porém, diversos relatos na literatura e em noticiários mostram que a adulteração desses medicamentos com o objetivo de aumentar sua eficácia é uma prática bastante comum e que vem aumentando atualmente [49,58,59]. O efeito de suprimir o apetite causado pela sibutramina e a consequente indução ao emagrecimento torna esse medicamento sintético um dos mais comumente encontrados em casos de adulterações [54].

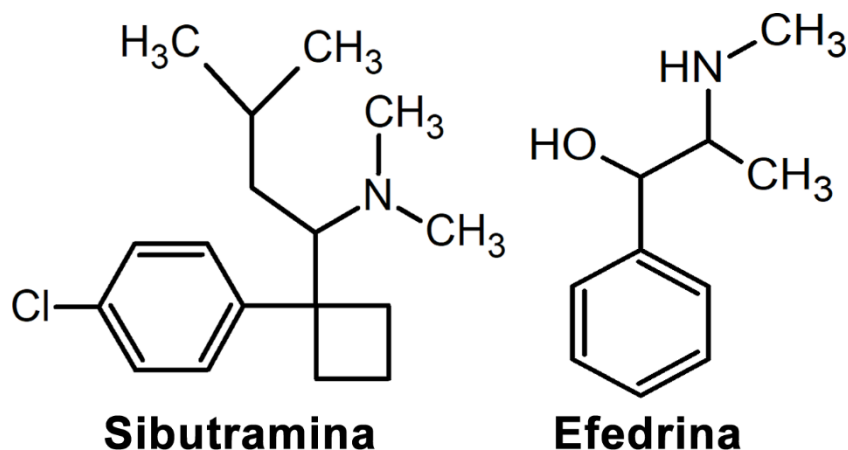
A Efedrina é um alcaloide pertencente ao grupo das anfetaminas, derivada de várias plantas do gênero *Ephedra*, pode ser usada como substância termogênica atuando no aumento do consumo de energia. Além disso, possui ação hipertensiva, aumentando o fluxo de sangue para o coração [53]. Seu uso é liberado pela Anvisa desde que seja acompanhada de receita médica [60]. Estudos mostraram que o uso de efedrina em associação com cafeína aumenta o desempenho aeróbico de esportistas melhorando o desempenho e auxiliando no emagrecimento [61,62]. Porém, efeitos colaterais como problemas cardiovasculares, infarto e morte súbita foram relatados após a ingestão da substância [63]. O comitê de substâncias proibidas da WADA estabelece uma concentração máxima de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de efedrina na urina [56], sendo que a taxa de excreção de efedrina inalterada é em torno de 60% [64,65]. Em 2004, a FDA proibiu a comercialização de suplementos alimentares contendo efedrina, estabelecendo que qualquer suplemento onde fosse constatada sua presença seria considerado como adulterado [66].

Suplementos alimentares contendo *Ephedra* sp., também conhecidos como Ma Huang, são usados com a finalidade de emagrecimento devido a liberação de catecolaminas e estimulação dos receptores β 3-adrenérgicos no tecido adiposo, provocando assim seu efeito termogênico [67]. Porém, vários estudos de casos clínicos mostraram que houve efeitos adversos como sintomas psíquicos e cardiovasculares em pessoas que consumiram esse tipo de suplementos. Segundo a literatura, assim como a sibutramina, efedrina também é uma das substâncias frequentemente usadas em adulterações de fitoterápicos [68].

Nesse contexto, diversos trabalhos são encontrados na literatura visando a identificação de adulterantes usando diferentes métodos analíticos. Para a maioria dos adulterantes, 1% ou a dose diária recomendada é a menor quantidade adicionada para obtenção dos efeitos farmacológicos [68–70]. Vários trabalhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência [53,54,71,72], cromatografia gasosa ou líquida com detecção por espectrometria de massas [73–76], cromatografia de camada delgada de alta eficiência [51,54] ou simples [68], cromatografia líquida de ultra eficiência [77,78], espectroscopia de infravermelho [79], espectrometria de mobilidade iônica [80], métodos espectrofotométricos [81,82], além de eletroforese capilar [58,83–85] foram descritos na literatura. Métodos empregando técnicas eletroquímicas para determinação de sibutramina [86–89] e efedrina [64,65,90,91] também foram relatados, porém, à exceção de Wang, *et al.* [84] e Barbosa, *et al.* [89], que aplicaram o método desenvolvido em amostras de alimentos funcionais, nenhum desses métodos foram

aplicados em amostras de suplementos ou medicamentos fitoterápicos. A Figura 2 apresenta as estruturas moleculares da sibutramina e da efedrina.

Figura 2. Estruturas moleculares da sibutramina e da efedrina.



1.4. Técnicas eletroquímicas

Diversas técnicas eletroquímicas são empregados em determinações analíticas, dentre elas, técnicas interfaciais que podem ser estáticas (corrente desprezível fluindo no sistema) como a potenciometria, ou dinâmicas (presença de corrente mensurável) como as voltametrias e a amperometria [92]. Voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) é a técnica mais utilizada para a aquisição de informações sobre reações eletroquímicas. Assim, é frequentemente, o primeiro experimento realizado em um estudo eletroquímico, pois oferece uma elucidação dos potenciais redox de espécies eletroativas além de informações importantes sobre efeito do material do eletrodo de trabalho e do meio (eletrólito de suporte e/ou pH) empregados sobre o processo redox [93].

Voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square-Wave Voltammetry*), é uma técnica voltamétrica diferencial na qual a aplicação do potencial no eletrodo de trabalho se dá na forma de uma onda quadrada simétrica sobreposta em uma escada de potencial. A aquisição do sinal na SWV é realizada no fim da aplicação de cada degrau de potencial, de forma que a corrente faradaica seja obtida após a minimização da contribuição da corrente capacitiva, uma vez que o decaimento da corrente capacitiva com o tempo é mais rápido do que o decaimento da corrente faradaica [94]. É considerada uma das técnicas mais rápidas e sensíveis. Limites de detecção comparáveis aos de técnicas espectroscópicas podem ser atingidos em algumas situações como determinações de metais, por exemplo. Além de propósitos analíticos, através

da avaliação de resultados obtidos em função de variações em parâmetros da técnica SWV, informações cinéticas e mecanísticas de processos redox podem ser obtidas, com destaque para reações de cinética rápida. Isto se deve à natureza de aplicação do potencial ao eletrodo de trabalho e a forma de aquisição da corrente onde as contribuições capacitivas são mínimas. Além disto, a corrente resultante é obtida através da subtração entre a corrente direta (medida no final do pulso anódico) e a corrente reversa (medida no final do pulso catódico), como a corrente reversa é geralmente de sinal oposto ao da corrente direta ocorre uma somatória das correntes proporcionando assim o aumento da sensibilidade (especialmente para processos eletródicos reversíveis) [93–95].

Amperometria convencional ou cronoamperometria é uma técnica eletroanalítica na qual o sinal resultante é uma corrente obtida a partir da aplicação de um potencial constante ao eletrodo de trabalho, o que a diferencia das técnicas voltamétricas, onde a corrente monitorada é um resultado da variação do potencial ao longo de uma varredura [96]. Através do monitoramento da corrente no potencial aplicado é possível verificar se uma reação de oxidação ou de redução de uma espécie ocorre e este fenômeno é conhecido como detecção amperométrica [97]. Estratégias para detecção simultânea de mais de um composto eletroativo utilizando amperometria são apresentadas na literatura, seja empregando mais de um eletrodo de trabalho [98–101], ou empregando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês *Multiple Pulse Amperometry*) [102–105]. Na MPA e com uso do software GPES (Metrohm Autolab) podem ser aplicados até 10 pulsos de potencial de forma sequencial e repetitiva no mesmo eletrodo de trabalho, sendo possível o monitoramento da corrente em cada pulso de potencial (o que corresponde à aquisição de até 10 amperogramas distintos simultaneamente) [102]. Não foi possível o uso do software NOVA (Metrohm Autolab) em experimentos de MPA devido a limitações do software.

Determinações simultâneas de compostos eletroativos em potenciais redox distintos ($\Delta E > 0,1 \text{ V}$) [70] somente são possíveis empregando a técnica de amperometria a potencial constante quando mais de um eletrodo de trabalho, como eletrodos de carbono vítreo ou diamante dopado com boro, são usados na detecção [75-77]. Quando somente um eletrodo de trabalho é usado, determinações simultâneas empregando amperometria somente são possíveis se a amperometria de múltiplos pulsos for empregada [78].

1.5. Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O diamante possui uma estrutura composta por carbonos hibridizados sp^3 ligados entre si em uma geometria tetraédrica. A ausência de ligações π em sua estrutura o torna um mal condutor elétrico, possuindo um “*bandgap*” de 5,45 eV e uma resistividade alta, da ordem de $10^{16} \Omega \text{ cm}$, por isso, é considerado um material isolante. Para a redução desta resistividade, tratamentos como a inserção de terminações em hidrogênio, com plasma de hidrogênio, por exemplo, são realizadas em filmes de diamante ou no próprio diamante natural para a redução dessa resistividade. Mesmo após esse tipo de tratamento, sua resistividade ($\sim 10^6 \Omega \text{ cm}$) ainda é considerada alta do ponto de vista de obtenção de materiais semicondutores. Por isso, processos de dopagem são aplicados a filmes de diamante, melhorando a condutividade e tornando-o um material promissor para ser empregado como eletrodo [106].

Entre os dopantes mais comuns estão nitrogênio, fósforo, enxofre e boro. Sendo o último mais utilizado para a produção de eletrodos de diamante, pelo fato do boro possuir menor energia de ativação como transportador de carga (0,37 eV). A dopagem se dá durante o processo de crescimento do filme de diamante pela técnica de deposição de vapor, onde diborano (B_2H_6), trimetilborato ($C_3H_9BO_3$) ou óxido de boro (B_2O_3) são adicionados à mistura de gases a serem depositadas no substrato (geralmente pastilhas de silício). Variáveis como reatividade, estabilidade, toxicidade e disponibilidade das substâncias adicionadas como dopantes devem ser levadas em consideração, tornando dessa forma, o B_2O_3 , o mais comum nos processos de dopagem [107,108].

Os eletrodos de diamante dopados foram introduzidos na eletroquímica por Pleskov *et al.* em 1987 [109]. Diamante dopado com boro (BDD, do inglês *boron doped diamond*) é material que possui propriedades eletródicas superiores, se comparadas com algumas outras formas de carbono, tais como: amplo intervalo de potencial onde a corrente de fundo é baixa e estável permitindo uma ampla faixa de potencial de trabalho em meio aquoso, cinética relativamente rápida de transferência de elétrons, baixa adsorção molecular, além de estabilidade mecânica e química [107,110]. Pleskov e colaboradores também demonstraram através de estudos fotoeletroquímicos que filmes de diamante podiam ter suas propriedades superficiais modificadas através de pré-tratamentos. Nesse contexto diversos trabalhos são encontrados na literatura para estudo e caracterização do comportamento eletroquímico obtido através dos diferentes pré-tratamentos (anódicos ou catódicos) impostos à superfície dos eletrodos de BDD [111–115].

Eletrodos de BDD tem sido usado em diferentes aplicações, de tratamento de água a eletrossínteses orgânicas e inorgânicas, tecnologia em energia eletroquímica, biotecnologia, além de eletroanálise [107], onde vem sendo usado com sucesso no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos. Detecção de analitos em diferentes tipos de amostras como farmacêuticas [103,105,116–119], suplementos alimentares [120–123], amostras biológicas [116,124–126], água [124,127,128] e biodiesel [129,130]. Entretanto não foram encontrados trabalhos utilizando eletrodos de BDD em análises de cocaína, ou substâncias utilizadas como agentes emagrecedores como sibutramina e efedrina.

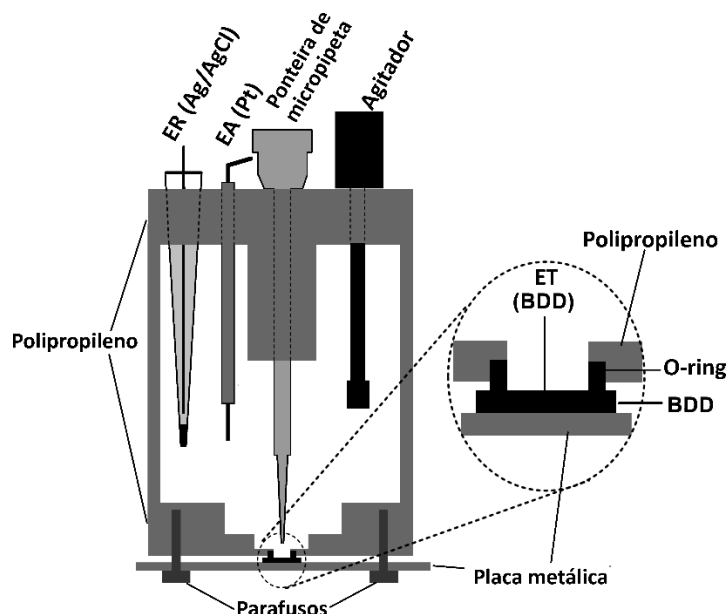
1.6. Análise por Injeção em Batelada (BIA)

Análise por Injeção em Batelada (BIA, do inglês, *Batch Injection Analysis*) é um sistema conceitualmente comparável aos sistemas de injeção em fluxo (FIA, do inglês, *Flow Injection Analysis*), no sentido de que também é baseada no transporte hidrodinâmico do analito até a superfície do eletrodo de trabalho. Primeiramente apresentado em 1991 por Wang e Taha, a técnica consiste em injeções de pequenos volumes de soluções de amostra usando uma micropipeta diretamente na superfície do detector (arranjo *wall-jet*) que está imerso em grande volume de eletrólito suporte [131].

Similar à sistemas FIA, características analíticas como velocidade, reprodutibilidade, simplicidade e baixo custo podem ser atingidas por sistemas de BIA. Além disso, esse tipo de arranjo dispensa o uso de válvulas, bombas e tubos de conexão eliminando problemas relacionados a vazamento ou presença de bolhas de ar. No entanto, sistemas BIA limitam a manipulação das soluções a serem injetadas, por exemplo, a conversão de um analito não detectável a um detectável (derivatização), não é possível “*online*” devido ao curto caminho que o analito percorre da injeção ao detector [131].

A demanda por métodos analíticos portáteis, capazes de serem operados fora do laboratório, associada à busca por métodos simples, rápidos, seguros, capazes de fazerem análises sequenciais com alta frequência analítica tornam a combinação do sistema BIA com detecção eletroquímica bastante atrativa. A Figura 3 apresenta um esquema de uma célula BIA adaptada para a detecção eletroquímica utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.

Figura 3. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso com eletrodo de diamante dopado com boro. Fonte: Adaptado de [132].



As potencialidades, bem como os conceitos e princípios do sistema BIA associado à detecção eletroquímica têm sido exploradas e demonstradas. Métodos envolvendo detecção por amperometria de múltiplos pulsos (BIA-MPA) [105,117,133–136], amperometria pulsada (BIA-PAD) [137,138] e voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) [119,134,139], foram apresentados nos últimos anos. Sistemas BIA usualmente requerem o uso de pipetas eletrônicas, porém, estudos mostraram que o uso de padrão interno permite o emprego de pipetas manuais na injeção [140], além de minimizar problemas relacionados com os fenômenos de adsorção irreversíveis (contaminação) [141]. O uso de pulsos de potenciais de limpeza e/ou condicionamento do eletrodo de trabalho também são apresentados como alternativas para evitar contaminações da superfície eletródica [105,117,135,142].

O modelo atual de célula BIA conta com tampa para colocação dos eletrodos de referência e auxiliar, fácil fixação do eletrodo de trabalho no fundo da célula, além de uma base que permite a sustentação da célula na bancada ou local de análise permitindo a dispensa do uso de suportes e garras para fixação da célula e dos eletrodos. Com isto, e juntamente com o uso de pipetas eletrônicas e potenciostatos portáteis alimentados a bateria, a portabilidade do sistema BIA foi estabelecida [143]. A adaptação de células BIA para o uso com eletrodos impressos [144] favoreceu o crescimento e a propagação deste tipo de análise, associando portabilidade e versatilidade. Recentemente, a primeira célula BIA produzida comercialmente

foi lançada a partir de uma parceria entre a empresa fornecedora de materiais e equipamentos para análise química Metrohm DropSens (Oviedo, Espanha) e nosso grupo de pesquisa. Esta combinação de sistema BIA adaptado para eletrodos impressos foi denominada “Sistema eletroquímico portátil para análises *“on-site”* [145]. O uso e operação de um sistema BIA comercial foi demonstrado em um vídeo, disponível no site YouTube.com[®] [146] contando com 633 visualizações até dia 23 de fevereiro de 2019. O vídeo pode ser acessado utilizando o código QR (do inglês, *Quick Response*) apresentado na Figura 4.

Figura 4. Código QR para rápido acesso à vídeo no YouTube.com[®] para visualização do funcionamento de uma célula BIA.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, portáteis e de baixo custo para aplicações em análises de interesse forense como análise do perfil químico de amostras de cocaína apreendidas e detecção de adulterações de suplementos alimentares e fitoterápicos usados para auxílio no processo de emagrecimento com sibutramina ou efedrina.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho:

- Estudo do comportamento eletroquímico da cocaína utilizando eletrodo de BDD;
- Estudo do perfil voltamétrico de diferentes tipos de adulterantes comumente presentes em amostras de cocaína apreendidas;
- Desenvolvimento de um método de triagem rápida e quantificação de cocaína e possíveis adulterantes em amostras de cocaína apreendidas;
- Estudo do comportamento eletroquímico da sibutramina e efedrina utilizando eletrodo de BDD;
- Desenvolvimento de um método simples e rápido para detecção da presença e quantificação de adulterações com sibutramina ou efedrina em diferentes tipos de amostras reais de suplementos alimentares e fitoterápicos utilizados para emagrecimento.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água deionizada de alta pureza ($R \geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida com um sistema de purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento dos trabalhos apresentados nesta tese foram de grau analítico e usados sem procedimento prévio de purificação. Possíveis contaminantes presentes em ácidos, como metais, não apresentaram interferência nos estudos realizados. As especificações de todos os reagentes utilizados no trabalho são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de reagentes usados no presente estudo e respectivas especificações.

Reagente	Teor (%)	Empresa	Origem
Ácido sulfúrico	95 – 99	Vetec	Rio de Janeiro - Brasil
Ácido acético	99,7	Vetec	Rio de Janeiro - Brasil
Ácido fosfórico	85,0	Synth	Diadema - Brasil
Ácido bórico	99,5	Panreac	Barcelona - Espanha
Hidróxido de sódio	98,0	Panreac	Barcelona - Espanha
Etanol	99,5	Synth	Diadema - Brasil
NaCl	99,0	Synth	Diadema - Brasil
KCl	99,0	Synth	Diadema - Brasil
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$,	99,0	Synth	Diadema - Brasil
Na_2SO_4 ,	99,0	Vetec	Rio de Janeiro - Brasil
KH_2PO_4	99,0	Synth	Diadema - Brasil
NH_4Cl	100,0	Synth	Diadema - Brasil
Ureia	99,9	Vetec	Rio de Janeiro - Brasil

Padrões utilizados na primeira parte do trabalho: Cloridrato de cocaína ($\text{COC} \cdot \text{HCl}$, pureza 92,45%) foi fornecida pelo Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, fenacetina, procaína, levamisol, benzocaína e lidocaína foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Steinheim – Alemanha), paracetamol e cafeína foram adquiridas da Synth (Diadema, São

Paulo, Brasil). Para a segunda parte do trabalho padrões de sibutramina (SIB) foi obtida de Nifty Laboratories, Índia e efedrina (EFD) de Fagron, Índia, ambas com 100% de pureza.

Diferentes soluções tampão foram preparadas utilizando as concentrações adequadas dos respectivos ácidos e o pH ajustado com NaOH 2 mol L⁻¹. Para a solução tampão Britton-Robbinson (BR), ácidos fosfórico, acético e bórico foram misturados em uma concentração de 0,04 mol L⁻¹ de cada com o ajuste do pH realizado posteriormente.

No estudo do comportamento eletroquímico da cocaína em função do pH, soluções tampão BR de diferentes pH (2,0 a 12,0) foram preparados em meio etanólico (70:30; água:etanol; v/v). Este procedimento foi adotado, inicialmente, com o objetivo de assegurar a solubilidade da cocaína em todos os valores de pH. Nos demais testes, após comprovada a solubilidade da cocaína em soluções com pH < 7,0, a cocaína foi diretamente diluída no eletrólito suporte utilizado (H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹). Todas as demais soluções estoque de padrões e amostras utilizados nesse trabalho foram preparadas por diluição direta no eletrólito suporte aquoso.

3.2. Amostras

Seis amostras apreendidas de cocaína foram fornecidas pelo Instituto de Criminalística de São Paulo. Essas amostras foram previamente analisadas qualitativamente e quantitativamente utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) conforme procedimento descrito na literatura [24]. A Tabela 2 apresenta as composições químicas das amostras de cocaína utilizadas neste trabalho. Todas as amostras utilizadas foram dissolvidas diretamente no eletrólito suporte (H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹) antes da análise com o método proposto neste trabalho.

Tabela 2. Composição química das amostras de cocaína apreendidas utilizadas [24].

Amostras	Composição (%; m/m)				
	Fenacetina	Cafeína	Lidocaína	Paracetamol ^a	Cocaína
1	6,4	-	1,1	-	60,2
2	13,7	2,7	0,9	-	40,8
3	19,4	-	-	-	72,7
4	11,8	39,3	1,6	-	21,6
5	0,7	30,6	6,7	Sim	10,7
6	-	40,2	1,1	-	10,3

^a: Composto foi analisado somente qualitativamente.

Nos estudos de adulteração de suplementos alimentares com sibutramina, oito amostras adquiridas em farmácias locais, incluindo cinco formulações para emagrecimento contendo somente produtos de fontes naturais (informados pelo fabricante), um suplemento à base de cafeína, um multivitamínico comercial e um multivitamínico composto produzido em uma farmácia de manipulação foram empregados para a aplicação do método desenvolvido. Informações sobre o nome comercial, forma física e composição declarada pelos fabricantes são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Características e composições declaradas pelos fabricantes de amostras utilizadas no estudo de adulteração com sibutramina.

Amostra	Nome comercial	Forma física	Composição declarada
1	Chá verde	Cápsula	<i>Camellia sinensis</i>
2	FC	Cápsula	<i>Panax ginseng</i> e <i>Camellia sinensis</i>
3	Quitosana	Cápsula	Quitosana
4	Spirulina	Cápsula	<i>Arthrospira platensis</i> e <i>Arthrospira maxima</i>
5	Garcínia	Cápsula	<i>Garcinia cambogia</i>
6	SC	Cápsula	Cafeína anidra e natural (Guaraná e cola)
7	M. Comercial	Comprimido	(a)*
8	M. Composto	Cápsula	(b)*

FC: Formulação composta; SC: Suplemento de cafeína; M: Multivitamínico: **(a)** Vitaminas A, B1, B2, B5, B6, B12, C, D3, E, K1, Ácido Fólico, Biotina, Nicotinamida, Ca, Cu, Fe, Cr, I, Mg, Mn, Mo, Se, Zn; **(b)** Vitaminas A, B1, B2, B6, B12, C, D3, PABA, Ácido Fólico, Nicotinamida, Extrato de uva, Tocoferol, Pantotenato de cálcio, Biotina, Colágeno, Cr, S, Se, Si, Zn, *Saccharomyces cerevisiae*.

Para os estudos com o objetivo de identificação de adulteração de suplementos naturais indicados para emagrecimento com efedrina, seis amostras adquiridas no comércio local, além de um suplemento à base de cafeína, foram empregadas para a aplicação do método desenvolvido. Informações sobre o nome comercial, forma física e composição declarada pelos fabricantes são apresentadas na Tabela 4. Além das amostras de produtos naturais para emagrecimento, amostras de urina sintética também foram utilizadas na aplicação do método desenvolvido para a análise de efedrina.

Tabela 4. Características e composições declaradas pelos fabricantes de amostras utilizadas no estudo de adulteração com efedrina.

Amostra	Nome comercial	Forma física	Composição declarada
1	Chá verde	Cápsula	<i>Camellia sinensis</i>
2	Spirulina	Cápsula	<i>Arthrospira platensis</i> e <i>Arthrospira maxima</i>
3	Garcínia	Cápsula	<i>Garcinia cambogia</i>
4	SC	Cápsula	Cafeína anidra e natural (Guaraná e cola)
5	Garcínia composta	Cápsula	<i>Garcinia cambogia</i> e <i>Centella asiatica</i>
6	Lipo Diet [®]	Cápsula	(a)

(a) Extratos secos de: linhaça, gengibre, alcachofra, berinjela, chia, beterraba, psyllium (*Plantago ovata*), maca peruana (*Lepidium meyenii*), laranja amarga e maracujá.

No preparo das amostras de suplementos alimentares contendo SIB e EFD, quando na forma de cápsulas, 10 cápsulas do mesmo produto foram abertas e os conteúdos misturados e homogeneizados, quando comprimidos foram utilizados, dez unidades da amostra foram maceradas utilizando um almofariz e pistilo de porcelana. Em seguida, um grama de cada amostra pura foi pesado e transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL. Para as amostras dopadas, adicionou-se 1% (m/m) dos padrões de SIB ou EFD, misturando-se 0,99 g das amostras com 0,01 g do respectivo padrão e transferidos para os tubos de centrífuga de 15 mL. Posteriormente, 10 mL de eletrólito suporte foram então adicionados nos tubos e agitados manualmente, em seguida os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos para decantação de sólidos insolúveis. A proporção de dopante nas amostras foi definida levando em conta a posologia indicada do suplemento e a quantidade da substância adulterante possivelmente contida em uma amostra real, como no caso da SIB a dose diária recomendada [55]. Após o preparo, todas amostras foram adequadamente diluídas até o intervalo de concentrações linear para cada método proposto.

A amostra de urina sintética foi preparada conforme descrito na literatura [147] adicionando-se a seguinte composição: 0,73 g NaCl, 0,40 g KCl, 0,27 g CaCl₂×H₂O, 0,56 g Na₂SO₄, 0,35 g KH₂PO₄, 0,25 g NH₄Cl e 6,25 g ureia em um balão volumétrico de 250 mL, e completando-o com água deionizada. A amostra de urina foi utilizada logo após a preparação.

As amostras de urina sintética foram dopadas com duas concentrações diferentes de EFD, 10 e 20 mg L⁻¹. Para realização do *screening* pelo método BIA-SWV, 5 mL das amostras foram diluídas com 5 mL do eletrólito suporte utilizado em uma concentração dobrada (Tampão ácido acético / acetato, 0,2 mol L⁻¹, pH 4,75) com o objetivo de aumentar a capacidade tamponante e manter as condições experimentais mais próximas possível das condições otimizadas (Tampão ácido acético / acetato, 0,1 mol L⁻¹, pH 4,75). Após a diluição, o pH da solução (50% amostra + 50% tampão) foi medido e notou-se uma alteração de 4,75 para 5,18, porém esta alteração não foi considerada significativa para a detecção da EFD.

3.3. Instrumentação

3.3.1. Medidas eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas (amperométricas e voltamétricas) foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB tipo III (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands - Metrohm[®]) interfaceado a um computador e controlado através do software GPES 4.9.007 ou NOVA 2.1.

3.3.2. Eletrodos

Neste trabalho foram utilizados dois diferentes eletrodos de trabalho: carbono vítreo (área geométrica = 7,07 mm²) e diamante dopado com boro (BDD; área geométrica = 22,9 mm²). O GCE foi adquirido da empresa Bioanalytical Systems, Inc. (West Lafayette, Indiana, EUA) e utilizado para um estudo voltamétrico de comparação para a cocaína. Na limpeza deste eletrodo usou-se o polimento mecânico com (granulometria 0,3 μ m) com posterior lavagem com água deionizada. Antes do uso nos estudos propostos, a superfície de resposta dos eletrodos foi testada (ativação) através de voltamogramas cíclicos sucessivos em meio do eletrólito em estudo (até obtenção de estabilidade). Os voltamogramas eram registrados na faixa de potencial de 0,0 V a +1,8 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

O eletrodo de BDD foi adquirido da empresa NeoCoat SA - La Chaux-de-Fonds, Suíça). Trata-se de um filme de BDD com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm depositado em uma base de silício (0,7 x 0,7 cm) com espessura de aproximadamente 1,2 mm. Antes do primeiro uso, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo de limpeza/ativação, empregando dois modos de limpeza eletroquímica, uma anódica (aplicando uma corrente de

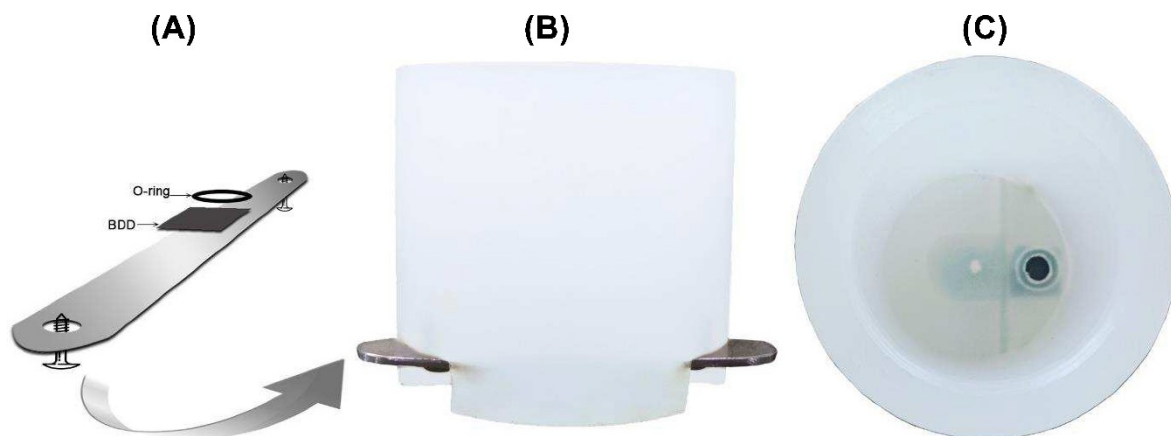
+0,01 A por 1000 s) em uma solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ de cada ácido constituinte (pH 2,0) e uma catódica (aplicando-se uma corrente de -0,01 A por 1000 s) em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Estes tratamentos são similares aos descritos na literatura [103,119]. Após o primeiro procedimento de ativação/limpeza, somente a limpeza catódica foi feita diariamente previamente ao uso, para a geração de uma superfície com terminações em hidrogênio, o que melhora a transferência eletrônica para alguns analitos e torna superfície mais condutiva [115].

Como eletrodo de referência utilizou-se um mini eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl_{sat.}) [148] preparado no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação de +0,3 V em meio de uma solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ durante 1 hora. Como eletrodo auxiliar (contra-eletrodo), um fio de platina foi utilizado.

3.3.3. Célula Eletroquímica para medidas estacionárias

Nas medidas voltamétricas estacionárias com o eletrodo de BDD utilizou-se uma célula de polipropileno (~15 mL) (Figura 5). Esta célula possui um orifício no fundo que possibilita o posicionamento do eletrodo de BDD com auxílio de um anel (“o-ring”) de borracha. O anel de borracha foi posicionado no fundo da célula e um pedaço de BDD (0,7 x 0,7 cm) foi fixado (pressionado) sobre o anel com auxílio de parafusos e uma placa metálica servindo como contato elétrico, similar ao apresentado na Figura 5. A agitação foi promovida por barra magnética com dimensões iguais a: 1,5 cm de comprimento; 0,5 cm de largura e 0,5 cm de altura, como ilustrada na parte inferior da figura. Para os experimentos realizados com eletrodo de carbono vítreo, utilizou-se um béquer de 10 mL como célula eletroquímica. Os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência foram posicionados na célula através de uma garra de fixação. Todos os experimentos foram realizados sem a remoção do O₂ dissolvido e na temperatura ambiente.

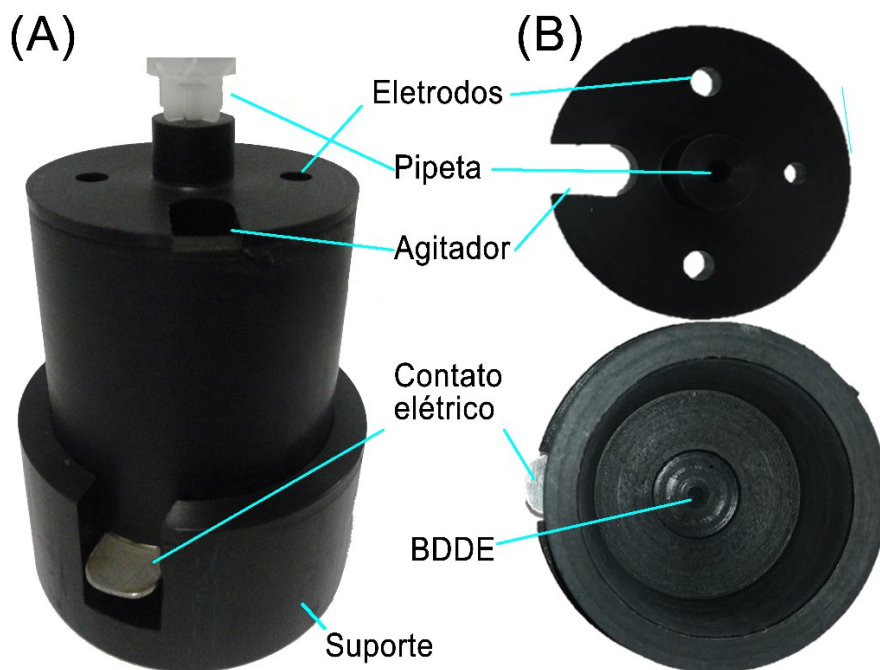
Figura 5. Esquema de posicionamento do eletrodo de BDD e a placa metálica. (B) Vista frontal da célula estacionária utilizada. (C) Vista superior da célula utilizada, mostrando o posicionamento do eletrodo no fundo da célula. Adaptado de: [149].



3.3.4. Sistema BIA

Nos estudos com o sistema BIA, utilizou-se uma célula construída no próprio laboratório [132]. A Figura 6 apresenta o diagrama e a respectiva célula constituída a partir de um tarugo de polipropileno com as seguintes dimensões: $\varnothing = 7,5$ cm; comprimento: 6 cm. Com auxílio de um torno (oficina da Faculdade de Mecânica – UFU), um orifício com as seguintes dimensões foi efetuado no tarugo: $\varnothing_{\text{interno}} = 6$ cm; profundidade = 5 cm; volume total ≈ 150 mL. Na Figura 6 são apresentadas fotos da célula mostrando as vistas frontais e superior, para melhor visualização dos componentes do sistema BIA empregado. Nas fotos são mostrados os orifícios para posicionamento dos eletrodos e do micromotor DC (adquirido em lojas de produtos eletrônicos) para agitação que foi usada entre injeções quando utilizado BIA-SWV.

Figura 6. (A) Imagem frontal da célula BIA utilizada no trabalho; (B) Imagem superior da célula BIA. Fonte: (A) Adaptado de [97]; (B) Próprio autor.

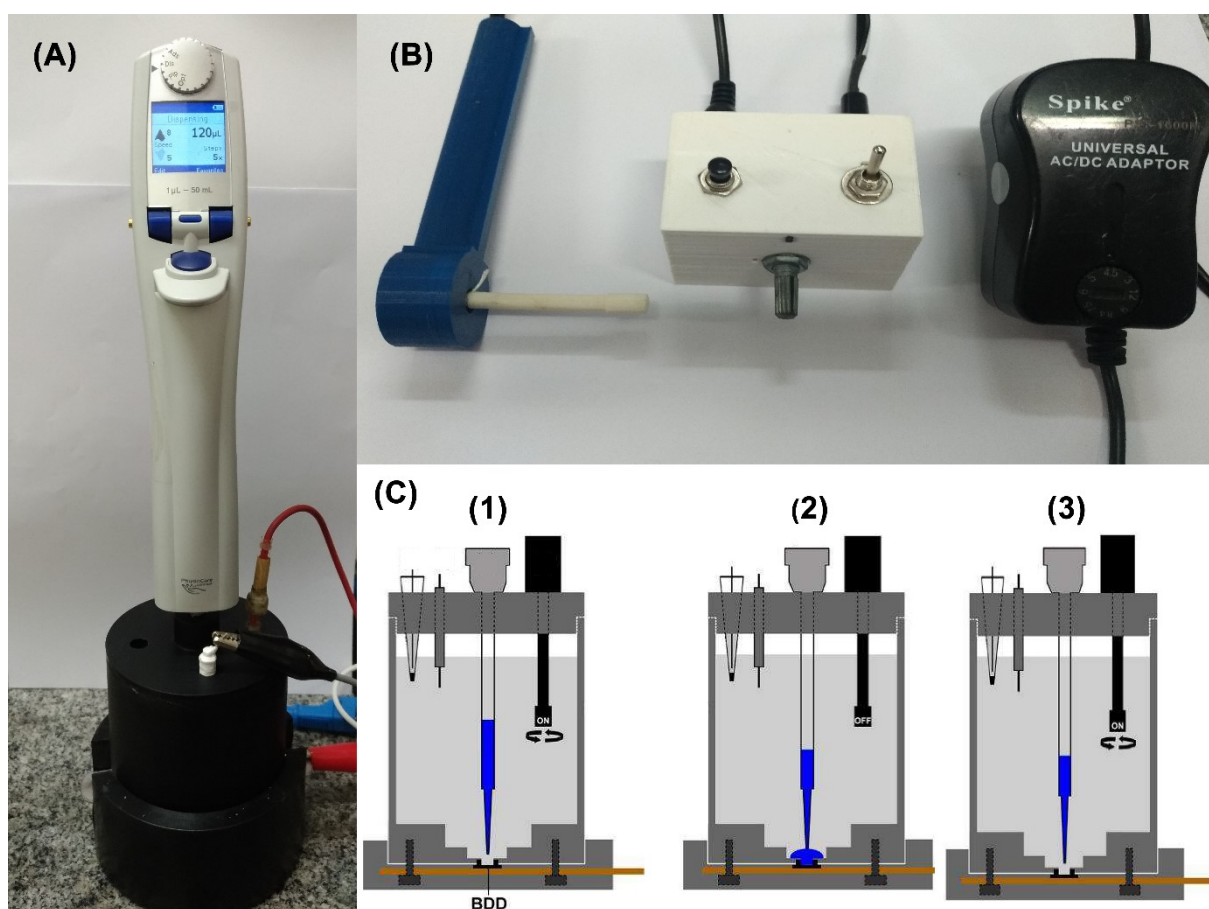


Para o posicionamento da ponteira do sistema de injeção uma tampa de polipropileno foi adaptada no lado aberto do tarugo. Quatro orifícios foram feitos na tampa, sendo o orifício central (na mesma direção do orifício para o eletrodo na base da célula) para a pipeta eletrônica, e os três orifícios: dois para fixação dos eletrodos auxiliar e referência e um para a inserção do agitador mecânico (Figura 6B). O sistema de agitação é composto por um micromotor DC de 12 V usado originalmente em secadores de cabelo ou brinquedos elétricos. Ao eixo deste micro motor foi adaptado com uma haste de teflon [150] e a velocidade de agitação é controlada com uma fonte universal de potencial variável (3 a 12 V - 700 a 4000 rpm). Quanto maior o potencial selecionado, maior é a rotação do motor (Figura 7B).

No orifício efetuado no centro da base (5,0 mm de diâmetro) foi posicionado um anel de borracha (O-ring) e sob este anel, a peça de BDD (0,7 x 0,7 cm) de forma similar ao da célula estacionária. A área útil do eletrodo de BDD é definida pelo diâmetro interno deste anel (5 mm; área = 22,9 mm²). Para fixação da peça de BDD e manter o contato elétrico, uma placa metálica foi presa através de dois parafusos colados nas extremidades da parte inferior da célula. A célula foi construída de forma que durante a injeção, a ponteira fique posicionada a aproximadamente 2 mm do eletrodo de BDD com o objetivo de obter resultados reprodutíveis

durante as análises [151]. Para a injeção neste sistema utilizou-se uma pipeta motorizada (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 μL (usando um combitip® de 1 mL) com velocidades de injeção de 28 a 250 $\mu\text{L s}^{-1}$ (Figura 7A).

Figura 7. Esquema de injeção no sistema BIA. (A) Sistema BIA montado com pipeta eletrônica. (B) Sistema de agitação. (C) Esquemas mostrando as etapas da injeção, mostrando o instante antes da injeção (1), durante a injeção e a análise (2) e após a dispersão da alíquota injetada (3). Fontes: (A) e (B): próprio autor, (C) adaptado de [119].

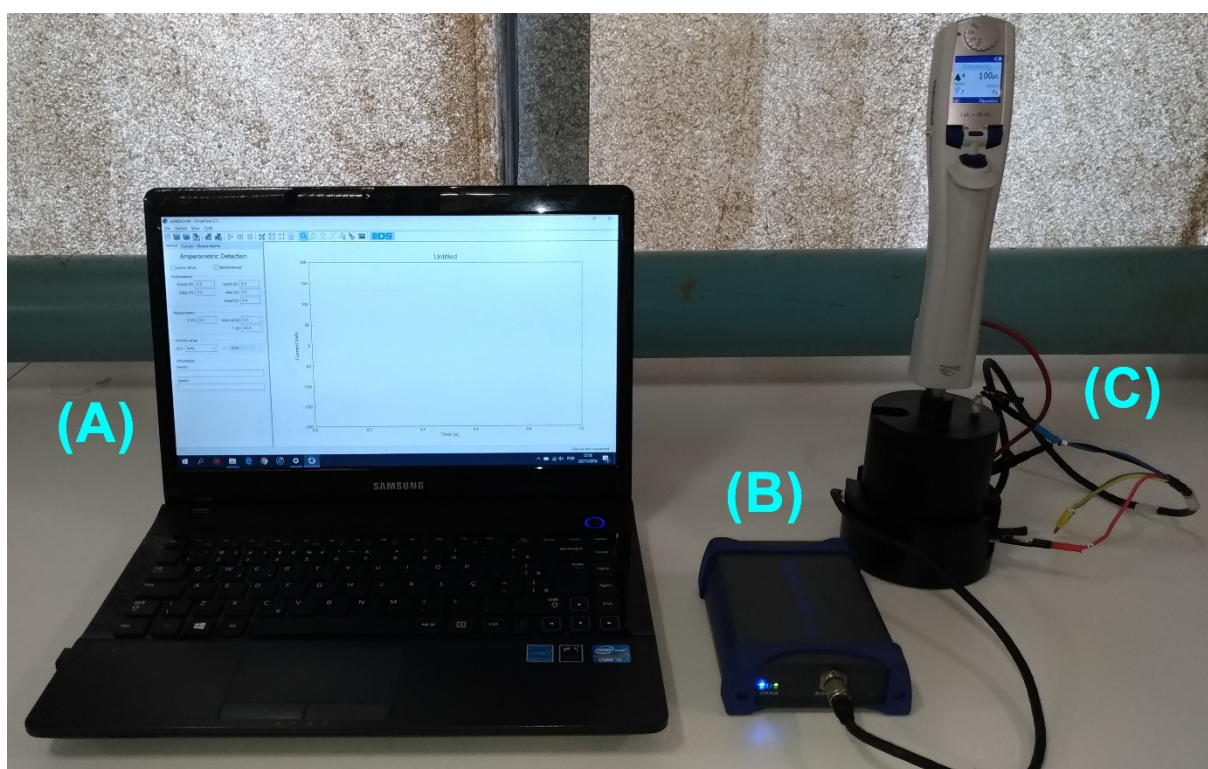


Neste sistema, a injeção pode ser realizada com ou sem agitação da solução no interior da célula (Figura 7C-1). Na detecção por SWV, a injeção é realizada de forma que a alíquota injetada permaneça próximo à superfície do eletrodo durante toda a varredura (Figura 7C-2), sendo dispersada somente no final quando a agitação é ligada, preparando o eletrodo para uma nova injeção (Figura 7C-3). Uma ideia melhor sobre o que ocorre na superfície do eletrodo pode ser visto no intervalo de tempo entre 5,11 e 5,48 minutos de um vídeo disponível na internet [146]. Na detecção por MPA, a agitação pode estar ligada o tempo todo, pois a

aquisição do sinal é simultânea à injeção. A agitação serve para que o tempo de contato entre a amostra e o eletrodo seja reduzido e minimize possíveis problemas de contaminação.

Todo o sistema de análise apresentado neste trabalho pode ser facilmente adaptado em relação à portabilidade, para isso utilizando um mini potenciostato que funciona a bateria, um computador ou outro hardware portátil como um tablet, por exemplo, para aquisição e tratamento dos dados da análise. A Figura 8 apresenta uma foto de um sistema de análise eletroquímica portátil.

Figura 8. Foto de um sistema BIA portátil. (A) Microcomputador para aquisição e tratamento dos dados. (B) Mini-potenciostato portátil. (C) Sistema BIA. Fonte: Próprio autor.



O mini-potenciostato mostrado na Figura 8 conectar-se ao microcomputador utilizando um cabo e uma conexão USB (do inglês, “*Universal Serial Bus*”) ou, como apresentado na foto, uma conexão Bluetooth. Este sistema apresentado pode ser utilizado para todos os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Considerações iniciais

Os resultados e discussões deste trabalho serão divididos em duas partes. Na primeira parte, serão apresentados os estudos realizados para desenvolver o método de triagem (“*screening*”) e quantificação de cocaína e adulterantes em amostras apreendidas pela Polícia Federal. Na segunda parte, serão apresentados os estudos relacionados com o desenvolvimento de um método para determinação de adulterações com SIB e EFD em diversas formulações e suplementos usados para emagrecimento.

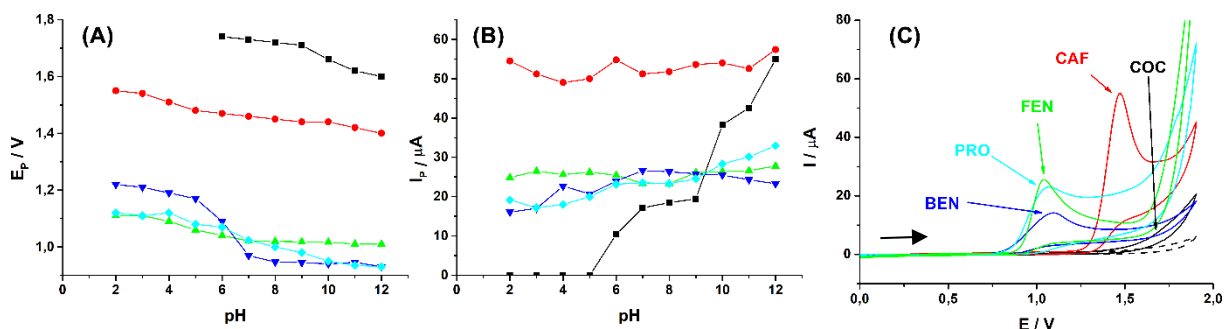
4.2. Parte 1: Triagem e quantificação de cocaína e adulterantes em amostras apreendidas

4.2.1. Comportamento eletroquímico da cocaína

O comportamento eletroquímico da cocaína (COC) e dos adulterantes mais comuns como: benzocaína (BEN), cafeína (CAF), levamisol (LEV), fenacetina (FEN), lidocaína (LID), procaína (PRO) e paracetamol (PAR) foi inicialmente investigado utilizando-se voltametria cíclica (CV) em soluções tampão BR em uma faixa de pH de 2,0 a 12,0. Dentre os compostos analisados, alguns apresentam baixa solubilidade em meio aquoso [152], então, adicionou-se etanol à solução tampão BR (30:70; v/v, respectivamente) para garantir a solubilidade dos compostos menos solúveis. Sem o solvente orgânico foi observada uma turvação nas soluções de pH superior a 7,0 indicando uma precipitação de alguns compostos.

O estudo foi conduzido utilizando BDD como eletrodo de trabalho em uma faixa de trabalho entre 0,0 e 1,8 V *vs* Ag/AgCl (KCl_{sat.}). A Figura 9 apresenta os resultados obtidos para o estudo de pH para cocaína e alguns interferentes, nota-se que para a cocaína foi observado um processo de oxidação somente a partir de valores de pH > 5,0 (Figura 9A), o que está de acordo com estudos anteriores que promoveram a oxidação da cocaína em outras superfícies de carbono [43,44]. Também pode-se observar que todos os adulterantes estudados apresentam processos de oxidação nas faixas de pH e potencial avaliadas. Para ilustração a Figura 9C apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para a COC e demais adulterantes em pH = 6.

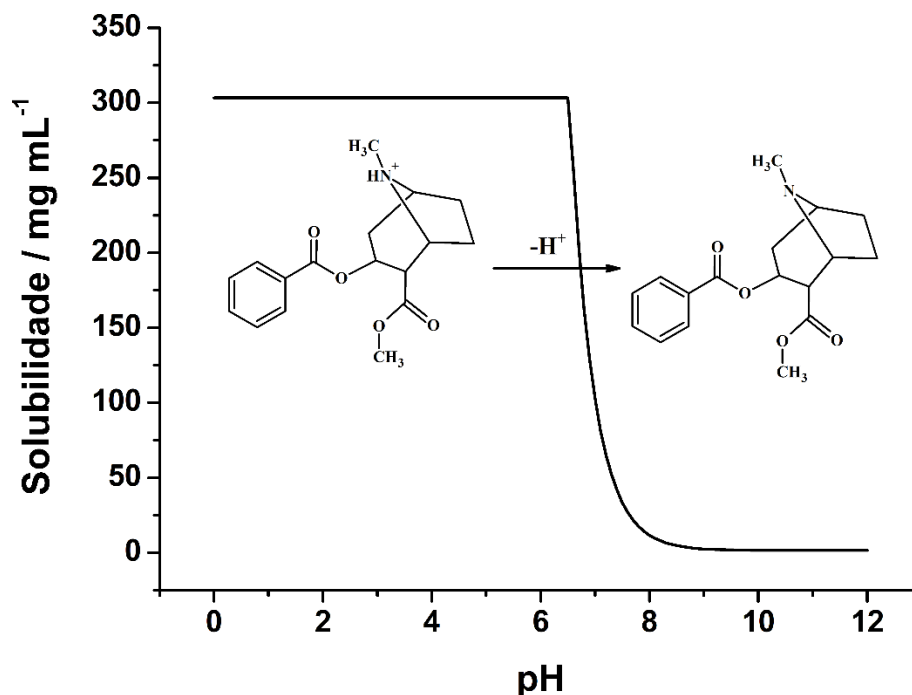
Figura 9. Efeito do pH nos (A) potenciais de pico e (B) correntes anódica para 0,5 mmol L⁻¹ de cocaína (■), cafeína (●), benzocaína (▼), procaína (◆) e fenacetina (▲), obtidos com CV usando eletrodo de BDD em soluções tampão BR de diferentes pHs (2,0 a 12,0). (C) Voltamogramas obtidos para cocaína e demais adulterantes em pH = 6. Parâmetros CV: Velocidade de varredura: 50mV s⁻¹; Step: 5mV



A Figura 9 mostra que o comportamento da cocaína difere bastante do comportamento dos adulterantes usados para comparação, principalmente quanto a corrente de pico (Figura 9B). Nos valores de pH de 1,0 a 5,0 não foram observados sinais de oxidação. O processo começa a ser observado somente a partir de pH = 6,0 onde ocorre um aumento significativo dos valores de corrente para a oxidação da cocaína. Entretanto, quanto maior o pH da solução, menor a faixa de trabalho na região anódica devido à oxidação do eletrólito suporte e evolução de oxigênio, tornando o pico obtido para a cocaína em valores de pH elevados pouco definidos e irreprodutíveis (Figura 9C). Um estudo recente realizado por de Jong e colaboradores [23] mostrou a detecção seletiva de cocaína em eletrodos impressos de carbono em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹ + KH₂PO₄ 0,020 mol L⁻¹ (pH 7,0). Um teste realizado no mesmo eletrólito utilizando eletrodo de BDD não apresentou sinais de oxidação para cocaína!

De acordo com a literatura, cocaína possui uma baixa solubilidade em meio aquoso em valores de pH maiores que 8, devido ao seu $pK_a = 8,6$. Nesta condição, há a desprotonação do grupo amino terciário presente na estrutura da molécula, (Figura 10), tornando a molécula menos polar e consequentemente menos solúvel em soluções aquosas.

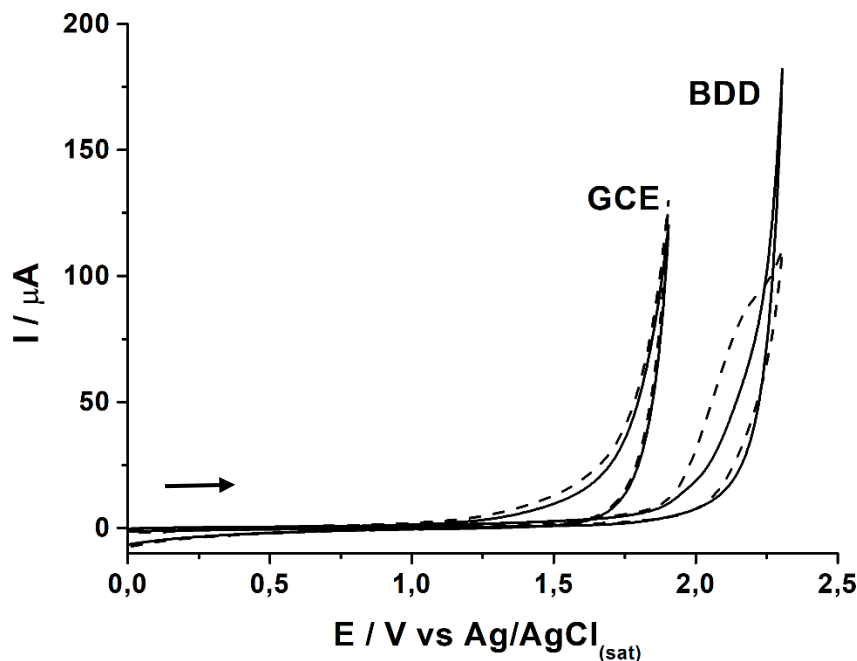
Figura 10. Solubilidade da cocaína em função do pH da solução.



A Figura 10 apresenta a solubilidade prevista para a cocaína obtida através de simulações [153,154] e disponível no site Chemicalize[®] [155]. Este gráfico ilustra como a solubilidade da cocaína varia drasticamente em valores de pH próximos ao pK_a da molécula (8,6). O comportamento previsto na Figura 10 está de acordo com informações encontradas na literatura [156]. Portanto, observa-se que soluções com pH < 7 seriam mais apropriadas (maior solubilidade) para se trabalhar com a cocaína sem necessidade de uso de solventes orgânicos. Porém, o processo de oxidação da cocaína em meios ácidos (pH < 6,0) ocorre em potenciais superiores a 1,8V (vs. Ag/AgCl), o que limita sua detecção na maioria dos eletrodos de trabalho disponíveis atualmente. De acordo com estudos prévios, o uso de H₂SO₄ como eletrólito suporte e BDD como eletrodo de trabalho proporciona uma ampla janela de potencial relativa, bem como correntes de fundo baixas e estáveis na região anódica [157,158].

Dessa forma, o uso de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte foi avaliado. Para comprovação, o eletrólito suporte foi utilizado para varreduras empregando GCE e BDD como eletrodos de trabalho. A Figura 11 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos.

Figura 11. Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (—) e na presença de 150 mg L⁻¹ de cocaína utilizando GCE e BDD (---) como eletrodos de trabalho em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹, incremento de potencial: 5 mV.



Na Figura 11 nota-se pelos voltamogramas cíclicos obtidos em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ para os dois eletrodos uma diferença na janela de potencial, sendo esta mais ampla para o eletrodo de BDD (aproximadamente 0,4 V) que para o GCE. Além disso, é possível observar o processo de oxidação da cocaína em potenciais maiores que 1,9 V, o que somente foi possível com o eletrodo de BDD devido à baixa corrente de fundo que o eletrodo apresenta nessa região, o que não é possível com o GCE. Deste modo, H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ e BDD foram selecionados como eletrólito suporte e eletrodo de trabalho, respectivamente, para os estudos posteriores. Mesmo com o eletrodo e o eletrólito suporte otimizados, os voltamogramas obtidos com CV para oxidação da cocaína apresentaram picos de oxidação pouco definidos (Figura 11), devido à alta corrente de fundo obtida em altos valores de potenciais (> 2,0 V), por esse motivo e por uma melhora na sensibilidade do método, SWV foi empregada nos estudos seguintes.

4.2.2. Otimização dos parâmetros de SWV e estudo do mecanismo de oxidação da cocaína

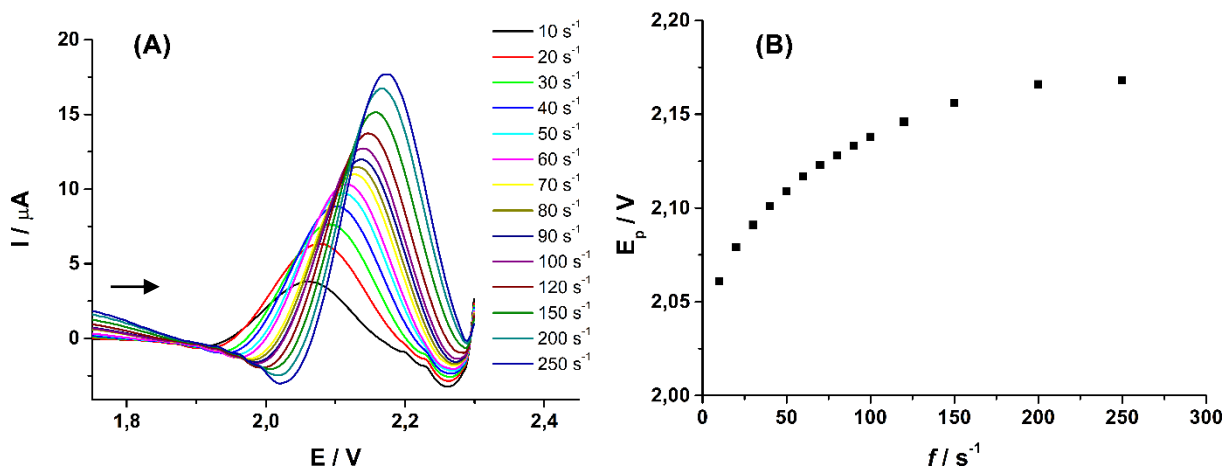
Para o desenvolvimento de um método analítico empregando SWV, os seguintes parâmetros instrumentais necessitam ser otimizados: amplitude de pulso de potencial (a), frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) e incremento de varredura de potencial (ΔE), com o objetivo de obter a melhor resposta, em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico. Na SWV, a frequência (f) de aplicação dos pulsos pode fornecer informações importantes na elucidação do mecanismo pelo qual ocorre uma reação de oxirredução de espécies eletroativas [159], assim, durante o processo de otimização da frequência, informações sobre o mecanismo de oxidação da cocaína em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando um eletrodo de BDD podem ser obtidas.

Todas as medidas obtidas com SWV foram realizadas com aplicação prévia de um potencial de (0,0 V) por 30 s, para condicionamento do eletrodo e estabilização da corrente, após o condicionamento um tempo de equilíbrio de 5 s sem aplicação de potencial foi utilizado antes do início da varredura. Os voltamogramas de SWV apresentados nesta seção tiveram a linha de base tratada para melhor visualização dos picos, o tratamento foi realizado utilizando o algoritmo “*moving average*”, com espessura de pico definida para 20 mV, disponível no software GPES 4.9.007.

4.2.2.1. Frequência: Otimização e estudo do mecanismo de oxidação da cocaína

Para a seleção da frequência a ser usada no desenvolvimento do método foram levados em consideração o aumento do sinal com o aumento da frequência, avaliada no intervalo de 10 s^{-1} a 250 s^{-1} , bem como o alargamento dos picos com esse aumento. A Figura 12A apresenta os voltamogramas de onda quadrada registrados para 20 mg L^{-1} de cocaína, variando a frequência de aplicação de pulso e mantendo-se constante a amplitude de pulso em 50 mV e incremento de varredura em 2 mV.

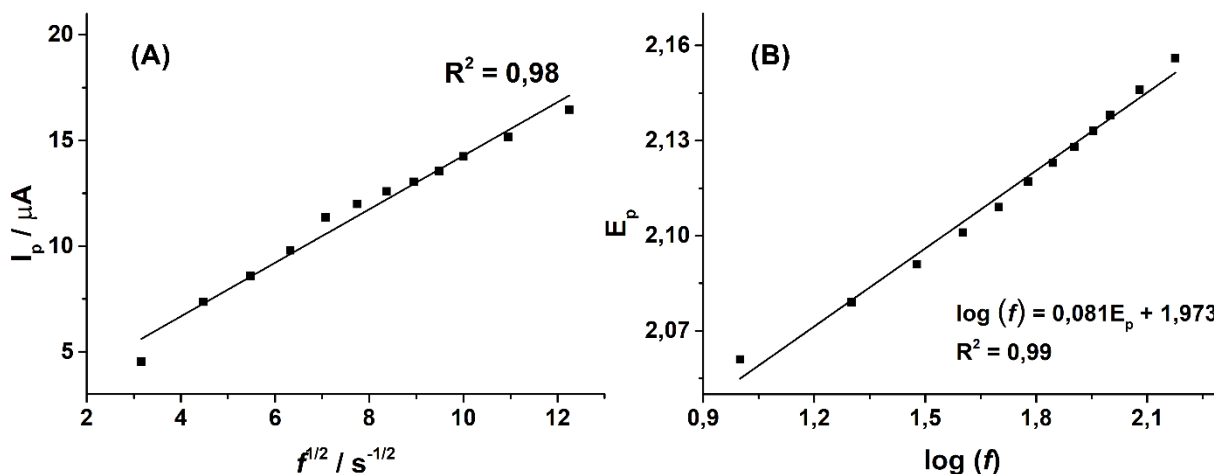
Figura 12. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para cocaína 20 mg L^{-1} , em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial (B) Relação entre potencial de pico (E_p) e a frequência (f) de aplicação de pulso. Eletrólito: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



A Figura 12A mostra que a variação da frequência para valores maiores provocou um aumento na corrente de resposta bem como um deslocamento do potencial de oxidação da cocaína para valores mais positivos, levando em consideração o aumento da corrente e o aumento da largura dos picos, o valor de 60 s^{-1} foi selecionado para os estudos posteriores.

Estes estudos de variação da frequência também foram realizados para obter informações adicionais sobre o processo eletroquímico de oxidação da cocaína na superfície do eletrodo de BDD em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O deslocamento do potencial de pico anódico (E_p) para valores mais positivos (Figura 12B), demonstra um comportamento característico de processos irreversíveis [160]. A relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação da frequência de aplicação dos pulsos (f) pode trazer informações quanto ao transporte de massa para a superfície do eletrodo. Uma relação linear de $I_p \times f$ é característica de um sistema que envolve preferencialmente processos adsorptivos. Já os processos preferencialmente difusionais são caracterizados por uma relação linear de $I_p \times f^{1/2}$ [161]. A Figura 13A mostra a relação de $I_p \times f^{1/2}$ para a cocaína. Observa-se pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,98$) uma relação linear, mostrando que para o sistema em questão, o transporte de massa é preferencialmente controlado por difusão.

Figura 13. (A) Relação entre corrente de pico (I_p) e a raiz da frequência ($f^{1/2}$). (B) Relação entre potencial de pico (E_p) e o logaritmo da frequência de aplicação de pulso ($\log f$). Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} ; $a = 50$ mV; $\Delta E_s = 2$ mV.

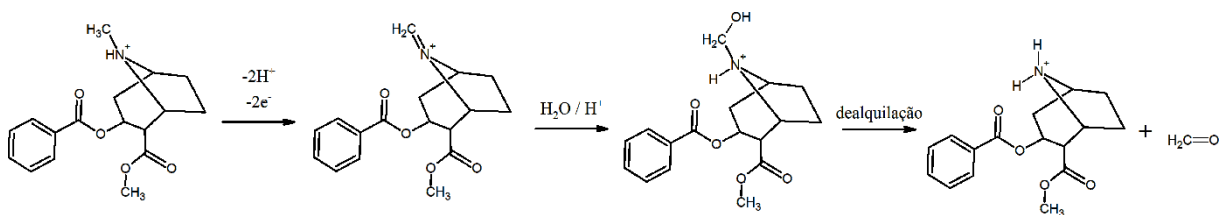


A Figura 13B mostra uma relação linear entre E_p e $\log f$. Para reações redox totalmente irreversíveis a inclinação da reta pode ser relacionada pela Eq. 1:

$$\frac{\partial E_p}{\partial \log f} = -2,3RT/\alpha nF \quad \text{Eq. (1)}$$

A Eq. 1 pode ser usada para estimar o número de elétrons envolvidos na reação redox [94,162]. Substituindo o valor do coeficiente angular da equação obtida na Figura 13B, obtém-se um valor de 0,73 para αn . Assumindo um valor de $\alpha = 0,5$ para moléculas orgânicas [95], conclui-se que a reação de oxidação da cocaína envolve 2 ($n = 1,45$) elétrons. Estudos da variação do E_p com o pH realizados por CV não foram conclusivos devido à baixa resolução do pico de oxidação da cocaína e alta corrente de fundo obtida com o eletrodo de BDD em altos valores de potenciais ($> 2,0$ V) em meios de pH elevados. Entretanto, com o dados obtidos e após pesquisa na literatura [163–166], um mecanismo para a oxidação da cocaína em meio ácido pode ser proposto. O processo de oxidação acontece pela transferência de dois elétrons e dois prótons, resultando em um íon intermediário imínio, após isso, ocorre uma hidratação e um rearranjo intramolecular para a obtenção de produtos de N-dealquilação, que corresponde a uma amina secundária protonada e um formaldeído. A Figura 14 apresenta o esquema com o mecanismo proposto.

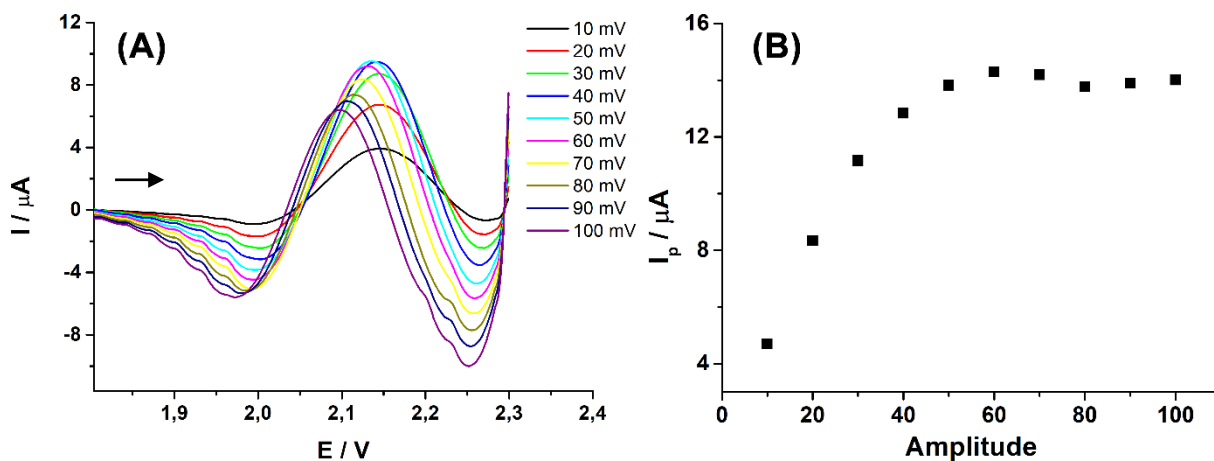
Figura 14. Esquema sugerido para mecanismo de oxidação da cocaína em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



4.2.2.2. Amplitude

Outro parâmetro estudado foi a influência da amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais na corrente de pico de oxidação da cocaína. A Figura 15A mostra os voltamogramas obtidos mediante a variação deste parâmetro entre 10 e 70 mV, mantendo-se constante a frequência de aplicação de pulsos de potenciais em 50 s^{-1} e o incremento de varredura de potencial em 2 mV.

Figura 15. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 20 mg L^{-1} em função da variação nos valores de amplitude de pulso de potencial aplicados. (B) Relação entre corrente de pico e amplitude de pulsos. $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



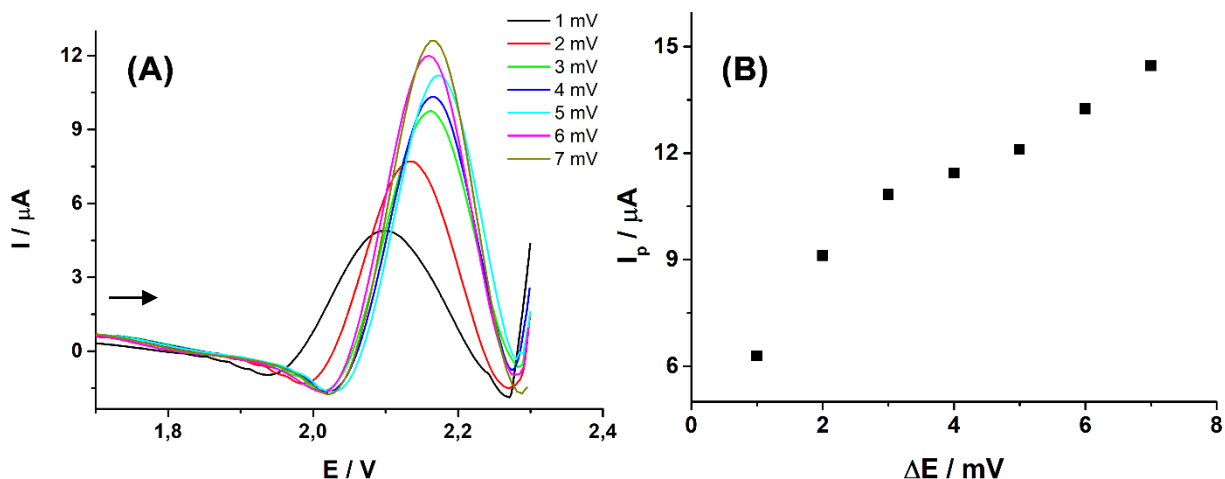
Observando as correntes de pico obtidas em diferentes amplitudes (Figura 15B), pode-se notar um comportamento linear até o valor de amplitude de 30 mV. Para valores acima de 40 mV observa-se um aumento da largura do pico além de uma maior distorção da linha de base, além disso nenhum ganho significativo de corrente foi observado. Dessa forma o valor de 40 mV foi selecionado para os estudos posteriores.

4.2.2.3. Incremento de potencial

O terceiro parâmetro estudado e otimizado da SWV foi o incremento de potencial (ΔE) que determina a diferença de altura entre um degrau de potencial e o degrau seguinte em uma escada de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho. O produto da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais pelo incremento de varredura de potencial define a velocidade de varredura ($v = \Delta E \times f$) [167].

O incremento de potenciais foi avaliado no intervalo entre 1 e 7 mV, mantendo-se constante a frequência e amplitude de aplicação de pulso em 50 s^{-1} e 50 mV, respectivamente. Os voltamogramas de onda quadrada registrados neste estudo são exibidos na Figura 16A. Analisando-se estes resultados, observou-se que o aumento de incremento de potencial promoveu acréscimo nos valores de corrente de pico. Além disso, pode-se notar o deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos, indicando comportamento irreversível [161]. A Figura 16B exibe a relação entre a corrente de pico e o incremento de potencial.

Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para cocaína 20 mg L^{-1} em função da variação no incremento de potencial. **(B)** Relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação do incremento de varredura (ΔE). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$.

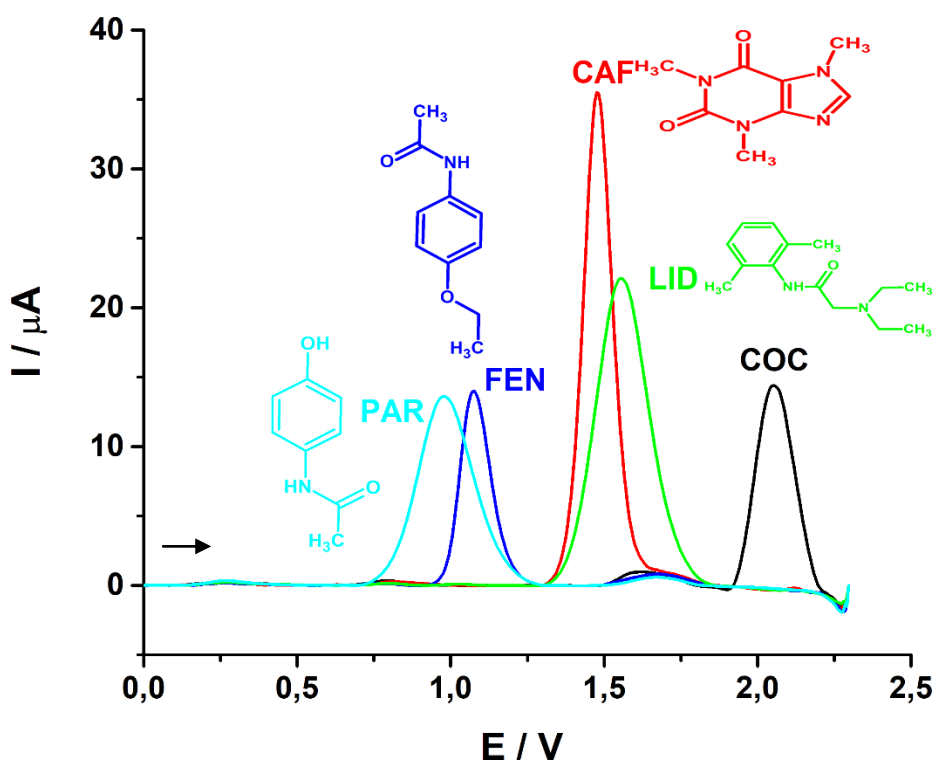


Valores de incremento de potencial maiores podem aumentar a corrente medida e melhorar a sensibilidade do método. No entanto, altos valores de incremento provocam uma omissão de pontos do voltamograma resultando em possíveis deformações, além de alargamento dos picos, o que pode ocasionar uma perda de seletividade no caso de determinações simultâneas. Desse modo, o incremento de varredura de 6 mV foi selecionado para a realização do trabalho.

4.2.3. Comportamento eletroquímico da cocaína e adulterantes por SWV

Após otimização dos parâmetros de SWV, foi realizado o estudo do perfil voltamétrico da cocaína e dos principais adulterantes encontrados em amostras apreendidas (paracetamol, fenacetina, cafeína e lidocaína) fornecidas pelo Instituto de Criminalística de São Paulo. A Figura 17 apresenta os voltamogramas de onda quadrada sobrepostos obtidos para cocaína e demais adulterantes (20 mg L^{-1} para todos os analitos) utilizando eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho.

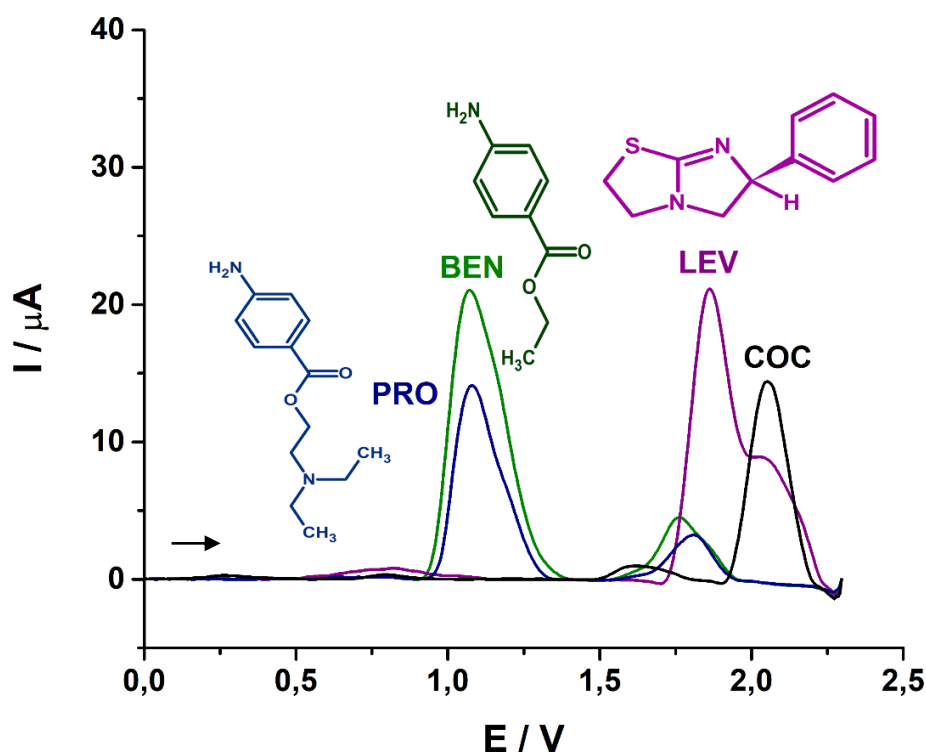
Figura 17. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 20 mg L^{-1} de cocaína (COC), lidocaína (LID), cafeína (CAF), fenacetina (FEN) e paracetamol (PAR). Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Frequência: 60 s^{-1} ; Amplitude: 40 mV ; Incremento: 6 mV . Resultados apresentados com correção da linha de base.



Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que a oxidação eletroquímica da cocaína em aproximadamente $+2,1 \text{ V}$ tem uma boa resolução em relação aos demais adulterantes encontrados nas amostras fornecidas. O paracetamol apresenta um processo de oxidação por volta de $1,0 \text{ V}$, fenacetina em $+1,1 \text{ V}$, cafeína e lidocaína em $+1,5$ e $+1,6 \text{ V}$, respectivamente. Dessa forma pode-se notar que é possível detectar seletivamente cocaína na presença de todos estes adulterantes, mostrando que uma triagem rápida ou “*screening*” desse tipo de amostra é possível usando o método proposto.

Outros adulterantes utilizados para mimetizar os efeitos da cocaína que podem comumente ser encontrados em amostras apreendidas são o levamisol (LEV), a benzocaína (BEN) e a procaina (PRO). As amostras utilizadas neste estudo não continham tais adulterantes, porém um estudo voltamétrico foi realizado com o objetivo de verificar a interferência e a detecção desses adulterantes em uma triagem. A Figura 18 apresenta os voltamogramas obtidos para cocaína e demais adulterantes (20 mg L^{-1}).

Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para 20 mg L^{-1} de cocaína (COC), procaina (PRO), benzocaína (BEN) e levamisol (LEV). Demais parâmetros: Ver Figura 17



Na Figura 18, nota-se que os adulterantes anestésicos procaina e benzocaína não apresentam interferência na detecção da cocaína (ambos com picos de oxidação em +1,1 V). O levamisol, frequentemente encontrado em amostras de cocaína devido aos efeitos estimulantes, é o único possível interferente, seu processo de oxidação apresenta dois picos, sendo o segundo pico detectado em um potencial próximo ao da cocaína. Mesmo com a presença do segundo pico da oxidação do levamisol, a triagem da amostra ainda é possível, pois a presença do levamisol pode ser detectada pelo primeiro pico em 1,9 V.

4.2.4. Determinação simultânea de cocaína e adulterantes por BIA SWV

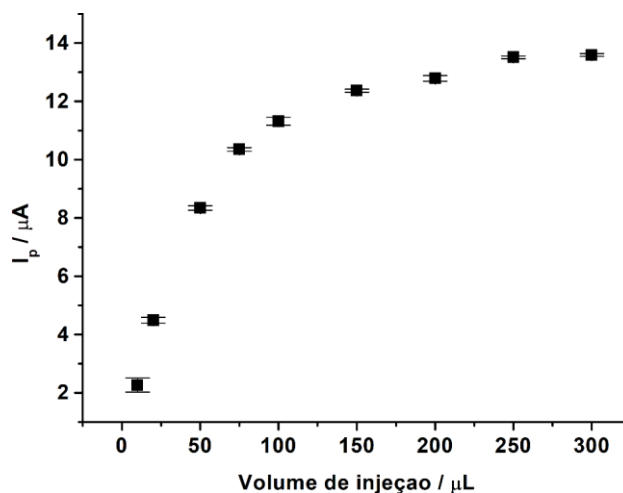
Os estudos feitos até aqui para determinação de cocaína e adulterantes foram realizados em um sistema estacionário, com uma célula de polipropileno (~15 mL) adaptada para o eletrodo de BDD (Figura 5). Para fins de melhorar a portabilidade e rapidez do método, o procedimento desenvolvido utilizando SWV foi adaptado para funcionamento no sistema de análise por injeção em batelada (BIA). Todos os parâmetros da técnica e o tempo de condicionamento otimizados foram mantidos e utilizados nos testes com o sistema BIA.

As injeções no sistema BIA-SWV foram realizadas no final do período de condicionamento, aproximadamente dois segundos antes do início da varredura. Neste caso, a solução no interior da célula BIA estava sem agitação, permitindo que a alíquota injetada permanecesse na próxima à superfície do eletrodo de trabalho tempo suficiente para que a varredura fosse realizada. O procedimento pode ser melhor observado na Figura 7C (parte experimental). Após a análise, o eletrodo era submetido novamente à etapa de condicionamento sob agitação e essa solução era então retirada da proximidade do eletrodo para que uma nova injeção pudesse ser realizada. Para obtenção dos melhores resultados, a otimização dos parâmetros de injeção do sistema BIA (volume e velocidade de injeção) foi realizada.

4.2.4.1. Volume de injeção

A otimização do volume de injeção foi realizada fixando uma velocidade de injeção ($100 \mu\text{L s}^{-1}$) e empregando o procedimento de injeção descrito anteriormente. A escolha foi feita avaliando-se o ganho de corrente do sinal de oxidação da cocaína, visando uma melhor sensibilidade e precisão para sua detecção. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos, em triplicata, para a variação da corrente de pico de oxidação de uma alíquota contendo 20 mg L^{-1} de cocaína com o volume injetado.

Figura 19. Variação da corrente de oxidação para 20 mg L⁻¹ de cocaína em função do volume injetado. Velocidade de injeção: 100 µL s⁻¹. Demais parâmetros: Ver Figura 17

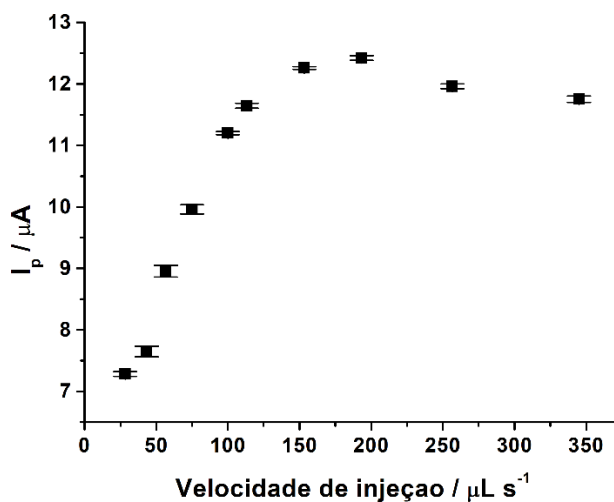


Através da Figura 19 pode-se observar que existe um aumento expressivo de corrente de oxidação da cocaína até o volume injetado de 150 μL . A partir desse volume o aumento foi pequeno, além disso foi observado um desvio padrão menor das triplicatas no volume de 150 μL . Desse modo o volume de 150 μL foi selecionado para os estudos subsequentes.

4.2.4.2. Velocidade de injeção

Com o volume escolhido, outro parâmetro a ser otimizado é a velocidade de injeção. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos, em triplicata, para a variação da corrente de pico de oxidação de uma alíquota de 150 μL de solução contendo 20 mg L⁻¹ de cocaína com a velocidade de injeção.

Figura 20. Variação da corrente de oxidação para 20 mg L⁻¹ de cocaína em função da velocidade de injeção. Volume de injeção: 100 µL. Demais parâmetros: Ver Figura 17

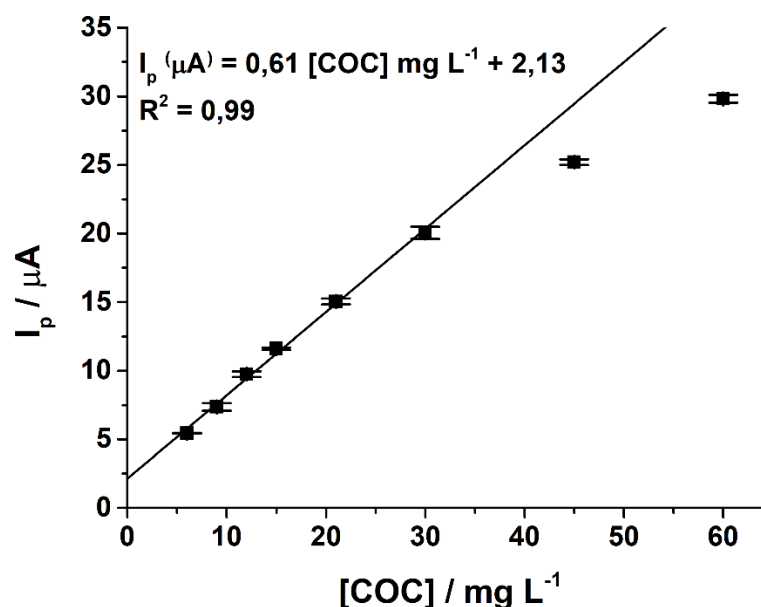


A Figura 20 mostra que com o aumento da velocidade de injeção entre 28 e 193 $\mu\text{L s}^{-1}$ ocorre um aumento da corrente de pico detectada para a cocaína. Em correntes maiores, esse valor começa a decrescer. O melhor valor para velocidade de injeção seria o valor de 193 $\mu\text{L s}^{-1}$, pois é onde o valor da corrente de pico é maior, porém devido ao menor desvio padrão das medidas e a pequena diferença de corrente, o valor de 153 $\mu\text{L s}^{-1}$ foi selecionado para os testes seguintes.

4.2.5. Faixa linear

Após otimização dos parâmetros do sistema BIA, estudos para determinação da faixa linear de trabalho, onde existe uma relação linear entre a altura dos picos obtidos por SWV e a concentração de cocaína, foram realizados para o sistema BIA-SWV. A Figura 21 apresenta a relação entre as correntes de picos obtidas a partir de injeções de concentrações crescentes (6 a 60 mg L^{-1}) de cocaína.

Figura 21. Relação entre corrente de pico (I_p) e aumento da concentração de cocaína. Volume injetado: 150 μL ; Velocidade de injeção: 153 $\mu\text{L s}^{-1}$; $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 40 \text{ mV}$; $\Delta = 6 \text{ mV}$



A partir da Figura 21, observou-se uma relação linear entre 6 e 30 mg L^{-1} de cocaína usando sistema BIA-SWV com parâmetros otimizados, com a seguinte equação linear:

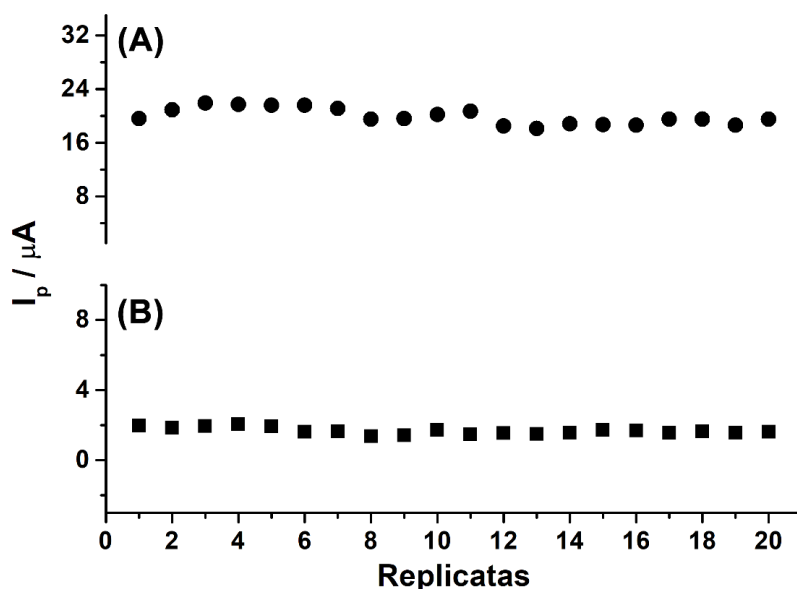
$$I_p (\mu\text{A}) = 0,61 \pm 0,02 [\text{COC}] \text{ mg L}^{-1} + 2,13 \pm 0,32$$

Nessas condições, o limite de detecção (LD) calculado ($3 \times s_B/S$, onde s_B é o desvio padrão do branco e S é a inclinação da curva de calibração) para cocaína foi de $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ e o limite de quantificação ($LQ = 3,33 \times LD$) em $0,81 \text{ mg L}^{-1}$. Este resultado de LD é comparável com outros métodos descritos na literatura onde foram empregados eletrodos sem modificação química da superfície ($0,06 \text{ mg L}^{-1}$ empregando FIA com detecção amperométrica e eletrodo de pasta de carbono [44] e $0,61 \text{ mg L}^{-1}$ empregando SWV e eletrodo impresso de carbono [23]).

4.2.6. Repetibilidade e reprodutibilidade

Após a definição das melhores condições de trabalho, bem como a faixa linear de trabalho, um estudo para avaliação da repetibilidade do método BIA-SWV proposto foi realizado. Na Figura 22 são apresentados os resultados obtidos para 20 injeções sucessivas (precisão intradia) de soluções contendo cocaína em duas concentrações diferentes: (A) 30 mg L^{-1} e (B) 6 mg L^{-1} , a maior e a menor concentração da faixa linear de trabalho.

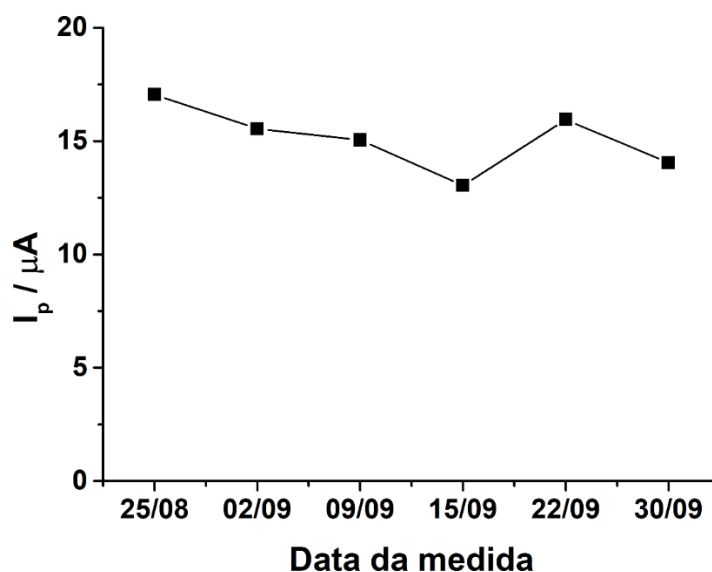
Figura 22. Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções sucessivas de uma solução contendo (A) 30 mg L^{-1} ou (B) 6 mg L^{-1} de cocaína. Condições experimentais: Ver Figura 21.



Os resultados na Figura 22 mostram que apesar de flutuações aleatórias nas alturas dos picos registradas ao longo das medidas, é possível perceber a ausência que qualquer tendência ou contaminação significativa da superfície do eletrodo (sem efeitos de memória). O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado em 2,9% e 1,4% ($n = 20$) para 6 mg L^{-1} e 30 mg L^{-1} de cocaína, respectivamente.

A precisão interdia ou reprodutibilidade foi calculada levando em consideração medidas de uma mesma concentração de cocaína realizadas em condições similares, tais como parâmetros otimizados e ativação do eletrodo, porém em dias diferentes. A Figura 23 apresenta os resultados para medidas realizadas para 20 mg L⁻¹ de cocaína em diferentes dias ao longo de aproximadamente um mês.

Figura 23. Resultados obtidos por BIA-SWV para injeções em diferentes dias de uma solução contendo 20 mg L⁻¹ de cocaína. Condições experimentais: Ver Figura 21.



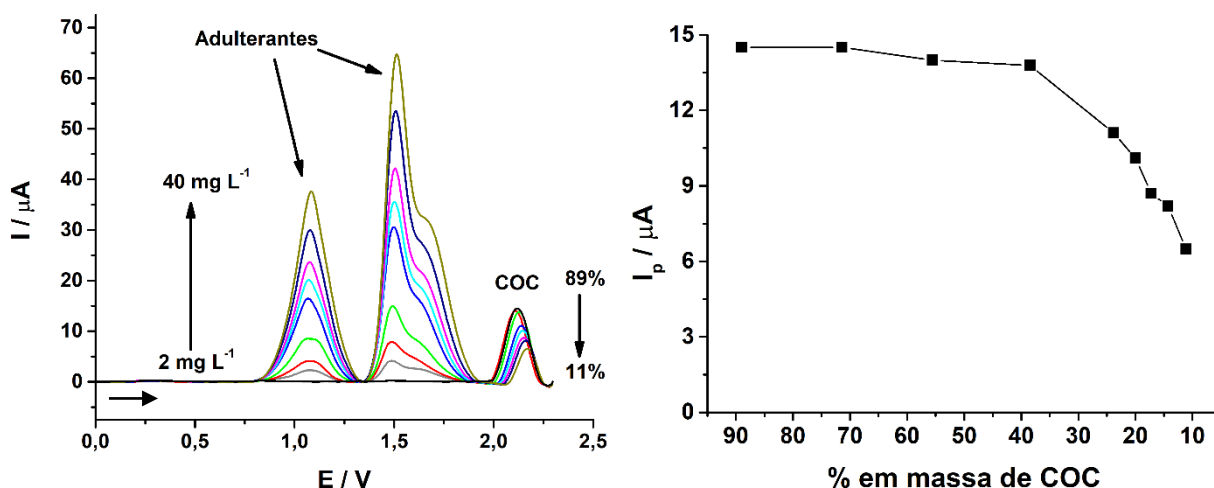
A partir dos resultados obtidos e apresentados na Figura 23, observa-se que apesar das variações nos valores de corrente de pico obtidas em diferentes dias, o método apresentou uma reprodutibilidade ou precisão interdia calculada de 9,4% ($n = 6$). Essa variação ($< 10\%$), ao longo de aproximadamente um mês de análises, mostra que o método proposto apresenta robustez quanto ao sinal de oxidação obtido com o eletrodo de BDD, no eletrólito e nas condições otimizadas.

4.2.7. Estudo da interferência dos adulterantes na detecção de cocaína por BIA-SWV

O estudo da interferência dos adulterantes presentes nas amostras de cocaína apreendidas foi realizado. Neste estudo, foram empregados como adulterantes e potenciais interferentes as substâncias previamente encontradas na análise realizada pelo Instituto Nacional de Criminalística [24] nas amostras empregadas: lidocaína, fenacetina, cafeína e

paracetamol. O estudo foi realizado fixando uma concentração de cloridrato de cocaína (20 mg L⁻¹) misturada com concentrações crescentes (2 a 40 mg L⁻¹) de todos os adulterantes estudados. A Figura 24 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos neste estudo.

Figura 24. (A) Voltamogramas de SWV obtidos a partir de soluções contendo uma concentração fixa de cocaína (20 mg L⁻¹) sem (linha preta) e com a adição de concentrações crescentes de lidocaína, cafeína, fenacetina e paracetamol (2 – 40 mg L⁻¹ / cada). (B) Relação entre a queda da proporção de cocaína e a corrente de pico. Condições experimentais: Ver Figura 21.



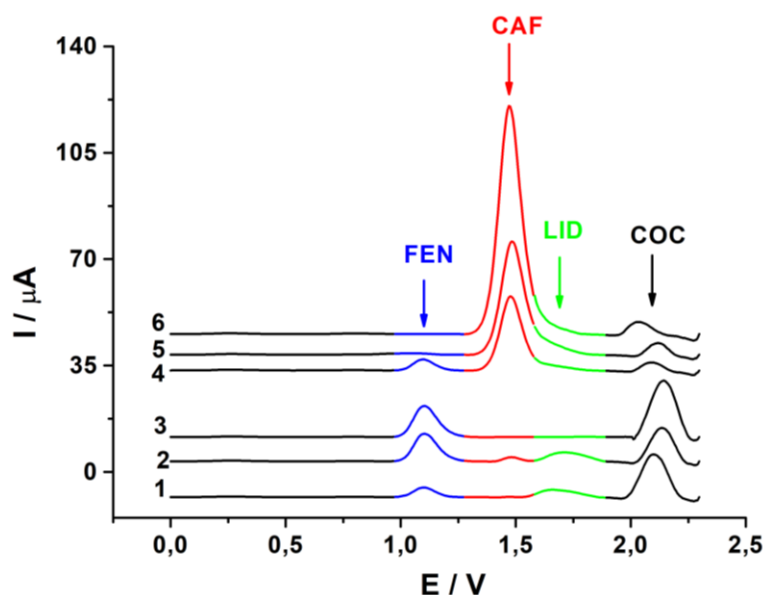
Observando a Figura 24, nota-se que a corrente de oxidação da cocaína se mantém relativamente constante (DPR = 3,4%) após as três primeiras adições de todos os adulterantes (2, 4 e 8 mg L⁻¹ de todos os adulterantes simultaneamente). Nesse caso, a proporção de cocaína em massa decresceu de 89% (m/m) para 72 e 38%, respectivamente, sem alteração significativa na altura do pico de oxidação de 20 mg L⁻¹ de cocaína. A partir desta concentração é observado um decréscimo no pico de oxidação da cocaína, mostrando que a presença de grandes quantidades de adulterantes (acima de 62 %; m/m) causa uma certa interferência ou diminuição do sinal de oxidação da cocaína. Entretanto, é facilmente verificado que mesmo na presença de baixas quantidades de cocaína (11 %; m/m) e altas quantidade de adulterantes (89 %; m/m), o sinal da cocaína pode ser detectado seletivamente, tornando a detecção da presença e consequente triagem ou “*screening*” das amostras possível.

Algumas conclusões puderam ser obtidas a partir desse estudo: (i) a possibilidade de um *screening* ou triagem rápida de amostras em campo é possível mesmo com baixas quantidades de cocaína nas amostras; (ii) os resultados indicam que para a quantificação de cocaína, o uso do método de adição de padrão seria necessário.

4.2.8. Triagem de amostras de cocaína apreendidas empregando BIA-SWV

O desempenho do método BIA-SWV desenvolvido foi avaliada na triagem ou *screening* de seis amostras de cocaína apreendidas pela polícia federal. Todas as amostras utilizadas já haviam sido previamente analisadas por GC-FID (Tabela 2, pág. 37), tendo assim sua composição previamente determinada. A Figura 25 apresenta os voltamogramas para injeções de 150 μL de soluções preparadas com as amostras diretamente diluídas no eletrólito suporte empregado (H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}).

Figura 25. Voltamogramas de SWV obtidos para injeções de 150 μL de amostras de cocaína apreendidas (Tabela 2). Condições experimentais: Ver Figura 21



Verificando os voltamogramas de SWV da Figura 25 pode-se concluir:

- ✓ A presença de cocaína em todas as amostras;
- ✓ A presença de um ou mais adulterantes em todas as amostras;
- ✓ Na amostra 1, a presença de fenacetina e lidocaína podem ser notadas;
- ✓ Na amostra 2, verifica-se a presença de fenacetina, cafeína e lidocaína;
- ✓ Na amostra 3 verifica-se somente a presença de fenacetina;
- ✓ Na amostra 4, estão presentes fenacetina e cafeína;
- ✓ Na amostra 5, somente cafeína foi detectada. Esta amostra também tinha a presença de fenacetina (< 1,0 %), paracetamol e lidocaína (6,7 %), porém estes não foram detectados;

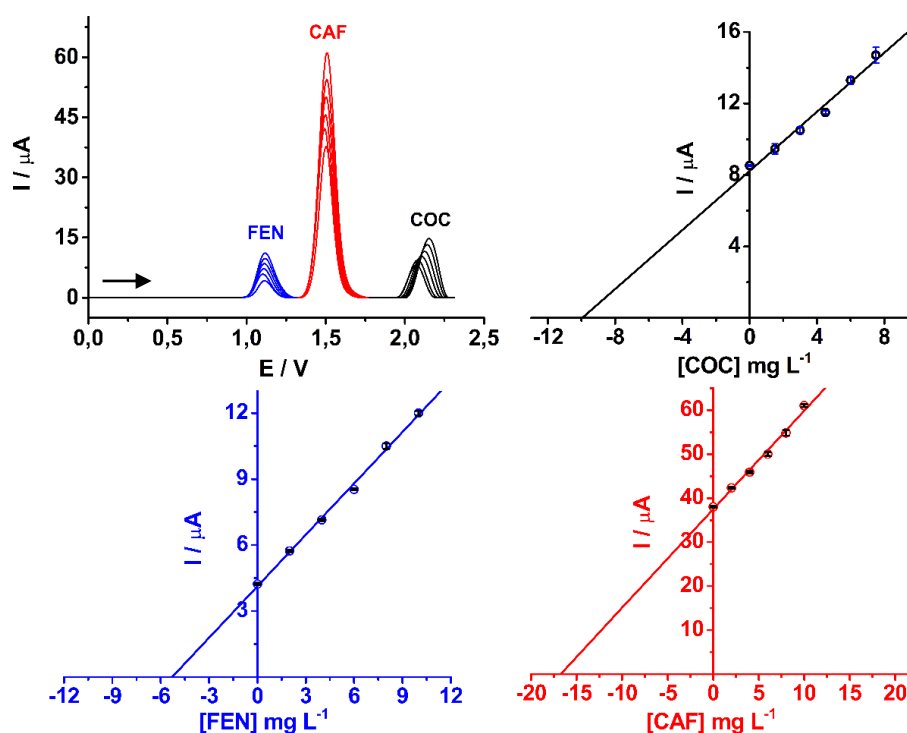
- ✓ Na amostra 6 foi detectada somente a cafeína como adulterante, lidocaína (1,1 %), também presente na amostra, não foi detectada.

Com base nessas observações pode-se concluir que o método apresenta uma boa concordância com o método de GC-FID (Tabela 2, pág. 37). Observa-se que a oxidação da cafeína quando em grandes quantidades apresenta uma certa interferência na detecção de lidocaína devido à proximidade dos picos, contudo não há evidência de interferência na detecção qualitativa da cocaína.

4.2.9. Quantificação simultânea de cocaína e adulterantes em amostras apreendidas

Todas as condições otimizadas bem como a faixa linear determinada para cocaína foram empregadas para a sua quantificação juntamente com alguns adulterantes (fenacetina e cafeína) presentes frequentemente nas amostras apreendidas. A Figura 26 apresenta os voltamogramas obtidos para uma amostra de cocaína apreendida durante a quantificação simultânea de fenacetina, cafeína e cocaína usando o método de adição de padrão. As respectivas curvas de adição de padrão também são apresentadas.

Figura 26. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de amostra apreendida sem e com adição de concentrações crescentes de cocaína, fenacetina e cafeína; e respectivas curvas de calibração. Condições experimentais: Ver Figura 21.



Uma vez determinada a concentração de cada composto nas soluções das amostras e utilizando a massa inicial, o teor de cada analito (%; m/m) foi determinado. Para a comparação com o método oficial empregado anteriormente, a Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a quantificação simultânea de cocaína, fenacetina e cafeína em duas amostras (2 e 4; Tabela 2) de cocaína apreendidas.

Tabela 5. Comparação dos valores obtidos para a fenacetina, cafeína e cocaína em duas amostras apreendidas pelo o método BIA-SWV e GC-FID.

Amostra	Valores encontrados (% m/m)					
	BIA-SWV			GC-FID		
	COC	FEN	CAF	COC	FEN	CAF
2	38,9 ± 1,3	13,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	40,8	13,7	2,7
4	22,1 ± 0,8	11,8 ± 0,2	37,2 ± 0,8	21,6	11,8	39,3

De acordo com o teste-t de Student pareado, os resultados obtidos pelo método de BIA-SWV desenvolvido foram estatisticamente semelhantes às determinações realizadas empregando-se GC-FID ($t_{\text{calculado}} < t_{n-1} = 4,30$; $n = 3$), com 95% de confiança. Pelo fato de o método proposto permitir a quantificação da cocaína, a presença de compostos sem atividade eletroquímica, tais como açúcares, ácido bórico e benzoico, também pode ser inferida através do cálculo das massas de cocaína e demais espécies eletroativas e comparando estes valores com a massa total da amostra tomada. A diferença mássica entre os valores encontrados e a massa total da amostra diz respeito aos diluentes ou espécies sem atividade eletroativa presentes, contudo a identificação destes compostos não é possível por este método.

4.2.10. Uso de amperometria de múltiplos pulsos (MPA) para triagem de amostras de cocaína apreendidas

Uma estratégia adicional para a triagem rápida de amostras apreendidas indicando a presença ou ausência dos adulterantes mais comuns foi proposta empregando amperometria de múltiplos pulsos (MPA) como forma de detecção acoplada ao sistema BIA. O sistema BIA-MPA tem sido bastante empregado em análises simultâneas de espécies sem uma etapa prévia de separação [97,105,129,130]. A presença de compostos eletroativos além da cocaína nas

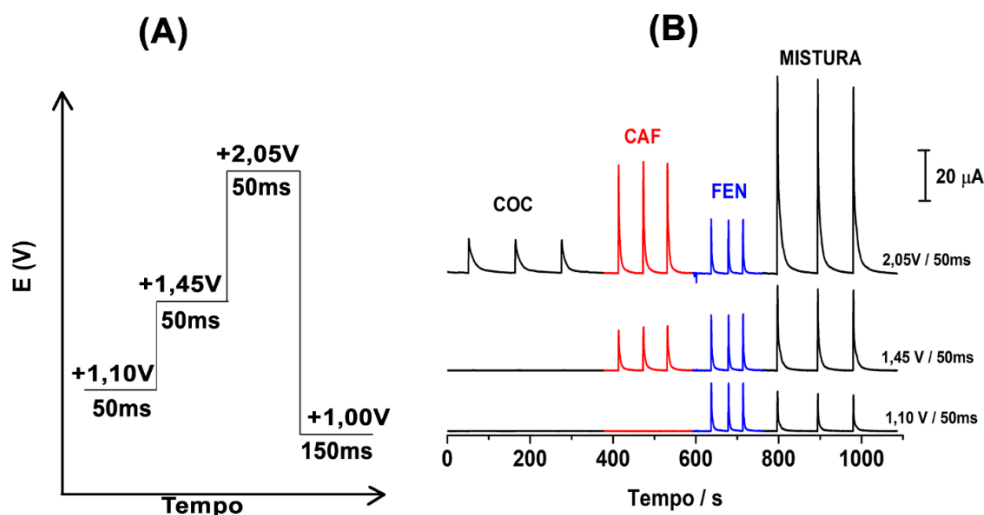
amostras apreendidas pode ser determinada rapidamente com uma única injeção de 150 μL no sistema BIA-MPA. Neste sistema, diferentemente do sistema BIA-SWV, a detecção é realizada no momento da injeção, uma vez que a corrente resultante devido a aplicação de um pulso de potencial definido está sendo monitorada de forma rápida e constante em relação ao tempo. A corrente de oxidação é detectada em forma de pico transiente em cada pulso de potencial aplicado.

Estudos de otimização dos pulsos de potenciais a serem definidos foram realizados. Os potenciais aplicados foram definidos com base nos picos de oxidação de cada espécie (fenacetina, fenacetina e cocaína) utilizadas neste experimento. Um quarto pulso de potencial (+1,00 V/150 ms) também foi definido com o intuito de constante limpeza eletroquímica do eletrodo, além de minimizar a corrente capacitiva gerada em +1,10 V, caso o salto de potencial fosse direto para +1,10 V.

- +1,10 V/50 ms: oxidação de FEN sem a interferência da CAF e da COC;
- +1,45 V/50 ms: oxidação de FEN e CAF sem interferência da COC;
- +2,05 V/50 ms: para oxidação de FEN, CAF e COC;
- +1,00 V/150 ms: limpeza eletroquímica e condicionamento do eletrodo (não mostrado).

A Figura 27 apresenta o esquema da escada de potencial empregada e os amperogramas obtidos simultaneamente após injeções ($n = 3$) sequenciais de uma solução contendo somente COC, somente fenacetina, somente fenacetina e uma mistura de todos os analitos.

Figura 27. (A) Escada de potencial aplicado em função do tempo ao eletrodo de BDD posicionado no sistema BIA-MPA. (B) Amperogramas obtidos para injeções ($n = 3$) de soluções contendo 20 mg L^{-1} de COC, FEN e CAF e de uma mistura contendo todos os compostos. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de aplicação de cada pulso de potencial: 50 ms . Volume injetado: $150 \text{ }\mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $153 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$.



A Figura 27B mostra que a cocaína somente é oxidada em $+2,05 \text{ V}$. Nos pulsos de potenciais de $+1,10$ e $+1,45 \text{ V}$, nenhum sinal para cocaína é detectado. Os adulterantes mais comuns, como cafeína e fenacetina foram detectados nos pulsos de potenciais menos positivos, em $+1,10 \text{ V}$, $+1,45 \text{ V}$ e $2,05 \text{ V}$ para fenacetina e em $+1,45 \text{ V}$ e $2,05 \text{ V}$ para cafeína. Estes resultados mostram que o sistema BIA-MPA possibilita a triagem rápida de amostras de cocaína através de dados qualitativos provendo informações sobre a pureza da cocaína na amostra apreendida de modo rápido e simples, necessitando somente de uma etapa de dissolução da amostra no eletrólito suporte (H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). No caso de ausência de outros adulterantes eletroativos na amostra, ou seja, se nenhum sinal em potenciais menores que $2,05\text{V}$ for detectado, pode-se realizar a quantificação da cocaína e informações sobre presença ou ausência de adulterantes ou diluentes que não são eletroativos pode ser obtida através da massa inicial de amostra tomada.

Se algum sinal de oxidação for observado em potenciais menores que $2,05 \text{ V}$, a presença de um ou mais adulterantes é confirmada. Dados qualitativos sobre estes adulterantes podem ser obtidos se comparados com resultados obtidos a partir de soluções contendo padrões dos possíveis adulterantes. A intensidade dos picos de um analito que oxida em potenciais menores pode ser prevista para potenciais maiores tomando-se um fator que relaciona as correntes de oxidação em cada potencial, tendo como referência a injeção de um padrão do analito [140]. Por exemplo, na Figura 27 observa-se que a oxidação da fenacetina (FEN) é

observada em +1,10 V com uma intensidade de 20,1 μA , em +1,45 V com 24,3 μA e em 2,05 V com 24,8 μA . A partir destes valores, fatores que relacionam estas correntes podem ser calculados. Um fator para cafeína (CAF) também pode ser calculado.

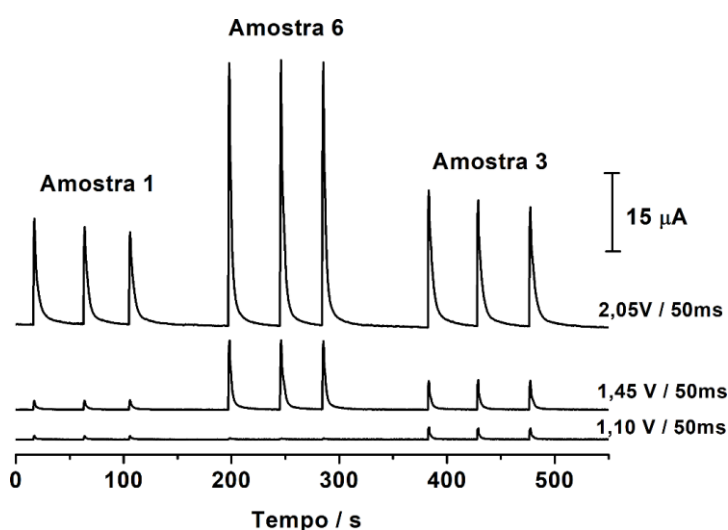
$$F_1 (\text{FEN}) = I_{1,45\text{V}} / I_{1,10\text{V}} = 1,21 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$F_2 (\text{FEN}) = I_{2,05\text{V}} / I_{1,10\text{V}} = 1,23 \quad \text{Eq. (3)}$$

$$F_3 (\text{CAF}) = I_{2,05\text{V}} / I_{1,45\text{V}} = 2,67 \quad \text{Eq. (4)}$$

Levando isso em conta, pode-se fazer uma aproximação para os valores esperados das correntes de oxidação para fenacetina ou cafeína nos potenciais maiores. Para ilustrar a discussão acima, a Figura 28 apresenta amperogramas obtidos após injeções das amostras 1, 3 e 6 (Tabela 2) adequadamente diluídas em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} .

Figura 28. Amperogramas obtidos após injeções de amostras apreendidas adequadamente diluídas em eletrólito suporte. Demais condições: Ver Figura 27.



Com base nos resultados obtidos na Figura 28 as seguintes conclusões podem ser obtidas:

- ✓ As amostras 1 e 3 podem conter fenacetina, não contêm cafeína ($F_1 \approx 1,21$) e pode conter cocaína ($F_2 \neq 1,23$);
- ✓ A amostra 6 não contém fenacetina, pode conter cafeína e pode conter cocaína ($F_3 \neq 2,67$);
- ✓ Todas as amostras podem conter cocaína ($F_2 \neq 1,23$ ou $F_3 \neq 2,67$);

Desse modo, o método desenvolvido usando BIA-MPA apresenta uma alternativa rápida e simples para triagem (screening) de amostras reais de cocaína apreendidas.

4.2.11. Conclusões parciais

Os métodos desenvolvidos nesta seção apresentam alternativas simples, rápidas, portáteis e de baixo custo para triagem ou quantificação de cocaína e alguns adulterantes comumente encontrados em amostras apreendidas. O sistema BIA-SWV permite a detecção de cocaína na presença dos adulterantes mais comuns. O uso de SWV para detecção e BDD como eletrodo de trabalho em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ que permite uma ampla janela de potencial de trabalho, com baixa corrente de fundo mesmo em altos valores de potencial proporcionando uma excelente seletividade para cocaína. O método tem como grande vantagem a simplicidade no preparo de amostra, consistindo somente em uma etapa de dissolução da mesma, não empregando solventes orgânicos. O sistema BIA permite uso de pequenas quantidades de amostras a cada injeção, melhora a portabilidade do método e a velocidade de análise, uma vez que permite injeções sequenciais de diferentes amostras sem necessidade de troca de eletrólito suporte.

O sistema proposto apresenta uma grande capacidade para aplicação em análises em campo e de rotina para laboratório sem grande infraestrutura. Um grande número de adulterantes foram testados, tais como benzocaína, cafeína, levamisol, lidocaína, paracetamol, fenacetina e procaína. Além disso, foi possível a quantificação de cocaína e alguns adulterantes simultaneamente. O sistema BIA-MPA apresenta um procedimento alternativo simples e rápido para triagem de amostras de cocaína apreendidas.

O método proposto apresenta algumas vantagens em relação a estudos apresentados anteriormente [32,36–41] como o uso de um eletrodo sem qualquer modificação química, excelente seletividade, com detecção de cocaína mesmo na presença de seis dos adulterantes mais comuns, além de maior robustez e rapidez na realização de análises sequenciais e replicatas. Em relação ao preparo das amostras, uma alternativa mais simples foi proposta por De Jong *et al* onde não há necessidade de dissolução da amostra e a análise é realizada empregando-se o contato da amostra com um hidrogel condutivo acoplado a um eletrodo flexível impresso em uma luva [23], este método, porém, não apresenta alternativas para quantificação da cocaína simultaneamente a alguns adulterantes como proposto neste trabalho.

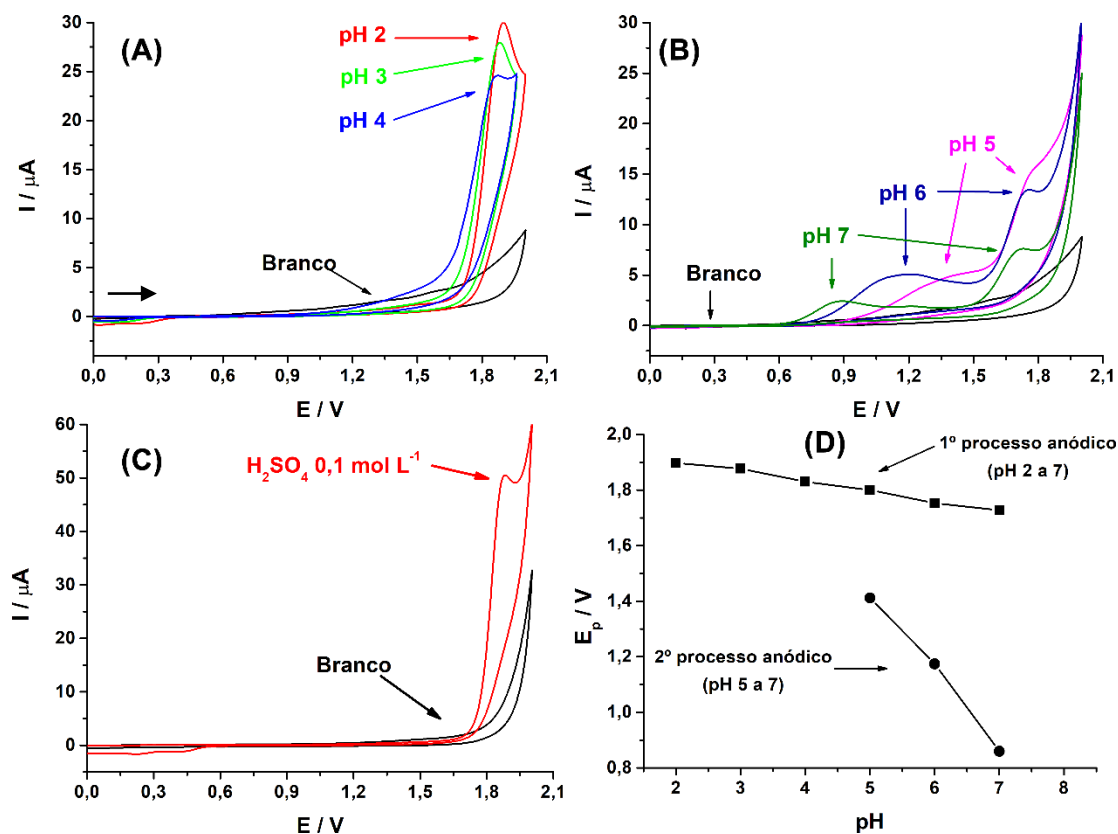
Parte 2 - Determinação de adulterações com sibutramina e efedrina em diversas formulações e suplementos usados para emagrecimento.

4.3. Detecção e *screening* de sibutramina em suplementos alimentares e fitoterápicos

4.3.1. Comportamento eletroquímico da sibutramina

O comportamento eletroquímico da sibutramina (SIB) foi primeiramente investigado empregando voltametria cíclica (CV) e BDD como eletrodo de trabalho. Devido a solubilidade da SIB ($pK_a = 8,5$) [85,168], durante os estudos foi verificado uma turvação da solução de SIB preparada em soluções tampão de pH maior que 7. Para manter a solubilidade do analito nesta faixa de pH ($> 7,0$) seria necessário o uso de solventes orgânicos, e com o intuito de minimizar a produção de resíduos orgânicos e manter a simplicidade do método neste trabalho optou-se por trabalhar em meio ácido somente. A Figura 29 apresenta o estudo da influência do pH no processo de oxidação da SIB empregando soluções tampão BR (2,0 e 7,0).

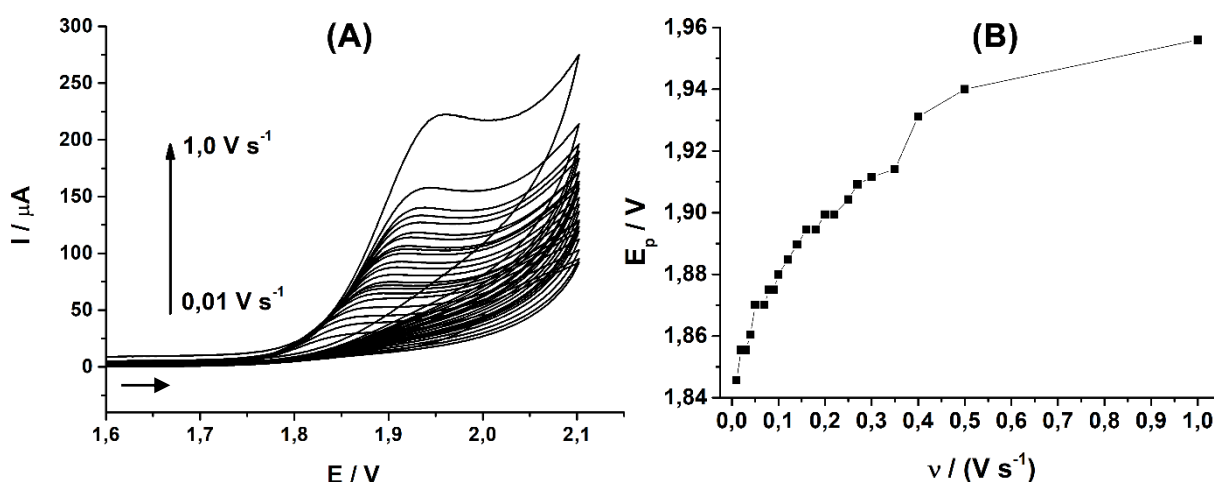
Figura 29. (A) e (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 2 – 7) sem (linha preta) e com 50 mg L⁻¹ de SIB (linhas coloridas). (C) Voltamogramas cíclicos obtidos em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ sem (linha preta) e com 50 mg L⁻¹ de SIB (linha vermelha). (D) Relação entre potencial de pico e pH para oxidação da SIB (■) Primeiro processo anódico, (●) segundo processo anódico. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹, incremento de potencial: 5 mV.



Observando os voltamogramas obtidos na faixa de pH entre 2 e 4 (Figura 29A), somente um pico de oxidação da SIB é observado em aproximadamente +1,9 V. O aumento nos valores de pH causa uma diminuição, tanto na corrente de oxidação, como no potencial de pico. Para valores maiores de pH (5 a 7), os voltamogramas (Figura 29B) apresentam um segundo processo de oxidação em valores de potenciais mais negativos. Um comportamento eletroquímico similar (dois processos anódicos) também foi observado para SIB em GCE modificado com oxido de grafeno reduzido [169]. Levando-se em conta que existe uma diminuição na corrente de oxidação da SIB com o aumento do pH, e devido as vantagens descritas anteriormente em relação ao uso de eletrodo de BDD em meio de ácido, testes também foram realizados usando H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} como eletrólito de suporte. A Figura 29C apresenta os voltamogramas obtidos com e sem a presença de 50 mg L^{-1} de SIB em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . Nestas condições foi obtido um pico de oxidação bem definido para SIB em 1,86 V, além de um aumento na corrente de oxidação. Dessa forma, H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} foi selecionado como eletrólito suporte para os estudos posteriores.

Definido o eletrólito suporte de trabalho, estudos foram realizados para a obtenção de informações a respeito do mecanismo de oxidação da SIB. Nestes estudos foi empregada a variação da velocidade de varredura na voltametria cíclica. A Figura 30A apresenta os voltamogramas obtidos para 50 mg L^{-1} de SIB em relação ao aumento da velocidade de varredura de 0,01 V s^{-1} a 1,0 V s^{-1} .

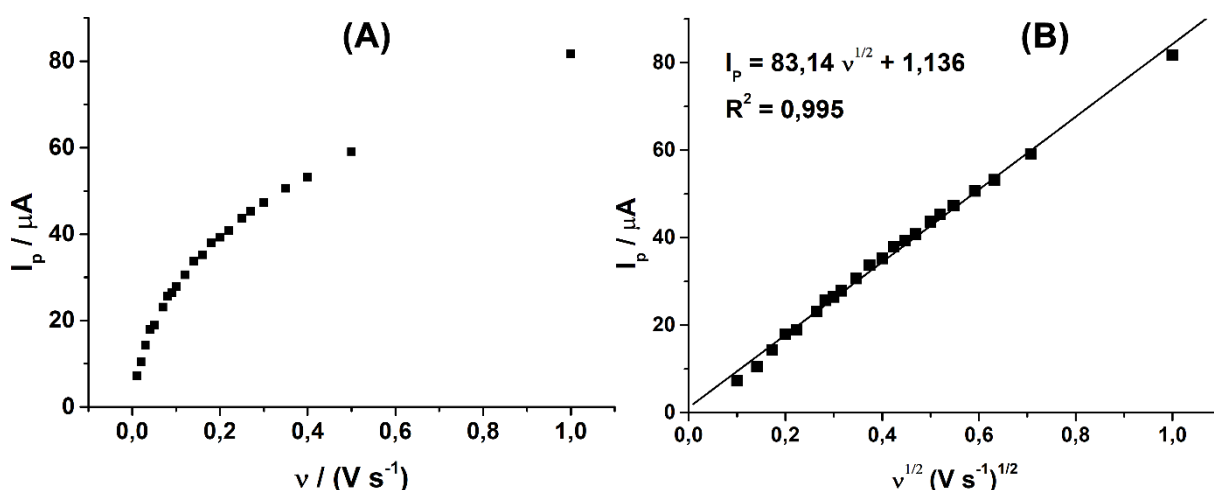
Figura 30. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para 50 mg L^{-1} de SIB em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} em função da variação da velocidade de varredura. (B) Variação do E_p com a velocidade de varredura.



Através da variação da velocidade de varredura, várias informações podem ser extraídas, inicialmente a confirmação de um processo irreversível é dada pela ausência de pico de redução durante a varredura catódica em todo o intervalo de potencial estudado. Também se observa uma variação do potencial de pico com o aumento da velocidade de varredura, característica de sistemas irreversíveis (Figura 30B) [170].

Por meio da relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação da velocidade de varredura (v) pode-se identificar se o transporte de massa da reação anódica é controlado preferencialmente por difusão ou adsorção das moléculas de SIB na interface eletrodo-solução. A Figura 31 A e B apresentam as variações da corrente de pico (I_p) com a velocidade de varredura (v) e com sua raiz quadrada ($v^{1/2}$), respectivamente.

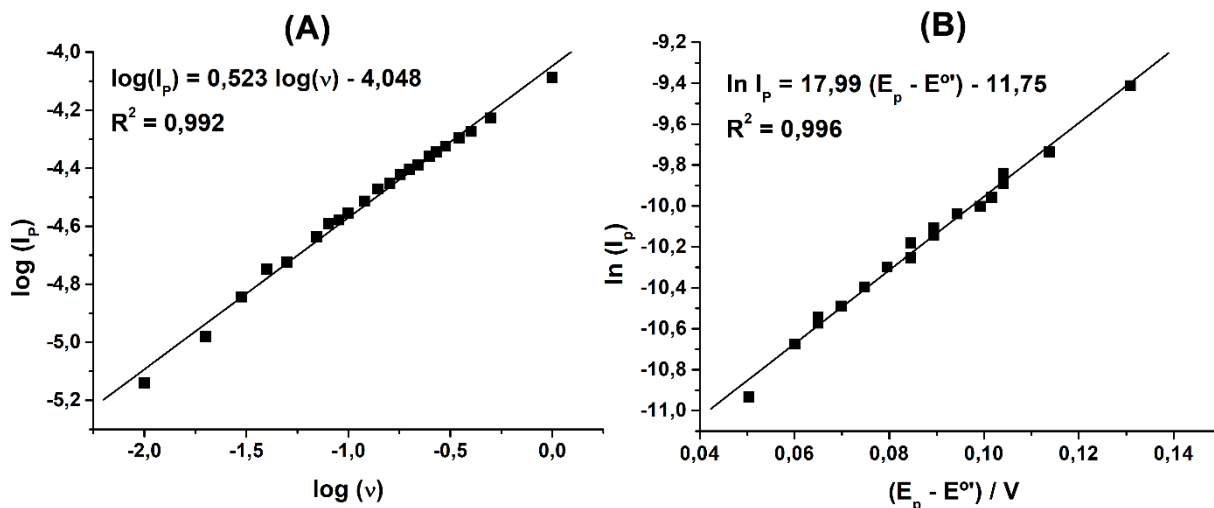
Figura 31. (B) Relação entre I_p e a raiz quadrada da velocidade de varredura com respectiva equação linear.



Através da Figura 31A pode-se observar o comportamento não-linear da relação $I_p \times v$. Já na Figura 31B pode ser observada uma relação linear entre o aumento da I_p de oxidação da SIB com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Esse tipo de comportamento é típico de sistemas onde o transporte de massa é preferencialmente controlado pela difusão da espécie para a superfície do eletrodo de acordo com a equação de Randles-Sevcik para sistemas irreversíveis [171,172].

Adicionalmente, esta informação pode ser confirmada fazendo a relação entre $\log(I_p) \times \log(v)$. A Figura 32A apresenta esta relação juntamente com a respectiva equação linear.

Figura 32. (A) Relação entre o logaritmo da corrente de pico ($\log I_p$) com o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). (B) Relação entre o logaritmo natural da corrente de pico ($\ln I_p$) com a diferença entre o potencial de pico e o potencial formal ($E_p - E^{o'}$).



Segundo a literatura [95,172], coeficientes angulares com valores próximos a 0,50 indicam a existência de processos difusionais e valores próximos a 1,0, processos controlados por adsorção. A Figura 32A mostra uma boa relação linear ($R^2 = 0,99$) para a relação $\log(I_p)$ vs. $\log(v)$ com o valor calculado para o coeficiente angular de 0,52, o que está de acordo com a literatura para sistemas controlados por difusão. Uma vez confirmado o processo de oxidação irreversível com transporte de massa controlado por difusão, o número de elétrons envolvidos na oxidação, bem como a constante de transferência eletrônica heterogênea (k_s), podem ser estimados empregando-se a equação de Nicholson e Shain [173], a qual relaciona a corrente de pico (I_p) com a diferença entre o potencial de pico e o potencial padrão ($E_p - E^{o'}$):

$$I_p = 0,227nFACk_s \exp \left[\left(\frac{\alpha n F}{RT} \right) (E_p - E^{o'}) \right] \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde n é o número de elétrons transferido, F é a constante de Faraday (96485 C mol⁻¹), A é a área do eletrodo delimitada pelo *O-ring* (0,23 cm²), C é a concentração da espécie eletroativa ($1,8 \times 10^{-7}$ mol cm⁻³), α é o coeficiente de transferência de carga, R é a constante universal dos gases (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹) e T é a temperatura termodinâmica (298,15 K). O valor do potencial formal, $E^{o'}$ ($1,81 \pm 0,02$ V), foi calculado como uma média de cada velocidade de varredura, no potencial onde $I = 0,82 I_p$ [174]. Uma relação linear entre I_p e ($E_p - E^{o'}$) pode ser obtida a partir da Eq. 5 fazendo o logaritmo natural dos dois termos da equação e rearranjando:

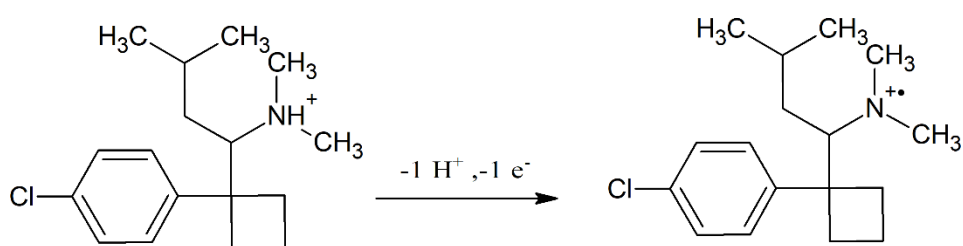
$$\ln(I_p) = \ln(0,227nFACk_s) + \left(\frac{\alpha nF}{RT}\right)(E_p - E^{0'}) \quad \text{Eq. (6)}$$

Observando a relação linear de $\ln(I_p)$ vs. $(E_p - E^{0'})$ da Figura 32B, a constante de transferência eletrônica heterogênea (k_s) pode ser obtida a partir do valor do intercepto, e o número de elétrons transferidos na oxidação da SIB usando o coeficiente angular. Para oxidação da SIB em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} empregando eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho, a seguinte relação foi obtida:

$$\ln(I_p) = -11,75 + 17,99(E_p - E^{0'}) \quad \text{Eq. (7)}$$

Aplicando os valores obtidos na Eq. (7) na Eq. (6), um valor para $\alpha n = 0,46$ foi calculado. Segundo a literatura pode-se considerar $\alpha = 0,5$ para moléculas orgânicas [95], deste modo, o número de elétrons estimados envolvidos na oxidação da SIB, nas condições estabelecidas, foi 1. Ainda empregando as equações 6 e 7, o valor de k_s calculado foi de $8,8 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$. A partir da relação entre E_p e pH apresentada na Figura 29D, obtém-se uma inclinação de 36 mV por unidade de pH, o que indica que o mesmo número de prótons e elétrons estão envolvidos no processo de oxidação. A Figura 33 apresenta o mecanismo sugerido para a oxidação da SIB em meio ácido em um eletrodo de BDD, o esquema apresenta a oxidação do grupo amino terciário protonado, consumindo um elétron e levando a um cátion radical.

Figura 33. Esquema sugerido para o mecanismo de oxidação da SIB em meio ácido.



4.3.2. Estudo e otimização dos parâmetros de SWV

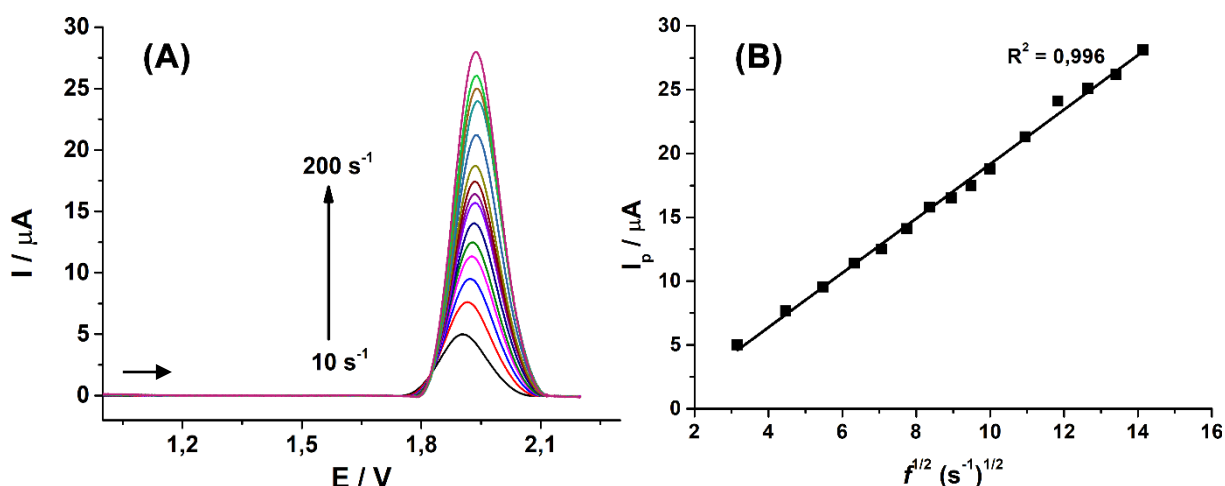
O objetivo inicial deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico empregando SWV. Para obtenção da melhor resposta, em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico os seguintes parâmetros instrumentais necessitam ser otimizados: amplitude de pulsos de potencial (a), frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) e incremento de varredura de potencial (ΔE).

Todas as medidas feitas em SWV foram realizadas com aplicação de um potencial de condicionamento (0,0 V) ao eletrodo por 5 s, seguido por um tempo de equilíbrio de 5 s antes do início da varredura.

4.3.2.1. Otimização da frequência

A influência da frequência foi avaliada no intervalo de 10 s^{-1} a 200 s^{-1} utilizando uma solução de 50 mg L^{-1} de SIB em meio de H_2SO_4 e BDD como eletrodo de trabalho (Figura 34A). A amplitude de pulso e o incremento de varredura foram mantidos constantes em 50 mV em 2 mV, respectivamente.

Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para SIB 50 mg L^{-1} , em diferentes frequências de aplicação de pulsos de potencial (B) Relação entre corrente de pico (I_p) e a frequência (f) de aplicação de pulso. Eletrólito: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

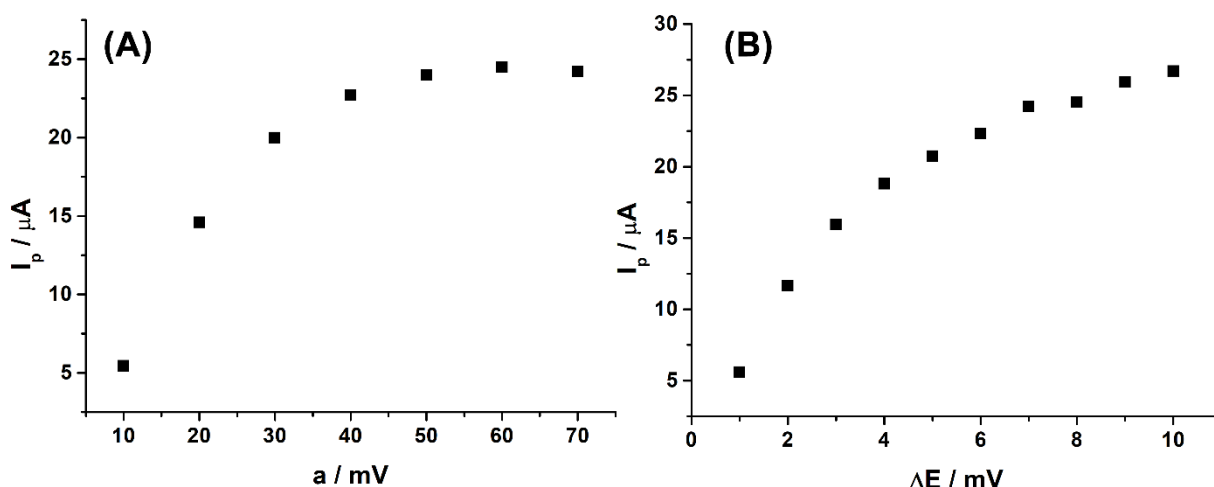


Analizando os voltamogramas da Figura 34A, com base na largura do pico e ruído da linha de base, o valor de frequência de 60 s^{-1} foi escolhido para os demais estudos. Os dados obtidos na Figura 34B, que relacionam a corrente de pico (I_p) com a raiz quadrada da frequência foram similares aos dados obtidos no estudo da variação da velocidade de varredura. O comportamento da I_p com a variação da raiz quadrada da frequência ($f^{1/2}$) foi linear corroborando com o comportamento preferencialmente difusional obtido nos testes empregando CV.

4.3.2.2. Otimização da amplitude e do incremento de potencial

A amplitude foi avaliada dentro do intervalo de 10 a 100 mV mantendo-se os outros parâmetros constantes ($f = 50 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 2 \text{ mV}$). Da mesma forma, durante a otimização do incremento de potencial, manteve-se a amplitude constante em 50 mV e a frequência em 50 s^{-1} . A Figura 35 apresenta as relações da variação dos dois parâmetros com a corrente de pico (I_p).

Figura 35. (A) Relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação da amplitude (a). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$. (B) Relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação do incremento de varredura (ΔE). $f = 50 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$.



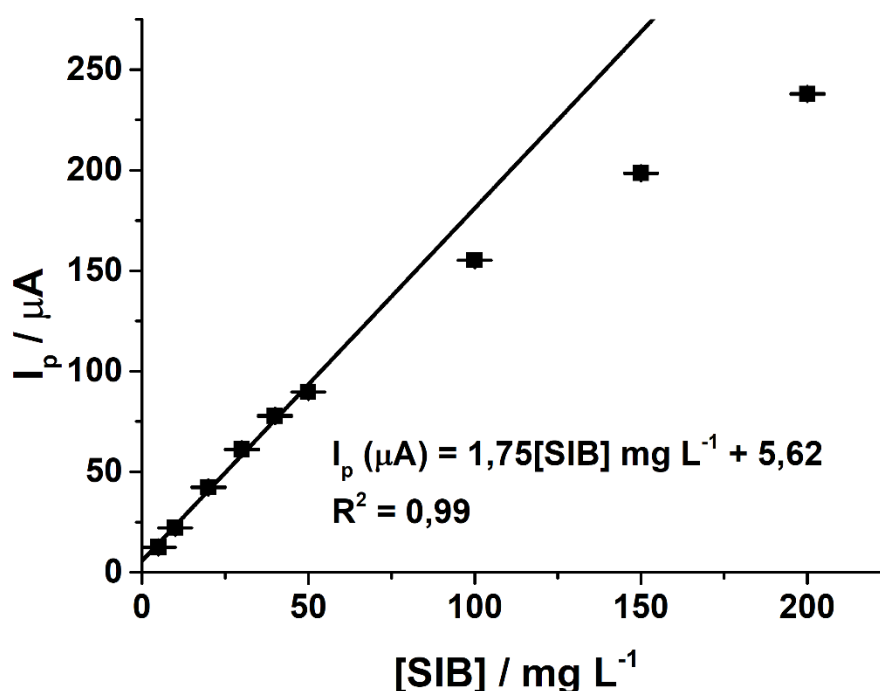
Observando as correntes de pico obtidas em diferentes amplitudes (Figura 35A), pode-se notar um aumento pronunciado até a amplitude de 40 mV. Para valores acima de 40 mV não há aumento significativo de corrente. Além disso, valores grandes de amplitude, provocam distorções e alargamento dos picos como dito anteriormente. Dessa forma, o valor de 40 mV foi selecionado para os estudos posteriores.

Analisando o efeito da variação do incremento de varredura na corrente de pico, observa-se um aumento maior entre os menores valores de incremento. A corrente de pico aumenta com um comportamento característico até o valor de 6 mV, a partir desse valor o comportamento se torna mais irregular. Dessa forma, o valor para incremento de potencial de 6 mV foi escolhido para os demais estudos.

4.3.3. Faixa linear

Após otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada, estudos para determinação da faixa linear de trabalho para a SIB foram realizados. A Figura 36 apresenta a relação entre as correntes de pico obtidas a partir de soluções de concentrações crescentes (5 a 200 mg L⁻¹) de SIB.

Figura 36. Relação entre a corrente de pico e concentrações crescentes de SIB. Condições experimentais: Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 40 \text{ mV}$; $\Delta = 6 \text{ mV}$



Analisando a Figura 36, observa-se uma relação linear entre 5 e 50 mg L⁻¹ de SIB para o método SWV otimizado com a seguinte equação linear:

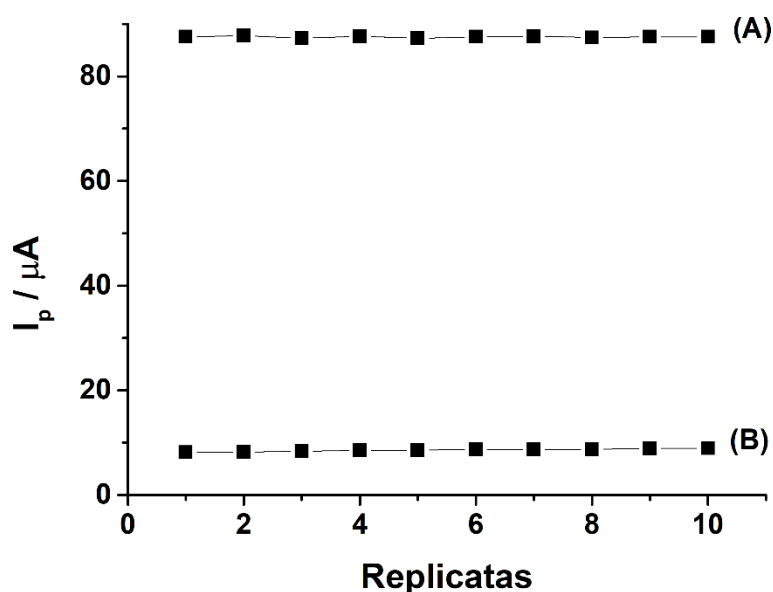
$$I_p (\mu\text{A}) = 1,75 \pm 0,07 [\text{SIB}] \text{ mg L}^{-1} + 5,62 \pm 0,22$$

A equação da reta obtida mostra que nas condições otimizadas, a análise de SIB apresenta uma excelente sensibilidade (1,75 $\mu\text{A} / \text{mg L}^{-1}$). Pode-se também observar um segundo comportamento linear para valores acima de 100 mg L⁻¹, no entanto, para fins práticos foi utilizada somente a faixa linear observada em concentrações menores. O limite de detecção (LD) para SIB foi estimado em 0,08 mg L⁻¹ e o limite de quantificação calculado em 0,27 mg L⁻¹.

4.3.4. Repetibilidade e reprodutibilidade

Após a otimização dos melhores parâmetros experimentais, bem como a definição da faixa linear de trabalho, um estudo para avaliação da repetibilidade do método SWV proposto foi realizado. Na Figura 37 são apresentados os resultados obtidos para 10 medidas sucessivas de soluções contendo SIB em duas concentrações diferentes: (A) 50 e (B) 5 mg L⁻¹, a maior e a menor concentração da faixa linear otimizada.

Figura 37. Resultados obtidos por SWV para medidas sucessivas de uma solução contendo (A) 50 mg L⁻¹ ou (B) 5 mg L⁻¹ de SIB. Condições experimentais: Ver Figura 36.



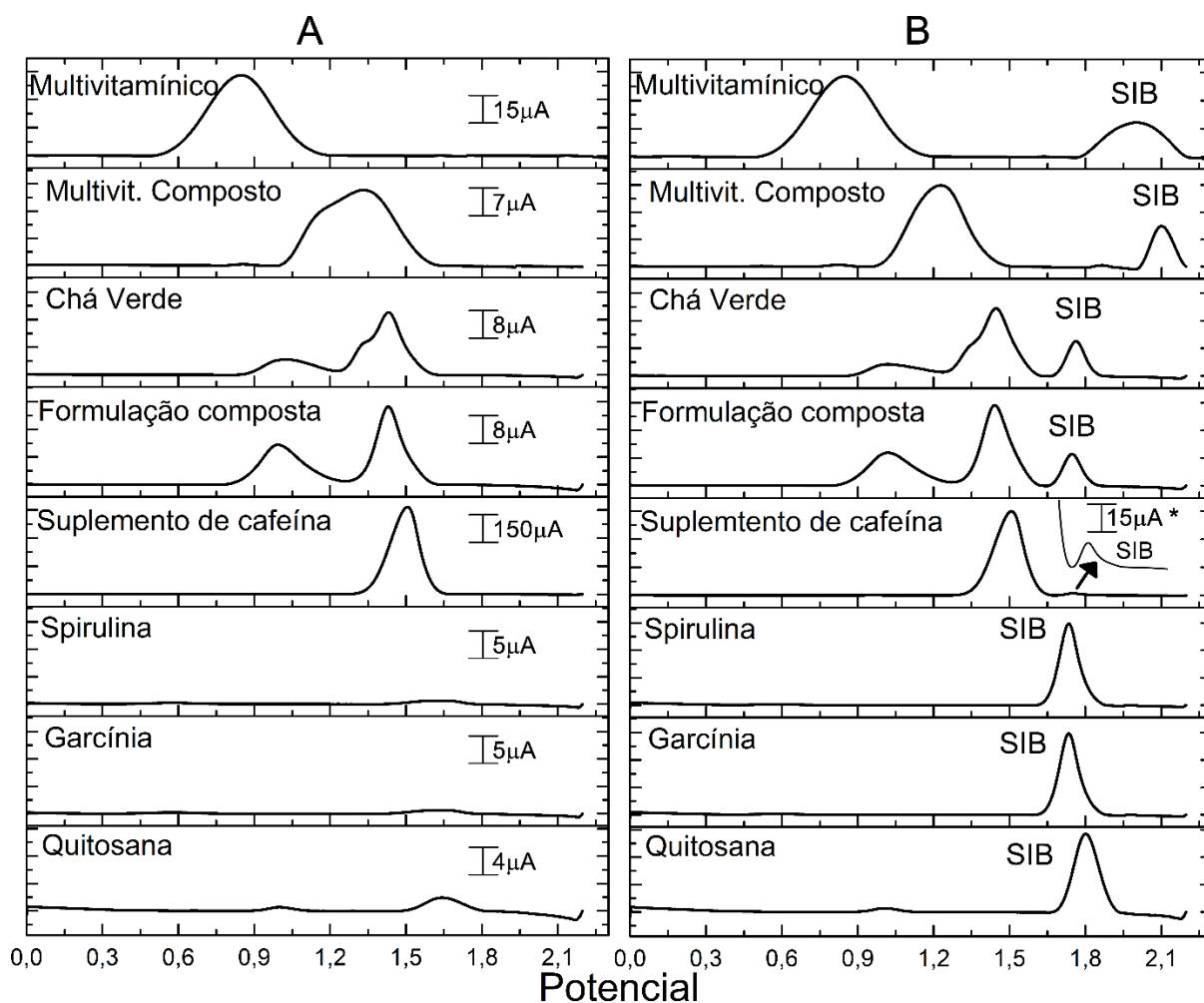
Pela Figura 37, é possível perceber a ausência de qualquer tendência ou contaminação significativa da superfície do eletrodo (efeito de memória). Os desvios padrões relativos (DPR) foram calculados em 3,2% e 0,2% (n = 10) para 5 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ de SIB, respectivamente. A variação de medidas realizadas em dias diferentes foi calculada utilizando o DPR dos valores de corrente obtidos ao longo de um mês em 6 dias diferentes, sendo o valor calculado de 8,7% (n = 6), indicando boa robustez para o método.

4.3.5. Detecção de sibutramina em suplementos alimentares

Com a definição dos parâmetros SWV e das melhores condições de trabalho, os estudos foram direcionados para a identificação da SIB em amostras de suplementos alimentares e medicamentos naturais ou fitoterápicos. A Figura 38A apresenta os

voltamogramas de onda quadrada obtidos para 8 amostras reais que foram adequadamente dissolvidas no eletrólito suporte de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 38B apresenta os voltamogramas para as mesmas amostras dissolvidas, porém fortificadas com 1% (m/m) de SIB.

Figura 38. Voltamogramas de onda quadrada de soluções contendo amostras reais adequadamente diluídas em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes (A) e após (B) adição de 1 % de SIB (m/m). Composição das amostras: Ver Tabela 3. Demais parâmetros experimentais: Ver Figura 36.



Observando a Figura 38A, observa-se que os perfis voltamétricos das amostras estudadas não apresentam picos na região acima de +1,8 V. No entanto, as mesmas amostras após dopagem com 1% de SIB passam a apresentar um pico de oxidação por volta de +1,9V relacionado com a oxidação da SIB (Figura 38B). Estes resultados mostram que a identificação de SIB é possível nesse tipo de amostra, mesmo em pequenas quantidades (1%; m/m). O processo de triagem de amostras (“screening”) pode trazer rapidamente informações sobre a

presença ou ausência de SIB em amostras analisadas. A informação, neste caso, é obtida pela presença do pico em aproximadamente 1,9 V.

Desvios neste valor de potencial ($\sim 1,9\text{V}$) puderam ser observados em amostras de maior complexidade, como os multivitamínicos. Estes desvios são causados devido a própria complexidade desse tipo de amostra e a presença de altas concentrações de outros compostos que podem interferir na transferência de massa da SIB para a superfície do eletrodo. Outro fato a ser considerado é que compostos eletroativos que oxidam em potenciais menores continuam sendo oxidados no potencial de oxidação da SIB. No entanto, a detecção seletiva da SIB nesse caso é possível devido ao processo de aquisição do sinal (subtração entre correntes detectadas em pulsos de potenciais diferentes) da SWV que fornece resolução tanto em relação ao potencial como em relação ao tempo [175]. Quando a detecção de correntes de oxidação ou redução passar a ser relativamente constante, a corrente final detectada tende a ser muito próxima de zero. O uso do potencial de condicionamento também é essencial para o aumento do tempo de operação do eletrodo de BDD nestas condições, pois proporciona uma limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo.

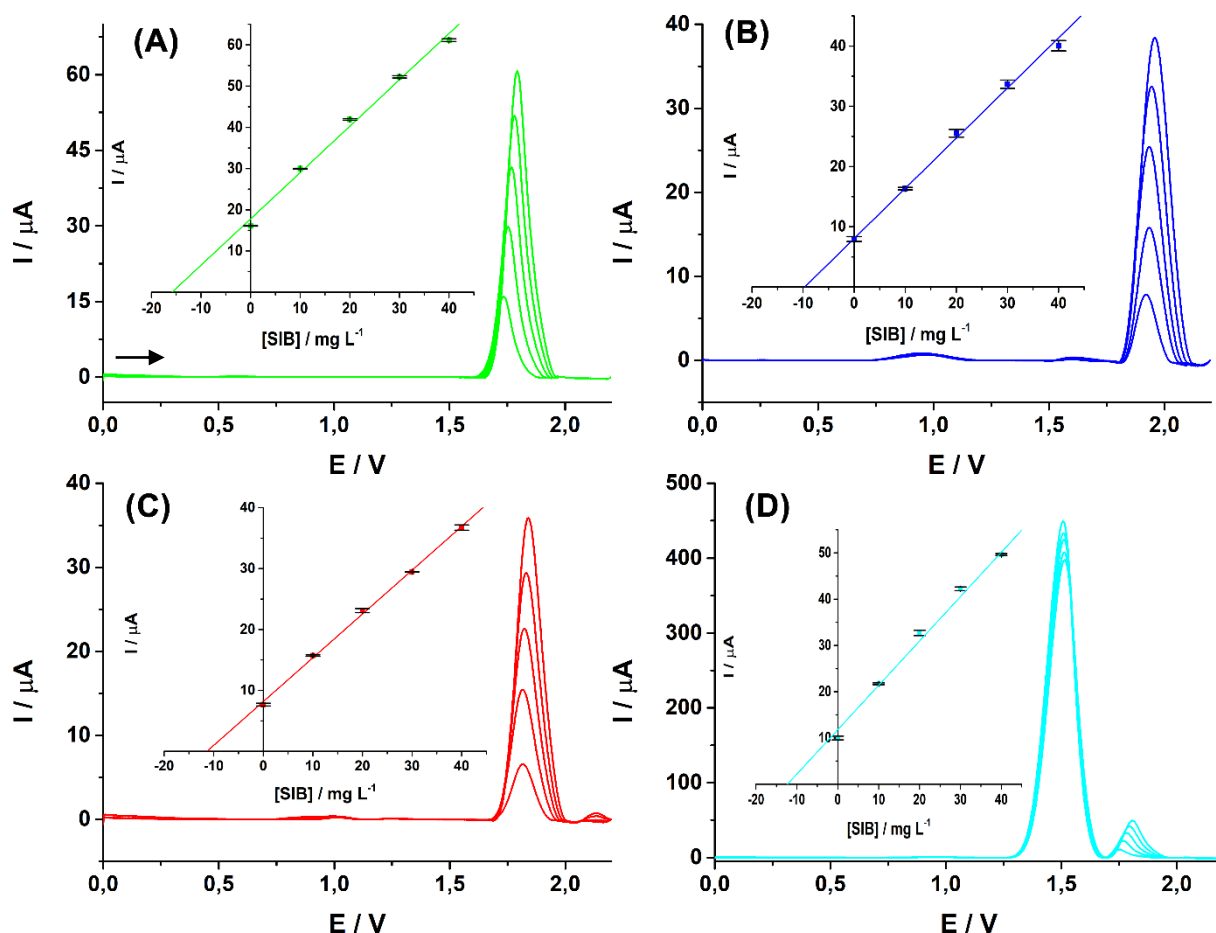
Estudos para identificação de SIB em menores quantidades também foram realizados. Amostras dopadas com 0,1 e 0,5% de SIB (m/m) também foram testadas. Em todas as amostras testadas foi possível a identificação de SIB a 0,5%. Já entre as amostras dopadas com SIB em níveis de 0,1%, a detecção foi possível somente na amostra contendo Garcínia, nas outras amostras o *screening* das amostras foi inconclusivo, provavelmente devido a efeitos de matriz. De acordo a dosagem diária recomendada de SIB [55] e levando em consideração a dosagem geralmente recomendada de suplementos alimentares, a detecção de 1% de SIB nesse tipo de amostra é adequado para análises forenses de rotina [68–70].

4.3.6. Quantificação de sibutramina em amostras de suplementos alimentares

Além da aplicação em processos de triagem rápida ou *screening* sugerida para o método SWV desenvolvido, sua funcionalidade também foi testada para a quantificação de SIB em diferentes amostras empregando o método de adição de padrão. Empregando os parâmetros otimizados anteriormente e levando em consideração a faixa linear obtida (5 a 50 mg L^{-1}), quatro curvas de calibração usando método de adição de padrão para diferentes amostras representativas (diferentes complexidades de matriz) foram construídas. A Figura 39 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curvas de calibração obtidas para soluções

de amostras dopadas antes e após a adições sucessivas de padrões de SIB (método de adição de padrão).

Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para quatro soluções de amostras dopadas, antes e após quatro adições de padrão de SIB para (A) Garcínia; (B) Quitosana; (C) Spirulina; e (D) Suplemento de cafeína, com as respectivas curvas de calibração. Condições experimentais: Ver Figura 36.



As curvas de calibração apresentadas na Figura 39 foram construídas em uma faixa de concentração menor ($10 - 40 \text{ mg L}^{-1}$) que a faixa linear para garantir que o comportamento fosse linear, mesmo na presença de uma amostra, durante todo o intervalo utilizado. As equações para cada curva de calibração são apresentadas a seguir:

- Garcínia: $I (\mu\text{A}) = 1,12 [\text{SIB}] (\text{mg L}^{-1}) + 17,8$; $R^2 = 0,99$;
- Quitosana: $I (\mu\text{A}) = 0,81 [\text{SIB}] (\text{mg L}^{-1}) + 8,40$; $R^2 = 0,99$;
- Spirulina: $I (\mu\text{A}) = 0,72 [\text{SIB}] (\text{mg L}^{-1}) + 8,16$; $R^2 = 0,99$;

➤ Supl. Cafeína: $I (\mu A) = 0,99 [SIB] (mg L^{-1}) + 11,3 R^2 = 0,99;$

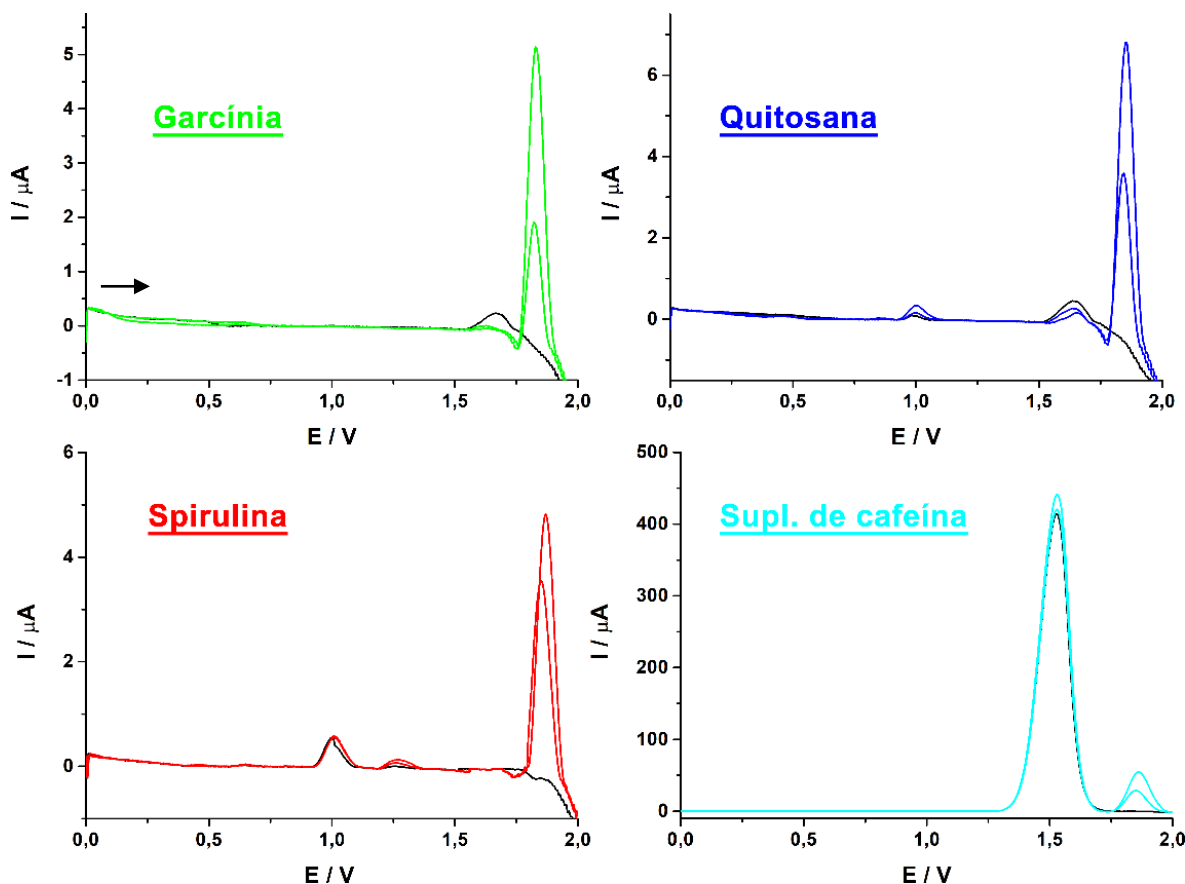
Os estudos de adição e recuperação nas amostras apresentaram resultados que variaram de 105 a 113%, com desvios padrões relativos menores que 3%, indicando que o método SWV proposto possui uma boa exatidão e precisão para quantificação de SIB. Todas as amostras foram dopadas com baixas quantidades de SIB (1% ;m/m) e o método se mostrou eficiente para quantificação mesmo nesta baixa proporção e se tratando de amostras complexas (suplementos alimentares e formulações emagrecedoras).

Estudos também foram realizados para a quantificação de SIB em amostras de multivitamínicos (amostras muito complexas). No entanto, a recuperação de SIB neste tipo de amostra apresentou resultados próximos a 50 %. A presença de altas concentrações de outros compostos orgânicos e minerais podem ter algum efeito de interação com a SIB como já mencionado anteriormente. Portanto, é importante mencionar que a quantificação de SIB em matrizes deste nível de complexidade não foi possível com o modo de preparo simples de amostra proposto neste trabalho. No entanto, apesar da complexidade das amostras, o método se mostrou bastante efetivo para uma triagem rápida com a finalidade de detectar a presença de SIB.

4.3.7. Aplicação do método SWV desenvolvido acoplado ao sistema BIA para triagens rápidas e sequenciais.

O método desenvolvido apresenta muitas vantagens, como o processo simples de preparo da amostra, baixo custo, boa seletividade e não emprega o uso de solventes orgânicos. Para melhorar ou facilitar a aplicação do método em análises rotineiras, fora do laboratório ou em análises sequenciais em grandes quantidades, o método SWV foi adaptado para uso com o sistema BIA. Nesse sistema é possível fazer grande número de análises sem necessidade da troca do eletrólito suporte ou qualquer parte do sistema eletroquímico, utilizando pequenas quantidades de amostras. A Figura 40 apresenta os voltamogramas obtidos com o sistema BIA-SWV para quatro amostras, antes e após a adição de duas concentrações diferentes de SIB. Os mesmos parâmetros SWV otimizados foram utilizados, e para o sistema BIA, o volume de injeção de 150 μL e a velocidade de injeção de 153 $\mu L s^{-1}$ otimizados previamente. O procedimento da injeção da amostra foi realizado de forma similar ao processo usado com a cocaína apresentado na seção anterior, antes do início da varredura por SWV.

Figura 40. Voltamogramas obtidos para quatro amostras antes (linhas pretas) e após (linhas coloridas) dopagem com duas concentrações diferentes de SIB, 5 e 10 mg L⁻¹ para garcínia, quitosana e Spirulina e 25 e 50 mg L⁻¹ para suplemento de cafeína. Condições experimentais: volume de injeção: 150 µL; velocidade de injeção: 153 µL s⁻¹; f : 60 s⁻¹; a : 40 mV; ΔE : 6 mV.



Os resultados apresentados na Figura 40 mostram que o sistema BIA-SWV possibilita a triagem rápida de amostras detectando a presença ou ausência de SIB através da injeção de uma pequena alíquota de amostra (150 µL) preparada de uma forma simples e rápida (somente diluição no eletrólito suporte). Pode ser observado que nestas condições, similarmente ao sistema SWV estacionário, nenhum pico é observado por volta de 1,9 V para soluções de amostras que não contém SIB, já no caso da presença de SIB, um pico aparece em todas as amostras nesta região de potencial (1,9 V). Estes resultados mostram que o sistema BIA-SWV é uma boa alternativa para aplicações em triagens rápidas e de forma portátil. Além disso, é possível fazer um grande número de análises sequenciais de maneira bastante rápida, sem a necessidade de sucessivas manipulações do sistema (células e eletrodos).

4.3.8. Conclusões parciais

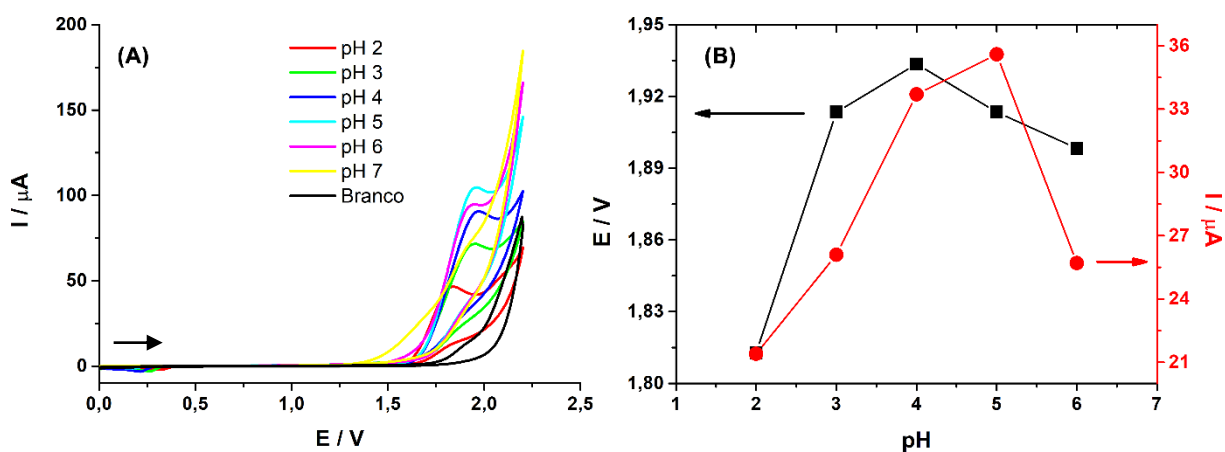
Nesta parte do trabalho foi desenvolvido um método portátil para triagem rápida ou *screening* de SIB em amostras de produtos naturais, como suplementos alimentares, fórmulas emagrecedoras e multivitamínicos. O método apresenta robustez, exatidão, repetibilidade e seletividade, sendo possível a discriminação de amostras puras ou adulteradas com SIB, além disso quantificações da SIB em diferentes tipos de amostras foram demonstradas com boa exatidão e mínima manipulação da amostra em todos os casos. O método BIA-SWV apresenta uma alternativa que melhora a velocidade do método desenvolvido, possibilitando análises sequenciais e também de forma portátil e robusta. Os métodos desenvolvidos nesta parte são métodos simples, rápidos e de baixo-custo, que podem ser facilmente adaptados para análises de rotina em laboratório com pouca infraestrutura.

4.4. Detecção de efedrina empregando BIA-SWV

4.4.1. Comportamento eletroquímico da efedrina

O comportamento eletroquímico da efedrina (EFD) foi investigado empregando voltametria cíclica (CV) e BDD como eletrodo de trabalho. Assim como a SIB, a EFD ($pK_a = 9,5$) [176] torna-se insolúvel em soluções com valores de pH maiores que 7, desse modo, optou-se pelo estudo em valores de $pH < 7,0$, somente. A Figura 41 apresenta o estudo da influência do pH no processo de oxidação da EFD empregando soluções tampão BR (2,0 a 7,0).

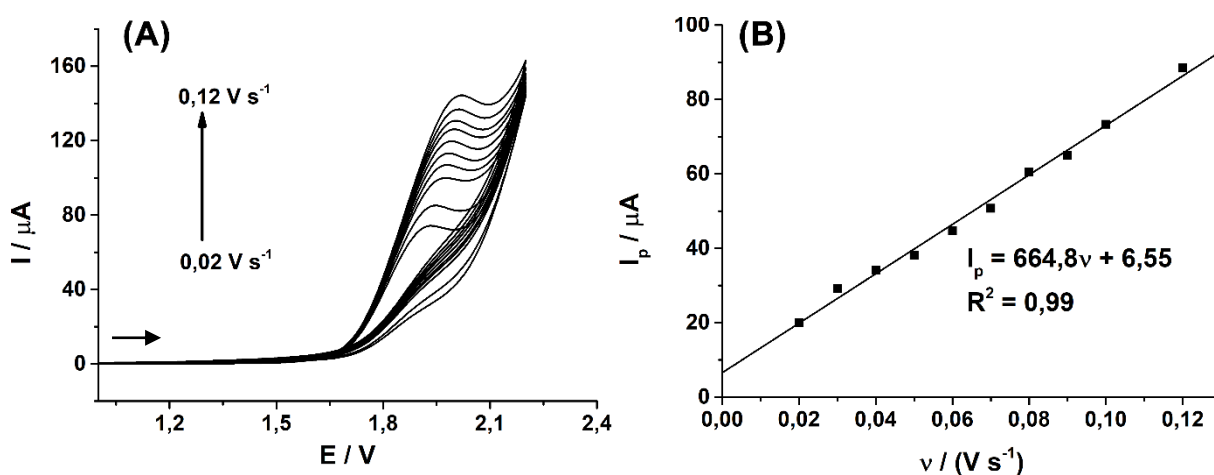
Figura 41. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 2 – 7) sem (linha preta) e com (linhas coloridas) a presença de 100 mg L⁻¹ de EFD. (B) Relação entre potencial (■) e corrente (●) de pico e pH para oxidação da EFD. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹, incremento de potencial: 5 mV.



Observando os voltamogramas obtidos na faixa de pH entre 2 e 7 para oxidação da EFD (Figura 41A), nota-se um aumento da corrente anódica até pH = 5, porém o aumento além deste valor provoca uma deformação no pico, sendo que para o valor de pH = 7 não pode ser observado um pico definido. O potencial de oxidação apresenta um pequeno deslocamento (≈ 10 mV) no sentido anódico até pH = 4 (Figura 41B) e depois sofre uma pequena diminuição. A corrente de oxidação da EFD foi maior em solução com pH 5 (+ 1,95 V). Por questões de economia e praticidade, a solução tampão ácido acético / acetato (HAc/Ac^-) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,75 foi testada e não foram observadas diferenças significativas entre os voltamogramas obtidos em solução tampão BR pH 5 e aqueles obtidos em tampão HAc/Ac^- . Dessa forma, a solução tampão HAc/Ac^- foi selecionada como eletrólito suporte para os experimentos seguintes.

Com a definição do eletrólito suporte, estudos foram realizados para a obtenção de informações a respeito do mecanismo de oxidação da EFD neste meio. A Figura 42A apresenta os voltamogramas obtidos para 100 mg L^{-1} de EFD em relação ao aumento da velocidade de varredura de $0,02 \text{ V s}^{-1}$ a $0,12 \text{ V s}^{-1}$.

Figura 42. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para 100 mg L^{-1} de EFD em tampão HAc/Ac^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em função da variação da velocidade de varredura. (B) Variação do I_p com a velocidade de varredura.

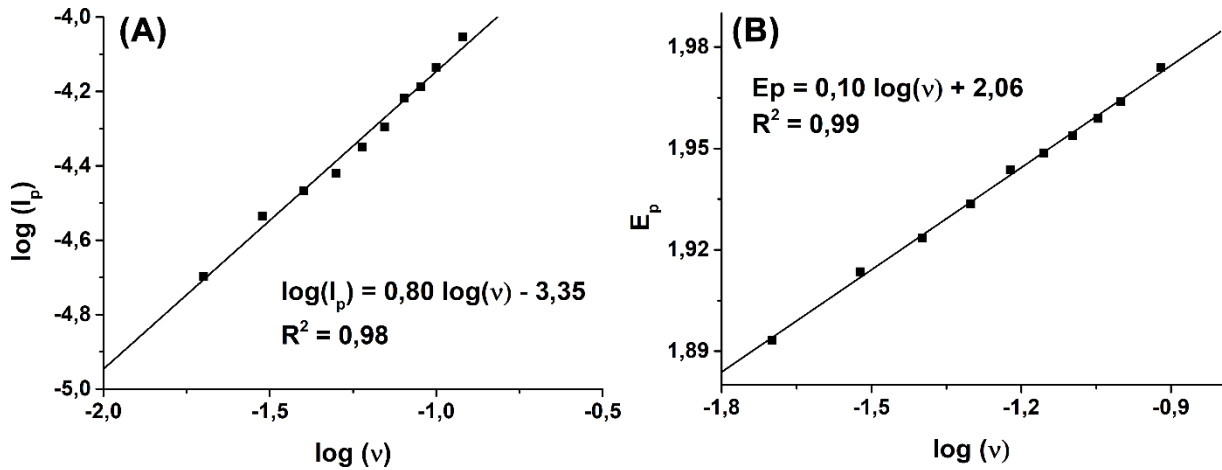


Através da variação da velocidade de varredura, várias informações podem ser extraídas. Inicialmente, a confirmação de um processo irreversível é dada pela ausência de pico de redução durante toda a varredura na direção catódica. Também se observa um deslocamento do potencial de pico para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, característica de sistemas irreversíveis (Figura 42A) [170].

Uma relação linear foi obtida entre a corrente de pico (I_p) e a variação da velocidade de varredura (v) (Figura 42B), indicando que o transporte de massa na oxidação da EFD é

controlado preferencialmente por adsorção. A Figura 43A e Figura 43B apresenta as relações entre o logaritmo da corrente de pico ($\log I_p$) e do potencial de pico (E_p) com o logaritmo da velocidade de varredura (v), respectivamente.

Figura 43. (A) Relação entre o logaritmo da corrente de pico ($\log I_p$) com o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). (B) Relação entre o potencial de pico (E_p) com o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$), para 100 mg L⁻¹ de EFD em tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L⁻¹.



A partir da Figura 43A observa-se um coeficiente angular de 0,80 para a relação $\log(I_p) \times \log(v)$. Segundo a literatura, valores próximos de 1 indicam a existência de processos controlados por adsorção [95,172]. Lançando mão destas informações (processo irreversível e adsorativo), o número de elétrons envolvidos na oxidação da EFD pode ser estimado utilizando a equação de Laviron [177], que relaciona a variação do potencial de pico (E_p) com $\log(v)$ (Figura 43B). Segundo Laviron, a relação entre E_p e $\log(v)$ é dada por:

$$E_p = E^{0'} + \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF}\right) \log\left(\frac{RTK^0}{\alpha nF}\right) - \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF}\right) \log(v) \quad \text{Eq. (8)}$$

Onde: R é a constante dos gases, T, a temperatura, F, a constante de Faraday, K^0 , a constante de velocidade heterogênea, v , a velocidade de varredura, α , o coeficiente de transferência de carga, n , o número de elétrons e $E^{0'}$ é o potencial formal. Na dependência entre potencial de pico (E_p) e logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$) apresentada na Figura 43B, se observou uma relação linear, com um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$) com a equação da reta apresentada abaixo:

$$E_p = 2,06 + 0,10 \log(v) \quad \text{Eq. (9)}$$

A partir desta relação, foi possível calcular o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação da EFD, aplicando-se o coeficiente angular obtido na Eq. (9) na Eq. (8), com $T = 298,15$ K, $R = 8,314$ J K⁻¹ mol⁻¹ e $F = 96485,3$ C mol⁻¹. Primeiramente, calculou-se o

valor de αn como sendo igual a 0,59. Considerando o coeficiente de transferência eletrônica (α) igual a 0,5 (moléculas orgânicas) [95], o número de elétrons envolvido na oxidação da EFD é igual a 1. Os resultados obtidos estão de acordo com mecanismos propostos anteriormente na literatura para a oxidação da EFD [65,90,178].

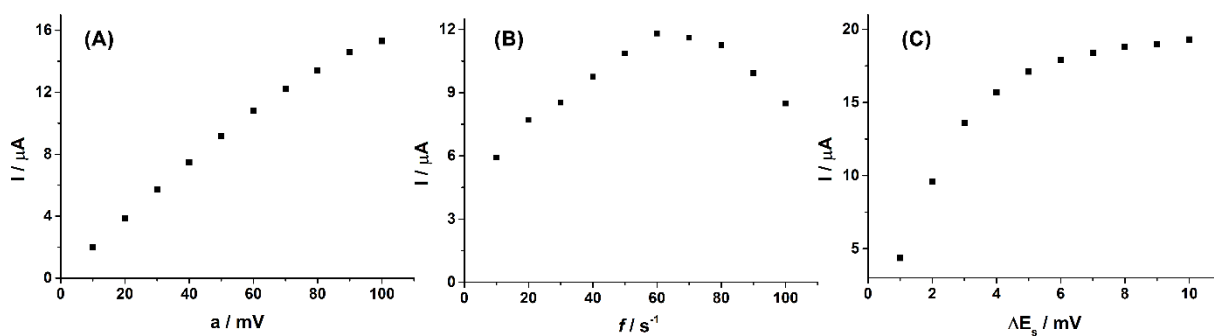
4.4.2. Estudo e otimização dos parâmetros de SWV

Para obtenção da melhor resposta, em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico, os seguintes parâmetros instrumentais foram otimizados para a técnica de SWV: amplitude de potencial (a), frequência (f) e incremento de potencial (ΔE_s).

Antes do início das varreduras por SWV, um potencial de condicionamento (0,0 V/5s) era aplicado ao eletrodo de BDD seguido por um tempo de equilíbrio de 5 s para estabilização da linha-base.

A amplitude foi avaliada dentro do intervalo de 10 a 100 mV mantendo-se os outros parâmetros constantes ($f = 50 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E = 2 \text{ mV}$). A influência da frequência foi avaliada no intervalo de 10 s^{-1} a 100 s^{-1} com amplitude de pulso e o incremento de varredura mantidos constantes em 50 mV e 2 mV, respectivamente. Da mesma forma, durante a otimização do incremento de potencial, manteve-se a amplitude constante em 50 mV e a frequência em 50 s^{-1} . A Figura 44 apresenta as relações da variação dos parâmetros supracitados com a corrente de pico (I_p).

Figura 44. Relações entre corrente de pico e variação (A) da amplitude (B) frequência de aplicação de pulso e (C) incremento de potencial. Concentração de EFD: 20 mg L^{-1} . Eletrólito: Tampão HAc/Ac⁻ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Analisando a Figura 44A, verifica-se que a corrente de oxidação da EFD aumenta com a amplitude em todo intervalo estudado, porém, como já discutido anteriormente, altos valores de amplitude e incremento podem provocar distorções nos picos detectados por SWV.

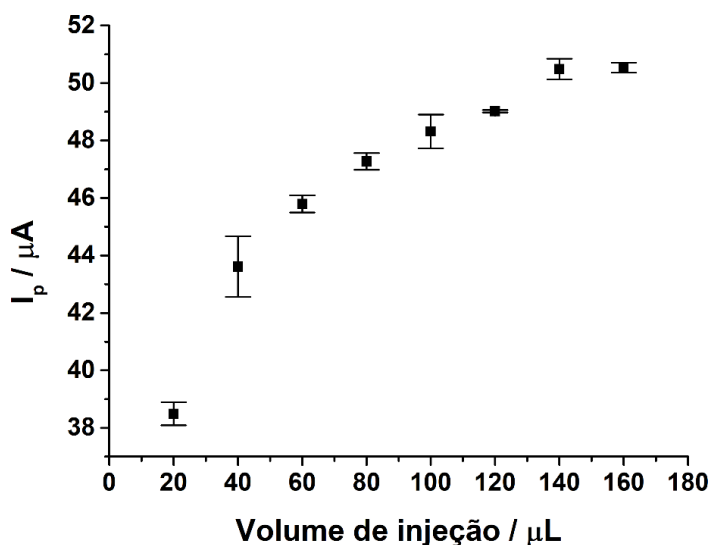
Dessa forma, o valor de 70 mV para a amplitude foi escolhido para os demais estudos. Na Figura 44B observa-se um aumento linear da corrente até o valor de 60 s^{-1} e, a partir desse valor houve um decréscimo na corrente de pico. Deste modo, o valor de 60 s^{-1} foi adotado nos estudos seguintes. Para o incremento de potencial (Figura 44C), o aumento provocado na corrente pelo aumento do incremento, se torna menos significativo a partir de 6 mV, sendo este valor selecionado para as medidas subsequentes realizadas por SWV.

4.4.3. Otimização dos parâmetros para o sistema BIA

Como a finalidade principal do trabalho é o desenvolvimento de um método rápido, robusto e prático para triagem de amostras para detecção da presença de EFD, os parâmetros SWV otimizados anteriormente foram utilizados durante a otimização dos parâmetros do sistema portátil BIA: volume e velocidade de injeção. As injeções neste sistema foram realizadas no final do período de equilíbrio descrito na seção anterior, aproximadamente dois segundos antes do início da varredura por SWV. Neste caso, a solução no interior da célula deve estar parada (sem agitação), permitindo assim, que a alíquota injetada permanecesse próxima a superfície do eletrodo durante toda a varredura. Uma descrição completa do procedimento foi realizada na seção 4.2.4 (pág. 57).

A otimização do volume de injeção foi realizada fixando uma velocidade de injeção ($78 \mu\text{L s}^{-1}$) e empregando o procedimento de injeção descrito anteriormente. A escolha foi feita avaliando-se o ganho de corrente no sinal de oxidação da EFD, visando uma melhor sensibilidade e precisão para sua detecção. A Figura 45 apresenta os resultados obtidos, em triplicata, para a variação da corrente de pico de oxidação de uma alíquota contendo 40 mg L^{-1} de EFD com o volume injetado.

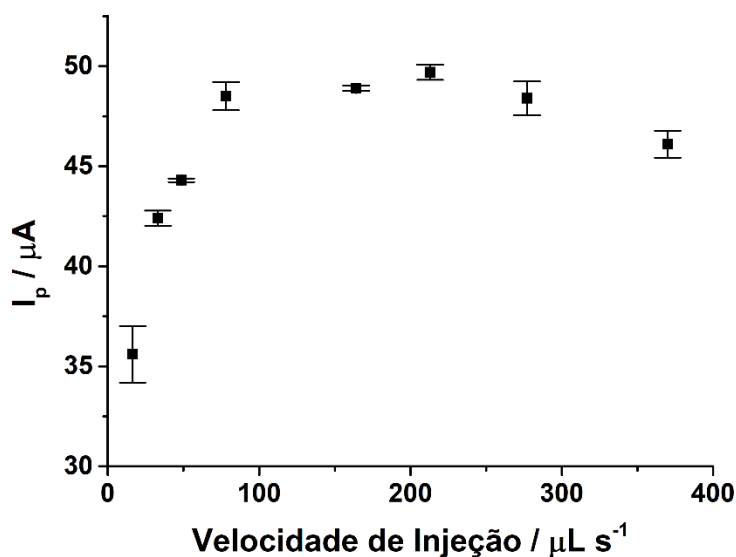
Figura 45. Variação da corrente de oxidação para 40 mg L⁻¹ de EFD em função do volume injetado no sistema BIA. Velocidade de injeção: 78 $\mu\text{L s}^{-1}$. Parâmetros SWV: $a = 70 \text{ mV}$; $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L⁻¹ pH = 4,75.



Através da Figura 45 pode-se observar que existe um aumento de corrente de oxidação da EFD em toda faixa de volume estudado. Porém, foi observado um desvio padrão menor na triplicata com o volume injetado de 120 μL . Desse modo, o volume de 120 μL foi selecionado para os estudos subsequentes.

Com o volume escolhido, foi otimizada a velocidade de injeção. A Figura 46 apresenta os resultados obtidos, em triplicata, para a variação da corrente de pico de oxidação de uma alíquota de 120 μL de solução contendo 40 mg L⁻¹ de EFD com a velocidade de injeção.

Figura 46. Variação da corrente de oxidação para 40 mg L⁻¹ de EFD em função da velocidade de injeção. Volume de injeção: 120 μL . Demais parâmetros: Ver Figura 45.

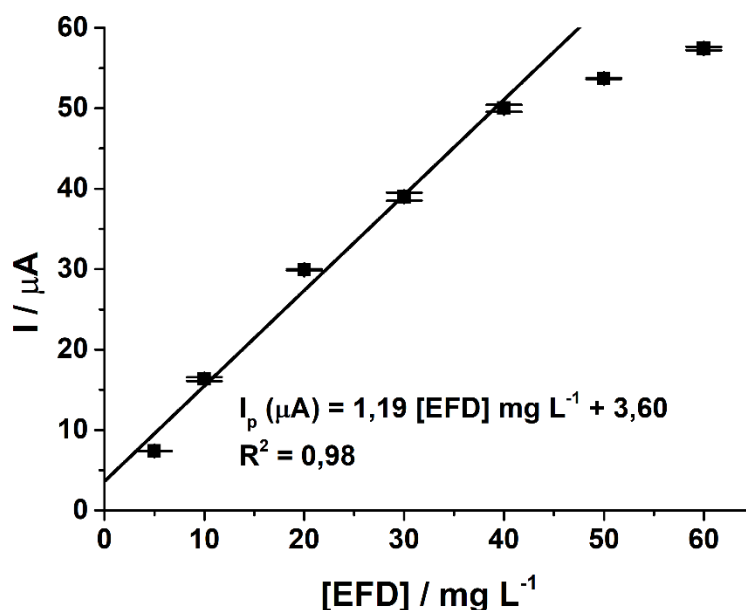


A Figura 46 mostra que com o aumento da velocidade de injeção entre 16,5 e 213 $\mu\text{L s}^{-1}$ ocorre um aumento da corrente de pico detectada para a EFD. Em velocidades maiores, esse valor começa a decrescer. Devido ao menor desvio padrão das medidas, o valor de 164 $\mu\text{L s}^{-1}$ foi selecionado pra os testes seguintes.

4.4.4. Faixa linear

Após otimização dos parâmetros do sistema BIA, estudos para determinação da faixa linear de trabalho, onde existe uma relação linear entre a altura dos picos obtidos por SWV e a concentração de EFD, foram realizados para o sistema BIA-SWV. A Figura 47 apresenta a relação entre as correntes de picos obtidas a partir de injeções de concentrações crescentes (5 a 60 mg L^{-1}) de EFD.

Figura 47. Relação entre corrente de pico (I_p) e aumento da concentração de EFD. Volume injetado: 120 μL ; Velocidade de injeção: 164 $\mu\text{L s}^{-1}$; $f = 60 \text{ s}^{-1}$; $a = 70 \text{ mV}$; $\Delta = 6 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L^{-1} pH = 4,75.



A partir da Figura 47, observou-se uma relação linear entre 5 e 40 mg L^{-1} de EFD usando sistema BIA-SWV com parâmetros otimizados representada pela equação:

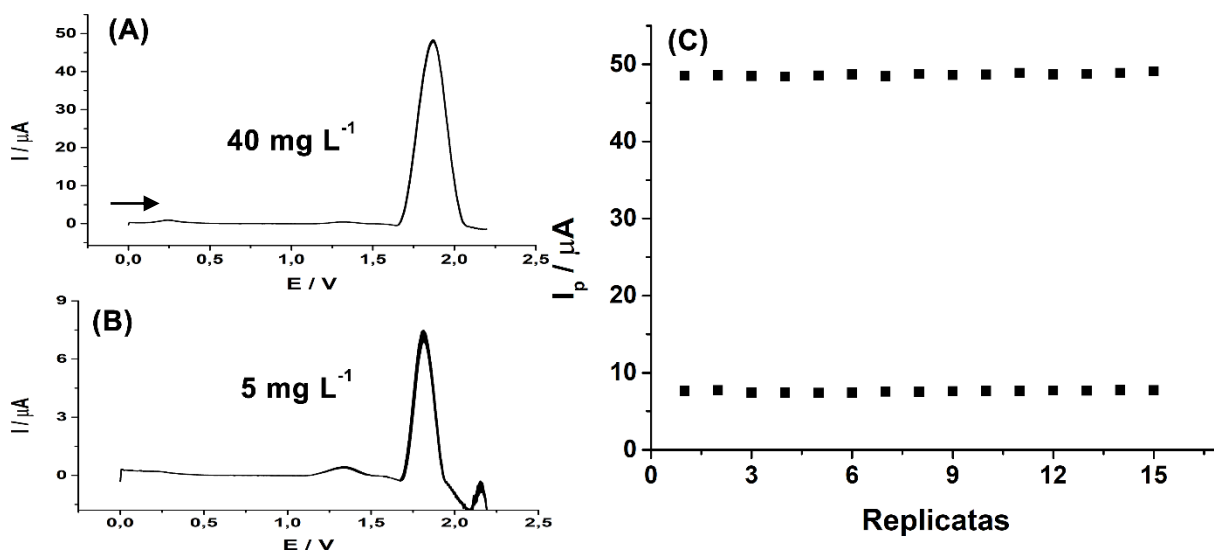
$$I_p (\mu\text{A}) = 1,19 \pm 0,07 [\text{COC}] \text{ mg L}^{-1} + 3,60 \pm 0,18$$

Nessas condições, o limite de detecção (LD) calculado para EFD foi de 0,13 mg L^{-1} e o limite de quantificação em 0,43 mg L^{-1} .

4.4.5. Repetibilidade e reprodutibilidade

A avaliação da repetibilidade do método BIA-SWV, foi realizada com 15 injeções sucessivas (precisão intradia) de soluções contendo EFD em duas concentrações diferentes (40 e 5 mg L⁻¹). A maior e a menor concentração da faixa linear de trabalho. Na Figura 48 são apresentados os resultados obtidos:

Figura 48. (A) Voltamogramas sobrepostos obtidos por BIA-SWV para 15 injeções consecutivas de uma solução contendo 40 mg L⁻¹ ou 5 mg L⁻¹ de EFD. (B) Correntes de pico obtidas para as injeções sucessivas. Condições experimentais: Ver Figura 47.

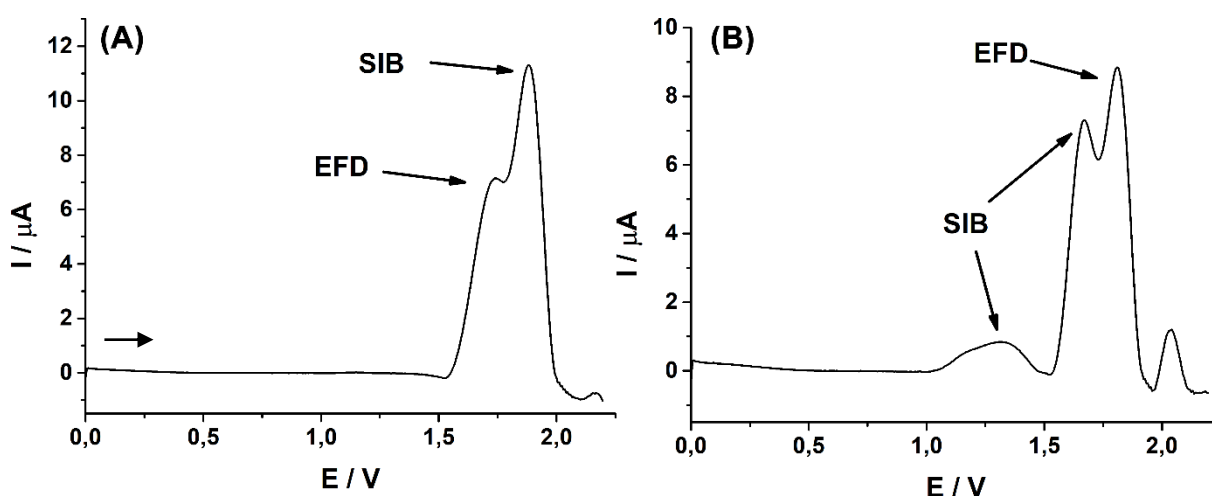


Os resultados na Figura 48A mostram que todos os voltamogramas possuem o mesmo perfil, mesmo após 15 varreduras consecutivas, ainda é possível perceber a ausência de qualquer tendência ou contaminação da superfície do eletrodo. O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado em 1,7% e 0,4% (n = 15) para 5 mg L⁻¹ e 40 mg L⁻¹ de EFD, respectivamente. A variação de medidas realizadas em dias diferentes foi calculada utilizando o DPR de valores de corrente obtidos para concentrações iguais de EFD ao longo de um mês, sendo o valor calculado em 9,8 % (n = 5), indicando excelente estabilidade inter-dias do método BIA-SWV.

4.4.6. Testes de interferência

Como foi apresentado até agora neste trabalho, a oxidação da EFD e da SIB ocorrem em potenciais próximos. Não foi encontrado na literatura situações onde EFD e SIB foram detectadas em uma mesma amostra. Contudo, este estudo foi realizado numa possível situação onde EFD e SIB pudessem estar presentes na mesma amostra. O teste de interferência foi realizado a partir de soluções contendo uma mistura de SIB e EFD, ambas 10 mg L^{-1} . Duas misturas foram preparadas com diluição nos eletrólitos suportes otimizados para cada analito (H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para SIB e tampão HAc/Ac^- para EFD). Uma varredura por SWV foi realizada com cada mistura, uma com todas as condições otimizadas para SIB, em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 49A) e, a outra, nas condições otimizadas para EFD, em meio de tampão HAc/Ac^- (Figura 49B).

Figura 49. Voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir de soluções contendo misturas de SIB e EFD 10 mg L^{-1} cada nas condições otimizadas para (A) SIB (Ver Figura 36, pág. 78) e (B) EFD (Ver Figura 47, pág 91)

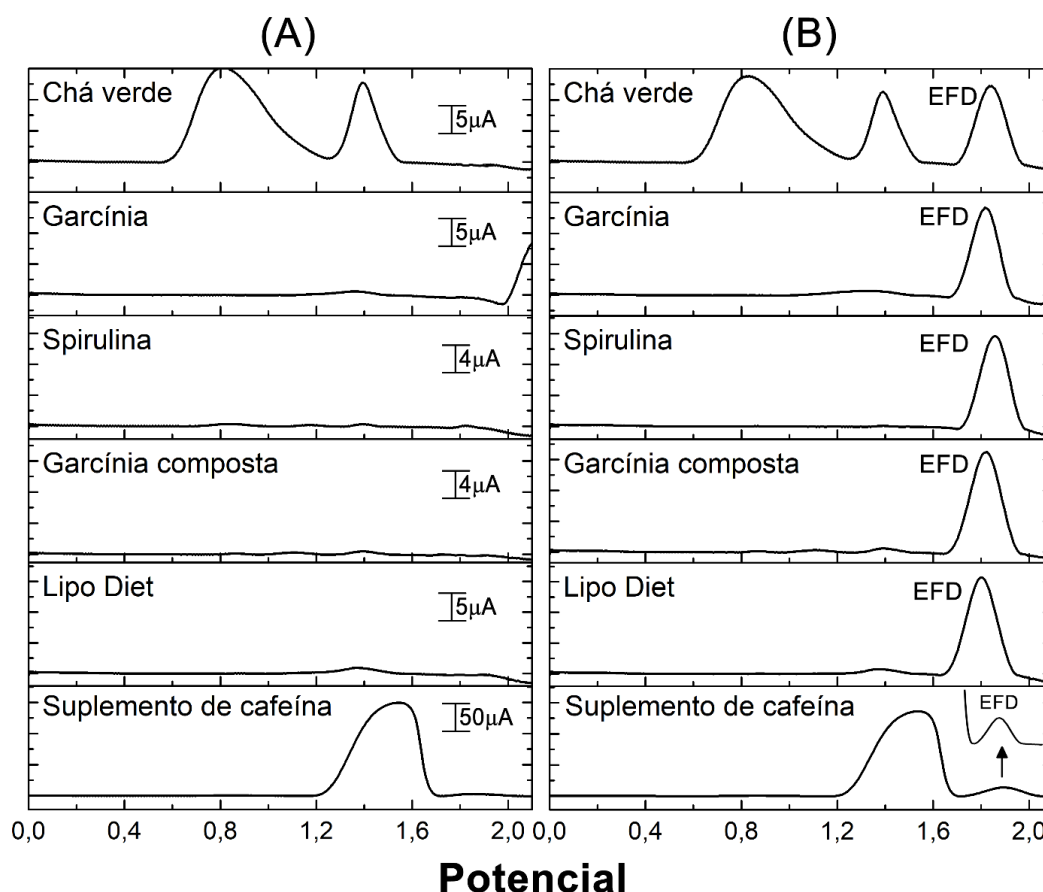


A Figura 49 mostra que SIB e EFD possuem picos parcialmente sobrepostos nas duas condições estudadas, porém, é possível obter informações sobre a presença de um ou os dois compostos. Estes estudos mostram que é possível a identificação de SIB na presença de EFD e vice-versa. Na hipótese da presença das duas substâncias em uma mesma amostra, um processo de deconvolução poderia ser usado para a determinação de cada espécie separadamente [179]. No entanto, este estudo não foi realizado.

4.4.7. Detecção de efedrina em suplementos alimentares, fitoterápicos e urina sintética

Com a definição dos parâmetros BIA-SWV e das melhores condições de trabalho, os estudos foram direcionados para a identificação da EFD em amostras de suplementos alimentares e fitoterápicos. A Figura 50A apresenta os voltamogramas obtidos com o sistema BIA-SWV para 6 amostras reais que foram adequadamente dissolvidas no eletrólito suporte de tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L⁻¹. A Figura 50B apresenta os voltamogramas para as mesmas amostras preparadas da mesma forma, porém, fortificadas antes com 1 % (m/m) de EFD.

Figura 50. Voltamogramas de onda quadrada de soluções contendo amostras reais adequadamente diluídas em tampão HAc/Ac⁻ 0,1 mol L⁻¹ antes (A) e após (B) adição de 1 % de EFD (m/m). Composição das amostras: Ver Tabela 4 (pág. 39). Demais parâmetros experimentais: Ver Figura 47.

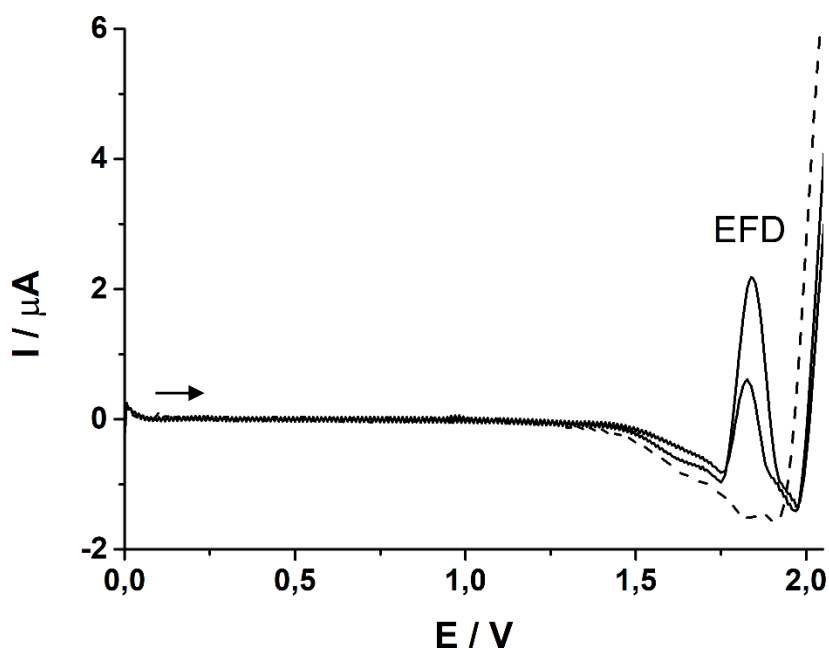


Observando a Figura 50A, nota-se que os perfis voltamétricos das amostras estudadas não apresentam picos na região acima de +1,80 V. No entanto, as mesmas amostras, após dopagem com 1% de EFD, passam a apresentar um pico de oxidação por volta de +1,85 V relacionado com a oxidação da EFD (Figura 50B). Estes resultados comprovam que o método

desenvolvido pode ser empregado na identificação de EFD nestes tipos de amostras, mesmo em pequenas quantidades (1%; m/m). Neste estudo, as concentrações finais (após diluição) detectadas nas amostras foram de 10 mg L^{-1} de EFD. Esta concentração detectada nos suplementos ou fitoterápicos torna o método bastante interessante para aplicações forenses, tanto criminais (adulterações), como no esporte, visto que o valor máximo permitido em exames antidoping, segundo a Agência Mundial Antidoping, é de 10 mg L^{-1} [56]. A taxa de excreção de EFD inalterada na urina é de 60 % [64,65]. Assim, para detecção de 10 mg L^{-1} de EFD na urina seria necessário a ingestão de uma dose de, no mínimo, 16 mg L^{-1} , o que torna a detecção de 10 mg L^{-1} adequada para esse tipo de aplicação.

Nesse contexto, o sistema BIA-SWV desenvolvido também foi empregado para detecção de EFD em uma amostra de urina sintética. Duas alíquotas da amostra foram fortificadas com concentrações diferentes de EFD (10 e 20 mg L^{-1}). As amostras foram então diluídas (50:50; v/v) em eletrólito suporte com concentração dobrada (Tampão HAc/Ac⁻ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,75). As concentrações finais de EFD utilizadas neste estudo foram, portanto, de 5 e 10 mg L^{-1} . A Figura 51 apresenta os voltamogramas obtidos.

Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada de soluções contendo urina sintética diluída em tampão HAc/Ac⁻ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ antes (---) e após (—) fortificação com duas concentrações diferentes de EFD. Concentração final de EFD: 5 e 10 mg L^{-1} . Demais parâmetros experimentais: Ver Figura 47.



A partir da Figura 51, pode-se observar que a EFD foi detectada nas amostras de urina sintética com uma simples diluição 1:1 no eletrólito suporte. Não foi observado nenhum

sinal de oxidação de compostos presentes na amostra. Entretanto, pode ser notada uma perda significativa de sensibilidade, esta perda pode ser devida à grande variação na composição do eletrólito suporte com a adição da urina fortificada. Apesar da diminuição da sensibilidade, a detecção de 10 mg L^{-1} de EFD na amostra foi possível mesmo após a diluição, demonstrando a adequação do método BIA-SWV desenvolvido para detecção de EFD em urina dentro dos limites máximos estabelecidos pela WADA [56].

Os dados apresentados nesta seção mostram que o método BIA-SWV apresenta características que possibilitam análises sequenciais rápidas (~ 30 análises por hora), além de portabilidade e robustez. Adicionalmente, são métodos simples, rápidos e de baixo-custo, que podem ser facilmente adaptados para análises de rotina em laboratório com pouca infraestrutura.

4.4.8. Quantificação de efedrina em amostras de suplementos alimentares

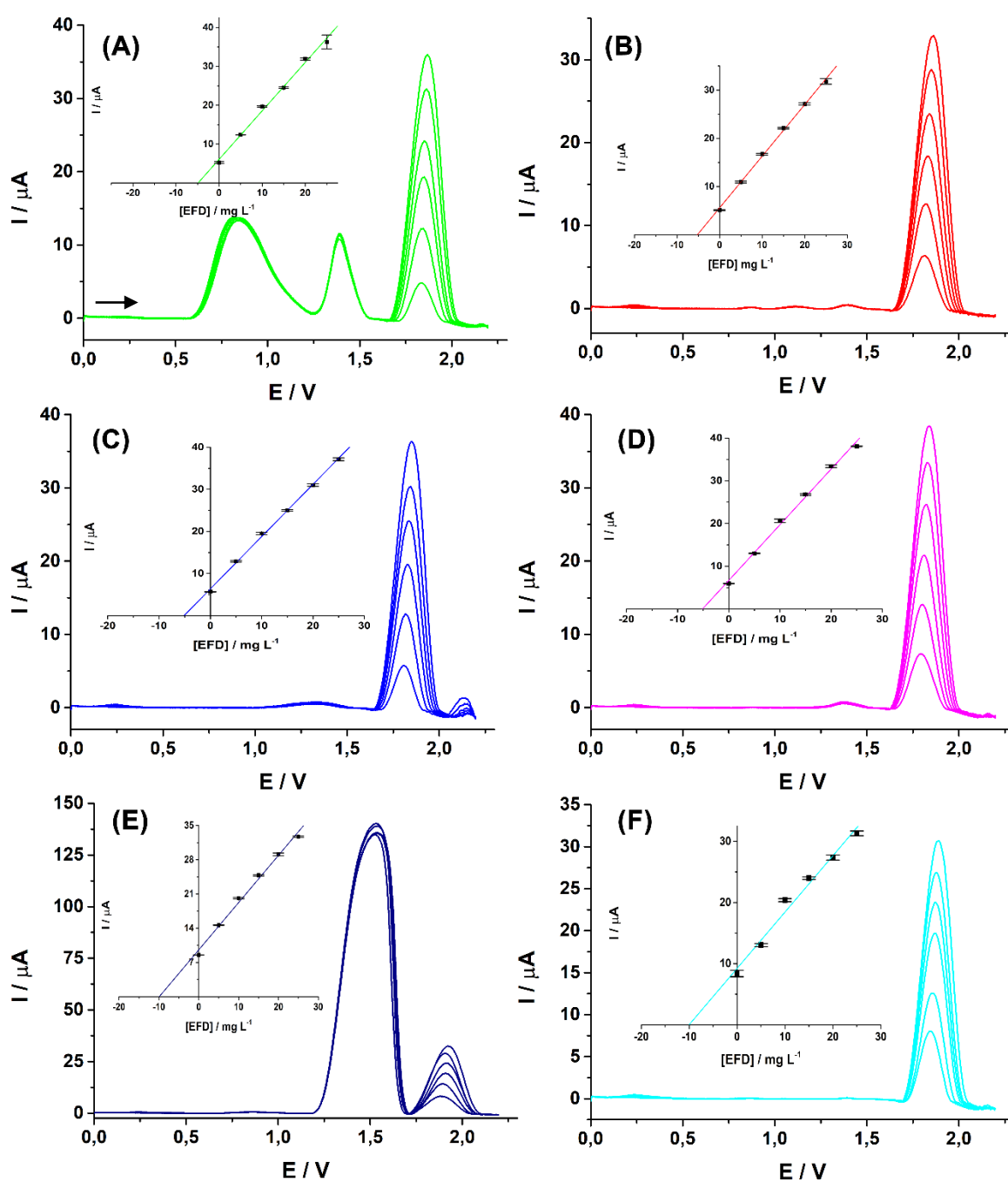
Além da aplicação em processos de triagem rápida ou “*screening*” sugerida para o método BIA-SWV desenvolvido, sua funcionalidade também foi testada para a quantificação de EFD nas amostras empregando o método de adição de padrão, uma vez que um possível efeito de matriz pode ser evitado, além de algum efeito advindo do próprio sistema de análise como, por exemplo, a regressão da faixa linear não cruzar a origem. Utilizando os parâmetros otimizados anteriormente e levando em consideração a faixa linear obtida (5 a 40 mg L^{-1}), seis curvas analíticas usando método de adição de padrão para diferentes amostras foram construídas. A Figura 52 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curvas de calibração obtidas para soluções de amostras dopadas antes e após a adições sucessivas de padrões de EFD (método de adição de padrão).

As curvas de calibração apresentadas na Figura 52 foram construídas em uma faixa de concentração menor ($5 - 25 \text{ mg L}^{-1}$) que a faixa linear para garantir que o comportamento fosse linear, mesmo na presença de uma amostra, durante todo o intervalo utilizado. As equações para cada curva de calibração são apresentadas a seguir:

- Chá verde: $I (\mu\text{A}) = 1,25 [\text{EFD}] (\text{mg L}^{-1}) + 6,07, R^2 = 0,99;$
- Garcínia composta: $I (\mu\text{A}) = 1,13 [\text{EFD}] (\text{mg L}^{-1}) + 5,89, R^2 = 0,99;$
- Garcínia: $I (\mu\text{A}) = 1,24 [\text{EFD}] (\text{mg L}^{-1}) + 6,35, R^2 = 0,99;$

- Lipo Diet: $I (\mu\text{A}) = 1,30 [\text{EFD}] (\text{mg L}^{-1}) + 6,68$, $R^2 = 0,99$;
- Suplemento de cafeína: $I (\mu\text{A}) = 0,97 [\text{EFD}] (\text{mg L}^{-1}) + 9,57$, $R^2 = 0,99$;
- Spirulina: $I (\mu\text{A}) = 0,92 [\text{EFD}] (\text{mg L}^{-1}) + 9,22$, $R^2 = 0,98$;

Figura 52. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para seis soluções de amostras dopadas, antes e após cinco adições de padrão de EFD para (A) Chá verde; (B) Garcínia composta; (C) Garcínia; (D) Lipo Diet; (E) Suplemento de cafeína e (F) Spirulina, com as respectivas curvas de calibração. Condições experimentais: Ver Figura 47.



Os estudos de adição e recuperação nas amostras apresentaram resultados que variaram de 97 a 104%, com desvios padrões relativos menores que 3%. Todas as amostras foram dopadas com baixas quantidades (1%; m/m) e o método se mostrou eficiente para quantificação de pequenas concentrações de EFD (5 mg L^{-1}) em amostras complexas (suplementos alimentares e fitoterápicos usados para emagrecimento). A sensibilidade média para todas as amostras estudadas foi de $1,14 \pm 0,16 (\mu\text{A} / \text{mg L}^{-1})$, sendo a melhor sensibilidade obtida para a amostra de Lipo Diet[®] ($1,30 \mu\text{A} / \text{mg L}^{-1}$) e a menor com valor de $0,92 \mu\text{A} / \text{mg L}^{-1}$ para Spirulina, mostrando pouca variação apesar das diferentes complexidades de cada amostra, atestando a robustez do método. Adicionalmente, a detecção e quantificação de efedrina em amostras de suplemento foi realizada pela primeira vez empregando técnicas eletroquímicas. Os resultados obtidos são comparáveis em seletividade e limites de detecção com métodos empregando técnicas tradicionais como cromatografia [180,181], eletroforese capilar [182] e espectrofotometria [183], que também analisaram efedrina em suplementos alimentares.

A quantificação de EFD em urina apresentou resultados de recuperação abaixo do esperado ($\sim 60\%$). A modificação na composição do eletrólito suporte devido a grande quantidade de amostra presente após a diluição pode ter causado algum efeito na faixa linear do método proposto. Portanto, a quantificação de EFD neste tipo de matriz não foi possível somente com a simples diluição proposta neste trabalho. No entanto, o método se mostrou bastante efetivo para uma triagem rápida com a finalidade de detectar a presença de EFD em baixas concentrações.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A voltametria de onda quadrada mostrou-se uma ferramenta bastante interessante para aplicações em análises e processos de triagem ou “*screening*” de amostras forenses. O uso de BDD como eletrodo de trabalho em meios ácidos proporcionou uma ampla faixa de potencial de trabalho, permitindo assim análises rápidas e simples de vários compostos simultaneamente, constituindo assim uma grande alternativa aos métodos atuais usados para triagem ou análise preliminar de amostras forenses.

Os métodos de análise desenvolvidos que empregam o sistema BIA-SWV, mostraram-se bastante robustos. Os parâmetros de injeção, como volume e velocidade de injeção são automaticamente controlados e fixados pela pipeta eletrônica, tornando o

procedimento de injeção, ainda que não automático, muito reproduzível. Além disso, é possível a análise rápida e sequencial de um grande número de amostras sem necessidade de troca de eletrólito suporte. Os métodos desenvolvidos requerem mínima manipulação da amostra (apenas dissolução em uma quantidade adequada de eletrólito), empregam pequenos volumes e podem ser aplicados em análises fora do laboratório.

O método BIA-SWV para triagem e quantificação de cocaína em amostras apreendidas mostrou-se seletivo, no sentido de que possibilita a detecção de cocaína na presença de todos os principais adulterantes encontrados. O método possui boa repetibilidade e reprodutibilidade, além de permitir a detecção de cocaína mesmo com grande quantidade de adulterantes eletroativos. Para a quantificação, um baixo limite de detecção ($0,27 \text{ mg L}^{-1}$) foi alcançado em um eletrodo sem modificações químicas complexas da sua superfície. Além disso uma segunda alternativa é demonstrada para a triagem de amostras apreendidas, o uso de BIA-MPA mostrou-se simples e eficiente, com possibilidade de um aumento ainda maior na frequência de análises. Todas estas características, no contexto forense, tornam o método mais seletivo que os testes preliminares tradicionalmente em uso e mais acessível que aqueles empregados para análises definitivas.

O uso da SWV também foi demonstrado com sucesso no desenvolvimento de um método que permite a identificação de SIB e EFD em amostras de diferentes complexidades, a detecção foi possível em amostras extremamente complexas como multivitamínicos ou urina, como também em amostras de fitoterápicos. A quantificação foi bem-sucedida mesmo em amostras que possuem uma alta concentração de possíveis interferentes com no suplemento de cafeína, que possuía uma concentração de cafeína dezenas de vezes maior que a de SIB ou EFD. Ainda, a associação do método SWV com o sistema BIA apresentou a mesma eficiência para a triagem de amostras com um ganho na portabilidade e na velocidade de análise. Os baixos níveis de concentração estudados tornam o método uma promissora ferramenta para aplicações forenses criminais, como a determinação de adulterações e/ou falsificações. A detecção de níveis de EFD abaixo do máximo estabelecido pela regulamentação antidoping, na urina, torna o método uma possibilidade simples, de relativo baixo custo e atrativa para exames desta natureza.

6. PERSPECTIVAS

Destaca-se como perspectivas deste trabalho:

- Aplicar o método acoplado o sistema BIA e as técnicas voltamétricas para análise de outras amostras de drogas ilícitas (como por exemplo, anfetaminas) e possíveis adulterantes encontrados em amostras reais;
- Utilizar do sistema BIA-SWV para determinação de outros adulterantes (como fluoxetina) em amostras de medicamentos naturais ou fitoterápicos;
- Aprofundar os estudos utilizando o sistema BIA acoplado BDD para determinação de cocaína na presença de levamisol;
- Estudos para determinação simultânea de adulterantes de classes farmacológicas similares, como diuréticos, em amostras de suplementos alimentares;
- Análise simultânea de efedrina, cafeína e aspirina (ECA) em amostras de suplementos para atletas.
- Estudos para preparos de amostra com o intuito de quantificar substâncias proibidas no esporte em amostras biológicas para aplicações em testes simples, de baixo custo e portáteis de análise;
- Realizar testes comparativos entre os métodos eletroanalíticos e os cromatográficos, espectrométricos, eletroforéticos ou espectrométricos.

7. REFERÊNCIAS

- [1] ROMÃO, W. et al. Química forense: Perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1717–1728, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000005>
- [2] BELL, S. Forensic Chemistry. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 297–319, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-060908-155251>
- [3] FARIAS, R. F. DE. **Introdução à Química Forense**. 2ª Edição ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.
- [4] GROBÉRIO, T. S. **Desenvolvimento de uma metodologia para comparação de amostras de sal de cocaína pela determinação de solventes residuais e análise quimiométrica**. 2012. 112 f. Universidade de Brasília. 2012.
- [5] SHIBUYA, E. K. et al. Multivariate classification based on chemical and stable isotopic profiles in sourcing the origin of marijuana samples seized in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 205–214, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100024>
- [6] ZACCA, J. J. et al. Brazilian Federal Police drug chemical profiling - the PeQui project. **Science & justice : journal of the Forensic Science Society**, v. 54, n. 4, p. 300–6, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.02.008>
- [7] COSTA, José Luiz da. **Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense**. 2008. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade of São Paulo, São Paulo, 2008. <https://doi.org/10.11606/T.46.2008.tde-23092008-104730>
- [8] BRUNI, A. T.; VELHO, J. A.; OLIVEIRA, M. F. DE. Fundamentos de Química Forense—uma análise prática da química que soluciona crimes. **Millennium editora**, p. 18–31, 2012.
- [9] TENÓRIO MEDEIROS, K. et al. Representações sociais do uso e abuso de drogas entre familiares de usuários. **Psicologia em estudo**, v. 18, n. 2, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-73722013000200008>.
- [10] UNODC. **World drug report 2017**. Vienna: United Nations Office on Drugs and Crime Vienna, 2017.
- [11] UNODC. Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials. **United Nations Office of Drugs and Crime**, p. 23, 2012.
- [12] NEERMAN, M. F. Drugs of abuse: Analyses and ingested agents that can induce interference or cross-reactivity. **Laboratory Medicine**, v. 37, n. 6, p. 358–361, 1 Jun. 2006. <https://doi.org/10.1309/RFNPK0RJGFCV2QM5>

- [13] SWIATKO, J.; FOREST, P. R. DE; ZEDECK, M. S. Further studies on spot tests and microcrystal tests for identification of cocaine. **J Forensic Sci**, v. 48, n. 3, p. 581–585, 1 May 2003. <https://doi.org/10.1520/JFS2002149>.
- [14] SWGDRUG. **Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Recommendations**, 2016. Disponível em: <<http://www.swgdrug.org/>>. Acesso em: 13 jun. 2018
- [15] ASTM. Standard Practice for Identification of Seized Drugs. **ASTM International**, p. 3–4, 2015.
- [16] BROSEÚS, J. et al. Qualitative, quantitative and temporal study of cutting agents for cocaine and heroin over 9 years. **Forensic Science International**, v. 257, p. 307–313, 1 Dec. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.09.014>
- [17] NEVES, Gustavo de Oliveira. **Caracterização de amostras de cocaína apreendida pela polícia civil do estado de Rondônia**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2013.
- [18] CARVALHO, D. G. DE; MÍDIO, A. F. Quality of cocaine seized in 1997 in the street-drug market of São Paulo city, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 71–75, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000100007>
- [19] BERNARDO, N. P. et al. Caffeine and other adulterants in seizures of street cocaine in Brazil. **International Journal of Drug Policy**, v. 14, n. 4, p. 331–334, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0955-3959\(03\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0955-3959(03)00083-5)
- [20] MAIETTI, S. et al. Cocaine adulterants used as marker compounds. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 7, p. 1124–1126, 2009. <https://doi.org/10.1002/jms.1578>
- [21] COLE, C. et al. Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. **Drug Testing and Analysis**, v. 3, n. 2, p. 89–96, 2011. <https://doi.org/10.1002/dta.220>
- [22] CHANG, A.; OSTERLOH, J.; THOMAS, J. Levamisole: A Dangerous New Cocaine Adulterant. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 3, p. 408–411, 28 Sep. 2010. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.156>
- [23] JONG, M. DE et al. Electrochemical fingerprint of street samples for fast on-site screening of cocaine in seized drug powders. **Chemical Science**, v. 7, n. 3, p. 2364–2370, 2016. <https://doi.org/10.1039/C5SC04309C>
- [24] BOTELHO, É. D. et al. Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 4, p. 611–618, 2014. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140008>
- [25] PAGANO, B. et al. Use of NMR in profiling of cocaine seizures. **Forensic Science International**, v. 231, n. 1–3, p. 120–124, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.04.028>

- [26] JONG, M. DE et al. Levamisole: A Common Adulterant in Cocaine Street Samples Hindering Electrochemical Detection of Cocaine. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 8, p. 5290–5297, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00204>
- [27] PENIDO, C. A. F. O. et al. Identification of different forms of cocaine and substances used in adulteration using near-infrared raman spectroscopy and infrared absorption spectroscopy. **Journal of Forensic Sciences**, v. 60, n. 1, p. 171–178, 2015. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12666>
- [28] MALDANER, A. O. et al. Chemical Profiling of Street Cocaine from Different Brazilian Regions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 4, p. 719–726, 2015. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150321>
- [29] WÄGLI, P. et al. Microfluidic droplet-based liquid-liquid extraction and on-chip IR spectroscopy detection of cocaine in human saliva. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 15, p. 7558–7565, 2013. <https://doi.org/10.1021/ac401606p>
- [30] SANTOS, H. et al. Quantification of cocaine and its adulterants (lidocaine and levamisole) using the Dragendorff reagent allied to paper spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, n. 24, p. 3662–3668, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7AY00588A>
- [31] LAWTON, Z. E. et al. Analytical Validation of a Portable Mass Spectrometer Featuring Interchangeable, Ambient Ionization Sources for High Throughput Forensic Evidence Screening. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, n. 6, p. 1048–1059, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1562-2>
- [32] OIYE, É. N. et al. Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a cobalt hexacyanoferrate film-modified electrode. **Forensic Science International**, v. 192, n. 1–3, p. 94–97, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.08.004>
- [33] BALBINO, M. A. et al. Use of screen-printed electrodes for quantification of cocaine and Δ^9 -THC: adaptations to portable systems for forensic purposes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2435–2443, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10008-016-3145-3>
- [34] ARAUJO, W. R. DE et al. Portable analytical platforms for forensic chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1034, p. 1–21, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.014>
- [35] SALLES, M. O. et al. Development of a Molecularly Imprinted Modified Electrode to Evaluate Phenacetin Based on the Preconcentration of Acetaminophen. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 54–61, 2015. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150240>

- [36] ASTURIAS-ARRIBAS, L. et al. Electrochemical determination of cocaine using screen-printed cytochrome P450 2B4 based biosensors. **Talanta**, v. 105, p. 131–134, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.078>
- [37] ASTURIAS-ARRIBAS, L. et al. CYP450 biosensors based on screen-printed carbon electrodes for the determination of cocaine. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, n. 1, p. 15–20, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.006>
- [38] ASTURIAS-ARRIBAS, L. et al. Sensitive and selective cocaine electrochemical detection using disposable sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 834, n. 1, p. 30–36, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.012>
- [39] GARRIDO, J. M. P. J. et al. Carbon nanotube β -cyclodextrin-modified electrode for quantification of cocaine in seized street samples. **Ionics**, v. 22, n. 12, p. 2511–2518, 2016.
- [40] MUZETTI RIBEIRO, M. F. et al. Voltammetric Determination of Cocaine Using Carbon Screen Printed Electrodes Chemically Modified with Uranyl Schiff Base Films. **Electroanalysis**, v. 28, n. 2, p. 320–326, 2016. <https://doi.org/10.1002/elan.201500372>
- [41] OLIVEIRA, L. S. IQUEIRA DE et al. Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a carbon paste electrode modified with different [UO₂(X-MeOsalen)(H₂O)] H₂O complexes. **Sensors**, v. 13, n. 6, p. 7668–7679, 2013. <https://doi.org/10.3390/s130607668>.
- [42] JONG, M. DE et al. Tackling Poor Specificity of Cocaine Color Tests by Electrochemical Strategies. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 11, p. 6811–6819, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00876>
- [43] FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T. et al. Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples. **Electroanalysis**, v. 3, n. 4–5, p. 409–412, 1991. <https://doi.org/10.1002/elan.1140030427>
- [44] FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCÍA, A. Flow injection analysis with amperometric detection of cocaine in confiscated samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 328, n. 1, p. 67–71, 1996. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(96\)00105-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(96)00105-5)
- [45] WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World Health Organization obesity and overweight fact sheet**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 11 jun. 2018.
- [46] MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Pharmacological treatment of obesity. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 50, n. 2, p. 377–389, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000200024>
- [47] FDA. **Drug Safety and Availability - Questions and Answers: FDA Recommends Against the Continued Use of Meridia (sibutramine)**. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm228746.htm>>. Acesso em: 24 out. 2017.

[48] EMA. European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorisations for sibutramine. **European Medicines Agency**, v. 44, n. 01, p. 1–2, 2010.

[49] LIU, Y.; LU, F. Adulterated pharmaceutical chemicals in botanical dietary supplements: novel screening approaches. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, n. 3, 2017. <https://doi.org/10.1515/revac-2016-0032>

[50] CALAHAN, J. et al. Chemical Adulterants in Herbal Medicinal Products: A Review. **Planta Medica**, v. 82, n. 06, p. 505–515, 2016. <https://doi.org/10.1055/s-0042-103495>

[51] MATHON, C. et al. Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 31, n. 1, p. 15–20, 2014. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.861934>

[52] DOMÉNECH-CARBÓ, A. et al. Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 194–204, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.10.031>

[53] SHI, Y. et al. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7655–7662, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.038>

[54] ARIBURNU, E. et al. Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 64–65, p. 77–81, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.004>

[55] FDA. **Meridia® label**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020632s032lbl.pdf>. Acesso em: 24 oct. 2017.

[56] WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **Standard Prohibited List, International Standard**. p. 1–9, 2017.

[57] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO - RDC No 133, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2016. **Diário Oficial da União**, v. 241, n. 1, p. 201, 2016.

[58] CARVALHO, L. M. DE et al. Determination of synthetic pharmaceuticals in phytotherapeutics by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection (CZE-C4D). **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 114–119, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.006>

[59] KESTING, J. R.; HUANG, J.; SØRENSEN, D. Identification of adulterants in a Chinese herbal medicine by LC–HRMS and LC–MS–SPE/NMR and comparative in vivo study with

standards in a hypertensive rat model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 3, p. 705–711, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.043>

[60] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução DC/ANVISA Nº 66 DE 18/03/2016. **Diário Oficial da União**, v. 54, p. 28, 2016.

[61] BELL, D. G.; JACOBS, I. Combined caffeine and ephedrine ingestion improves run times of Canadian Forces Warrior Test. **Aviation, space, and environmental medicine**, v. 70, n. 4, p. 325–329, 1999.

[62] GRAHAM, T. E. Caffeine, Coffee and Ephedrine: Impact on Exercise Performance and Metabolism. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 26, n. S1, p. S186–S191, 2001. <https://doi.org/10.1139/h2001-046>

[63] HALLER, C. A.; BENOWITZ, N. L. Adverse Cardiovascular and Central Nervous System Events Associated with Dietary Supplements Containing Ephedra Alkaloids. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 25, p. 1833–1838, 2000. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012213432502>

[64] HERNANDEZ, L. et al. Indirect determination of ephedrine in urine by differential pulse polarography. **Electroanalysis**, v. 9, n. 15, p. 1214–1218, 1997. <https://doi.org/10.1002/elan.1140091518>

[65] CHICHARRO, M. et al. Determination of ephedrine in human urine using a glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 273, n. 1–2, p. 361–368, 1993. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80178-N](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80178-N)

[66] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, HHS et al. Final rule declaring dietary supplements containing ephedrine alkaloids adulterated because they present an unreasonable risk. Final rule. **Federal register**, v. 69, n. 28, p. 6787, 2004.

[67] DIEPVENS, K.; WESTERTERP, K. R.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R77–R85, 2006. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00832.2005>

[68] LV, D. et al. Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 5, p. 1313–1325, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8380-9>

[69] PANG, W. et al. LC-MS–MS in MRM Mode for Detection and Structural Identification of Synthetic Hypoglycemic Drugs Added Illegally to ‘Natural’ Anti-Diabetic Herbal Products. **Chromatographia**, v. 70, n. 9–10, p. 1353–1359, 2009. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1344-0>

- [70] ZHU, Q. et al. Rapid on-site TLC–SERS detection of four antidiabetes drugs used as adulterants in botanical dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 7, p. 1877–1884, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7605-7>
- [71] HUANG, Z. et al. Simultaneous Determination of Sibutramine and N-Di-desmethysibutramine in Dietary Supplements for Weight Control by HPLC–ESI-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 8, p. 707–711, 2008. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.8.707>
- [72] STYPULKOWSKA, K. et al. X-ray powder diffractometry and liquid chromatography studies of sibutramine and its analogues content in herbal dietary supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 969–975, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.08.028>
- [73] WILSON, P.; MASSE, C. Detection of Synthetic Drugs as Adulterants in Natural and Herbal Slimming Products by LC-ESI-MS/MS with Polarity Switching. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 929–940, 2016. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0295>
- [74] BOGUSZ, M. J. et al. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 554–564, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.015>
- [75] KIM, H. J. et al. Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 31, n. 5, p. 777–783, 2014. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.888497>
- [76] STRANO-ROSSI, S. et al. Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 144–152, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.06.011>
- [77] REBIERE, H. et al. Detection of hazardous weight-loss substances in adulterated slimming formulations using ultra-high-pressure liquid chromatography with diode-array detection. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 2, p. 161–171, 2012. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.638676>
- [78] VACLAVIK, L.; KRYNITSKY, A. J.; RADER, J. I. Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 810, p. 45–60, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.006>

- [79] LU, F. et al. A new method for testing synthetic drugs adulterated in herbal medicines based on infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, n. 2, p. 200–207, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.007>
- [80] DUNN, J. D. et al. Using a portable ion mobility spectrometer to screen dietary supplements for sibutramine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 3, p. 469–474, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.017>
- [81] AYAD, M. M. et al. Utility of molybdophosphoric acid in qualitative and quantitative analysis of Sibutramine HCl, Sumatriptan succinate and Lomefloxacin HCl. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 3, n. 2, p. 121–126, 2012.
- [82] YOUSSEF, R. M. et al. Microspectrometric determination of sibutramine in an adulterated slimming formulation. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3395, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3ay41872c>
- [83] ZHU, H. et al. Enantioseparation and determination of sibutramine in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 6, p. 1496–1500, 2010. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2010.31.6.1496>
- [84] WANG, D. et al. Detection of sibutramine and phenolphthalein in functional foods using capillary electrophoresis. **Analytical Methods**, v. 8, n. 3, p. 621–626, 2016. <https://doi.org/10.1039/C5AY02973B>
- [85] HANCU, G. et al. Enantiomeric Separation of Sibutramine by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1116–1120, 2015. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150359>
- [86] TERADAL, N. L.; NARAYAN, P. S.; JALADAPPAGARI, S. Electro-reduced graphene oxide film modified glassy carbon electrode as an electrochemical sensor for sibutramine. **Analytical Methods**, v. 5, n. 24, p. 7090–7095, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3ay41575a>
- [87] GOHARY, N. A. EL; NASHAR, R. M. EL; ABOUL-ENIEN, H. Y. Potentiometric determination of sibutramine using batch and flow injection analysis. **Analytical Letters**, v. 44, n. 1–3, p. 241–257, 2011. <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.500760>
- [88] CARVALHO, J. M. et al. Voltammetric determination of sibutramine in beverages and in pharmaceutical formulations. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 988–992, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500023>
- [89] BARBOSA, A. L.; SANTOS, W. T. P. DOS; COMPTON, R. G. Simple And Sensitive Determination of Sibutramine in Slimming Tea Beverages using a Carbon Screen-printed Electrode with Adsorptive Stripping Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 31, 2019. <https://doi.org/10.1002/elan.201800888>

- [90] BAGHERI, H. et al. Fabrication of a novel electrochemical sensing platform based on a core-shell nano-structured/molecularly imprinted polymer for sensitive and selective determination of ephedrine. **RSC Advances**, v. 6, n. 56, p. 51135–51145, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA09488K>
- [91] CHICHARRO, M. et al. Ephedrine Determination in Human Urine Using a Carbon Paste Electrode Modified with C₁₈ Bonded Silica Gel. **Analytical Letters**, v. 27, n. 10, p. 1809–1831, 1994. <https://doi.org/10.1080/00032719408002634>
- [92] BARD, A. J.; INZELT, G.; SCHOLZ, F. **Electrochemical Dictionary**. Leipzig, Springer Berlin Heidelberg, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29551-5>
- [93] WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New Jersey. John Wiley & Sons, 2006. <https://doi.org/10.1002/0471790303>
- [94] SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>
- [95] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New York. Wiley, 2001. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19810851142>
- [96] BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra. Almedina Coimbra, 1996. v. 1
- [97] FREITAS, J. M. DE. **Determinação estequiométrica de dimenidrinato e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- [98] MATOS, R. C. et al. Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone. **The Analyst**, v. 125, n. 11, p. 2011–2015, 2000. <https://doi.org/10.1039/b004805o>
- [99] PAIXÃO, T. R. L. C.; MATOS, R. C.; BERTOTTI, M. Development of a Dual-Band Amperometric Detector for Determination of Ascorbic Acid and Glucose. **Electroanalysis**, v. 15, n. 2324, p. 1884–1889, 2003. <https://doi.org/10.1002/elan.200302773>
- [100] THANGARAJ, R. et al. A flow injection analysis coupled dual electrochemical detector for selective and simultaneous detection of guanine and adenine. **Electrochimica Acta**, v. 123, p. 485–493, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.01.066>
- [101] GARCÍA-MIRANDA FERRARI, A. et al. Batch injection electroanalysis with stainless-steel pins as electrodes in single and multiplexed configurations. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 253, p. 1207–1213, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.148>

- [102] SANTOS, W. T. P. DOS et al. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753–1761, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011001000008>
- [103] FREITAS, J. M. et al. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670–675, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.048>
- [104] CHAVES, S. C. et al. Simultaneous Determination of Caffeine, Ibuprofen, and Paracetamol by Flow-injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 27, n. 12, p. 2785–2791, 2015. <https://doi.org/10.1002/elan.201500306>
- [105] GIMENES, D. T. et al. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 411–418, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.132>
- [106] ZOSKI, Cynthia G. (Ed.). Handbook of electrochemistry. Amsterdam. Elsevier, 2006.
- [107] KRAFT, A. Doped Diamond: A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355–385, 2007.
- [108] BARROS, R. D. C. M. DE et al. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000200024>.
- [109] PELSKOV, Y. V. et al. Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 228, n. 1–2, p. 19–27, 1987. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80093-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80093-1)
- [110] FUJISHIMA, A. et al. **Diamond Electrochemistry**. Tokyo: Elsevier, 2005. <https://doi.org/10.1023/A:1021651920042>
- [111] OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 648, n. 1, p. 60–66, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.06.020>
- [112] GIRARD, H. et al. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**, v. 16, n. 2, p. 316–325, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2006.06.009>

- [113] CHEN, L. C.; CHANG, C. C.; CHANG, H. C. Electrochemical oxidation of histidine at an anodic oxidized boron-doped diamond electrode in neutral solution. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 6, p. 2883–2889, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.071>
- [114] BALDAN, M. R. et al. Cathodic and anodic pre-treated boron doped diamond with different sp² content: Morphological, structural, and impedance spectroscopy characterizations. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 74, n. 12, p. 1830–1835, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2013.07.015>
- [115] SUFFREDINI, H. B. et al. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 4021–4026, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.01.082>
- [116] PYSAREVSKA, S. et al. A state-of-the-art approach for facile and reliable determination of benzocaine in pharmaceuticals and biological samples based on the use of miniaturized boron-doped diamond electrochemical sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 270, p. 9–17, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.012>
- [117] OLIVEIRA, T. DA C. et al. Development of a Novel Versatile Method for Determination of two Antihistamines in Association with Naphazoline Using Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 30, n. 5, p. 868–876, 2018. <https://doi.org/10.1002/elan.201700658>
- [118] SILVA, W. P. et al. Determinação rápida e simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína utilizando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica. **Química Nova**, v. 40, n. 10, p. 1180–1185, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170131>
- [119] OLIVEIRA, T. D. C. et al. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, v. 152, p. 308–313, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.031>
- [120] BALL, A. T.; PATEL, A. Electrochimica Acta Rapid voltammetric monitoring of melatonin in the presence of tablet excipients. **Electrochimica Acta**, v. 83, p. 196–201, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.100>
- [121] ALPAR, N. et al. Voltammetric Method for the Simultaneous Determination of Melatonin and Pyridoxine in Dietary Supplements Using a Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 29, n. 7, p. 1691–1699, 2017. <https://doi.org/10.1002/elan.201700077>
- [122] YIĞIT, A. I. et al. Electrochemical determination of pterostilbene at a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode using square-wave adsorptive anodic stripping voltammetry in cationic surfactant media. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 231, p. 688–695, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.03.113>

- [123] ŠVORC, UBOMÍR et al. Flow-injection amperometric determination of yohimbine alkaloid in dietary supplements using a boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 215–218, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.08.071>
- [124] WONG, A.; SANTOS, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 85, p. 68–73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.03.034>
- [125] HAYASHI, T. et al. Electrochemical Detection of Sugar-related Compounds Using Boron-doped Diamond Electrodes. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 127, 2012. <https://doi.org/10.2116/analsci.28.127>
- [126] ASAI, K.; IVANDINI, T. A.; EINAGA, Y. Continuous and selective measurement of oxytocin and vasopressin using boron-doped diamond electrodes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32429, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep32429>
- [127] MALDONADO, V. Y. et al. Analysis of Ag(I) Biocide in Water Samples Using Anodic Stripping Voltammetry with a Boron-Doped Diamond Disk Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 11, p. 6477–6485, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04983>
- [128] DORNELLAS, R. M.; MUNOZ, R. A. A.; AUCELIO, R. Q. Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: Square-wave voltammetry versus BIA-multiple pulse amperometry. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 1–8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.010>
- [129] SILVA, R. A. B. DA et al. Batch injection analysis with amperometric detection: Application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2804–2808, 2011. <https://doi.org/10.1039/C1AY05395G>
- [130] TORMIN, T. F. et al. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, v. 99, p. 527–531, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.024>
- [131] WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, 1991. <https://doi.org/10.1021/ac00010a025>
- [132] TORMIN, T. F. et al. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1274–1278, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.008>
- [133] GIMENES, D. T. et al. Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively

coupled contactless conductivity detection. **Anal. Methods**, v. 6, n. 10, p. 3261–3267, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4AY00272E>

[134] CARDOZO, C. G. et al. Batch Injection Analysis-Multiple Pulse Amperometric Fingerprint: A Simple Approach for Fast On-site Screening of Drugs. **Electroanalysis**, v. 29, n. 12, p. 2847–2854, 2017. <https://doi.org/10.1002/elan.201700520>

[135] PEREIRA, P. F. et al. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 766, p. 87–93, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.01.034>

[136] FREITAS, J. M. et al. Development of a simple and fast electrochemical method for screening and stoichiometric determination of dimenhydrinate. **Electroanalysis**, v. 26, n. 9, p. 1905–1911, 2014. <https://doi.org/10.1002/elan.201400300>

[137] SILVA, A. A. et al. Determination of Amlodipine and Atenolol by Batch Injection Analysis with Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 28, n. 7, p. 1455–1461, 2016. <https://doi.org/10.1002/elan.201501138>

[138] SILVA, R. A. G. et al. Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 733, p. 85–90, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.09.025>

[139] SILVA, W. P. et al. Square-wave Voltammetric Determination of Propyphenazone, Paracetamol, and Caffeine: Comparative Study between Batch Injection Analysis and Conventional Electrochemical Systems. **Electroanalysis**, v. 29, n. 8, p. 1860–1866, 2017. <https://doi.org/10.1002/elan.201700160>

[140] GIMENES, D. T. et al. Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 2, p. 216–218, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.11.028>

[141] SILVA, R. A. B. **Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho**. 2012. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

[142] FREITAS, J. M. et al. Amperometric determination of 8-chlorotheophylline, caffeine, and diphenhydramine in a single run. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 739–744, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170050>

- [143] ROCHA, D. P. et al. Batch-Injection Analysis Better Than Ever: New Materials for Improved Electrochemical Detection and On-Site Applications. **Electroanalysis**, 2018. <https://doi.org/10.1002/elan.201800042>
- [144] TORMIN, T. F. et al. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 93–98, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.096>
- [145] RICHTER, E. M. et al. A Compact Batch Injection Analysis Cell for Screen Printed Electrodes: A Portable Electrochemical System for On-site Analysis. **Electroanalysis**, 2016. <https://doi.org/10.1002/elan.201600008>
- [146] **BIASPE Cell - A Portable Electrochemical System for On-site Analysis. - YouTube.** Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=oe0G2RA_t4o>. Acesso em: 9 abr. 2018.
- [147] LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1-2, p. 367-374, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(01\)01547-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(01)01547-0)
- [148] PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080713>
- [149] SILVA, Weberson Pereira. **Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.** 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- [150] PEREIRA, P. F. et al. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v. 90, p. 99–102, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.004>
- [151] QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513–523, 2004. <https://doi.org/10.1002/elan.200302878>
- [152] YALKOWSKY, S. H.; HE, Y.; JAIN, P. Handbook Of Aqueous Solubility Data. Boca Raton. CRC Press, 2016. <https://doi.org/10.1201/9780203490396>
- [153] HOU, T. J. et al. ADME Evaluation in Drug Discovery. 4. Prediction of Aqueous Solubility Based on Atom Contribution Approach. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 1, p. 266–275, 2004. <https://doi.org/10.1021/ci034184n>
- [154] SHOGHI, E. et al. Solubility-pH profiles of some acidic, basic and amphoteric drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1–2, p. 291–300, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.028>

- [155] SWAIN, M. chemicalize.org by ChemAxon Ltd. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 2, p. 613–615, 2012. <https://doi.org/10.1021/ci300046g>
- [156] ZUO, Y. et al. An accurate and nondestructive GC method for determination of cocaine on US paper currency. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 13, p. 2444–2450, 2008. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800117>
- [157] MEDEIROS, R. A. et al. Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 76, n. 3, p. 685–689, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.015>
- [158] SARTORI, E. R. et al. Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 360–366, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000200022>
- [159] LOVRIC, M.; KOMORSKY-LOVRIC, Š. Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 248, n. 2, p. 239–253, 1988. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(88\)85089-7](https://doi.org/10.1016/0022-0728(88)85089-7)
- [160] O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. A. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 695–701, 1981. <https://doi.org/10.1021/ac00227a028>
- [161] O'DEA, J. J.; RIBES, A.; OSTERYOUNG, J. G. Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 345, n. 1–2, p. 287–301, 1993. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)80485-Z](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)80485-Z)
- [162] SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications**. New York: Springer, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8>
- [163] LVAREZ-LUEJE, A.; PREZ, M.; ZAPAT, C. Electrochemical Methods for the In Vitro Assessment of Drug Metabolism. In: PAXTON J. **Topics on Drug Metabolism**. Rijeka: InTech, 2012. cap. 9, p. 221–246. <https://doi.org/10.5772/28647>
- [164] GARRIDO, J. M. P. J. et al. Voltammetric oxidation of drugs of abuse III. Heroin and metabolites. **Electroanalysis**, v. 16, n. 18, p. 1497–1502, 2004. <https://doi.org/10.1002/elan.200302975>
- [165] NOURI-NIGJEH, E. et al. Lidocaine oxidation by electrogenerated reactive oxygen species in the light of oxidative drug metabolism. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 18, p. 7625–7633, 2010. <https://doi.org/10.1021/ac101364s>
- [166] SALAHIFAR, E.; NEMATOLLAHI, D. Electrochemical generation of a Michael acceptor: A green method for the synthesis of 4-amino-3-(phenylsulfonyl)diphenylamine

derivatives. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 3852–3858, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5NJ00087D>

[167] NUWER, M. J.; O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J. Analytical and kinetic investigations of totally irreversible electron transfer reactions by square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 251, n. 1–2, p. 13–25, 1991. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(91\)87110-S](https://doi.org/10.1016/0003-2670(91)87110-S)

[168] NOH, K. et al. Enantioselective Pharmacokinetics of Sibutramine in Rat. **Arch Pharm Res**, v. 33, n. 2, p. 267–273, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0212-7>

[169] DOMÉNECH-CARBÓ, A. et al. Screening and authentication of herbal formulations based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. **Analytical Methods**, v. 7, n. 14, p. 5740–5747, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5AY01145K>

[170] COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding voltammetry**. Oxford: World Scientific, 2011. <https://doi.org/10.1142/p783>

[171] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry : principles, methods, and applications**. Midsomer Norton: Oxford University Press, 1993. <https://doi.org/10.1002/ange.19941062240>

[172] GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: VCH New York, 1993. v. 43. <https://doi.org/10.1080/00945719408001398>

[173] NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 706–723, 1964. <https://doi.org/10.1021/ac60210a007>

[174] GONZÁLEZ-VELASCO, J. The linear sweep voltametric method: An application to the study of reversible and irreversible processes. **Electroanalysis**, v. 6, n. 9, p. 711–724, 1994. <https://doi.org/10.1002/elan.1140060902>

[175] SAMUELSSON, R.; O'DEA, J.; OSTERYOUNG, J. Rapid Scan Square Wave Voltammetric Detector For High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 2215–2216, 1980. <https://doi.org/10.1021/ac50063a053>

[176] LI, F.; DING, Z.; CAO, Q. E. Separation and determination of ephedrine and pseudoephedrine in Ephedrae Herba by CZE modified with a Cu(II)-L-lysine complex. **Electrophoresis**, v. 29, n. 3, p. 658–664, 2008. <https://doi.org/10.1002/elps.200700334>

[177] LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, 1979. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(79\)80075-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)80075-3)

- [178] MASUI, M.; OZAKI, S. Anodic oxidation of amines. V. Cyclic voltammetry and controlled potential electrolysis of ephedrine and the related compounds in aqueous buffer solution. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 2153–2159, 1978. <https://doi.org/10.1248/cpb.26.2153>
- [179] ROCHA, R. G. et al. Simple Strategy for Selective Determination of Levamisole in Seized Cocaine and Pharmaceutical Samples Using Disposable Screen-printed Electrodes. **Electroanalysis**, v. 31, n. 1, p. 153–159, 2019. <https://doi.org/10.1002/elan.201800716>
- [180] GANZERA, M.; LANSER, C.; STUPPNER, H. Simultaneous determination of Ephedra sinica and Citrus aurantium var. amara alkaloids by ion-pair chromatography. **Talanta**, v. 66, p. 889–894, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.045>
- [181] PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Determination of ephedrine alkaloids in Ephedra natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 254–263, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.034>
- [182] PHINNEY, K. W.; IHARA, T.; SANDER, L. C. Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 90–97, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.068>
- [183] AMAN, T. et al. Spectrophotometric Determination of Ephedrin Hydrochloride. **Analytical Letters**, v. 30, n. 8, p. 1517–1529, 1997. <https://doi.org/10.1080/00032719708001672>

8. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

8.1. Publicação de artigos em revistas científicas relacionados à tese de doutorado

- FREITAS, Jhonys M. et al. A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, p. 557-565, 2017.
- FREITAS, Jhonys M. et al. A simple and fast-portable method for the screening of the appetite-suppressant drug sibutramine in natural products and multivitamins supplements. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 282, p. 449-456, 2019.

8.2. Outras publicações de artigos em revistas científicas

- GIMENES, Denise T. et al. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 411-418, 2015.
- RIBEIRO, Michelle M. A. C .et al. Fast determination of diphenhydramine, pyridoxine, and 8-chlorotheophylline by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 8, n. 22, p. 4432-4437, 2016.
- OLIVEIRA, Thiago C. et al. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, v. 152, p. 308-313, 2016.
- FREITAS, Jhonys M et al. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670-675, 2016.

- FREITAS, Jhonys M. et al. Amperometric determination of 8-chlorotheophylline, caffeine, and diphenhydramine in a single run. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 739-744, 2017.
- OLIVEIRA, Thiago C. et al. Development of a Novel Versatile Method for Determination of two Antihistamines in Association with Naphazoline Using Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 30, n. 5, p. 868-876, 2018.

8.3. Outras atividades

- Doutorado sanduíche no exterior (04/2017 – 09/2017)
Metropolitan University of Manchester, Manchester, UK
Orientador no exterior: Prof. Dr. Craig E. Banks
Bolsista do(a): PDSE - Edital nº 19/2016 - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- Curso de Docência Universitária
Universidade Federal de Uberlândia
Divisão de Formação Docente da Pró-Reitoria de Graduação da Universidade Federal de Uberlândia
Duração: 40 h.