



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

RAQUEL GOMES DA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ELETROANALÍTICO PARA A
DETERMINAÇÃO DE MIDAZOLAM EM AMOSTRAS FORENSES USANDO
ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

UBERLÂNDIA

2019

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ELETROANALÍTICO PARA A
DETERMINAÇÃO DE MIDAZOLAM EM AMOSTRAS FORENSES USANDO
ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias
Richter

Co orientador: Prof. Dr. Rodrigo
Alejandro Abarza Muñoz

Área de concentração: Química
Analítica

UBERLÂNDIA

2019

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

R672d
2019 Rocha, Raquel Gomes da, 1993-
Desenvolvimento de procedimento eletroanalítico para a
determinação de Midazolam em amostras forenses usando eletrodo de
diamante dopado com Boro [recurso eletrônico] / Raquel Gomes da
Rocha. - 2019.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.
Coorientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1506>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Midazolam. 3. Química legal. 4. Métodos de Análise.
I. Richter, Eduardo Mathias, 1965-. II. Muñoz, Rodrigo Alejandro
Abarza, 1980-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54



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



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 293/PPQUI.

DATA: 22/02/2019

DISCENTE: Raquel Gomes da Rocha

MATRÍCULA: 11722QMI003

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de procedimento eletroanalítico para a determinação de midazolam em amostras forenses usando eletrodo de diamante dopado com boro.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

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

Às quatorze horas do dia vinte e dois de fevereiro de dois mil e dezenove, no(a) Sala de Reuniões do Instituto de Química da UFU, Bloco 1D, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof^ª Dra. Regina Massako Takeuchi, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e Prof. Dr. 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 Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. 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 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Regina Massako Takeuchi

Prof^ª Dra. Regina Massako Takeuchi

Wallans Torres Pio dos Santos

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

Rodrigo Abarza Muñoz

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

Agradecimentos

Me faltam palavras para agradecer a todos que estiveram comigo durante o período do mestrado. Foram dias de aprendizado, conquistas, choros, alegrias e ainda bem que estive com todos vocês.

Quero agradecer a Deus pelo dom da vida e por me dar forças para continuar lutando; Aos meus pais, Vina e Agilson, e irmãos, Luiza e Eduardo, que nunca mediram esforços em me ajudar e lutar pelo meu sonhado título de mestre e mais uma vez, vocês são minha fonte de inspiração para lutar e seguir em frente;

Aos meus familiares que estiveram sempre me apoiando, mesmo com o ano turbulento que enfrentamos e em especial ao meu Tio Antônio (*in memoriam*) que nos deixou, mas que sempre esteve me apoiando, não media esforços de ver a alegria no meu rosto. Tio, onde é que o senhor esteja, saiba que seus ensinamentos estão vivos em mim... Eu te amo;

Ao meu orientador Eduardo Mathias Richter e ao meu co-orientador Rodrigo Muñoz pelos ensinamentos e pela fonte de inspiração durante toda minha pesquisa; Aos meus amigos do NUPE pelo apoio diário, quero que vocês saibam que todos vocês se tornaram uma família para mim; Ao meus grandes amigos que a UFU me permitiu conhecer: Thiago (marido), Jhonys, Jéssica (parceira de gordice), Alice (minha filha), Michelle (minha musa fit e mamãe do amor maior da Tia), Pablo, Jian, Silvia, Breno, Leandro, Kindlly, Luiza, Luiz André, Jorge, Priscila, Lívia, Sandro, José Flauzino, Bárbara, Jamília, Hellen, Fernando e mais tanto outros, obrigada pela parceria, paciência...Amo vocês;

Ao meu amigo Weberson (mané), um agradecimento especial: você foi minha surpresa boa durante o mestrado, obrigada pela parceria. Sem você, esse mestrado não seria possível;

À Ana que está de longe me desejando boas vibrações;

Ao IQ-UFU pela disponibilidade do laboratório para a realização deste trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho;

Aos examinadores da Banca, por dedicarem seu tempo a leitura e estudo do meu trabalho e contribuição para o aprimoramento.

RESUMO

Midazolam (MID) é um imidazobenzodiazepínico usado como tranquilizante, sedativo, hipnótico e anticonvulsante. O MID difere de outros benzodiazepínicos, devido à sua rápida absorção e solubilidade em soluções aquosas, permitindo seu uso em amostras de bebidas, sendo comumente utilizado como drogas de estupro consentido (do inglês “*date rape drug*”) ou também chamado de Golpe do “*Boa Noite Cinderela*”. Além disso, esse tipo de droga e seus metabólitos têm meia-vida curta em humanos, dificultando a detecção de MID em amostras biológicas. Neste caso, a determinação de MID em amostras de bebidas torna-se uma alternativa como evidência em investigação criminal. Neste trabalho, foi descrito um método simples, portátil e de baixo custo para determinação seletiva de MID em bebidas alcólicas (vinho tinto, whisky e vodka). Voltametria de pulso diferencial, eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) e tampão Britton-Robinson (BR) 0,12 mol L⁻¹ (pH = 2,0) foram utilizados como, técnica eletroquímica, eletrodo de trabalho e eletrólito suporte, respectivamente. Os seguintes parâmetros de pulso diferencial foram otimizados: amplitude de modulação: 70 mV, incremento de potencial: 6 mV e tempo de modulação: 25 ms. Diferentes faixa lineares de resposta (4-25 µmol L⁻¹ e r = 0,997; 1-10 µmol L⁻¹ e r = 0,995; 1-15 µmol L⁻¹ e r = 0,998) e limites de detecção (0,46, 0,43 e 0,33 µmol L⁻¹) foram obtidos em amostras de vodka, whisky e vinho tinto, respectivamente. A precisão (RSD < 6,3%, n = 15) e exatidão (88-103 %) do método foram satisfatórias. Para comparar as características analíticas (faixa linear de resposta, LD, LQ e seletividade) obtidas entre os dois processos eletroquímicos que ocorrem para o MID, o pico de redução também foi explorado utilizando a mesma técnica, eletrodo de trabalho e eletrólito suporte usado para o pico de oxidação. Os seguintes parâmetros de pulso diferencial foram otimizados: amplitude de modulação: 70 mV, incremento de potencial: 5 mV e tempo de modulação: 25 ms, sendo possível comparar as características analíticas obtidas com o processo de oxidação e redução do MID. Por fim, o método também foi adaptado ao sistema eletroquímico portátil de análise por injeção em batelada (BIA, do inglês “*Batch Injection Analysis*”) que tem grande potencial para ser usado em análise em triagens rápidas.

Palavras-chave: Mecanismo eletroquímico, química forense, eletrodo de BDD, análises *in locu*

ABSTRACT

Midazolam (MID) is an imidazobenzodiazepine commonly used as tranquilizer, sedative hypnotic and anticonvulsant drug. MID differs from other benzodiazepines, because of its fast absorption and solubility in aqueous solutions, which enables its use in many types of beverage samples as a facilitated-sexual or date rape drug, also known “*Good night, Cinderella*”. In this work, we described a simple, portable and low-cost method for fast screening and selective determination of MID in beverage samples (vodka, whisky and red wine). Differential-pulse voltammetry, boron-doped diamond electrode (BDD), and Britton-Robinson (BR) buffer (pH = 2.0) were selected as electrochemical technique, working electrode and supporting electrolyte, respectively. Different linear response ranges (4-25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and $r = 0.997$; 1-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and $r = 0.995$; 1-15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and $r = 0.998$) and limits of detection (0.46, 0.43 and 0.33 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were obtained for the analysis of samples as vodka, whisky, red wine, respectively. The precision and accuracy were satisfactory considering the low relative standard deviation values ($\text{RSD} < 6.3\%$, $n = 15$) and the values obtained in the recovery studies (88-103%). In order to compare the performance (LOD, LOQ and selectivity) between two MID electrochemical processes, the reduction peak was also explored using the same technique, work electrode and the supporting electrolyte for the oxidation peak. The parameters of differential pulse voltammetry for the reduction peak were optimized: modulation amplitude: 70 mV; step potential: 5 mV and modulation time: 25 ms, being possible to compare with the analytical characteristics of the oxidation and reduction process of the MID. Finally, the proposed method was also adapted to a robust portable electrochemical system (BIA, batch injection analysis) which has great potential for rapid point-of-care testing (rapid screening tests).

Keywords: Electrochemical mechanism; Forensic chemistry; BDD electrode; On-site analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de alguns benzodiazepínicos.	16
Figura 2. Estrutura química do midazolam.	17
Figura 3. Representação esquemática da aplicação de potencial em DPV.	24
Figura 4. Forma de aplicação de potencial em SWV.	26
Figura 5. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para (A) um processo redox reversível (B) irreversível.	26
Figura 6. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica adaptada para o eletrodo de BDD.	28
Figura 7. Etapas de operação de um sistema BIA com detecção amperométrica e respectivo sinal analítico obtido (A) antes da injeção; (B) durante a injeção; (C) final da injeção; (D) dispersão; (E) equilíbrio final.	29
Figura 8. (A) Esquemática da fixação e do contato elétrico do eletrodo de BDD na célula de polipropileno. (B) Vista frontal da célula e (C) Vista superior da célula com o eletrodo de BDD posicionado ao fundo, com a área geométrica definida pelo O-ring.	33
Figura 9. Componentes do sistema BIA: (a) Micropipeta eletrônica recarregável; (b) Ponteira da micropipeta (100 μ L); (c) célula BIA (\approx 200 mL); (d) tampa da célula e (e) sistema BIA portátil pronto para uso.	34
Figura 10. Voltametria cíclica para uma solução sem (---) e com (—) a presença de 1 mmol L ⁻¹ de MID em tampão BR 0,12 mol L ⁻¹ (pH = 2,0) usando BDD com pré-tratamento catódico. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ ; incremento de potencial: 5 mV.	37
Figura 11. Reação de redução eletroquímica do MID.	38
Figura 12. (a) I_p vs. $f^{1/2}$; (b) $\log I_p$ vs $\log f$. Eletrólito suporte: tampão BR 0,12 mol L ⁻¹ (pH = 2,0). Solução: 50 μ mol L ⁻¹ de MID; Parâmetros de onda quadrada: $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.	39
Figura 13. Relação obtida entre o potencial de pico (E_p) e o logaritmo da frequência ($\log f$).	40

Figura 14. Variação do E_p em função do pH para o MID, utilizando voltametria cíclica e BDD como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV	41
Figura 15. Molécula de MID e os respectivos pKas.	42
Figura 16. Mecanismo de oxidação proposto para MID.	43
Figura 17. Comparação entre os voltamogramas cíclicos de uma solução contendo 1 mmol L^{-1} de MID após a realização de ativação catódica (—) e anódica (—) do eletrodo de BDD. Demais condições experimentais: idem Figura 12	44
Figura 18. (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação de aplicação da amplitude de modulação. (b) Relação entre corrente de pico e amplitude de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0).	45
Figura 19. (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação do incremento de potencial. (b) Relação entre corrente de pico e incremento de potencial. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $a = 50 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0).	46
Figura 20. (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em função da variação do tempo de modulação (10-50 ms). (b) Relação entre corrente de pico e tempo de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0).	47
Figura 21. Voltamogramas com correção de linha base obtidos para adição de soluções com concentrações crescentes ($1\text{-}50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) de MID e respectivas curvas de calibração obtidas (Figura inserida) em tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0). Parâmetros de DPV: $a = 70 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; $t_m = 25 \text{ ms}$	48
Figura 22. DPV com correção de linha base obtidas para soluções de concentrações crescentes de MID. (A) $4\text{-}50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em vodka diluído 1:20 (v/v). (B) $1\text{-}11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em whisky diluído 1:100 (v/v) e (C) $1\text{-}45 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em vinho tinto diluído 1:100 (v/v). Figura inserida: Respectivas curvas de calibração. Demais condições ver Figura 20. ...	51

- Figura 23.** Resultados obtidos por voltametria de pulso diferencial para análises sucessivas ($n = 15$) de soluções contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID nas bebidas avaliadas, nas mesmas condições apresentadas na Figura 21..... 53
- Figura 24.** DPV com correção de linha base para a análise de amostras de bebidas alcóolicas dopadas e adições crescentes de MID para **(A)** vodka, **(B)** whisky e **(C)** vinho tinto e **(D, E, F)** respectivas curvas de calibração. Outras condições ver **Figura 13**..... 54
- Figura 25.** **(A)** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID após a aplicação de potenciais de adsorção entre $+0,45\text{V}$ e $-0,45\text{V}$; **(B)** corrente de redução obtida para a aplicação de cada potencial. Parâmetros de DPV: $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ e $t_m = 25 \text{ ms}$. Tempo de acumulação = 30s . Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$). 56
- Figura 26.** **(A)** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação de aplicação da amplitude de modulação ($10 - 100 \text{ mV}$). **(B)** Relação entre corrente de pico e amplitude de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ 57
- Figura 27.** **(A)** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação do incremento de potencial ($1 - 10 \text{ mV}$). **(B)** Relação entre corrente de pico e incremento de potencial. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $a = 50 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$). 58
- Figura 28.** **(A)** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação do tempo de modulação ($10 - 50 \text{ ms}$). **(B)** Relação entre corrente de pico e tempo de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$ 59
- Figura 29.** **(A)** Voltamogramas com correção de linha base obtidos para análise de soluções com concentrações crescentes ($1 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) de MID e **(B)** respectiva curva de calibração obtida em tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2$). Parâmetros de DPV: $a = 70 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; $t_m = 25 \text{ ms}$ 60
- Figura 30.** Voltamogramas de pulso diferencial de **(a)** $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de clonazepam (CLO —), midazolam (MID —) e flunitrazepam (FLU —) e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ diazepam (DIA —)

na região catódica e **(b)** $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CLO, DIA e FLU e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID na região anódica. A linha tracejada refere-se ao sinal obtido com o branco. 62

Figura 31. BIA-DPV varreduras obtidas para amostras de whisky e vinho tinto (diluição 1:100) e vodka (diluição 1:20) em eletrólito suporte antes (---) e depois (—) da adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID. Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $16,5 \mu\text{L s}^{-1}$. Demais condições de DPV: Figura 13..... 65

Figura 32. BIA-DPV obtidos para whisky e vinho tinto (diluição 1:100) e vodka (diluição 1:20) em eletrólito suporte antes (---) e depois (—) da adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID, utilizando a redução eletroquímica. Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $16,5 \mu\text{L s}^{-1}$. As mesmas condições de DPV da **Figura 28**. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns métodos e características analíticas encontrados na literatura para a determinação de MID	19
Tabela 2. Efeito da diluição na estabilidade e detecção do MID (n = 4) nas amostras avaliadas, usando DPV nas condições otimizadas.	49
Tabela 3. Efeito da diluição na adição, recuperação e sensibilidade do MID em uma solução hidroalcoólica, utilizando DPV nas condições otimizadas. As soluções foram dopadas na célula eletroquímica.....	50
Tabela 4. Resultados de recuperação obtidas para amostras de bebidas dopadas com MID, usando DPV (n = 3)	54
Tabela 5. Comparação entre os resultados analíticos obtidos para a determinação de MID usando voltametria de pulso diferencial a partir do pico de oxidação e redução.	61
Tabela 6. Comparação entre as características analíticas do método proposto com outros métodos eletroquímicos reportados para a determinação de MID.	63

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ΔE_s – incremento de potencial

a – amplitude

Au-PoliAn – eletrodo de ouro modificado com polianilina

BDD – do inglês, *boron doped diamond* – diamante dopado com boro

BIA – do inglês, “*Batch Injection Analysis*” – análise por injeção em batelada

BR – tampão Britton-Robinson

BZP – benzodiazepínicos

CLO – clonazepam

CPE – do inglês “*paste carbon*”, pasta de carbono

CVD – do inglês, *chemical vapour deposition* – deposição química em fase de vapor

DFC – droga facilitadora de crime

DIA – diazepam

DPAdsCV – Voltametria de pulso diferencial adsortiva com redissolução catódica

DPP – Polarografia de pulso diferencial

DPR – desvio padrão relativo

DPV – do inglês, *differential pulse voltammetry* – voltametria de pulso diferencial

f – frequência

FL – faixa linear

FLU – flunitrazepam

GCE – do inglês “*glassy carbon electrode*”, eletrodo de carbono vítreo

GE-paraffin – parafina impregnada com grafite

GHB – ácido gamahidroxibutírico

HMD – do inglês, “*hanging Mercury drop electrode*”, eletrodo de gota pendente de mercúrio

HPHT – do inglês, “*High Pressure/ High Temperature*” – alta pressão/ alta temperatura

HPLC – do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography*” – cromatografia líquida de alta eficiência

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MID – midazolam

Nano-MIP-CPE – do inglês, “*molecular imprinted polymers*”, eletrodo molecularmente impresso em pasta de carbono

ND – não detectado

NPAdSV – Voltametria de pulso normal adsortiva com redissolução catódica

PVC – membrana de PVC Policloreto de vinila

R – coeficiente de correlação linear

SWAdSCV – Voltametria de onda quadrada adsortiva com redissolução catódica

SWV – do inglês, *square wave voltammetry* – voltametria de onda quadrada

t_m – tempo de modulação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Justificativa.....	15
1.2 Midazolam (MID)	16
1.3 Eletrodo de diamante dopado com boro	21
1.4 Voltametria de pulso diferencial	23
1.5 Voltametria de onda quadrada.....	25
1.6 Análise por injeção por batelada (BIA).....	27
2 OBJETIVOS	31
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	32
3.1 Medida eletroquímicas	32
3.1.1 Instrumentação.....	32
3.1.2 Célula eletroquímica.....	33
3.2 Soluções, reagentes e preparação das amostras.....	34
3.3 Parâmetros analíticos utilizados no método proposto	35
3.3.1 Limite de detecção (LD).....	35
3.3.2 Limite de quantificação (LQ)	36
3.3.3 Repetibilidade.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Comportamento eletroquímico do MID em eletrodo de BDD	37
4.2 Efeito da ativação do BDD na resposta eletroquímica do MID	43
4.2 Otimização dos parâmetros de voltametria de pulso diferencial.....	44
4.2.1 Otimização da amplitude de modulação.....	45
4.2.2 Otimização do incremento de potencial	45
4.2.3 Otimização do tempo de modulação	46
4.3 Estudo da faixa linear	47
4.4 Repetibilidade.....	52
4.5 Análise de amostras de bebidas	53
4.6 Comparação dos resultados obtidos para determinação do MID, utilizando oxidação e redução	55
4.6.1 Estudos de aplicação de potenciais de adsorção para redução do MID	55
4.6.2 Otimização dos parâmetros de pulso diferencial.....	57
4.6.2.1 Otimização da amplitude de modulação.....	57
4.6.2.2 Otimização do incremento de potencial	58

4.6.2.3 Otimização do tempo de modulação	58
4.6.3 Estudo da faixa linear a partir do pico de redução do MID.....	59
4.6.4 Seletividade do método	61
4.6.5 Comparação eletroquímica dos resultados obtidos com os descritos na literatura.....	62
4.7 Triagem rápida de amostra de bebidas	64
5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

A utilização de drogas como facilitadora de crimes é um fenômeno que tem sido reportado por diversos autores (ADAMOWICZ; KAŁA, 2010; LLEDO-FERNANDEZ; POLLARD; ROMEROSA, 2014; SHBAIR; LHERMITTE, 2010). Estas drogas são conhecidas como drogas de estupro consentido (do inglês “*date rape drug*”) ou drogas facilitadoras de crime (DFC) e geralmente envolvem agressões, roubos ou abusos sexuais. Dados do relatório de 2017 da Secretária de Segurança Pública do Estado de São Paulo (SSP-SP) mostram que 93% das vítimas eram homens (resultando em roubos e furtos) e 7% mulheres (resultando em caso de estupro) (DADOS, 2018). No Brasil, não há uma classificação para esse tipo de droga, porém, um termo comum é utilizado para esse tipo de prática que é conhecido como “Golpe do boa noite Cinderela” (BARRETO DA SILVA, 2016).

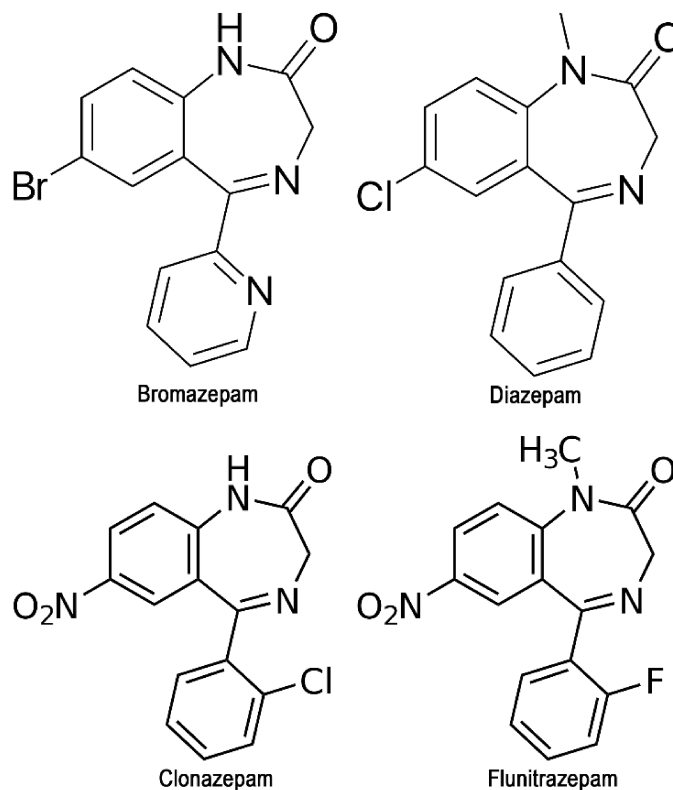
Geralmente, esse golpe é realizado quando DFC são adicionadas nas bebidas ou nos alimentos das vítimas, atuando no sistema nervoso central, na qual provoca: diminuição dos efeitos motores e cognitivos, perda de memória, desinibição, sociabilidade e suave embriaguez. Essas drogas geralmente não alteram o sabor e o cheiro das bebidas alcoólicas, o que facilita que os criminosos pratiquem seus crimes sem que a vítima perceba o que ocorreu (PASSAGLI, 2016). As drogas mais reportadas para esse uso são: cetamina, dimenidrinato, escopolamina, ácido gamahidroxibutírico (GHB) e o grupo dos benzodiazepínicos (clonazepam, flunitrazepam, diazepam, bromazepam e o midazolam) (ADAMOWICZ; KAŁA, 2010).

Dentre as DFC reportadas, a classe dos benzodiazepínicos vem sendo reportada como a mais utilizada para esse tipo de prática, devido a sua disponibilidade no mercado (classe de drogas depressoras mais vendidas no mundo), sua rápida absorção quando comparado à outras drogas (~1-3 horas) e aos efeitos proporcionados a vítimas, sendo potencializado com o uso de LSD (ácido lisérgico) e bebidas alcoólicas (ANDERSON; FLYNN; PILGRIM, 2017; D’ALOISE; CHEN, 2012).

Os benzodiazepínicos (BZPs) são moléculas que apresentam um núcleo benzênico fundido com um anel de sete membros contendo dois átomos de nitrogênio (1,4-diazepina), que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC), atuando como drogas depressoras, sedativas, hipnóticas e miorelaxantes. Os BZPs interagem com os

receptores de neurotransmissores inibitórios ativados pelos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) (PASSAGLI, 2016). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das moléculas de BZPs descritas na literatura como DFC.

Figura 1. Estrutura química de alguns benzodiazepínicos.

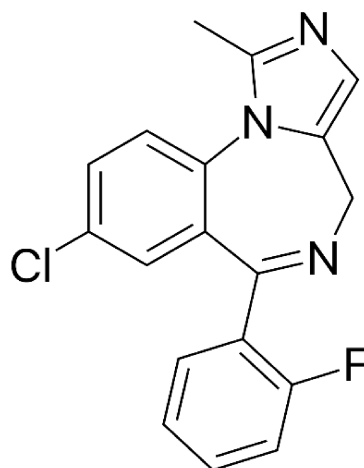


Fonte: A autora.

1.2 Midazolam (MID)

O midazolam (MID) é um imidazobenzodiazepínico que foi sintetizado pela primeira vez por Fryer e Walser e tem ação ansiolítica, anticonvulsante, hipnótica e miorelaxante (KROPF; HUGHES, 2018; WALSER *et al.*, 1978). Seu mecanismo de ação é similar aos descritos para os benzodiazepínicos e é imediatamente metabolizado (~1 hora) a α -hidroximidazolam, 4-hidroximidazolam e α -4-dihidroximidazolam (KUPIETZKY, 1993). A Figura 2 mostra a estrutura química do midazolam.

Figura 2. Estrutura química do midazolam.



Fonte: A autora.

O MID (Figura 2) difere da estrutura molecular descrita comumente para os BZPs devido a presença de um grupo imidazol ligado ao nitrogênio do grupo benzodiazepínico e por isso, possui propriedades diferentes, tais como: solubilidade em meios aquosos e não-aquosos, metabolismo e absorção mais rápidos, além de ser facilmente administrado via intravenoso e intramuscular. Devido sua rápida absorção e metabolismo, o MID é dificilmente encontrado em fluidos biológicos, dificultando evidências de atividades criminais no uso indevido como uma DFC (GERECKE, 1983; ORIVE *et al.*, 1993). Por isso, a análise em bebidas alcoólicas torna-se uma alternativa neste tipo de investigação (ACIKKOL; MERCAN; KARADAYI, 2009; D’ALOISE; CHEN, 2012).

Os métodos comumente encontrados para a determinação de MID são cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”) (DESAI; VIDYASAGAR; DESAI, 2011; ESPINOSA-BOSCH *et al.*, 2015), cromatografia gasosa (ACIKKOL; MERCAN; KARADAYI, 2009; ADAMOWICZ; KAŁA, 2010), espectrometria UV-vis (NARAYANA; DIVYA; NAYAK, 2013; PFENDT; POPOVIĆ; SUPANČIĆ, 1995), eletroforese capilar (LAUSECKER; HOPFGARTNER; HESSE, 1998) e cromatografia capilar eletrocínica micelar (OLEDZKA *et al.*, 2015; OLEDZKA *et al.*, 2013).

Na literatura, são descritos alguns trabalhos eletroquímicos para a determinação do MID. Vire, Patriarche e Hermosa (1987) mostraram pela primeira vez a redução eletroquímica do MID utilizando polarografia de pulso diferencial. Em 1990, Ribes e

Osteryoung mostraram a determinação de MID usando eletrodo de gota pendente de mercúrio e voltametria de pulso normal adsorptiva com redissolução catódica. No mesmo ano, Kir, Onar e Temizer mostraram a possibilidade da detecção de MID em fármacos, utilizando voltametria de pulso diferencial com redissolução catódica. Outros trabalhos mostraram métodos eletroquímicos para a determinação de MID (DE CARVALHO *et al.*, 2010; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2013b; DOS SANTOS; FAMILA; GONÇALVES, 2002; GANJALI; LARIJANI; NOROUZI, 2012; GHORBANI *et al.*, 2014; JAIN; YADAV, 2012; RAMESHKUMAR *et al.*, 2016).

PANAHI *et al.*, (2018) desenvolveram um sensor eletroquímico à base de um polímero nano-molecularmente impresso para detecção de MID em formulações farmacêuticas e amostras de urina. Outros autores, desenvolveram um eletrodo a base de papel, fabricado com grafite de lapiseira (eletrodo de trabalho) para a determinação de MID em whisky (DIAS *et al.*, 2018). Embora existam inúmeros trabalhos na literatura que descrevem a determinação eletroquímica de MID, até o presente momento não foram encontrados trabalhos empregando a oxidação eletroquímica deste composto. A Tabela 1 resume características analíticas e amostra aplicada para alguns trabalhos encontrados na literatura para a determinação de MID.

Tabela 1. Alguns métodos e características analíticas encontrados na literatura para a determinação de MID

Técnica	Amostra	LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	FL / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Referência
RP-HPLC-UV	Formulações farmacêuticas	6,13	6,13 - 92	(DESAI; VIDYASAGAR; DESAI, 2011)
GC-MS	Bebidas alcoólicas	NR	NR	(ACIKKOL; MERCAN; KARADAYI, 2009)
GC-EI-MS	Urina	2,14	3,68-153,5	(ADAMOWICZ; KAŁA, 2010)
UV-VIS	Formulações farmacêuticas	5,33 1,78	46,1- 92,1 30,7- 153,5	(NARAYANA; DIVYA; NAYAK, 2013)
UV-VIS	Formulações farmacêuticas	NR	5-70	(PFENDT; POPOVIĆ; SUPANČIĆ, 1995)
CZE-ESI-MS	Plasma Humano	1,53	NR	(LAUSECKER; HOPFGARTNER; HESSE, 1998)
MEKC	Urina	0,06	0,15-6,13	(OLEDZKA et al., 2013)
DPP	Sol. Padrão	0,06	0,1-10	(VIRE; PATRIARCHE; HERMOSA, 1987)
NPA _{AdSV}	Sol. Padrão	0,00001	3,6-36	RIBES; OSTERYOUNG, 1990
Potenciometria	Formulações farmacêuticas	10	10-10000	GANJALI; LARIJANI; NOROUZI, 2012
SWA _{AdCV}	Formulações farmacêuticas	0,016	0,1-10	DOS SANTOS; FAMILA; GONÇALVES, 2002
DPA _{AdCV}	Sol. Padrão	NR	0,001-1.6	KIR; ONAR; TEMIZER, 1990
Impedancia	Sol. Padrão	NR	10-400	RAMESHKUMAR <i>et al.</i> , 2016
DPV	NR	NR	46-2760	JAIN; YADAV, 2012

Tabela 1 - Continuação

SWV	Urina	0,0017	0,0005-0,1	PANAHI <i>et al.</i> , 2018
SWV	Herbal	NR	NR	DOMÉNECH-CARBÓ <i>et al.</i> , 2013
SWAdSCV	Fitoterápica	NR	NR	DE CARVALHO <i>et al.</i> , 2010
Potenciometria	Plasma sanguíneo	0,6	10-1000	GHORBANI <i>et al.</i> , 2014

FL: faixa linear; LD: limite de detecção; NR: Não reportado; **Técnica:** DPP – Polarografia de pulso diferencial; NPAdSV – Voltametria de pulso normal adsortiva com redissolução catódica ; SWAdSCV – Voltametria de onda quadrada adsortiva com redissolução catódica; DPAdSCV – Voltametria de pulso diferencial adsortiva com redissolução catódica; DPV – Voltametria de pulso diferencial; SWV – Voltametria de onda quadrada; GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada com massas; GC-EI-MS: Cromatografia Gasosa de elétron impacto acoplado a espectrômetro de massas; RP-HPLC-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção espectrofotométrica na região do UV.; MEKC: Cromatografia eletrocínética micelar. CZE-ESI-MS: Eletroforese capilar de zona acoplada com ionização por electrospray e espectrometro de massas.

1.3 Eletrodo de diamante dopado com boro

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês “*boron doped diamond*”) é um material a base de carbono de alta dureza e resistência mecânica que vem sendo empregado com sucesso no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos aplicados em diferentes amostras, como: forense (OLIVEIRA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2017), ambiental (MIGLIORINI, 2011), farmacêuticas (LOURENCAO *et al.*, 2016; ALENCAR *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017) e biológicas (LIMA *et al.*, 2018). Esse material possui propriedades distinguíveis de outros eletrodos a base de carbono bastante utilizados (pasta de carbono, carbono vítreo, etc.), das quais, destacam-se: (i) estabilidade à corrosão em meios muito agressivos; (ii) ampla faixa de potencial em meio aquoso; (iii) baixa e estável corrente de fundo; (iv) baixa adsorção molecular; (v) robusto. Se o eletrólito adequado for selecionado, a evolução de hidrogênio é observada a partir de $-1,5 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{sat.})}$ e de oxigênio em $+2,3 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{sat.})}$ (FUJISHIMA *et al.*, 2005; SUFFREDINI *et al.*, 2004).

Para a síntese do eletrodo de diamante, os dois métodos mais reportados são a deposição química a partir da fase vapor (CVD, do inglês “*chemical vapor deposition*”) e o crescimento a alta-pressão/alta-temperatura (HPHT, do inglês “*high-pressure/high-temperature*”). O método HPHT foi desenvolvido pela General Electric (1955) (DE BARROS *et al.*, 2005; SPEAR; DISMUKES, 1994) e se assemelha mais ao crescimento natural do diamante, enquanto que o método CVD foi desenvolvido por William Eversole, da Union Carbide, no ano de 1952. O método HPHT necessita de temperaturas iguais ou maiores a 1670 K e de pressões altíssimas, da ordem de $5 \times 10^9 \text{ Pa}$, enquanto o método CVD trabalha a temperaturas da ordem de 1270 K e pressões entre 1000 e 10000 Pa (DE BARROS *et al.*, 2005; SPEAR; DISMUKES, 1994). Atualmente, o método CVD vem sendo mais empregado por sua versatilidade, simplicidade, economia e permitir o crescimento dos filmes em vários substratos de tamanhos diferentes (PLESKOV, 2002).

Diversos substratos condutores podem ser utilizados na fabricação do eletrodo de BDD, dos quais destacam-se o silício, molibdênio, tungstênio e titânio. A produção pelo método CVD é baseado na disposição de uma película de diamante sobre um substrato através da ativação de uma fase gasosa rica em carbono, introduzida em um reator (reatores com ativação de filamentos de tungstênio, ou plasma por micro-ondas). Geralmente, se utiliza metano altamente diluído em hidrogênio. Porém, podem ser empregados metanol, etanol e acetona, no processo. Com o objetivo de obter maiores taxas de crescimento dos filmes, pequenas frações de oxigênio ou compostos halogenados podem ser usados (DE BARROS *et al.*, 2005; NOTSU, 1999).

O diamante natural é um material isolante (resistividade em torno de $10^{16} \Omega \text{ cm}$). Os filmes de diamante natural tratado com plasma têm a sua resistividade diminuída a $10^6 \Omega \text{ cm}$, porém, para a obtenção de materiais semicondutores, esse valor de resistividade ainda é alto, sendo necessária a dopagem do diamante para obter um material com boa condutividade e assim, aplicar-se como eletrodo. O boro é o dopante mais empregado na construção de filmes de diamante (semicondutor do tipo p), devido o átomo de boro possuir baixa energia de ativação como transportador de carga ($\sim 0,37 \text{ eV}$). Geralmente, a introdução do boro no filme de diamante ocorre durante o crescimento, adicionando-se no reator substâncias que contenham boro. Os dopantes mais utilizados são: diborano (B_2H_6) e óxido de boro (B_2O_3). (DE BARROS *et al.*, 2005; KRAFT, 2007).

O B_2H_6 não contém carbono ou oxigênio na molécula, a qual evita a inclusão de elementos extras no reator e é facilmente encontrado, porém, é altamente tóxico, explosivo e reativo. O B_2O_3 é o mais empregado, pois tem grande disponibilidade, mas deve ser solubilizado em metanol e acetona (DE BARROS *et al.*, 2005). Em geral, são usados dopagem de boro entre 500 a 10000 ppm ($10^{19} - 10^{21} \text{ átomos cm}^{-3}$) (PLESKOV, 2002).

As superfícies do BDD recém preparado possui terminações de hidrogênio, o que se deve a atmosfera contendo gás hidrogênio usado durante o processo de fabricação (KRAFT, 2007). No entanto, essa terminação pode ser mudada para oxigênio através da exposição da superfície por um plasma de oxigênio, uma solução ácida em ebulição, ou uso de tratamentos eletroquímicos (aplicação de corrente ou potencial). Assim, pode-se obter BDD com terminações de hidrogênio e oxigênio (YAGI *et al.*, 1999).

Pelskov *et al.* (1987) mostraram pela primeira vez que as propriedades superficiais do eletrodo de BDD podem ser facilmente alteradas usando pré-tratamento eletroquímico. A partir deste estudo, diversos outros trabalhos vem investigando o comportamento eletroquímico pelas mudanças superficiais a partir de tratamentos eletroquímicos anódicos e catódicos (GOETING *et al.*, 2000; GRANGER *et al.*, 2000; NOTSU, 1999; TERASHIMA *et al.*, 2003; YAGI *et al.*, 1999).

É importante destacar que tratamentos anódicos aumentam a relação oxigênio/ carbono na superfície do filme, tornando a cinética de reação de transferência de elétrons em pares redox, como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ mais lenta. Para estas espécies, a reversibilidade da reação de transferência de carga aumenta com a diminuição do pH, indicando que grupos carboxilas,

negativamente carregados podem estar na superfície do filme, diminuindo a reversibilidade da reação de transferência eletrônica por exclusão de carga (DE BARROS *et al.*, 2005; YAGI *et al.*, 1999).

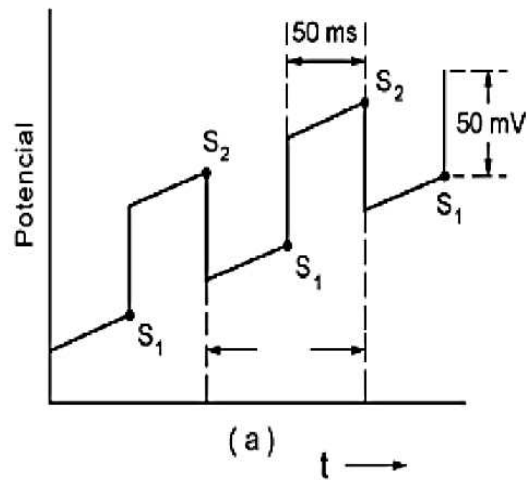
Devido as diferenças obtidas por estes tipos de tratamento, o eletrodo pode apresentar características hidrofóbicas (terminações de hidrogênio), ou hidrofílicas (terminações de oxigênio), de tal maneira que essas terminações podem influenciar as respostas eletroquímicas da espécie de interesse (KASAHARA *et al.*, 2017).

1.4 Voltametria de pulso diferencial

Barker e Jenkin introduziram as técnicas de pulso para reduzir os limites de detecção das medidas voltamétricas (WANG, 2006). Inicialmente, esse tipo de técnica surgiu como uma maneira de sincronizar os pulsos aplicados com o desprendimento das gotas no sistema de eletrodo gotejante de mercúrio, de tal maneira a diminuir a contribuição da corrente capacitiva. Assim, as técnicas de pulso baseiam-se na aplicação de degraus de potencial, fixos ou variáveis, para minimizar a aquisição da corrente capacitiva (BARD,, FAULKNER, 1980; WANG, 2006).

Na Voltametria de Pulso Diferencial (DPV, do inglês “*differential-pulse voltammetry*”), pulsos de potencial fixos são aplicados em uma rampa de potencial crescente no eletrodo de trabalho. A Figura 3 mostra a esquematização da aplicação de potencial em DPV (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; WANG, 2006).

Figura 3. Representação esquemática da aplicação de potencial em DPV.



Fonte: BRETT e BRETT, 1996.

Na DPV, como se pode observar na Figura 3, a corrente é medida imediatamente antes (Ponto S_1) e no final da aplicação do pulso de potencial (Ponto S_2). Essas correntes são instrumentalmente subtraídas ($I = I_{S_2} - I_{S_1}$) e essa diferença é registrada em função do potencial aplicado, gerando um pico de forma gaussiana. A medida em DPV é realizada desta maneira para minimizar a corrente capacitiva (corrente não faradaica). Quando se aplica um pulso, há um acréscimo da contribuição da corrente capacitiva e faradaica, no entanto, a corrente capacitiva decai exponencialmente enquanto que a faradaica, linearmente (BARD, FAULKNER, 1980; DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Deste modo, escolhendo-se um tempo adequado entre a primeira e a segunda leitura, a medida da corrente total é realizada a um valor onde a corrente capacitiva é minimizada sem perda significativa da corrente faradaica. A maneira em que a corrente é medida possibilita que em DPV, se obtenha limites de detecção da ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (WANG, 2006). Assim, a corrente resultante em DPV é proporcional a concentração da espécie de interesse, de acordo com a Equação (1):

$$I = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{t_m\pi}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad (1)$$

em que, I é a corrente resultante, F constante de Faraday, n número de elétrons, A área do eletrodo, D coeficiente de difusão, t_m tempo de modulação, C a concentração do analito de

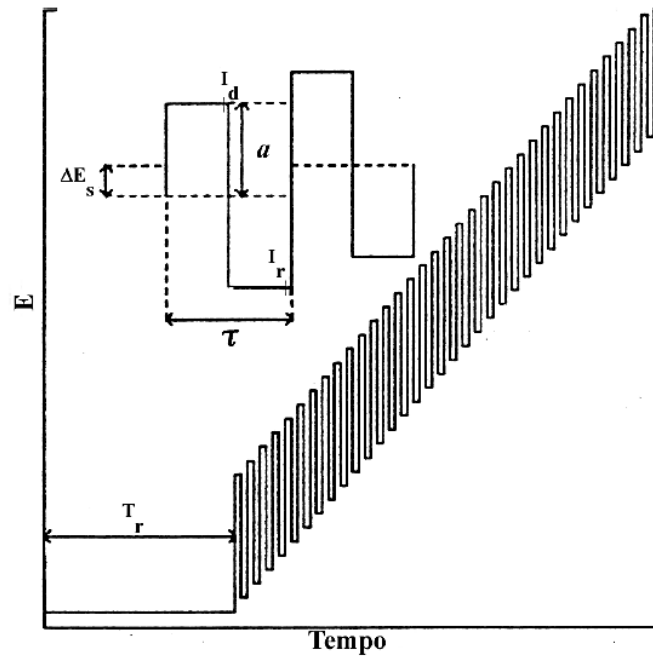
interesse e σ corresponde a $\exp(nFa/2RT)$, sendo a amplitude de modulação, R a constante dos gases e T a temperatura da análise. É importante destacar também que a corrente de pico é diretamente proporcional a amplitude de modulação e por isso, um aumento de amplitude gera maior intensidade no sinal. No entanto, um alargamento da base do pico gaussiano é observado com o aumento da amplitude (BARD, FAULKNER, 1980; BRETT; BRETT, 1996; WANG, 2006).

1.5 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*square-wave voltammetry*”) é uma técnica de pulso mais rápida e sensível em relação a outras técnicas eletroquímicas pulsadas. Além disso, ela permite a avaliação cinética e mecanística do processo redox em estudo, a partir da análise dos seus parâmetros característicos (BARD, FAULKNER, 1980).

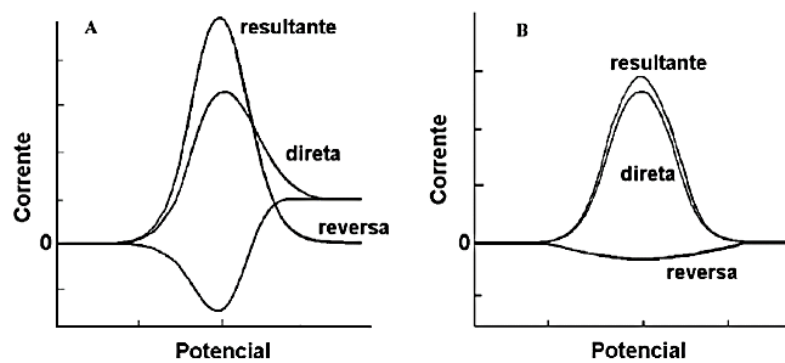
OSTERYOUNG e OSTERYOUNG (1985) desenvolveram o modelo de SWV mais utilizado atualmente. Neste modelo, a forma da curva de corrente-potencial é devido a aplicação de potenciais de amplitude a (amplitude do pulso de potencial) que variam numa rampa de potencial em forma de escada com altura de ΔE_s (incremento de potencial) e duração τ período, como mostrado na Figura 4. A corrente é medida ao final dos pulsos direto (pulso no sentido da varredura) e reverso de cada período. O sinal obtido resultante é a diferença entre as duas correntes obtidas (ΔI), como mostrado na Figura 5. O modo de aquisição de corrente diminui a detecção da corrente capacitiva, melhorando assim, o limite de detecção da técnica (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003)

Figura 4. Forma de aplicação de potencial em SWV.



Fonte: WANG, 2006.

Figura 5. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para (A) um processo redox reversível (B) irreversível.



Fonte: DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003.

Como o intervalo entre o pulso direto e reverso é pequeno, a corrente capacitiva é relativamente constante de modo que o cálculo da diferença entre as respostas dos pulsos direto e reverso, anulam efetivamente a contribuição da corrente capacitiva. Consequentemente,

velocidades de varreduras mais elevadas podem ser utilizadas em SWV, devido a forma de aquisição de corrente e subtração da corrente de fundo (BARD, FAULKNER, 1980; OSTERYOUNG; OSTERYOUNG, 1985).

Outra vantagem importante em SWV está relacionada a seu uso em soluções sem a remoção de gás oxigênio. Isso porque na região de corrente limitante para a redução de oxigênio, a contribuição das correntes diretas e reversas são iguais, levando assim a uma corrente resultante nula. Além disso, durante a varredura de potenciais negativos no sentido positivo, a elevada velocidade de varredura limita o tempo que as espécies eletroativas de oxigênio difundam até a superfície do eletrodo (BARD, FAULKNER, 1980).

Outra característica importante da SWV é a possibilidade de obtenção de informações precisas em relação ao mecanismo redox do sistema avaliado, levando em consideração os sinais de varredura direta e reversa. Os modelos teóricos desenvolvidos para o estudo mecanístico em SWV foram desenvolvidos por dois grupos de pesquisas: Grupo de Janet Osteryoung (OSTERYOUNG; OSTERYOUNG, 1985) e o grupo de Lovric (LOVRIC; KOMORSKY-LOVRIC; BOND, 1991). A utilização de programas computacionais capazes de simular o comportamento químico de sistemas reversíveis, quase-irreversíveis e irreversíveis, permitiu que os dois grupos desenvolvessem a teoria da voltametria de onda quadrada, a qual, atualmente, é bastante utilizada em diversos trabalhos (LIMA *et al.*, 2018; SELVA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017) para a obtenção de dados em relação a cinética, mecanismo e número de elétrons envolvidos, sob variadas condições (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

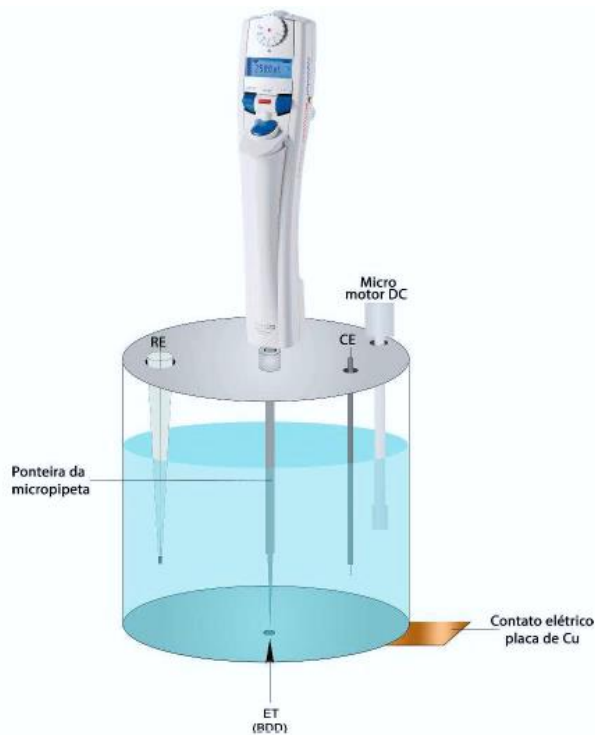
1.6 Análise por injeção por batelada (BIA)

O desenvolvimento de sistemas práticos e com boa precisão vem se tornando fundamental para análises rápidas em laboratórios com infraestrutura mínima ou mesmo *in locu*. Por isso, sistemas por injeção em batelada vem sendo explorados por diversos autores (CARDOSO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2017; TORMIN *et al.*, 2014). O sistema por injeção em batelada (BIA, do inglês “*Batch Injection Analysis*”) foi introduzido por WANG e TAHA (1991) utilizando o método amperométrico de detecção para explicar os conceitos do sistema BIA.

Este tipo de sistema pode ser uma alternativa para a análise em injeção em fluxo (FIA, do inglês, “*Flow Injection Analysis*”) (RAMSING; RŮŽIČKA; HANSEN, 1981). O sistema

BIA permite: **(i)** cerca de duzentas determinações sem manuseio de eletrodos e sem a necessidade de troca de solução, **(ii)** pequenos volumes de amostras podem ser injetados (10 a 150 μL), **(iii)** componentes usados são alimentados à bateria (mini-potenciostato, laptop e micropipeta), o que permite análise *in locu*. A Figura 6 mostra o esquema de uma célula BIA para a utilização do eletrodo de BDD. A injeção de amostra (injeções entre 10-150 μL) é realizada na posição oposta ao eletrodo de trabalho (configuração “*wall-jet*”) e um sistema de agitação pode ainda ser operado (opcional) (PEREIRA *et al.*, 2012).

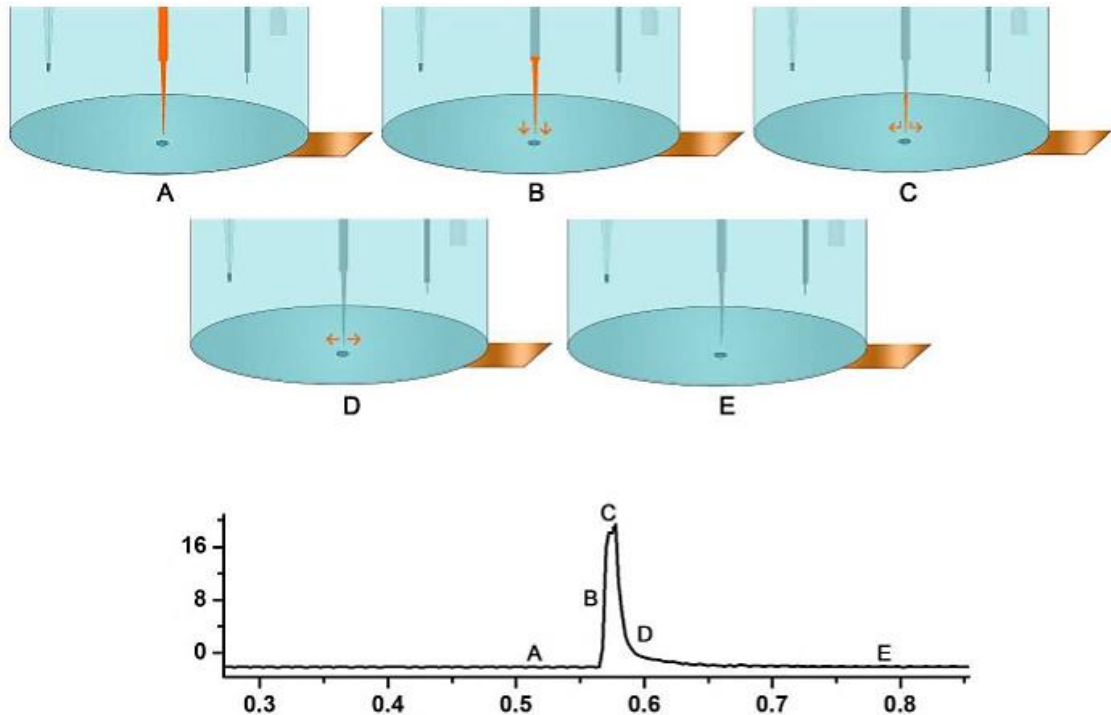
Figura 6. Esquema de uma célula BIA com detecção eletroquímica adaptada para o eletrodo de BDD.



Fonte: SILVA, 2017.

A injeção da amostra sobre a superfície do eletrodo de trabalho resulta na obtenção de sinais transientes (picos) (WANG; TAHA, 1991), conforme observado na Figura 7.

Figura 7. Etapas de operação de um sistema BIA com detecção amperométrica e respectivo sinal analítico obtido **(A)** antes da injeção; **(B)** durante a injeção; **(C)** final da injeção; **(D)** dispersão; **(E)** equilíbrio final.



Fonte: SILVA, 2017.

Antes da injeção da solução no sistema BIA é observado uma corrente constante, que é atribuída a corrente residual medida a partir do eletrólito inerte (Figura 7A). Ao se adicionar a amostra com a presença de uma espécie eletroativa no potencial aplicado, há um aumento rápido da corrente (Figura 7B), devido ao processo redox do analito na superfície do eletrodo transportado por convecção, que atinge um valor de corrente máximo rapidamente (Figura 7C). Após a injeção ocorre uma queda do sinal em direção a linha base (Figura 7D) até atingir o equilíbrio existente antes da injeção (Figura 7E). Essa última etapa pode ser acelerada através do uso de agitação mecânica da solução presente no interior da célula (PEREIRA *et al.*, 2012). A magnitude da corrente observada é proporcional a concentração da solução injetada e é observado que o fenômeno da passivação do eletrodo é menor quando comparado com o sistema estacionário, devido ao menor tempo de contato entre o analito e o eletrodo de trabalho (QUINTINO; ANGNES, 2004). Após a injeção ocorre uma elevada diluição na célula (ex.:

injeção de 100 μ L em 150 mL), o que é útil para diminuir a contaminação do eletrodo de trabalho e realização de inúmeras análises sem necessidade de manipulação dos eletrodos e lavagem da célula utilizada.

Nos estudos iniciais, a reprodutibilidade dos resultados com sistemas BIA era menor, devido ao uso de pipetas manuais, sendo que o sucesso da análise dependia da habilidade do operador em ser reprodutível na velocidade de injeção (WANG; TAHA, 1991). A introdução de pipetas eletrônicas com dispersão programada permitiu que melhores resultados fossem obtidos. No entanto, é importante destacar que parâmetros de volume e velocidade de injeção devem ser otimizados (QUINTINO; ANGNES, 2004). Seringas de insulina descartáveis ou pipetas manuais podem ser utilizadas em substituição da pipeta eletrônica, mas para corrigir eventuais erros relacionados a variações de volume e velocidade de injeção, faz-se necessário o uso de um padrão interno (GIMENES *et al.*, 2012).

O sistema BIA pode ser associado a diferentes tipos de técnicas de detecção, tais como: calorimetria (THAVARUNGKUL *et al.*, 1999), espectrofotometria (WANG; ANGNES, 1993), fluorescência (FERNANDES *et al.*, 1998), potenciometria (WANG; TAHA, 1991), amperometria (CARDOSO *et al.*, 2018; SILVA, 2017; RICHTER *et al.*, 2016) e voltametria (OLIVEIRA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2017).

BRETT e colaboradores mostraram pela primeira vez a utilização de técnicas voltamétricas acopladas ao sistema BIA. Eles utilizaram voltametria cíclica (CV), linear (LV) e onda quadrada (SWV) na determinação de hexacianoferrato (II), como composto modelo. As injeções por SWV envolviam uma injeção fornecendo uma curva voltamétrica contínua (BRETT; BRETT; MITOSERIU, 1994).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples, rápido e de baixo custo, utilizando voltametria de pulso diferencial na determinação de midazolam em amostras de bebidas alcóolicas (vodka, whisky e vinho tinto). O objetivo específico desse trabalho foi avaliar a oxidação eletroquímica desse composto e comparar os resultados obtidos com os da redução eletroquímica.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Medida eletroquímicas

3.1.1 Instrumentação

Para as medidas voltamétricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB Tipo III ou 128N (Eco Chemie, Metrohm, Holanda) interfaceado e controlado por um computador através do software Nova 1.11. Como eletrodo de trabalho, foi utilizado o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD), com área geométrica de $0,18 \text{ cm}^2$ adquirido pela empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (atualmente chamada NeoCoat SA - La Chaux-de-Fonds, Suíça). O eletrodo é constituído de uma placa a base de silício ($0,7 \times 0,7 \text{ cm}$) com espessura de aproximadamente 1 mm e coberta com fino filme de diamante ($1,2 \mu\text{m}$) com nível de dopagem com boro de 7000 a 8000 ppm.

Antes do início das análises eletroquímicas, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo de limpeza e/ou ativação eletroquímica. Esse procedimento foi realizado de duas maneiras:

- Ativação anódica: consiste na aplicação de uma corrente de $+0,01 \text{ A}$ em meio de tampão Britton-Robinson $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$) (TERASHIMA *et al.*, 2003).
- Ativação catódica: aplicação de uma corrente de $-0,01 \text{ A}$ em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010).

Este procedimento tinha duração de aproximadamente 16 minutos quando a ativação catódica era aplicada, e 30 minutos quando ambas as ativações eram empregadas. Diariamente, a ativação anódica a catódica era feita para a realização do trabalho.

Foi utilizado um mini-eletrodo de referência de $\text{Ag}/\text{AgCl}(\text{KCl}_{\text{sat.}})$, preparado no próprio laboratório, como previamente descrito por (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996) em que sobre um fio de prata, era aplicado um potencial de $+0,3 \text{ V}$ em meio de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ durante 1 hora, para promover a eletrodeposição de cloreto de prata sobre o fio. Este procedimento foi realizado uma única vez e o eletrodo de referência era utilizado em todas as análises. Um fio de platina foi empregado como eletrodo auxiliar.

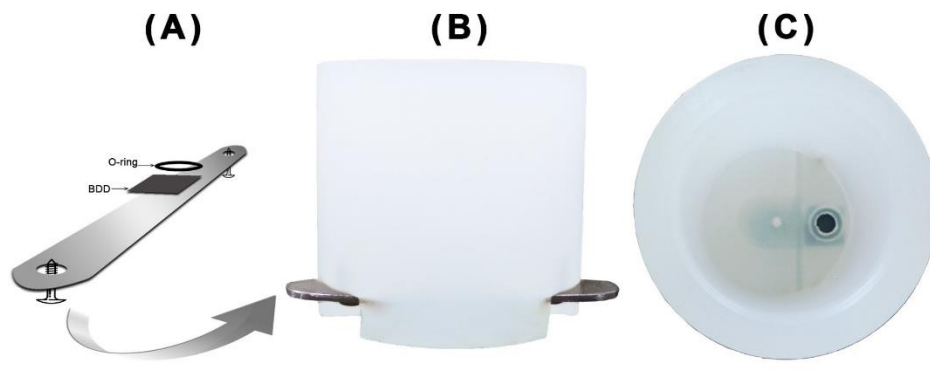
Para as análises eletroquímicas utilizando o pico de redução, foi necessário a aplicação de um potencial de $+1,40 \text{ V}$ entre as replicatas, para a limpeza da superfície do eletrodo.

Nos voltamogramas de pulso diferencial, foram realizados tratamentos de linha base (baseline), utilizando o software NOVA 1.11.

3.1.2 Célula eletroquímica

Nas medidas voltamétricas estacionárias, uma célula de polipropileno de 10 mL foi utilizada. Na parte inferior da célula, o eletrodo de BDD (0,7 x 0,7 cm) foi posicionado com auxílio de um anel de borracha (O-ring) que delimitava a área geométrica do eletrodo (0,18 cm²) e evitava vazamentos. A base de silício coberta com BDD foi fixada com o auxílio de uma placa metálica (contato elétrico) e parafusos, como mostrado na Figura 8. Todos os experimentos foram realizados sem a remoção do O₂ dissolvido e a temperatura ambiente (25 °C).

Figura 8. (A) Esquemática da fixação e do contato elétrico do eletrodo de BDD na célula de polipropileno. (B) Vista frontal da célula e (C) Vista superior da célula com o eletrodo de BDD posicionado ao fundo, com a área geométrica definida pelo O-ring.



Fonte: SILVA, 2017.

Nos estudos com o sistema BIA, foi utilizada uma célula cilíndrica de polipropileno, construída no próprio laboratório (TORMIN *et al.*, 2011). A célula apresentava altura de 7 cm, diâmetro de 6 cm, com capacidade de 150 mL. Uma tampa de polipropileno foi fixada e um orifício central foi feito na tampa e na base da célula. No orifício localizado na parte inferior da célula é fixado um O-ring e a placa de BDD, como descrito anteriormente para célula do sistema estacionário. Na parte superior da célula, a tampa continha quatro orifícios para posicionar os eletrodos de referência, auxiliar, o sistema de agitação da solução no interior do sistema BIA

(opcional) e um no centro da tampa para posicionar a ponteira da micropipeta eletrônica (injeção de solução). A célula foi construída de forma que a ponteira da micropipeta ficasse a uma distância de 2 mm do eletrodo de BDD durante a injeção (QUINTINO; ANGNES, 2004). Para a injeção das amostras, foi usado uma micropipeta eletrônica (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 μL usando um combitip (ponteira) de 1 mL e velocidades de injeção de 28 a 350 $\mu\text{L s}^{-1}$. A Figura 9 ilustra a célula BIA e seus componentes.

Figura 9. Componentes do sistema BIA: **(a)** Micropipeta eletrônica recarregável; **(b)** Ponteira da micropipeta (100 μL); **(c)** célula BIA ($\approx 200 \text{ mL}$); **(d)** tampa da célula e **(e)** sistema BIA portátil pronto para uso.



Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2018.

3.2 Soluções, reagentes e preparação das amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ($R \geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtidas pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore Direct-Q3, Bedford, MA, Estados Unidos). Todos os reagentes usados apresentavam pureza analítica e foram empregados sem purificação prévia. O padrão de maleato de midazolam de grau de pureza 99,9% foi disponibilizado pela Superintendência Regional da Polícia Federal Brasileira (Uberlândia, Minas Gerais). Uma solução estoque de 10 mmol L^{-1} foi preparada a partir da dissolução de quantidade adequada

do sal em água deionizada. Posteriormente, as soluções usadas nos estudos foram diluídas de forma apropriada no eletrólito suporte composto por tampão Britton-Robinson 0,12 mol L⁻¹ (pH = 2,0).

O tampão Britton-Robinson (BR) foi preparado pela mistura de ácido bórico de padrão analítico (Panreac, Barcelona, Espanha), ácido acético de grau de pureza de 99,7% e fosfórico, 85% (Synth, Diadema, Brasil), todos em concentração de 0,04 mol L⁻¹. A concentração final deste eletrólito é estimada em 0,12 mol L⁻¹, considerando-se a soma das concentrações do componente do tampão BR. O pH das soluções foi ajustado com hidróxido de sódio (Panreac, Barcelona, Espanha).

As amostras de bebidas usadas (vinho tinto, whisky e vodka), foram adquiridas em supermercados locais (Uberlândia, MG, Brasil) e eram diluídas em eletrólito suporte para posterior análise.

Para o teste de seletividade na detecção de MID, outros compostos benzodiazepínicos foram utilizados, como clonazepam (Pharma mostra, Campinas, Brasil), flunitrazepam (Sigma Aldrich, Alemanha) e diazepam (Pharma mostra, Campinas, Brasil). As soluções de clonazepam e diazepam foram preparadas em etanol com uma solução estoque de 1 mmol L⁻¹. A solução de flunitrazepam é comercialmente vendida na concentração de 100 µg mL⁻¹ dissolvida em metanol.

3.3 Parâmetros analíticos utilizados no método proposto

3.3.1 Limite de detecção (LD)

O limite de Detecção (LD) é definido como a menor quantidade da espécie analisada que pode ser determinada, mas não necessariamente quantificada sob as condições experimentais descritas do método proposto, ou seja, a menor quantidade do analito que pode ser identificada de forma confiável e diferente do sinal ruído do sistema (SKOOG *et al.*, 2006). O LD pode ser calculado de acordo com Equação 2:

$$LD = \frac{3s_b}{b} \quad (2)$$

onde, s_b refere-se ao desvio padrão do branco ($n = 10$) e b a inclinação da curva analítica (sensibilidade do método). Nestas condições, a confiabilidade do LD é de 95%.

3.3.2 Limite de quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação (LQ), por sua vez, é a menor concentração da espécie analítica que pode ser quantificada com um nível aceitável de precisão (proximidade dos vários resultados obtidos da mesma maneira) e exatidão (concordância entre o valor obtido com o valor verdadeiro) (MOCAK *et al.*, 1997). O LQ pode ser calculado de acordo com Equação 3:

$$LQ = \frac{10s_b}{b} \quad (3)$$

De acordo com GONZÁLEZ; HERRADOR, (2007), o fator 10 da Equação 2 leva em consideração de que o grau de confiança é 10% do sinal obtido.

3.3.3 Repetibilidade

A repetibilidade refere-se ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas sob as mesmas condições experimentais (procedimento de medição, observados, instrumento, local em repetições num curto espaço de tempo). As repetições devem incluir todas as etapas do processo de medição (INMETRO, 2016). Ela pode ser verificada contemplando uma concentração dentro da faixa de trabalho do método e pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medidas. O DPR pode ser calculado como na Equação 4.

$$DPR = \frac{D_{px}}{\bar{X}} * 100\% \quad (4)$$

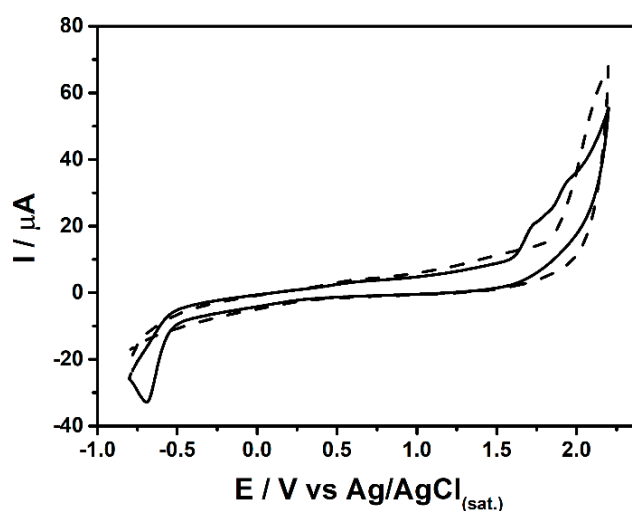
Em que, \bar{X} é a média da concentração do analito encontrada e D_{px} , o desvio padrão da concentração do analito.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento eletroquímico do MID em eletrodo de BDD

O comportamento eletroquímico do MID foi avaliado usando voltametria cíclica e tampão BR 0,12 mol L⁻¹ (pH = 2,0), sendo observado dois picos de oxidação (+1,69 V e +1,93 V) e um pico de redução (-0,64 V), como mostrado na Figura 10.

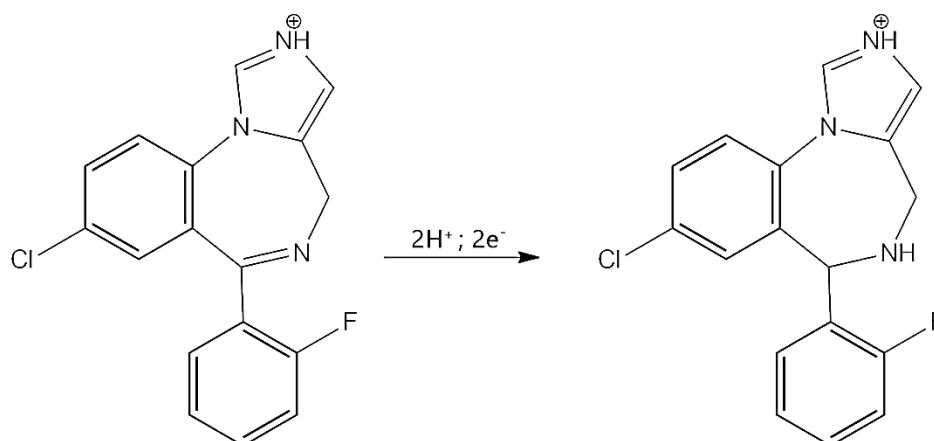
Figura 10. Voltametria cíclica para uma solução sem (---) e com (—) a presença de 1 mmol L⁻¹ de MID em tampão BR 0,12 mol L⁻¹ (pH = 2,0) usando BDD com pré-tratamento catódico. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹; incremento de potencial: 5 mV.



Fonte: A Autora.

A redução eletroquímica do MID já foi demonstrada anteriormente por outros autores (JAIN; YADAV, 2012; PANAHI *et al.*, 2018; RIBES; OSTERYOUNG, 1990). A reação ocorre em aproximadamente -0,64 V e está relacionada a um processo de redução irreversível envolvendo 2 elétrons e 2 prótons onde ocorre a formação da hidroxilamina como intermediário da reação, como descrito para outros benzodiazepínicos (HONEYCHURCH *et al.*, 2013). A Figura 11 mostra a reação de redução eletroquímica da molécula de MID.

Figura 11. Reação de redução eletroquímica do MID.

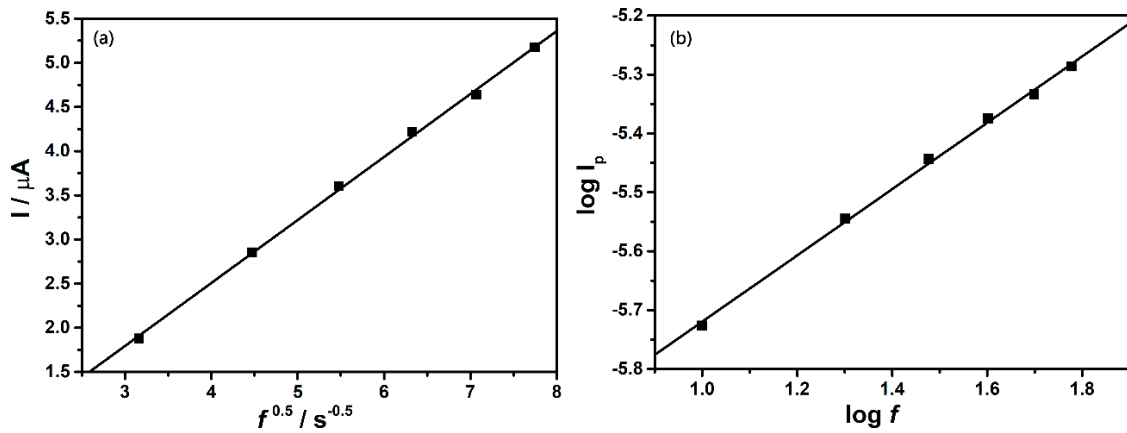


Fonte: Adaptado de JAIN; YADAV, 2012.

Na Figura 10 também foram observados dois picos de oxidação para o MID, em aproximadamente +1,69 V e +1,93 V. Após revisão bibliográfica foi verificado que o mecanismo de oxidação eletroquímica dessa molécula não foi investigado até o presente momento. Assim, estudos foram realizados com o objetivo de obter informações adicionais a respeito do processo eletroquímico existente entre o MID e o eletrodo de BDD. A Figura 11 mostra a influência do parâmetro frequência de aplicação dos pulsos (f) da técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) no comportamento eletroquímico do MID usando como eletrólito suporte BR 0,12 mol L⁻¹ (pH = 2,0) e BDD como eletrodo de trabalho. A frequência de aplicação dos pulsos em SWV pode fornecer informações importantes sobre o mecanismo do transporte de massa e o valor de αn (em que n é o número de elétrons e α o coeficiente de transferência de carga) para sistema irreversíveis (LOVRIĆ; KOMORSKY-LOVRIĆ; BOND, 1991).

Assim, foi realizado um estudo para identificar se o transporte de massa no processo de oxidação do MID é controlado preferencialmente por difusão ou adsorção de suas moléculas na interface do eletrodo/solução. Usando os dados da variação da frequência de aplicação de pulsos na voltametria de onda quadrada e a corrente detectada foram construídos dois gráficos, relacionando a corrente de pico (I_p) com: **(a)** raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos (f) e **(b)** logaritmo frequência de aplicação dos pulsos.

Figura 12. (a) I_p vs. $f^{1/2}$; (b) $\log I_p$ vs $\log f$. Eletrólito suporte: tampão BR 0,12 mol L⁻¹ (pH = 2,0). Solução: 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MID; Parâmetros de onda quadrada: $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.



Fonte: A Autora.

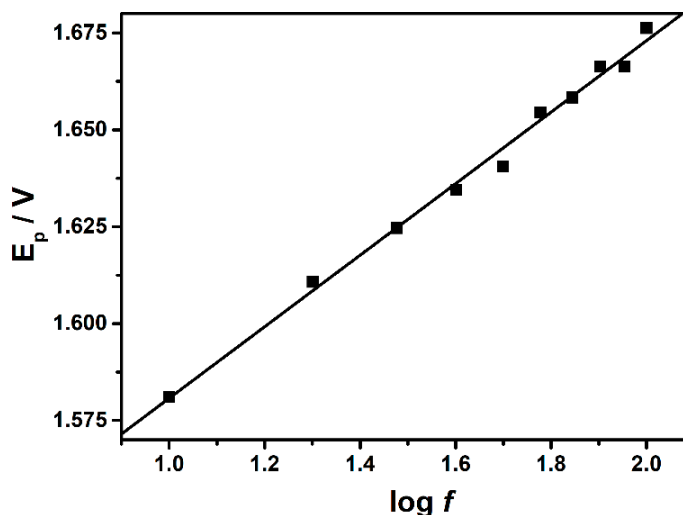
No processo de oxidação para o MID, com o aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais provocaram o aumento da corrente do pico. De acordo com O'DEA; RIBES; OSTERYOUNG (1993) em um sistema irreversível, o transporte de massa é controlado por difusão quando a corrente varia linearmente com a raiz quadrada da frequência de aplicação dos pulsos e adsorção quando a corrente de pico varia linearmente com a frequência de aplicação dos pulsos. Pelos resultados da Figura 12(a), observa-se uma relação linear entre a corrente de pico e a raiz da frequência dos pulsos aplicados ($r = 0,999$), indicando que o processo é controlado preferencialmente por difusão. Essa informação pode ser confirmada, avaliando o coeficiente angular da relação linear obtida ($r = 0,999$) entre $\log I_p$ vs $\log f$ (Figura 12(b)) na oxidação da MID que apresentou valor igual a 0,56. Este valor confirma que a natureza do processo de oxidação é preferencialmente por difusão, pois é descrito na literatura que valores próximos a 0,5 indicam processos controlados por difusão e valores próximo a 1,0 processos controlados preferencialmente por adsorção (GOSSER, 1993).

Para sistemas irreversíveis, a relação entre E_p e $\log f$ pode estimar o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação, a partir da Equação (5) (LOVRIC; KOMORSKY-LOVRIC; BOND, 1991):

$$\frac{\Delta E}{\log f} = - \frac{2,3RT}{\alpha nF} \quad (5)$$

em que, R é a constante dos gases, T temperatura, α coeficiente de transferência de carga, F a constante de Faraday e n o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação. A Figura 13 apresenta a relação entre o potencial de pico e logaritmo da frequência.

Figura 13. Relação obtida entre o potencial de pico (E_p) e o logaritmo da frequência ($\log f$).



Fonte: A Autora.

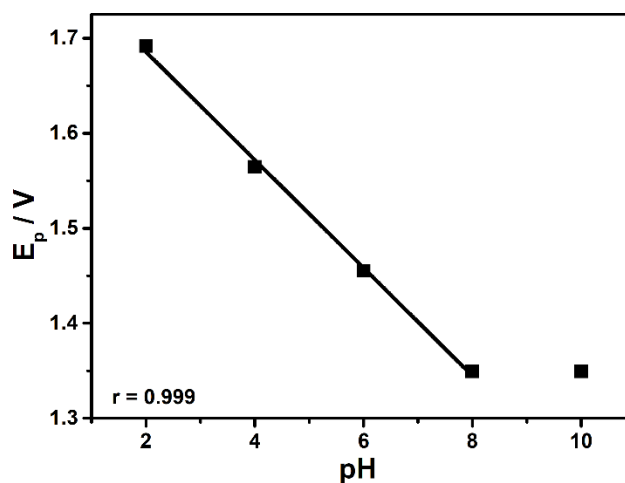
É observado a partir da Figura 12, um comportamento linear ($r = 0,996$) entre E_p e o $\log f$ com a equação de reta $y = 1,4884 + 0,0923x$. Assim, o número de elétrons pode ser obtido, utilizando o coeficiente angular da reta obtida e a Equação (4). Considerando o coeficiente de transferência de carga igual 0,5 como descrito para moléculas orgânicas que envolvam processos irreversíveis de oxidação (BARD, FAULKNER, 1980), o número de elétrons n calculado corresponde a 1,2 que pode ser aproximado à 1.

Posteriormente, foi verificada a influência do pH no potencial de oxidação (E_p) para o composto analisado, utilizando voltametria cíclica. Para este estudo, foi utilizado tampão BR 0,12 mol L⁻¹ (pH 2 a 10) ajustado com NaOH. De acordo com a literatura, a relação entre E_p e o pH determina o número de prótons envolvidos no processo de oxidação (HUYNH; MEYER, 2007). A Equação 6 mostra a dependência do potencial de pico e o pH:

$$E_p = E^o - \frac{0,059m}{n} pH \quad (6)$$

em que, $E^{o'}$ refere-se ao potencial formal, m e n ao número de prótons e elétrons envolvidos na reação, respectivamente. Figura 13 apresenta a relação entre E_p e pH para a molécula do MID.

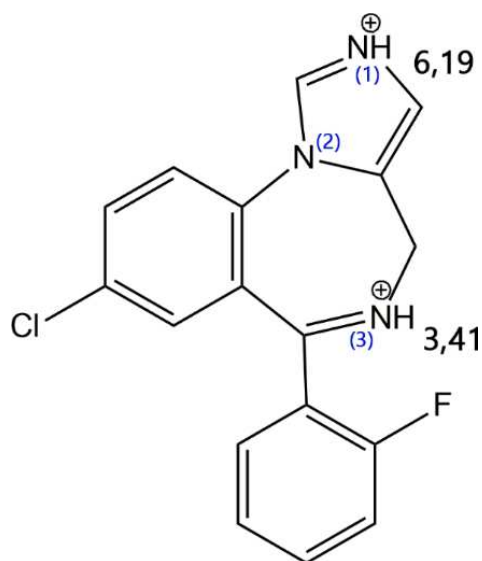
Figura 14. Variação do E_p em função do pH para o MID, utilizando voltametria cíclica e BDD como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; incremento de potencial: 5 mV .



Fonte: A Autora.

De acordo com a Figura 13, há uma relação linear entre E_p e pH (2,0-8,0) com o coeficiente angular igual a $0,057 \text{ V pH}^{-1}$ ($r = 0,999$). Substituindo esse valor na Equação 6, pode inferir-se que o número de elétrons envolvidos na reação é igual ao número de prótons. Assim, foi proposto o mecanismo de oxidação do MID, levando em consideração os resultados obtidos pelo estudo eletroquímico a qual mostrou o envolvimento de 1 próton e 1 elétron, a irreversibilidade da reação e os pKas dos hidrogênios da molécula do MID. A Figura 15 mostra os pKas da molécula de MID.

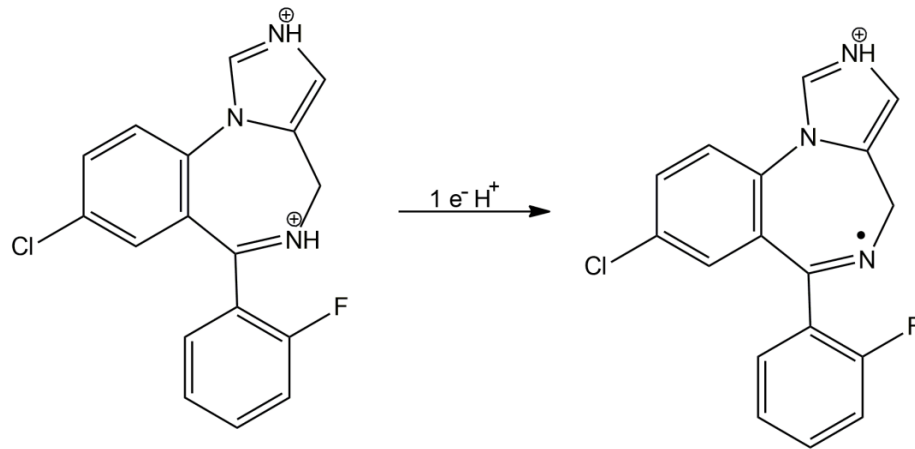
Figura 15. Molécula de MID e os respectivos pKas.



Fonte: Adaptado de Chemicalize (2018)

Devido a reação ocorrer em tampão BR 0,12 mol L⁻¹ (pH = 2,0), os nitrogênios 1 e 3 da Figura 15 estão protonados, e então existe a possibilidade de perda de um próton e um elétron nesses dois sítios da molécula (MORAES *et al.*, 2009). Desta maneira, para verificar em qual sítio ocorre a reação eletroquímica, é importante verificar a estabilidade dos radicais formados na reação destacada. No nitrogênio 3 (Figura 15), o cátion radical formado é estabilizado por diversas estruturas de ressonância, em ambos anéis benzênicos presentes na molécula. No entanto, no nitrogênio 1, presente no anel imidazólico da molécula (Figura 15), o grupo radical não é estabilizado por nenhuma estrutura de ressonância, sendo assim menos estável (BRUICE, 2006). Por isso, o mecanismo propõe que a oxidação ocorra no nitrogênio 3, de acordo com a Figura 15.

Figura 16. Mecanismo de oxidação proposto para MID.



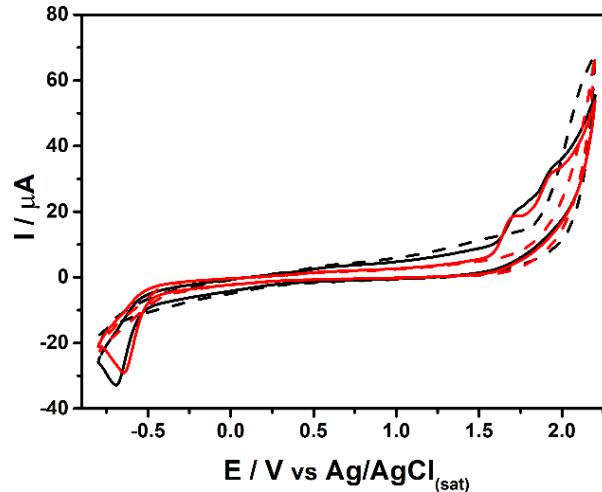
Fonte: A Autora.

Desta maneira, a oxidação envolve um elétron e um próton, formando um cátion radical que pode ocorrer rapidamente a dimerização do grupo radical de imidazol como já descrito por outros autores (OLIVEIRA *et al.*, 2016; WANG; O'MALLEY; FERNANDEZ, 1994).

4.2 Efeito da ativação do BDD na resposta eletroquímica do MID

O eletrodo de BDD apresenta diferentes polaridades superficiais, dependendo da ativação eletroquímica aplicada. A ativação catódica aumenta o número de terminações contendo hidrogênio, apresentando características hidrofóbicas, enquanto que a ativação anódica aumenta as terminações de oxigênio, exibindo características hidrofílicas (KONDO *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-HUITLE, 2007). A Figura 17 exhibe voltamogramas cíclicos obtidos após a adição de 1 mmol L^{-1} de MID em tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$).

Figura 17. Comparação entre os voltamogramas cíclicos de uma solução contendo 1 mmol L^{-1} de MID após a realização de ativação catódica (—) e anódica (---) do eletrodo de BDD. Demais condições experimentais: idem **Figura 12**.



Fonte: A Autora.

Analisando a corrente de pico para ambas as ativações avaliadas, não foram observadas diferenças significativas na intensidade do sinal. No entanto, uma melhor resolução dos picos de oxidação foi observada quando a ativação catódica foi aplicada na superfície do eletrodo. A baixa resolução e alargamento dos picos observados na ativação anódica pode ser atribuído à elevada reatividade dos radicais hidroxilas adsorvidos na superfície do BDD, promovendo reações de oxidação do eletrólito ou formação de peróxido (DE BARROS *et al.*, 2005; NOTSU, 1999). Assim, a ativação catódica foi escolhida para a realização das etapas subsequentes do trabalho.

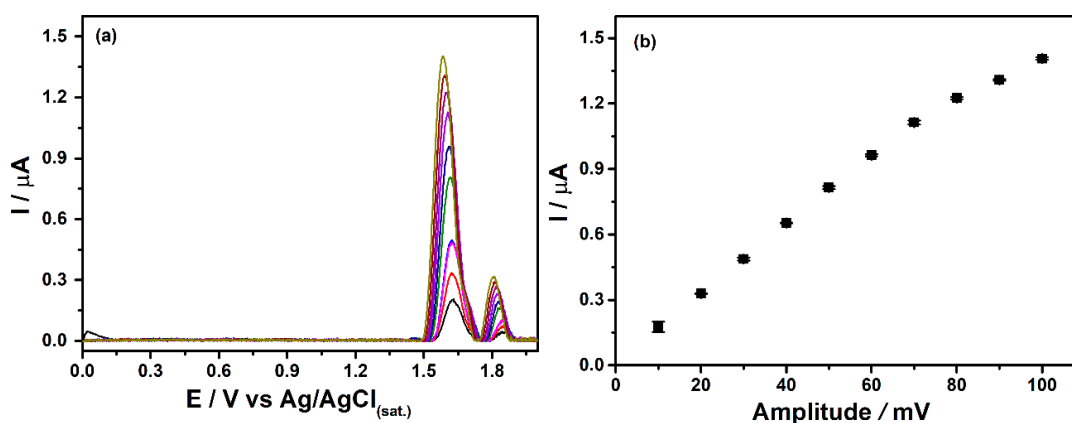
4.2 Otimização dos parâmetros de voltametria de pulso diferencial

Para o desenvolvimento de um método de análise empregando voltametria de pulso diferencial, é necessário a otimização dos parâmetros: tempo de modulação (t_m), incremento de potencial (ΔE_s) e amplitude de modulação (a) para obtenção de melhor resposta em relação a sensibilidade, perfil voltamétrico e velocidade de análise (WANG, 2006).

4.2.1 Otimização da amplitude de modulação

Inicialmente, foi avaliada a influência da amplitude de modulação no sinal analítico do MID. Para isso, foram fixados os valores do tempo de modulação e incremento de potencial e variou-se a amplitude entre 10 e 100 mV. A Figura 18 mostra a influência da amplitude na resposta voltamétrica do MID.

Figura 18. (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação de aplicação da amplitude de modulação. **(b)** Relação entre corrente de pico e amplitude de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0).



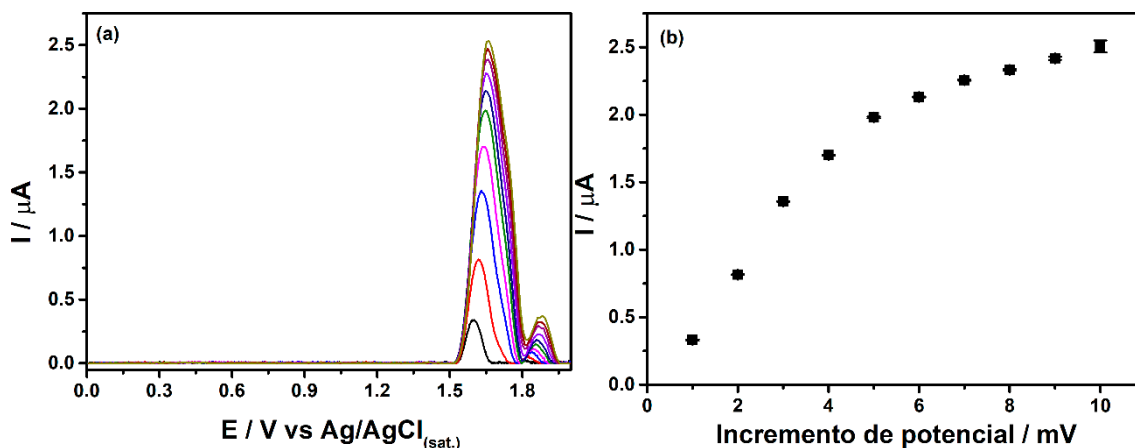
Fonte: A Autora.

Como se pode-se observar pela Figura 18, com o aumento da amplitude de modulação, há um aumento na corrente de pico do MID. No entanto, o aumento do parâmetro avaliado, gerou um alargamento do pico e por isso, escolheu-se para as análises amplitude de modulação de 70 mV.

4.2.2 Otimização do incremento de potencial

A medida do incremento de potencial foi avaliada num intervalo de 1 a 10 mV, mantendo-se constante a amplitude e o tempo de modulação em 50 mV e 25 ms, respectivamente. A Figura 18 mostra o efeito da variação do incremento de potencial no sinal analítico do MID.

Figura 19. (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação do incremento de potencial. **(b)** Relação entre corrente de pico e incremento de potencial. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $a = 50 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$).



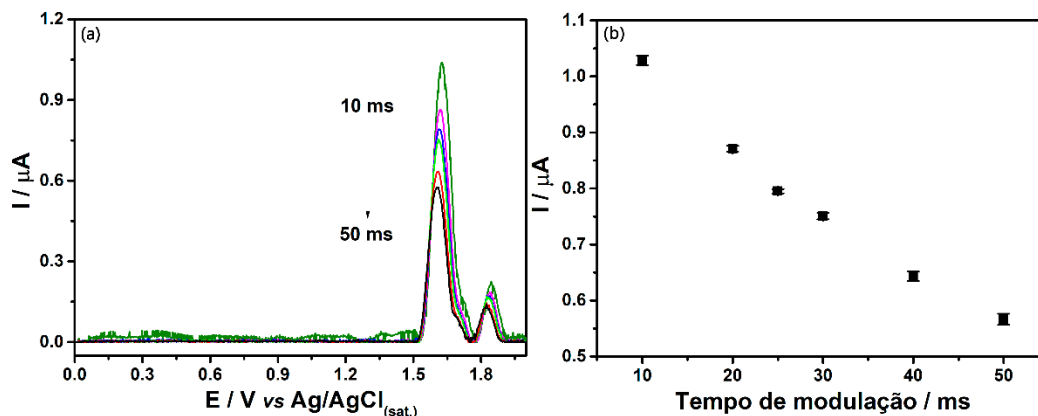
Fonte: A Autora.

Como se pode observar na Figura 19, à medida que o incremento de potencial aumenta, ocorre um aumento na intensidade da corrente de oxidação do MID. No entanto, também é observado um alargamento dos picos, comprometendo a resolução dos voltamogramas e consequentemente uma diminuição na seletividade do método. Além disto, o aumento no incremento de potencial, acarreta na diminuição dos números de pontos de aquisição de corrente da medida voltamétrica, deformando o voltamograma resultante. Por isso, para as análises posteriores, foi escolhido o valor de 6 mV , como incremento de potencial.

4.2.3 Otimização do tempo de modulação

Finalmente, foi avaliada a influência do tempo de modulação na detecção do MID, fixando os valores de incremento de potencial e amplitude em 2 mV e 50 mV , respectivamente. A Figura 20 mostra os voltamogramas obtidos para a variação do tempo de modulação no intervalo de $10\text{-}50 \text{ ms}$.

Figura 20. (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função da variação do tempo de modulação (10-50 ms). (b) Relação entre corrente de pico e tempo de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$).



Fonte: A Autora.

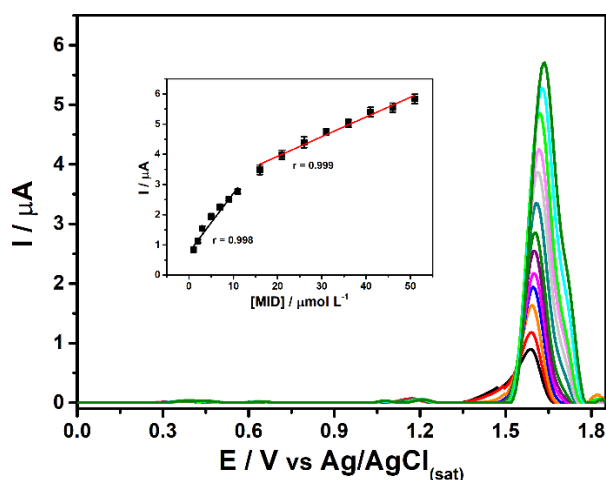
Como se pode observar na Figura 20, há uma diminuição da intensidade da corrente de pico, com o aumento do tempo de modulação. No entanto, maior ruído e alargamento do pico são observado em valores menores tempo de modulação. Na DPV, a corrente é medida, antes e após a aplicação do pulso de potencial com o objetivo de se obter a diferença entre elas para diminuir a contribuição da corrente capacitiva (BRETT; BRETT, 1996; WANG, 2006). Quando o pulso de potencial é aplicado, há um aumento da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradaica, no entanto, a diminuição da corrente capacitiva ocorre exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente. Dessa forma, o tempo de modulação selecionado para se fazer a leitura do valor da corrente após a aplicação do pulso de potencial deve ser suficiente para minimizar a contribuição da corrente capacitiva (WANG, 2006). Por isso, para análises de DPV, é recomendado valores maiores de tempo de modulação, pois, há uma menor contribuição da corrente capacitiva (BARD, FAULKNER, 1980; WANG, 2006). Além disso, maior ruído foi encontrado na linha base quando se utiliza o valor de 10 ms e por isso, escolheu-se o tempo de 25 ms para as análises posteriores.

4.3 Estudo da faixa linear

Um estudo para identificação da faixa concentração de MID onde há uma resposta linear com a corrente de oxidação do MID foi realizada utilizando os parâmetros otimizados para

DPV, descritos anteriormente. A Figura 20 mostra os voltamogramas obtidos na análise de soluções contendo concentrações crescentes de MID e as respectivas curvas de calibração obtidas.

Figura 21. Voltamogramas com correção de linha base obtidos para adição de soluções com concentrações crescentes ($1-50 \mu\text{mol L}^{-1}$) de MID e respectivas curvas de calibração obtidas (Figura inserida) em tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$). Parâmetros de DPV: $a = 70 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; $t_m = 25 \text{ ms}$.



Fonte: A Autora.

Como pode ser observado nos voltamogramas e nas curvas de calibração da Figura 21, foram obtidas duas faixas de resposta linear ($1-11 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $15-50 \mu\text{mol L}^{-1}$) com bons coeficientes de relação linear ($r = 0,998$ e $0,999$, respectivamente). A diferença encontrada entre as inclinações das duas curvas obtidas pode estar relacionada a disponibilidade da área eletroativa do BDD. Provavelmente, concentrações maiores do MID podem causar bloqueio parcial da área eletroativa, diminuindo a sensibilidade do método (inclinação da curva). Além disso, o produto de oxidação proposto para o MID e a formação do dímero podem estar adsorvendo na superfície do eletrodo, na qual contribui para o efeito observado.

Após isso, foi avaliada a estabilidade e a detecção do MID em três bebidas diferentes (vodka, vinho tinto e whisky). A Tabela 2 mostra o desvio padrão relativo para medidas sucessivas ($n = 4$) de amostras dopadas com MID para avaliar o efeito da diluição nas bebidas na estabilidade de resposta do BDD. Para este estudo, as amostras foram diluídas em diferentes

proporções em eletrólito suporte (1:10; 1:20; 1:50; 1:75; 1:100). Após isso, na própria célula eletroquímica, as soluções foram dopadas em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID, nas amostras de vodka, whisky e vinho tinto, respectivamente. As amostras foram dopadas com valores diferentes, devido a detecção observada para a determinação do MID nas diferentes amostras avaliadas.

Tabela 2. Efeito da diluição na estabilidade e detecção do MID ($n = 4$) nas amostras avaliadas, usando DPV nas condições otimizadas.

Diluição	DPR / %			
	Vodka [†]	Whisky [#]	Vinho tinto [*]	Solução hidro alcoólica [†]
1:10	ND	ND	ND	ND
1:20	2,7	7,7	ND	3,1
1:50	10,8	5,2	12,7	8,7
1:75	10,0	3,7	11,3	9,2
1:100	11,2	0,91	4,9	10,6

ND: Não detectada; Amostras dopadas com [†] $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ [#] $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e ^{*} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID. Solução hidro alcoólica contendo água e etanol na proporção 1:1.

Fonte: A Autora.

Como observado na Tabela 1, nenhum sinal analítico foi obtido para as bebidas avaliadas quando a diluição de 1:10 (v/v) foi utilizada. Para as amostras de vodkas, bons resultados ($\text{DPR} < 2,7\%$) foram obtidos quando a amostra foi diluída na proporção 1:20 (v/v). A presença do etanol na vodka pode contribuir para reduzir a adsorção do MID ou dos produtos de oxidação na superfície do eletrodo, melhorando a repetibilidade entre as análises. O mesmo efeito foi observado em uma solução hidro alcoólica na proporção água e álcool encontrado na vodka (1:1 (v/v)). Efeito similar também foi observado por JIMÉNEZ-PÉREZ *et al.* (2018) na determinação eletroquímica do ácido gama-hidroxibutírico (GHB) em amostras de vodka.

Para as amostras de vinho tinto e whisky, melhores resultados foram observados quando a diluição foi na proporção de 1:100 (v/v). Provavelmente, o efeito de matriz causado pela presença de outros compostos eletroativos na amostra foi minimizado nesta condição, já que o

whisky é uma bebida alcóolica destilada obtida pelo malte de cereais (cevada, trigo e centeio), contendo grupos fenólicos, moléculas orgânicas oxigenadas complexas, como 1-propanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, acetato de etila e monossacarídeos (BARBEIRA; STRADIOTTO, 1998; JIMÉNEZ-PÉREZ *et al.*, 2018; LEHTONEN; KELLER; ALI-MATTILA, 1999). Já as amostras de vinho, contêm antioxidantes polifenólicos (ácido fenólicos, flavonoides, antocianinas) e ácido tartárico, que são descritas como moléculas eletroativas em eletrodos a base de carbono (LOURENÇO *et al.*, 2018; NEWAIR; KILMARTIN; GARCIA, 2018).

Além disso, um estudo de adição e recuperação em uma solução hidroalcoólica (1:1 (v/v)) também foi realizado para verificar como a presença do etanol poderia interferir nas recuperações de MID e na sensibilidade do método. Para isso, a solução hidroalcoólica foi estudada nas diluições (1:20, 1:50, 1:75 e 1:100 (v/v)) em eletrólito suporte. A Tabela 3 apresenta as inclinações de cada curva obtidas (sensibilidade) e as recuperações em cada diluição avaliada.

Tabela 3. Efeito da diluição na adição, recuperação e sensibilidade do MID em uma solução hidroalcoólica, utilizando DPV nas condições otimizadas. As soluções foram dopadas na célula eletroquímica.

Diluição	Valor adicionado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Valor encontrado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação / %	Inclinação / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$
1:20	4	4,04 ± 0,12	101 ± 3	0,059
1:50	4	4,40 ± 0,36	110 ± 9	0,130
1:75	2	1,7 ± 0,21	85 ± 10	0,164
1:100	2	1,6 ± 0,24	80 ± 12	0,171

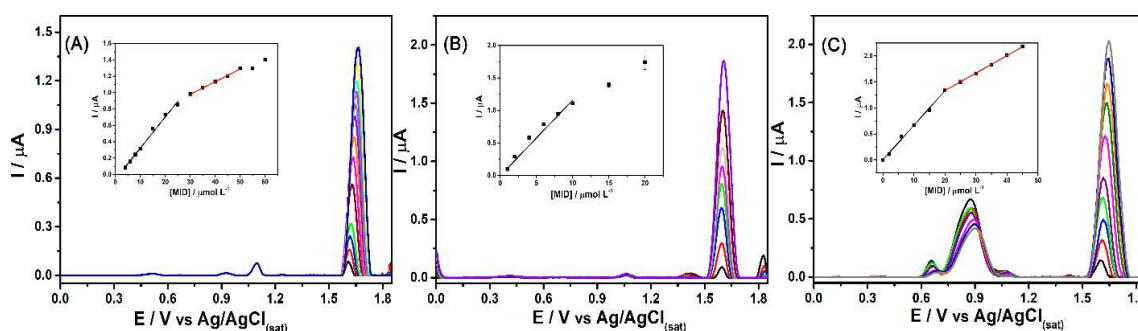
Fonte: A Autora.

Como observado na Tabela 3, boas recuperações foram obtidas com diluições menores da solução hidroalcoólica. Provavelmente, como discutido anteriormente, a presença do álcool pode contribuir para diminuição da adsorção do MID ou dos produtos de oxidação na superfície

do eletrodo, contribuindo para a obtenção de melhores resultados na quantificação do MID. No entanto, a inclinação (sensibilidade) da curva de calibração foi diminuindo, pois, o etanol contribui para o aumento da resistência da solução (BARD, FAULKNER, 1980; WANG, 2006) e, conseqüentemente, pode dificultar o processo de oxidação do MID. Além disso, a presença de etanol, aumenta a corrente de fundo do sistema, de tal modo que a sensibilidade é diminuída.

Assim, após definir a melhor diluição para cada amostra e as condições de DPV, um estudo para obtenção da resposta linear para cada amostra foi realizado. A Figura 22 apresenta os voltamogramas obtidos na análise de uma solução contendo concentrações crescentes de MID e a respectiva curva de calibração.

Figura 22. DPV com correção de linha base obtidas para soluções de concentrações crescentes de MID. (A) 4 -50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em vodka diluído 1:20 (v/v). (B) 1 - 11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em whisky diluído 1:100 (v/v) e (C) 1- 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em vinho tinto diluído 1:100 (v/v). Figura inserida: Respectivas curvas de calibração. Demais condições ver Figura 20.



Fonte: A Autora.

Como se pode notar na Figura 22(A), duas faixas lineares entre 4-25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 30-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram encontrados para amostra de vodka. Na presença de vodka, as faixas de concentrações com respostas lineares são maiores que as obtidas para solução padrão (Figura 21), indicando que o álcool pode ter diminuído a adsorção de MID ou dos produtos de oxidação (radical) ou do dímero formado na superfície do eletrodo, como descrito anteriormente. Entretanto, a inclinação da curva (sensibilidade do método) foi consideravelmente menor, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre as características analíticas do método proposto para determinação de MID em vodka, whisky e vinho tinto.

Características Analíticas	Amostras			
	Solução padrão*	Vodka	Whisky	Vinho tinto
r	0,998/0,999	0,997/0,998	0,995	0,998 / 0,999
Inclinação / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	0,1941/ 0,066	0,038/0,015	0,116	0,065/ 0,036
FL / $\mu\text{mol L}^{-1}$	1-11/15-50	4-25 / 30-50	1-10	1-15 /20-45
LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,074	0,46	0,43	0,33
LQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,24	1,52	1,42	1,09

FL – Faixa linear; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação. *Adições de MID em eletrólito suporte.
Fonte: A autora.

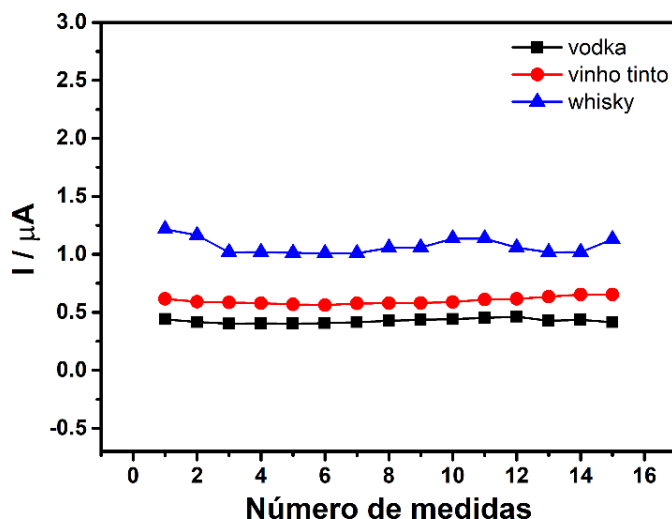
As faixas lineares obtidas para a determinação de MID na presença de whisky e vinho tinto foram similares quando comparados com as soluções padrões, porém, as inclinações das curvas foram menores devido ao efeito de matriz de cada amostra.

As respectivas diluições, faixas lineares, os valores de limites de detecção e quantificação foram satisfatórios para a aplicação do método proposto, uma vez que a dose sedativa estimada é $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$. Então, o efeito esperado ocorrerá em uma pessoa de aproximadamente 50 kg, se a concentração da bebida for em torno de 15 mg por 100 mL de bebida ($460 \mu\text{mol L}^{-1}$) (MARÇON *et al.*, 2018; REED *et al.*, 2001). É importante destacar que os valores mostrados na Tabela 4, não levam em consideração o fator de diluição.

4.4 Repetibilidade

Após a definição de todos os parâmetros de voltametria de pulso diferencial e da faixa linear de resposta para cada amostra (matriz), um estudo de repetibilidade do método proposto em cada amostra realizado. Na Figura 23 são mostrados os resultados obtidos para análises sucessivas ($n = 15$) de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em cada uma das bebidas avaliadas.

Figura 23. Resultados obtidos por voltametria de pulso diferencial para análises sucessivas ($n = 15$) de soluções contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID nas bebidas avaliadas, nas mesmas condições apresentadas na Figura 21.



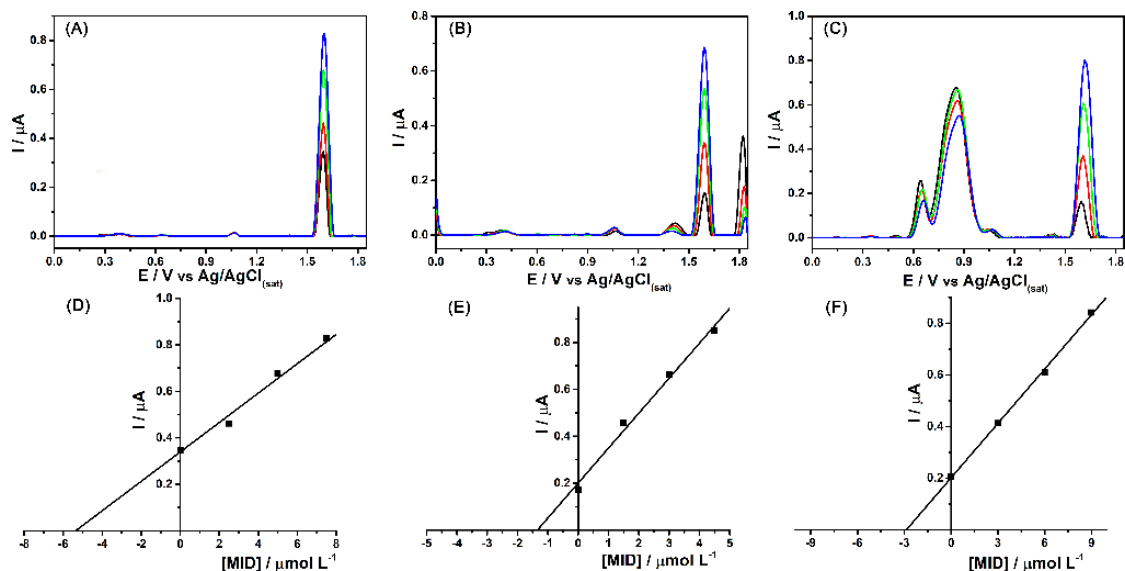
Fonte: A Autora.

Os resultados mostrados na Figura 23 demonstram flutuações aleatórias nas correntes de pico, o que indica que não há contaminação significativa no eletrodo de BDD, uma vez que não houve decaimento constante nos valores de corrente de picos registrados. O desvios padrões relativos calculados foram de 6,3%, 4,4% e 4,9% para soluções de amostras de whisky, vodka e vinho tinto contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID, respectivamente.

4.5 Análise de amostras de bebidas

As análises de bebidas alcólicas foram realizadas utilizando os parâmetros de DPV otimizados anteriormente. Para isso, curvas de adição de padrão foram feitas, considerando as faixas lineares obtidas e a diluição para cada amostra de bebida. A Figura 24 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos na análise de amostras de diferentes bebidas avaliadas dopadas com MID.

Figura 24. DPV com correção de linha base para a análise de amostras de bebidas alcóolicas dopadas e adições crescentes de MID para (A) vodka, (B) whisky e (C) vinho tinto e (D, E, F) respectivas curvas de calibração. Outras condições ver **Figura 13**.



Fonte: A Autora.

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na análise de amostras dopadas de bebidas com seus respectivos desvios padrões ($n = 3$).

Tabela 5. Resultados de recuperação obtidas para amostras de bebidas dopadas com MID, usando DPV ($n = 3$)

Amostra	Adicionado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Encontrado \pm DP / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação \pm DP / %
Vodka	5,00	5,13 \pm 0,36	103 \pm 3
Whisky	1,50	1,32 \pm 0,09	87 \pm 3
Vinho tinto	3,00	2,90 \pm 0,19	97 \pm 6

Fonte: A Autora.

Como pode observar na Figura 24, as curvas de adição de padrão apresentaram boa relação linear ($r > 0,996$). A recuperação média ficou entre 87 e 103%, podendo afirmar que o método proposto não apresentou efeitos significativos de matriz para a determinação de MID

nas bebidas avaliadas. Além disso, é importante que os valores encontrados não levaram em conta a diluição das amostras.

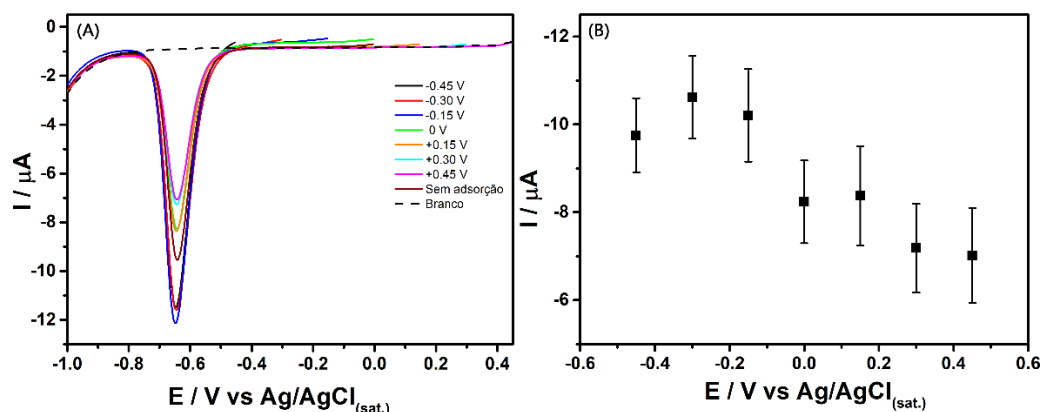
4.6 Comparação dos resultados obtidos para determinação do MID, utilizando oxidação e redução

Na literatura, diversos trabalhos exploram a determinação de MID através da redução eletroquímica (DIAS *et al.*, 2018; RIBES; OSTERYOUNG, 1990; VIRE; PATRIARCHE; HERMOSA, 1987). De acordo com a revisão bibliográfica, a determinação de MID por redução nunca foi explorada utilizando BDD como eletrodo de trabalho. Por isso, foram realizados experimentos de DPV, explorando o processo de redução para comparar os parâmetros analíticos obtidos (faixa linear, sensibilidade, repetibilidade e recuperação) com os observados pelo pico de oxidação.

4.6.1 Estudos de aplicação de potenciais de adsorção para redução do MID

Estudos realizados previamente por outros autores reportaram que o processo de redução do MID é preferencialmente controlado por adsorção. Assim, melhores resultados (intensidade do pico e repetibilidade dos dados) foram obtidos quando um potencial que promovesse a acumulação do MID na superfície do eletrodo foi empregado (DOS SANTOS; FAMILA; GONÇALVES, 2002; KIR; ONAR; TEMIZER, 1990; RIBES; OSTERYOUNG, 1990). Por isso, foi avaliada a utilização de potenciais de adsorção entre -0,45 e +0,45 V, durante 30 s, observando a repetibilidade e a intensidade da corrente de redução obtida para MID. A Figura 25 mostra os voltamogramas obtidos neste estudo.

Figura 25. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID após a aplicação de potenciais de adsorção entre $+0,45\text{V}$ e $-0,45\text{V}$; (B) corrente de redução obtida para a aplicação de cada potencial. Parâmetros de DPV: $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ e $t_m = 25 \text{ ms}$. Tempo de acumulação = 30s . Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$).



Fonte: A Autora.

Como pode ser verificado nos voltamogramas da Figura 25, com a aplicação de potenciais positivos, houve a diminuição do sinal analítico do MID, quando comparado com os voltamogramas obtidos com a aplicação de potenciais de adsorção negativos e sem a aplicação de qualquer potencial (sem adsorção). Provavelmente, o acúmulo de MID na superfície do eletrodo é desfavorecido com a aplicação de potenciais positivos, pois, no meio reacional, a molécula do MID está carregada positivamente (dois grupos azos da molécula estão protonados), gerando uma repulsão entre a molécula e a superfície do eletrodo. A aplicação de $-0,15 \text{ V}$ apresentou melhor sinal analítico, porém, a diferença entre o sinal obtido na aplicação de $-0,15 \text{ V}$ e sem a aplicação de qualquer potencial não foi significativa. A utilização de um potencial de adsorção, neste caso, diminuiria a frequência analítica do método sem melhoras significativas na intensidade do sinal. Por isso, nos estudos posteriores, não foi aplicado nenhum potencial de adsorção.

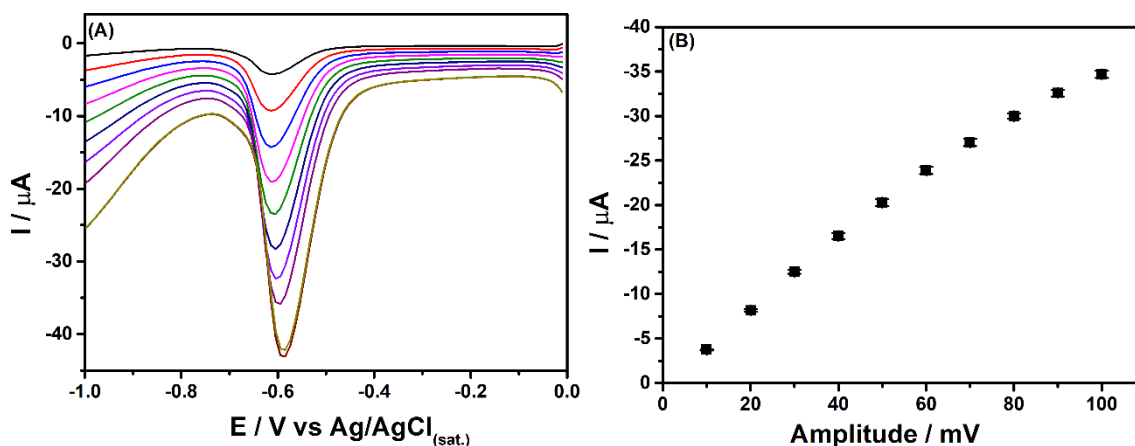
4.6.2 Otimização dos parâmetros de pulso diferencial

Assim como realizado nos estudos de oxidação do MID, os parâmetros da técnica de DPV (incremento de potencial, amplitude de modulação e incremento de potencial) em relação a redução do MID afim de obter a melhor resposta em relação a sensibilidade, resolução, perfil voltamétrico e velocidade de análise.

4.6.2.1 Otimização da amplitude de modulação

Foi avaliada a influência da amplitude de modulação no sinal analítico do MID. Para isso, foram mantidos constantes os valores de tempo de modulação em 25 ms e incremento de potencial em 2 mV e a amplitude foi estudada entre 10 e 100 mV. A Figura 26 mostra a influência da amplitude na resposta voltamétrica de redução do MID.

Figura 26. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação de aplicação da amplitude de modulação (10 – 100 mV). (B) Relação entre corrente de pico e amplitude de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



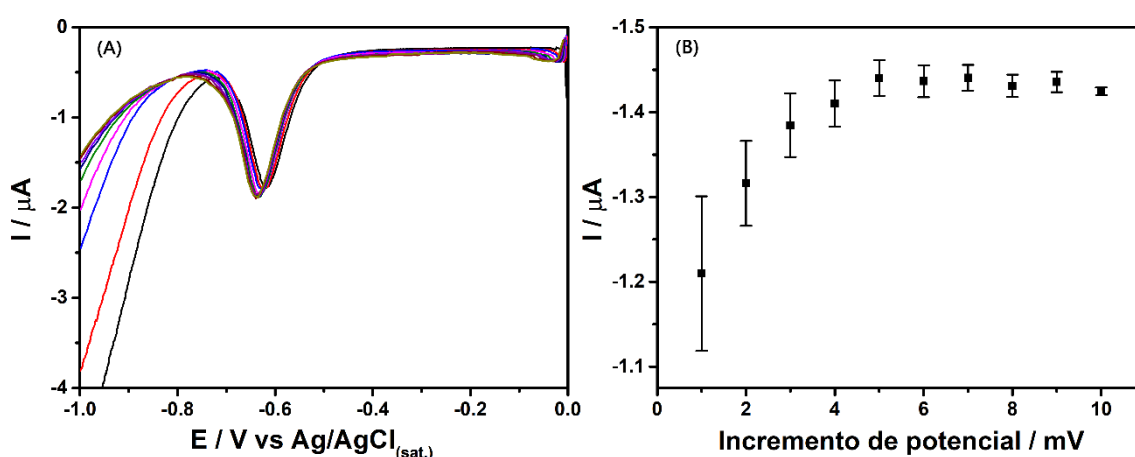
Fonte: A Autora.

Como pode se verificar na Figura 26, um aumento na amplitude de modulação promoveu um aumento no sinal analítico do MID. No entanto, um aumento deste parâmetro gera um alargamento do pico e, por isso, escolheu-se para as análises seguintes a amplitude de modulação de 70 mV.

4.6.2.2 Otimização do incremento de potencial

A medida do incremento de potencial foi avaliada num intervalo de 1 a 10 mV, fixando a amplitude de modulação em 50 mV e o tempo de modulação em 25 ms. A Figura 27 mostra o efeito da variação do incremento de potencial no sinal analítico do MID.

Figura 27. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação do incremento de potencial (1 - 10 mV). (B) Relação entre corrente de pico e incremento de potencial. Parâmetros de pulso diferencial: $t_m = 25 \text{ ms}$ e $a = 50 \text{ mV}$. Eletrólito suporte: Tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0).



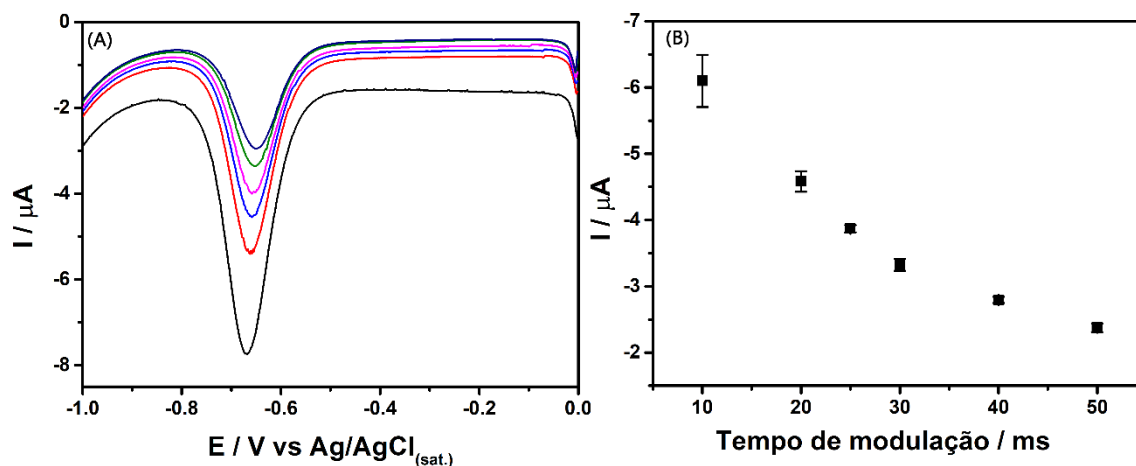
Fonte: A Autora.

Como pode se observar nos voltamogramas da Figura 27, houve um pequeno aumento na corrente de pico até 5 mV. Após isso, a corrente manteve-se constante. Por isso, para os experimentos posteriores, escolheu-se o incremento de potencial de 5 mV.

4.6.2.3 Otimização do tempo de modulação

Por fim, foi verificada a influência do tempo de modulação na detecção do MID, fixando os valores de incremento de potencial e amplitude de modulação em 2 mV e 50 mV, respectivamente. Na Figura 28, são apresentados os voltamogramas obtidos para a variação do tempo de modulação no intervalo de 10-50 ms.

Figura 28. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID em função da variação do tempo de modulação (10 - 50 ms). (B) Relação entre corrente de pico e tempo de modulação. Parâmetros de pulso diferencial: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$.



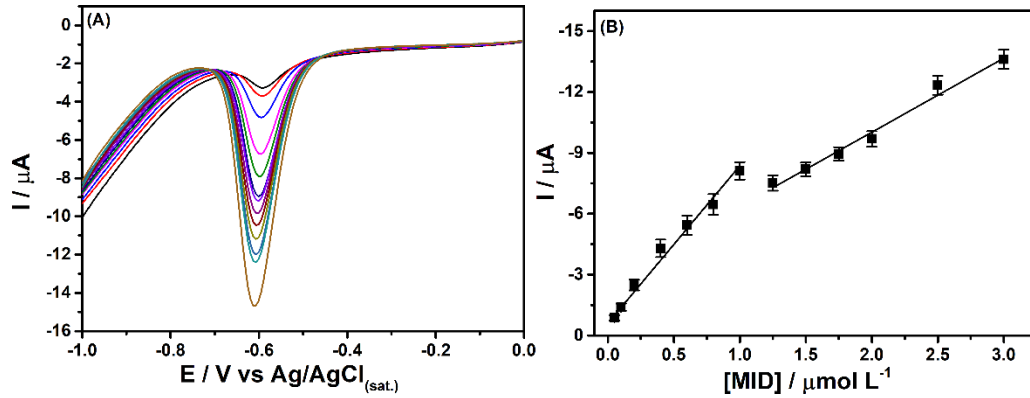
Fonte: A Autora.

Como se pode verificar na Figura 28, há uma diminuição da intensidade da corrente de pico, com o aumento do tempo de modulação. No entanto, maior ruído e alargamento do pico são observados em valores menores de tempos de modulação. Como já discutido na seção 4.2.3, para análises de DPV, é recomendado o uso de valores maiores de tempo de modulação, para que ocorra uma menor contribuição da corrente capacitiva (BARD, FAULKNER, 1980; WANG, 2006). Por isso, escolheu-se o tempo de 25 ms para as análises posteriores.

4.6.3 Estudo da faixa linear a partir do pico de redução do MID

Após a otimização dos parâmetros de DPV, foi avaliado a faixa de resposta linear para o MID usando o pico de redução. A Figura 29 apresenta os voltamogramas obtidos na análise de soluções contendo concentrações crescentes de MID e a respectiva curva de calibração.

Figura 29. (A) Voltamogramas com correção de linha base obtidos para análise de soluções com concentrações crescentes (1 - 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de MID e (B) respectiva curva de calibração obtida em tampão BR 0,12 mol L^{-1} (pH = 2). Parâmetros de DPV: $a = 70 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$; $t_m = 25 \text{ ms}$.



Fonte: A Autora.

Como pode ser observado nos voltamogramas e nas curvas de calibração da Figura 29, foram obtidas duas faixas lineares de resposta ($0,05\text{-}1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,25\text{-}3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) com bons coeficientes de correlação ($r = 0,994$ e $0,992$, respectivamente).

Assim, foi possível fazer a comparação entre os resultados obtidos para determinação de MID a partir dos processos de oxidação e redução. A Tabela 6 reúne as características analíticas para a determinação de MID usando DPV a partir do pico de oxidação e de redução.

Tabela 6. Comparação entre os resultados analíticos obtidos para a determinação de MID usando voltametria de pulso diferencial a partir do pico de oxidação e redução.

Características Analíticas	Pico oxidação	Pico redução
r	0,998/0,999	0,994/0,992
Inclinação / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	0,1941/0,066	-7,76/-3,64
FL / $\mu\text{mol L}^{-1}$	1-11/15-50	0,05-1/ 1,25-3,0
LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,07	0,01
LQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,24	0,03
Repetibilidade (n=10) / %	3,5*	8,0 [†] /6,6 [‡]
Frequência analítica / h⁻¹	20	30

para uma solução de *10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [†]0,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e [‡]1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MID.

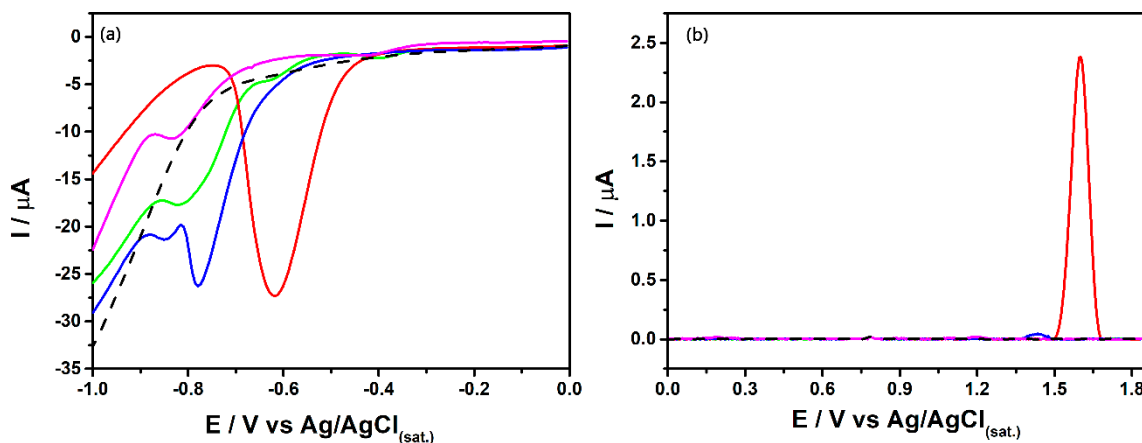
Fonte: A Autora.

Como pode ser observado na Tabela 6, os resultados obtidos com o processo de redução são melhores em relação a sensibilidade, faixa linear e limite de detecção. Somente a linearidade do método é ligeiramente melhor usando o pico de oxidação. No entanto, para o tipo de amostra para qual o trabalho é proposto, os valores dos parâmetros analíticos encontrados para o pico de oxidação são adequados.

4.6.4 Seletividade do método

Para avaliar e comparar a seletividade dos métodos utilizando o pico de oxidação e redução, outras moléculas do grupo dos benzodiazepínicos que são descritas na literatura como drogas de estupro consentido (ACIKKOL; MERCAN; KARADAYI, 2009; MARTINS *et al.*, 2010; SMYTH; IVASKA, 1985) foram avaliadas. Os benzodiazepínicos avaliados foram: clonazepam (CLO), flunitrazepam (FLU) e diazepam (DIA), mantendo-se as mesmas condições experimentais otimizadas previamente. A Figura 30 mostra os voltamogramas obtidos para cada molécula avaliada.

Figura 30. Voltamogramas de pulso diferencial de (a) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de clonazepam (CLO —), midazolam (MID —) e flunitrazepam (FLU —) e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ diazepam (DIA —) na região catódica e (b) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CLO, DIA e FLU e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MID na região anódica. A linha tracejada refere-se ao sinal obtido com o branco.



Fonte: A Autora.

Como pode ser observado na Figura 30(a), DIA e o CLO reduzem na região de próxima do potencial de redução do MID. Já a molécula de FLU apresentou o pico em aproximadamente -0,86 V e, nas concentrações avaliadas, o pico não interferiu na determinação de MID. No entanto, na região anódica (Figura 30(b)), não são observados picos de oxidação para o FLU, DIA e CLO. Portanto, quando o processo de oxidação do MID é usado, o método é seletivo na presença dos benzodiazepínicos avaliados. O processo redox observado para os benzodiazepínicos analisados já foi descrito previamente por outros autores, e assim como para o MID ocorre a partir da redução do grupo azo existente nessas moléculas, envolvendo número igual de prótons e elétrons (HONEYCHURCH *et al.*, 2013; SMYTH; IVASKA, 1985).

4.6.5 Comparação eletroquímica dos resultados obtidos com os descritos na literatura

Como já discutido anteriormente, não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizassem a oxidação eletroquímica do MID para sua determinação. Assim, foi realizado um levantamento bibliográfico dos trabalhos eletroquímicos que utilizavam a redução do MID para comparar com as características analíticas obtidas com o método proposto neste trabalho. A

Tabela 7 sumariza as características analíticas de métodos eletroquímicos descritos na literatura e os obtidos neste trabalho.

Tabela 7. Comparação entre as características analíticas do método proposto com outros métodos eletroquímicos reportados para a determinação de MID.

Técnica	Amostra	LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	FL / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Eletrodo	Referência
DPP	Sol. Padrão	0,06	0,1-10	HMD	(VIRE; PATRIARCHE; HERMOSA, 1987)
NPAdSV	Sol. Padrão	0,00001	3,6-36	HMD	RIBES; OSTERYOUNG, 1990
Potenciometria	Comprimido	10	10-10000	PVC	GANJALI; LARIJANI; NOROUZI, 2012
SWAdSCV	Comprimido	0,016	0,1-10	HMD	DOS SANTOS; FAMILA; GONÇALVES, 2002
DPAdSCV	Sol. Padrão	NR	0,001-1.6	HMD	KIR; ONAR; TEMIZER, 1990
Impedancia	Sol. Padrão	NR	10-400	Au- PoliAn	RAMESHKUMAR <i>et al.</i> , 2016
DPV	NR	NR	46-2760	GCE	JAIN; YADAV, 2012
SWV	Urina	0,0017	0,0005- 0,1	MIP- CPE	PANAHI <i>et al.</i> , 2018
SWV	Herbal	NR	NR	GE- paraffin	DOMÉNECH-CARBÓ <i>et al.</i> , 2013
SWAdSCV	Fitoterápica	NR	NR	HMD	DE CARVALHO <i>et al.</i> , 2010
Potenciometria	Plasma sanguíneo	0,6	10-1000	CPE	GHORBANI <i>et al.</i> , 2014
	Vodka	0,46	4-25		
DPV	Whisky	0,43	1-10	BDD	Este trabalho
	Vinho tinto	0,33	1-15		

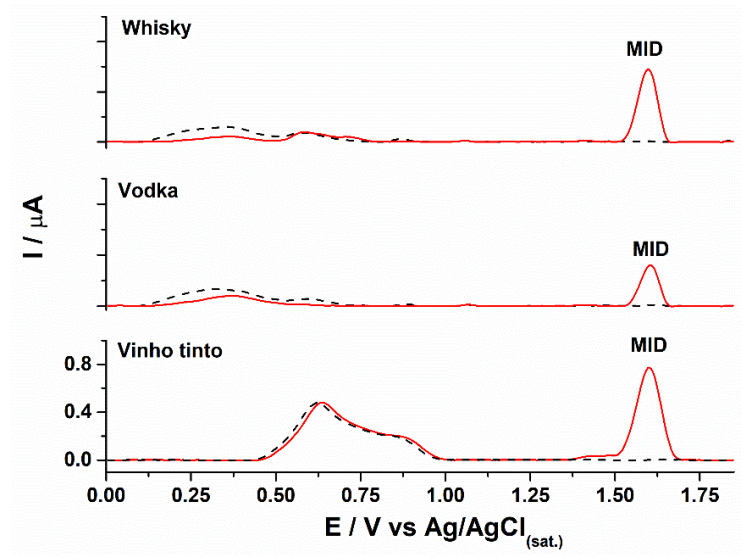
FL: faixa linear; LD: limite de detecção; NR: Não reportado; **Técnica:** DPP – Polarografia de pulso diferencial; NPAdSV – Voltametria de pulso normal adsortiva com redissolução catódica; SWAdSCV – Voltametria de onda quadrada adsortiva com redissolução catódica; DPAdSCV – Voltametria de pulso diferencial adsortiva com redissolução catódica; DPV – Voltametria de pulso diferencial; SWV – Voltametria de onda quadrada; **Eletrodos:** HMD – Eletrodo de gota pendente de mercúrio; PVC – Membrana de PVC; Au-PoliAn – Eletrodo de ouro modificado com polialinina; GCE – Eletrodo de carbono vítreo; Nano-MIP- CPE – Eletrodo molecularmente impresso em pasta de carbono; GE-paraffin – parafina impregnada com grafite; CPE – Pasta de carbono BDD – diamante dopado com boro. **Fonte:** A Autora

Como pode se verificar na Tabela 6, cinco trabalhos localizados na literatura não verificaram o desempenho do método desenvolvido com a determinação do MID em amostras reais. Além disso, sete trabalhos encontrados na literatura, descritos na Tabela 6, requerem o uso de etapas de pré-concentração (adsorção na superfície do eletrodo) ou a modificação de eletrodos (etapas trabalhosas e pouco reprodutíveis), as quais aumentam o tempo de análise. O trabalho usando o eletrodo de BDD apresentou boa repetibilidade, limite de detecção adequado para a aplicação proposta e maior rapidez e robustez, pois a análise é possível usando eletrodo sem modificação.

4.7 Triagem rápida de amostra de bebidas

Os métodos eletroquímicos têm grande potencial para análises rápidas e *in locu* (DE ARAUJO *et al.*, 2018). No entanto, nas células eletroquímicas convencionais, a manipulação dos três eletrodos (referencia, auxiliar e de trabalho), célula eletroquímica e das amostras não são práticos, o que muitas vezes dificulta a triagem rápida de amostras e em locais de infraestrutura mínima ou mesmo “*in locu*”. Por esse motivo, o método proposto foi adaptado a um sistema BIA portátil para a triagem/determinação rápida de MID em bebidas. Como discutido na seção 1.6, com a utilização do sistema BIA é possível a realização de duzentas injeções (triagens) sem manuseio de eletrodos, da célula e sem a necessidade de adicionar soluções (alta taxa de diluição após a injeção) ou reagentes ao sistema (RICHTER *et al.*, 2016). A Figura 31 mostra os resultados obtidos para uma rápida triagem em três bebidas diferentes (vodka, whisky e vinho tinto), antes e depois da adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID.

Figura 31. BIA-DPV varreduras obtidas para amostras de whisky e vinho tinto (diluição 1:100) e vodka (diluição 1:20) em eletrólito suporte antes (---) e depois (—) da adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID. Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $16,5 \mu\text{L s}^{-1}$. Demais condições de DPV: Figura 13.

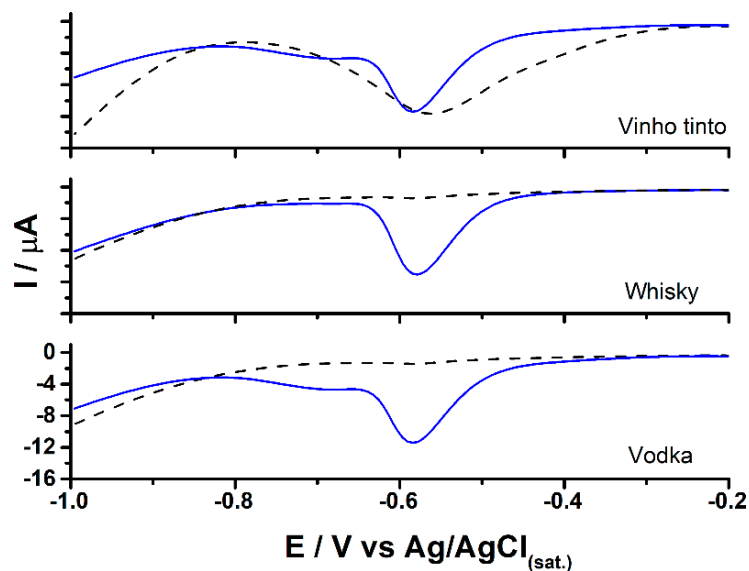


Fonte: A Autora.

Como pode se observar na Figura 30, nenhuma das bebidas avaliadas apresentaram picos em torno de +1,6 V. Ao se adicionar MID nas bebidas avaliadas, um pico de oxidação bem definido foi observado em +1,6 V, indicando que a oxidação do MID pode ser utilizada como um sistema de identificação da contaminação das bebidas *in locu*. É importante destacar que esse tipo de análise requer simples diluição da amostra em eletrólito e volume mínimo de solução por triagem ($100 \mu\text{L}$) (WANG, JOSEPH; TAHA, 1991). A amostra foi injetada numa velocidade lenta sobre a superfície do eletrodo para que a amostra permaneça tempo suficiente perto do eletrodo para que a varredura por DPV seja possível.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando a redução eletroquímica do MID. A Figura 32 mostra os resultados obtidos utilizando o sistema BIA e amostras de bebidas para o pico de redução.

Figura 32. BIA-DPV obtidos para whisky e vinho tinto (diluição 1:100) e vodka (diluição 1:20) em eletrólito suporte antes (---) e depois (—) da adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MID, utilizando a redução eletroquímica. Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; Velocidade de injeção: $16,5 \mu\text{L s}^{-1}$. As mesmas condições de DPV da **Figura 28**.



Fonte: A Autora.

Para a amostra de whisky e vodka, nenhum pico de redução foi encontrado em torno de $-0,56 \text{ V}$. Porém, para a amostra de vinho, uma banda larga foi detectada antes da adição de MID a bebida, o que poderia acarretar em erros de falso-positivo em análises. Assim, este teste indica, que nas bebidas analisadas, a utilização do pico de oxidação para determinação de MID seria mais viável, uma vez que não foram observados picos nas bebidas no mesmo potencial de oxidação do MID.

É importante salientar que o sistema BIA usando BDD como eletrodo de trabalho é robusto e pode ser usado com sucesso como um sistema portátil de triagem rápida. Além da aplicação aqui demonstrada, o sistema também permite a triagem de amostras de bebidas para detecção de escopolamina (OLIVEIRA *et al.*, 2018) triagem de produtos naturais para detecção de adulterações com sibutramina (FREITAS *et al.*, 2019), triagem de amostras apreendidas de cocaína para verificação de sua pureza (FREITAS *et al.*, 2017) e controle de qualidade de inúmeras formulações farmacêuticas (GARCIA CARDOZO *et al.*, 2017). Portanto, o trabalho

aqui proposto aumenta o número de aplicações possíveis com o sistema BIA usando BDD como eletrodo de trabalho.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi demonstrado pela primeira vez a possibilidade de detecção de MID por oxidação empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Além disso, a possibilidade de detecção de MID em uma triagem rápida de amostras de bebidas foi demonstrada utilizando o sistema BIA.

O processo de oxidação do MID também foi avaliado, mostrando que a reação envolvia número igual de elétrons e prótons (1 elétron e 1 próton). Foram comparadas as características analíticas (sensibilidade, linearidade, LD e LQ), empregando o pico de oxidação e redução do MID. Além disso, uma comparação entre a seletividade de cada pico foi avaliada, usando diferentes benzodiazepínicos (CLO, FLU e DIA). O pico de oxidação mostrou-se mais seletivo, pois nenhum dos benzodiazepínicos testados apresentou sinal analítico, nas condições do método empregadas (DPV, eletrodo de BDD e tampão BR 0,12 mol L⁻¹, pH = 2,0).

O método proposto tem inúmeras características desejáveis, como rapidez, apresentar baixo custo operacional, gerar uma pequena quantidade de resíduo aquoso e requer etapas simples de preparação da amostra (somente diluição). O método apresentou ainda sensibilidade, seletividade e estabilidade adequada para quantificação de MID em bebidas avaliadas (vodka, whisky e vinho tinto), com a utilização de um eletrodo de trabalho (BDD) sem nenhuma modificação química, o que torna os métodos mais atraentes para aplicações em análises de rotina.

Devido às características portáteis do sistema BIA, o método proposto tem potencialidade para ser usado em laboratórios com infraestrutura limitada e para realização de análises “*in locu*”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIKKOL, M.; MERCAN, S.; KARADAYI, S. Simultaneous Determination of Benzodiazepines and Ketamine from Alcoholic and Nonalcoholic Beverages by GC-MS in Drug Facilitated Crimes. **Chromatographia**, 70, 7–8, 1295–1298, 2009. <<http://doi.org/10.1365/s10337-009-1278-6>>
- ADAMOWICZ, P.; KAŁA, M. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry. **Forensic Science International**, 198, 1–3, 39–45, 2010. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.02.012>>
- ALENCAR, L. M.; SANTOS, R. B.; GUEDES, T.; J. G. SANTOS, W. T. P.; BATISTA, J. G. S.; FERREIRA, V. S.; SILVA, R. A. B. Fast and Selective Simultaneous Determination of Acetaminophen, Aspirin and Caffeine in Pharmaceutical Products by Batch Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. **Electroanalysis**, 30, 2, 296–303, 2018. <<http://doi.org/10.1002/elan.201700721>>
- ANDERSON, L. J.; FLYNN, A.; PILGRIM, J. L. A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: A systematic review. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, 47, 46–54, 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.02.005>>
- BARBEIRA, P. J. S.; STRADIOTTO, N. R. Anodic stripping voltammetric determination of Zn, Pb and Cu traces in whisky samples. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, 361, 5, 507–509, 1998. <<http://doi.org/10.1007/s002160050935>>
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**: 2 ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1980 <<http://doi.org/B978-0-12-381373-2.00056-9>>.
- BARRETO, A S. Determinação de cetamina e norcetamina em cabelo, como modelos de drogas básicas para a investigação toxicológica sobre o golpe “boa noite cinderela”. *151ª* Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro, Universidade Federal Fluminense, UFF, 2016.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**: [s.ed.]. Coimbra: Almedina, 1996.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection Analysis. **Analytical Chemistry**, 66, 19, 3145–3150, 1994. <<http://doi.org/10.1021/ac00091a024>>
- BRUCE, P. Y. Química Orgânica 1: [s. ed.]. São Paulo: Person Prentice Hall, 2006.
- CARDOSO, R. M.; MENDONÇA, D. M. H.; SILVA, W. P.; SILVA, M. N. T.; NOSSOL, E.; DA SILVA, R. A. B.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, 1033, 49-57, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.021>>
- CHEMICALIZE. Disponível em: <<https://chemicalize.com/>> - Acesso em 20/08/2018.

DADOS. Disponível em <<https://g1.globo.com/sao-paulo/noticia/golpe-boa-noite-cinderela-em-sp-maior-parte-das-vitimas-e-homem-e-objetivo-do-crime-e-roubo.ghtml>> - Acesso em: 10/01/2019.

D'ALOISE, P.; CHEN, H. Rapid determination of flunitrazepam in alcoholic beverages by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. **Science & Justice**, 52, 1, 2–8, 2012. <<http://doi.org/10.1016/j.scijus.2011.08.007>>

DE ARAUJO, W. R.; CARDOSO, T. M. G.; DA ROCHA, R. G.; SANTANA, M. H. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; PAIXÃO, T. R. L. C.; COLTRO, W. K. T. Portable analytical platforms for forensic chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, 1034, 1–21, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.014>>

DE BARROS, R. D. C. M.; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. D. S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, 28, 2, 317–325, 2005. <<http://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200024>>

DE CARVALHO, L. M.; CORREIA, D.; GARCIA, S. C.; DE BAIRROS, A. V.; NASCIMENTO, P. C. DO; BOHRER, D. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. **Forensic Science International**, 202, 1–3, 75–81, 2010. <<http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.04.030>>

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, 26, 1, 81–89, 2003. <<http://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>>

DESAI, S.; VIDYASAGAR, G.; DESAI, D. Validation and application of a modified RP-HPLC method for the quantification of midazolam in pharmaceutical dosage forms. **The International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, 2, 411-416, 2011.

DIAS, A. A.; CARDOSO, T. M. G.; CHAGAS, C. L. S.; OLIVEIRA, V. X. G.; MUNOZ, R. A. A.; HENRY, C. S.; SANTANA, M. H. P.; PAIXÃO, T. R. L. C.; COLTRO, W. K. T. Detection of Analgesics and Sedation Drugs in Whiskey Using Electrochemical Paper-based Analytical Devices. **Electroanalysis**, 30, 10, 2250–2257, 2018. <<http://doi.org/10.1002/elan.201800308>>

DOMÉNECH-CARBÓ, A.; MARTINI, M.; DE CARVALHO, L. M.; VIANA, C.; DOMÉNECH-CARBÓ, M. T.; SILVA, M. Standard additions-dilution method for absolute quantification in voltammetry of microparticles. Application for determining psychoactive 1,4-benzodiazepine and antidepressants drugs as adulterants in phytotherapeutic formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 80, 159–163, 2013a. <<http://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.005>>

DOMÉNECH-CARBÓ, A.; MARTINI, M.; DE CARVALHO, L. M.; VIANA, C.; DOMÉNECH-CARBÓ, M. T.; SILVA, M. Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. **Journal of Pharmaceutical and**

Biomedical Analysis, 74, 194–204, 2013b. <<http://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.10.031>>.

DOS SANTOS, M. M. C.; FAMILA, V.; GONÇALVES, M. L. S. Square-wave voltammetric techniques for determination of psychoactive 1,4-benzodiazepine drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 374, 6, 1074–1081, 2002. <<http://doi.org/10.1007/s00216-002-1535-0>>

ESPINOSA-BOSCH, M.; RUIZ-SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-ROJAS, F.; BOSCH-OJEDA, C. Analytical Methodologies for the Determination of Midazolam in Pharmaceuticals. **Chromatographia**, 78, 9–10, 609–619, 2015. <<http://doi.org/10.1007/s10337-015-2885-z>>

FERNANDES, J. C. B.; GARCIA, C. A. B.; GRANDIN, L. A.; OLIVEIRA NETO, G. DE; GODINHO, O. E. S. Determination of acetylsalicylic acid in tablets with salicylate ion selective electrode in a Batch Injection Analysis system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 9, 3, 249–251, 1998. <<http://doi.org/10.1590/S0103-50531998000300008>>

FREITAS, J. M.; RAMOS, D. L. O.; SOUSA, R. M. F.; PAIXÃO, T. R. L. C.; SANTANA, M. H. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 243, 557–565, 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.024>>

FREITAS, J. M.; OLIVEIRA, T. C.; SANTANA, M. H. P.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. 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**, 282, 449–456, 2019. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.094>>

FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y.; RAO, T. N.; TRYK, D. A. **Diamond electrochemistry**: 1 ed. [s.l.]: Elsevier, 2005.

GANJALI, M. R.; LARIJANI, B.; NOROUZI, P. Determination of midazolam by potentiometric PVC membrane and MWCNTS based carbon paste sensors. **International Journal of Electrochemical Science**, 7, 5, 4822–4833, 2012.

GARCIA CARDOZO, C.; MELO CARDOSO, R.; MATHEUS GUIMARÃES SELVA, T.; EVARISTO DE CARVALHO, A.; TORRES PIO DOS SANTOS, W.; REGIS LONGO CESAR PAIXÃO, T.; AMORIM BEZERRA DA SILVA, R. Batch Injection Analysis-Multiple Pulse Amperometric Fingerprint: A Simple Approach for Fast On-site Screening of Drugs. **Electroanalysis**, 29, 12, 2847–2854, dez. 2017. <<http://doi.org/10.1002/elan.201700520>>

GERECKE, M. Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 16, S1, 11S–16S, 1983. <<http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1983.tb02266.x>>

GHORBANI, N.; HOSSEINZADEH, S.; PASHAEI, S.; HOSSEINZADEH, A.; HAMIDI, H. A. The effect of produce conditions for preparation of potentiometric carbon paste sensor for determination of midazolam in pharmaceutical. **International Journal of Electrochemical**

Science, 9, 7, 3772–3783, 2014.

GIMENES, D. T.; PEREIRA, P. F.; CUNHA, R. R.; BEZERRADA SILVA, R. A.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection. *Electroanalysis*, 24, 9, 1805–1810, 2012. <<http://doi.org/10.1002/elan.201200254>>

GOETING, C. H.; MARKEN, F.; GUTIÉRREZ-SOSA, A.; COMPTON, R. G.; FOORD, J. S. Electrochemically induced surface modifications of boron-doped diamond electrodes: an X-ray photoelectron spectroscopy study. *Diamond and Related Materials*, 9, 3–6, 390–396, 2000. [http://doi.org/10.1016/S0925-9635\(99\)00267-8](http://doi.org/10.1016/S0925-9635(99)00267-8)

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26, 3, 227–238, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>

GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry**: simulation and analysis of reaction mechanisms: [s.ed.] Nova Iorque: VCH, 1993. <<http://doi.org/10.1080/00945719408001398>>

GRANGER, M. C.; WITEK, M.; XU, J.; WANG, J.; HUPERT, M.; HANKS, A.; KOPPANG, M. D.; BUTLER, J. E.; LUCAZEAU, G.; MERMOUX, M. Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. *Analytical Chemistry*, 72, 16, 3793–3804, 2000. <<http://doi.org/10.1021/ac0000675>>

HONEYCHURCH, K. C.; CREW, A.; NORTHALL, H.; RADBOURNE, S.; DAVIES, O.; NEWMAN, S.; HART, J. P. The redox behaviour of diazepam (Valium®) using a disposable screen-printed sensor and its determination in drinks using a novel adsorptive stripping voltammetric assay. *Talanta*, 116, 300–307, 2013. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.017>>

HUYNH, M. H. V.; MEYER, T. J. Proton-coupled electron transfer. *Chemical Reviews*, 107, 11, 5004–5064, 2007. <<http://doi.org/10.1021/cr200177j>>

INMETRO. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. DOQ-CGRE-008, 5 Revisão, 2016.

JAIN, R.; YADAV, R. K. Voltammetric behavior of sedative drug midazolam at glassy carbon electrode in solubilized systems. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2, 2, 123–129, 2012. <<http://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.11.008>>

JIMÉNEZ-PÉREZ, R.; SEVILLA, J. M.; PINEDA, T.; BLÁZQUEZ, M.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, J. Electrocatalytic performance enhanced of the electrooxidation of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and ethanol on platinum nanoparticles surface. A contribution to the analytical determination of GHB in the presence of ethanol. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 256, 553–563, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.142>>

KASAHARA, S.; NATSUI, K.; WATANABE, T.; YOKOTA, Y.; KIM, Y.; IIZUKA, S.; TATEYAMA, Y.; EINAGA, Y. Surface hydrogenation of boron-doped diamond electrodes by cathodic reduction. *Analytical chemistry*, 89, 21, 11341–11347, 2017.

<<http://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02129>>

KIR, S.; ONAR, A. N.; TEMIZER, A. Adsorptive stripping voltammetric determination of midazolam as a method for quality control. **Analytica Chimica Acta**, 229, 145–147, 1990. <[http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)85120-X](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)85120-X)>

KONDO, T.; HONDA, K.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. AC impedance studies of anodically treated polycrystalline and homoepitaxial boron-doped diamond electrodes. **Electrochimica Acta**, 48, 19, 739–2748, 2003. <[http://doi.org/10.1016/S0013-4686\(03\)00391-8](http://doi.org/10.1016/S0013-4686(03)00391-8)>

KRAFT, A. Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, 2, 5, 355–385, 2007.

KROPF, J.; HUGHES, J. M. L. Effects of midazolam on cardiovascular responses and isoflurane requirement during elective ovariohysterectomy in dogs. **Irish Veterinary Journal**, 71, 1, 26, 2018. <<http://doi.org/10.1186/s13620-018-0136-y>>

KUPIETZKY, A. HOUPPT, M. I. Midazolam: a review of its use for conscious sedation of children. **Pediatric Dentistry**, 15, 4, 237–238, 1993.

LAUSECKER, B.; HOPFGARTNER, G.; HESSE, M. Capillary electrophoresis–mass spectrometry coupling versus micro-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry coupling: a case study. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 718, 1, 1–13, 1998. <[http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00358-2](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00358-2)>

LEHTONEN, P. J.; KELLER, L. A.; ALI-MATTILA, E. T. Multi-method analysis of matured distilled alcoholic beverages for brand identification. **Z Lebwensm Unters Forsch A**, 208, 5–6, 413–417, 1999. <<http://doi.org/10.1007/s002170050439>>

LIMA, A. B.; DE OLIVEIRA, F. M.; GUEDES, T. DE J.; SOUSA, R. M. F.; MUNOZ, R. A. A.; DOS SANTOS, W. T. P. Altered electrochemistry of oxcarbazepine on cathodically treated boron-doped diamond electrode: Selective detection by pulsed amperometric detection coupled to flow-injection analysis. **Electrochimica Acta**, 260, 564–570, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.12.089>>

LLEDO-FERNANDEZ, C.; POLLARD, P.; ROMEROSA, A. The date rape drug-flunitrazepam-electroanalytical sensing using electrogenerated chemiluminescence. **International Journal of Electrochemical Science**, 9, 1, 227–237, 2014. <<http://doi.org/10.13189/ujc.2013.010307>>

LOURENCAO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; THOMASI, S. S.; FERREIRA, A. G.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Amperometric flow-injection determination of the anthelmintic drugs ivermectin and levamisole using electrochemically pretreated boron-doped diamond electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 222, 181–189, 2016. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.036>>

LOURENÇO, A. S.; NASCIMENTO, R. F.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, W. F.; ARAUJO, M. C. U.; OLIVEIRA, S. C. B.; NASCIMENTO, V. B. Voltammetric determination of tartaric acid in wines by electrocatalytic oxidation on a cobalt(II)-phthalocyanine-modified electrode

associated with multiway calibration. **Analytica Chimica Acta**, 1008, 29–37, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.005>>

LOVRIĆ, M.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; BOND, A. M. Theory of square-wave stripping voltammetry and chronoamperometry of immobilized reactants. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 319, 1–2, 1–18, 1991. <[http://doi.org/10.1016/0022-0728\(91\)87064-B](http://doi.org/10.1016/0022-0728(91)87064-B)>

MARÇON, F.; GUITTET, C.; MANSO, M. A.; BURTON, I.; GRANIER, L. A.; JACQMIN, P.; DUPONT, H. Population pharmacokinetic evaluation of ADV6209, an innovative oral solution of midazolam containing cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, n. June 2017, p. 46–54, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.030>>

MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. Conductive diamond electrodes for water purification. **Materials Research**, 10, 4, 419–424, 2007. <<http://doi.org/10.1590/S1516-14392007000400016>>

MARTINS, I.; CANAES, L. S.; DORETTO, K. M.; RATH, S. Boron-doped diamond electrode coupled to liquid chromatography: Application to simultaneous determination of benzodiazepines. **Electroanalysis**, v. 22, n. 4, p. 455–462, 2010. <<http://doi.org/10.1002/elan.200900346>>

MIGLIORINI, F. L. Produção e caracterização de eletrodos de diamante dopado com boro crescidos sobre titânio, aplicados da degradação de corantes textil. *123f*. Dissertação de Mestrado, São José dos Campos, Instituto Nacional em Pesquisa Espacial, **INPE**, 2011.

MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques (technical report). **Pure and Applied Chemistry**, 69, 2, 297–328, 1997. <<http://doi.org/10.1351/pac199769020297>>

MORAES, F. C.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; BRETT, C. M. A. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. **Talanta**, 79, 5, 1406–1411, 2009. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.013>>

NARAYANA, B.; DIVYA, K.; NAYAK, P. S. Selective and validated spectrophotometric methods for the determination of midazolam using N -Bromosuccinimide. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 5, 4, 268–274, 2013.

NEWAIR, E. F.; KILMARTIN, P. A.; GARCIA, F. Square wave voltammetric analysis of polyphenol content and antioxidant capacity of red wines using glassy carbon and disposable carbon nanotubes modified screen-printed electrodes. **European Food Research and Technology**, 244, 7, 1225–1237, 2018. <<http://doi.org/10.1007/s00217-018-3038-z>>

NOTSU, H.; YAGI, I.; TATSUMA, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Introduction of Oxygen-Containing Functional Groups onto Diamond Electrode Surfaces by Oxygen Plasma and Anodic Polarization. **Electrochemical and Solid-State Letters**, 2, 10, 522–524, 1999. <<http://doi.org/10.1149/1.1390890>>

O'DEA, J. J.; RIBES, A.; OSTERYOUNG, J. G. Square-wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 345, 1–2, 287–301, 1993. <[http://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)80485-Z](http://doi.org/10.1016/0022-0728(93)80485-Z)>

OLEDZKA, I.; KULIŃSKA, Z.; PRAHL, A.; BACZEK, T. Simultaneous Separation of Eight Benzodiazepines in Human Urine Using Field-Amplified Sample Stacking Micellar Electrokinetic Chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, 39, 6, 436–443, 2015. <<http://doi.org/10.1093/jat/bkv042>>

OLEDZKA, I.; BACZEK, A.; PANKA, J.; BACZEK, T. Development and Validation of the MEKC Method for a Stability-indicating Assay of Midazolam in Pediatric Syrup. **Current Pharmaceutical Analysis**, 9, 4, 347–354, 2013. <<http://doi.org/10.2174/1573412911309040004>>

OLIVEIRA, T. C.; FREITAS, J. M.; ABARZA MUNOZ, R. A.; RICHTER, E. M. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, 152, 308–313, 2016. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.031>>

OLIVEIRA, T. C.; SANTANA, M. H. P.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Electrochemical Portable Method for On-Site Screening of Scopolamine in Beverage and Urine Samples. **Electroanalysis**, 31, 567–574, 2018. <<http://doi.org/10.1002/elan.201800707>>

ORIVE, M. M.; GALLO, B.; ALONSO, R. M.; VICENTE, F.; VIRÉ, J. C.; PATRIARCHE, G. J.; KUPIETZKY, A.; M., G. Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. **Mikrochimica Acta**, 16, 3–4, 11S–16S, 1993. <<http://doi.org/10.1007/BF01242464>>

OSTERYOUNG, J. G.; OSTERYOUNG, R. A. Square Wave Voltammetry. **Analytical chemistry**, 57, 1, 101A–110A, 1985. <<http://doi.org/10.1021/ac00279a789>>

PANAHI, Y.; MOTAHARIAN, A.; HOSSEINI, M. R. M.; MEHRPOUR, O. High sensitive and selective nano-molecularly imprinted polymer based electrochemical sensor for midazolam drug detection in pharmaceutical formulation and human urine samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 273, 6, 1579–1586, 2018. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.069>>

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. **Electroanalysis**, 8, 7, 673–675, 1996. <<http://doi.org/10.1002/elan.1140080713>>

PELSKOV, Y. V.; SAKHAROVA, A. Y.; KROTOVA, M. D.; BOUILOV, L. L.; SPITSYN, B. V. Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond. **Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry**, 228, 1–2, 19–27, 1987. <[http://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80093-1](http://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80093-1)>

PEREIRA, P. F.; MARRA, M. C.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v.

90, p. 99–102, fev. 2012. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.004>>

PFENDT, L. B.; POPOVIĆ, G. V.; SUPANČIĆ, S. I. Spectrophotometric determination of midazolam in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, n. 12, p. 1551–1553, 1995. <[http://doi.org/10.1016/0731-7085\(95\)01570-1](http://doi.org/10.1016/0731-7085(95)01570-1)>

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of diamond: A review. **Russian Journal of Electrochemistry**, 38, 12, 1275–1291, 2002. <<http://doi.org/10.1023/A:1021651920042>>

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, 16, 7, 513–523, 2004. <<http://doi.org/10.1002/elan.200302878>>

RAMESHKUMAR, S.; PADMAPRIYA, M.; VIJAYAN, M.; KUMARAVEL, M. Development of an Electrochemical Biosensor Based on Interaction of Midazolam with Polymer Supported **Chemical Science Review and Letters**. 5, 19, 318–325, 2016.

RAMSING, A. U.; RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. The principles and theory of high-speed titrations by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, 129, 1–17, 1981. <[http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)84115-5](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84115-5)>

REED, M. D.; RODARTE, A.; BLUMER, J. L.; KHOO, K. C.; AKBARI, B.; POU, S.; PHARMID; KEARNS, G. L. The single-dose pharmacokinetics of midazolam and its primary metabolite in pediatric patients after oral and intravenous administration. **Journal of clinical pharmacology**, 41, 12, 1359–1369, 2001. <<http://doi.org/10.1177/00912700122012832>>

RIBES, A. J.; OSTERYOUNG, J. Determination of 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine by adsorptive stripping with pulse voltammetry. **Analytical Chemistry**, 62, 23, 2632–2636, 1990. <<http://doi.org/10.1021/ac00222a021>>

RICHTER, E. M. E. M.; TORMIN, T. F. T. F.; CUNHA, R. R. R. R.; SILVA, W. P. W. P.; PÉREZ-JUNQUERA, A.; FANJUL-BOLADO, P.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; MUÑOZ, R. A. A. R. A. A Compact Batch Injection Analysis Cell for Screen Printed Electrodes: A Portable Electrochemical System for On-site Analysis. **Electroanalysis**, 28, 8, 1856–1859, 2016. <<http://doi.org/10.1002/elan.201600008>>

SALAZAR-BANDA, G. R.; DE CARVALHO, A. E.; ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. **Journal of Applied Electrochemistry**, 40, 10, 1817–1827, 2010. <<http://doi.org/10.1007/s10800-010-0139-1>>

SELVA, T. M. G.; DE ARAUJO, W. R.; BACIL, R. P.; PAIXÃO, T. R. L. C. Study of Electrochemical Oxidation and Quantification of the Pesticide Pirimicarb Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electrochimica Acta**, 246, 588–596, 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.06.051>>

SHBAIR, M. K. S.; LHERMITTE, M. Drug-facilitated crimes: Definitions, prevalence, difficulties and recommendations. A review. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, 68, 3, 136–147, 2010 <<http://doi.org/10.1016/j.pharma.2010.03.005>>

SILVA, W. P. Determinação simultânea de propifenazona , paracetamol e cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro. *95 f*, Dissertação de Mestrado, Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, 2017.

SILVA, W. P.; SILVA, L. A. J.; FRANÇA, C. H.; SOUSA, R. M. F.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Square-wave Voltammetric Determination of Propyphenazone, Paracetamol, and Caffeine: Comparative Study between Batch Injection Analysis and Conventional Electrochemical Systems. **Electroanalysis**, 29, 8, 1860–1866, 2017. <<http://doi.org/10.1002/elan.201700160>>

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**: 8 ed. [s.l.]: Editora Thomson, 2006.

SMYTH, W. F.; IVASKA, A. A study of the electrochemical oxidation of some 1,4-benzodiazepines. **The Analyst**, 110, 11, 1377, 1985. <<http://doi.org/10.1039/an9851001377>>

SPEAR, K. E.; DISMUKES, J. P. **Synthetic diamond**: [s.l.]: John Wiley & Sons, 1994.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, 49, 22–23, 4021–4026, 2004. <<http://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.01.082>>

TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; SARADA, B. V; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes. **Analytical chemistry**, 75, 7, 1564–1572, 2003. <http://doi.org/10.1021/ac020583q>

THAVARUNGKUL, P.; SUPPAPITNARM, P.; KANATHARANA, P.; MATTIASSON, B. Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 14, 1, 19–25, 1999. <[http://doi.org/10.1016/S0956-5663\(98\)00105-5](http://doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00105-5)>

TORMIN, T. F.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, 85, 3, 1274–1278, 2011. <<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.008>>

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Combination of screen-printed electrodes and batch injection analysis: A simple, robust, high-throughput, and portable electrochemical system. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 202, 93–98, 2014. <<http://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.096>>

VIRE, J. C.; PATRIARCHE, G. J.; HERMOSA, B. G. Polarographic behaviour and hydrolysis of midazolam and its metabolites. **Analytica Chimica Acta**, 196, , 205–212, 1987. <[http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83085-8](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83085-8)>

WALSER, A.; BENJAMIN, L. E.; FLYNN, T.; MASON, C.; SCHWARTZ, R.; FRYER, R. I. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. 84. Synthesis and reactions of imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepines. **The Journal of Organic Chemistry**, 43, 5, 936–944, 1978. <<http://doi.org/10.1021/jo00399a029>>

WANG, JOSEPH; TAHA, Z. **Batch Injection Analysis**. In: Analytical Chemistry. [s.l.] American Chemical Society, 1991.

WANG, H. L.; O'MALLEY, R. M.; FERNANDEZ, J. E. Electrochemical and chemical polymerization of imidazole and some of its derivatives. **Macromolecules**, 27, 4, 893–901, 1994. <<http://doi.org/10.1021/ma00082a003>>

WANG, J. **Analytical electrochemistry**: 2 ed. [s.l.]: John Wiley & Sons, 2006.

WANG, J.; ANGNES, L. Batch Injection Spectroscopy. **Analytical Letters**, 26, 11, 2329–2339, 1993. <<http://doi.org/10.1080/00032719308017473>>

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis with thermistor sensing devices. **Analytical letters**, 24, 8, 1389–1400, 1991. <<http://doi.org/10.1080/00032719108052979>>

YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 473, 1–2, 173–178, 1999. <[http://doi.org/10.1016/S0022-0728\(99\)00027-3](http://doi.org/10.1016/S0022-0728(99)00027-3)>.